

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

DISSERTATION

Vergleich von grünem und schwarzem Tee auf
NO-Produktion und Endothelfunktion

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janka Urban

aus Rüdersdorf

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. V. Stangl
2. Prof. Dr. med. H. Lochs
3. Prof. Dr. R. Galensa

Datum der Promotion: 18.09.2009

Für Claus

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Tee und kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.2	Die Inhaltsstoffe von grünem und schwarzem Tee	2
1.3	Atherosklerose	7
1.4	Stickstoffmonoxid (NO)	8
1.4.1	Wirkung von NO im Organismus	9
1.4.2	NO-Synthasen (NOS)	10
1.4.3	Mechanismus der Muskelrelaxation in den Blutgefäßen durch NO	12
2	ZIEL DER ARBEIT	14
3	MATERIALIEN UND METHODEN	16
3.1	Übersicht der verwendeten Materialien und Chemikalien	16
3.2	Zellkultur	20
3.2.1	Subkultivierung von Zellen	20
3.2.2	Kryokonservierung von Zellen	21
3.3	Bestimmung der Konzentration der Teeinhaltsstoffe	22
3.4	Experimentelle Arbeiten	23
3.4.1	Zellbehandlung und Zellyse	23
3.4.2	Proteinmessung in vorstimulierten Zellen	23
3.4.3	Western Blot	24
3.4.4	Messung der eNOS-Aktivität in lebenden Zellen	25
3.4.5	Vasodilatation in isolierten Rattenaortenringen	26
3.5	Statistische Auswertung	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Wirkung von grünem und schwarzem Assam-Tee auf endotheliale Parameter	28
4.1.1	Untersuchung der Inhaltsstoffe	28
4.1.2	Vergleich von grünem und schwarzem Assam-Tee auf die eNOS-Aktivierung	29
4.1.3	Vergleich von grünem und schwarzem Assam-Tee auf die NO-abhängige Vasodilatation	30

4.2	Wirkung der individuellen Catechine auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation	31
4.3	Wirkung der individuellen Theaflavine auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation	34
4.4	Wirkung weiterer Teebestandteile auf die eNOS-Aktivierung	39
4.5	Wirkung von Polyphenolgemischen aus grünem und schwarzem Assam-Tee	42
4.5.1	Herstellung der Polyphenolgemische	42
4.5.2	Vergleich der Polyphenolgemische auf die eNOS-Aktivierung	43
4.5.3	Vergleich der Polyphenolgemische auf die NO-abhängige Vasodilatation	44
4.6	Wirkung von Thearubiginen auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation	45
5	DISKUSSION	48
5.1	Wirkung von Tee auf kardiovaskuläre Erkrankungen	48
5.1.1	Grüner Tee	48
5.1.2	Schwarzer Tee	49
5.2	Wirkung einzelner Teeinhaltsstoffe auf das kardiovaskuläre System	54
5.2.1	Catechine	54
5.2.2	Theaflavine	56
5.2.3	Thearubigine	58
5.2.4	Weitere Teebestandteile	58
5.2.5	Polyphenolgemische	61
5.3	Fazit der Diskussion	63
6	ZUSAMMENFASSUNG	64
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	66
8	LITERATURVERZEICHNIS	69
	DANKSAGUNG	VI
	ERKLÄRUNG	VII
	LEBENS LAUF	VIII
	PUBLIKATIONS LISTE	IX

1 EINLEITUNG

1.1 Tee und kardiovaskuläre Erkrankungen

Tee ist nach Wasser das meist konsumierte Getränk in der Welt. In Deutschland lag der Pro-Kopf-Konsum 2006 bei 25 l, weltweit wurden 3,5 Mio. Tonnen Tee produziert [1]. Zahlreiche epidemiologische Studien berichten über eine inverse Beziehung zwischen Teekonsum und kardiovaskulären Ereignissen [2]. Teetrinken ist zudem assoziiert mit einer reduzierten kardiovaskulären Mortalität [3, 4, 5] und mit einer geringeren Progression von Atherosklerose [6].

Es existieren unterschiedliche Teesorten auf der Welt, deren Konsum in verschiedenen geographischen Gebieten variiert. Auffallend ist, dass die Gebiete, in denen viel Tee getrunken wird, eine geringere Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen. Viele Studien aus Ostasien demonstrieren einen schützenden Effekt von Tee [7]. In diesen Ländern wird hauptsächlich grüner Tee konsumiert. Eine umfangreiche prospektive Kohorten-Studie über sieben Jahre aus Japan zeigte, dass das Trinken von grünem Tee verbunden war mit einer niedrigeren kardiovaskulären und Gesamtmortalität [8]. Ähnliche epidemiologische Studien zur Untersuchung von schwarzem Tee lieferten allerdings widersprüchliche Ergebnisse. Auf der einen Seite zeigten Duffy et al. in ihrer randomisierten Cross-Over-Studie, dass der Konsum von schwarzem Tee die endotheliale Dysfunktion bei Patienten mit dokumentierter koronarer Herzkrankheit (KHK) vermindert bzw. rückgängig machen kann. Die Forscher konnten beobachten, dass sich die Relaxation der Arterie sowohl durch kurzfristigen als auch langfristigen Konsum von schwarzem Tee im Vergleich zum Wasserkonsum verbesserte [9]. Eine andere Forschungsgruppe stellte fest, dass schwarzer Tee das kardiovaskuläre Risiko reduziert und die vasodilatierende Funktion von Gefäßen verbessert [10]. In der Studie von Jochmann et al. konnte das erste Mal in vivo und in vitro gezeigt werden, dass grüner und schwarzer Tee den gleichen Effekt auf die Verbesserung der Endothelfunktion haben [11]. Dazu wurde bei 21 gesunden postmenopausalen Frauen vor und zwei Stunden nach dem Konsum von Wasser, schwarzem oder grünem Tee die Dilatation an der A. brachialis per Ultraschall gemessen. Außerdem wurden beide Teesorten auf die eNOS-Aktivierung und die Vasorelaxation in Rattenaortenringen untersucht. Dabei hatten grüner und schwarzer Tee vergleichbare Effekte hinsichtlich NO-Produktion und

Vasodilatation. Andererseits werden in der Literatur dem schwarzen Tee auch keine bis negative Effekte auf das kardiovaskuläre System zugeschrieben [12, 13]. Trotzdem deuten experimentelle und interventionale Daten auf einen protektiven kardiovaskulären Effekt auch von schwarzem Tee hin.

1.2 Die Inhaltsstoffe von grünem und schwarzem Tee

Grüner und schwarzer Tee entstehen aus derselben Pflanze, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (= *Thea sinensis*), die bereits vor 2000 Jahren im alten China und Südostasien kultiviert wurde. [14, 15]. Der Teestrauch gedeiht in Gebieten von 45° nördlicher Breite bis 30° südlicher Breite und wird daher in verschiedenen Ländern angebaut und für die Teeproduktion genutzt. Heutiger Hauptproduzent ist die indische Provinz Assam, gefolgt von China, Sri Lanka und einigen weiteren Ländern [16].

Der Unterschied zwischen den beiden Sorten liegt in der Herstellung. Je nach Verarbeitung der frischen Blätter und Blattknospen erhält man grünen (unfermentierten), schwarzen (fermentierten) oder Olong- (halbfermentierten) Tee [17]. Der grüne Tee ist ein unfermentiertes Erzeugnis. Ihm fehlt das typische Teearoma und er dient vorwiegend dem Eigenverbrauch Japans, Brasiliens, Chinas und einiger Kaukasusländer. Er gewinnt jedoch auch in den westlichen Industrieländern zunehmend an Beliebtheit [16]. Seine Blätter werden zunächst erhitzt, um oxidierende Enzyme, die Polyphenoloxidasen, zu inaktivieren. Das Erhitzen erfolgt bei chinesischen Grüntees durch Anwendung trockener Hitze, wie z. B. durch Anrösten in heißen Pfannen, und bei japanischen Grüntees durch eine Wasserdampfbehandlung [18]. Danach werden die Blätter gerollt, um anschließend in der Sonne zu trocknen. Nach dieser Prozedur behalten die Blätter ihre grüne Farbe und geben dem Tee seinen Namen. Schwarzer Tee dagegen entsteht durch eine andere Verarbeitung. Die Blätter werden zunächst gewelkt. Durch die Lufttrocknung senkt sich der Wassergehalt dabei auf ca. 60%. Danach erfolgt das Rollen der Blätter, was die Zellwände zerstört [16]. Nun kommt es zu einem oxidativ-enzymatischen Prozess, der sogenannten Fermentation. Dieser Prozess wird durch blatteigene Enzyme hervorgerufen, die die Inhaltsstoffe verändern, und kann 45 – 90 min dauern. Temperaturen zwischen 20°C und 30°C, viel Feuchtigkeit und die Aussetzung an Luft sind optimale Bedingungen für den Prozess [15]. Während der Fermenta-

tion erhält der schwarze Tee sein charakteristisches Aroma und eine kupferne Farbe, die durch anschließendes Trocknen in Schwarz übergeht. Wichtige Aromastoffe werden durch die Oxidation von ungesättigten Fettsäuren und Carotinoiden gebildet. Olong-Tee ist ein Zwischenprodukt von grünem und schwarzem Tee. Hier wird vor Ende der Fermentation der Prozess durch Dampfbehandlung abgebrochen [16].

Die bekannteste Zubereitung von Tee ist der Aufguss eines Teebeutels mit heißem Wasser in einem Verhältnis von 1 g Teeblätter auf 100 ml Wasser. Im Teegetränk befinden sich dann ungefähr 0,35% feste Bestandteile und die Tasse Tee enthält somit ungefähr 2500 – 3500 ppm Feststoffe [14]. Einen Großteil der Teeinhaltsstoffe nehmen bei beiden Teesorten die Polyphenole ein. Die Gesamtgehalte an Polyphenolen sind in grünen und schwarzen Tees in einer vergleichbaren Größenordnung [16, 19]. Es handelt sich dabei um eine Gruppe chemischer Substanzen, die im Pflanzenreich weit verbreitet und außerdem in der Nahrung zu finden sind [20]. Polyphenole werden beschrieben als organisch aromatische Verbindungen mit meist mehr als zwei Phenol- oder Phenoethergruppen [21]. Sie zeigen in vitro zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften, wie antioxidative, antikanzerogene, antimikrobielle, blutzuckerregulierende, entzündungs- und gerinnungshemmende und immunstimulierende Effekte [16]. Unter der großen Anzahl der verschiedenen Polyphenolgruppen wird den Catechinen einen großen Teil der protektiven Gesundheitseffekte zugeschrieben, dazu gehören u. a. antioxidative Eigenschaften [15]. Catechine gehören zu den Flavonoiden mit den sechs Untergruppen Flavone, Flavanone, Isoflavone, Flavonole, Flavanole und Anthocyanine. Die Catechine werden der Untergruppe Flavanole zugeordnet und haben im grünen Tee von allen Inhaltsstoffen den größten Anteil [15, 22]. Der Anteil der Catechine an den Gesamtpolyphenolen liegt beim grünen Tee deutlich über 50%, während er dagegen beim schwarzen Tee meist zwischen 20% und 40% beträgt [18]. Bei den Catechinen handelt es sich um eine vom Flavonring abgeleitete Stoffklasse mit mehreren phenolischen Hydroxylgruppen [16]. Sie sind farblos, astringierend, wasserlöslich und im Pflanzenreich weit verbreitet. Es existieren zwei Konfigurationen, wobei die Epiform im Tee überwiegt [15]. Epicatechine unterscheiden sich von den Catechinen dadurch, dass ihre Hydroxylgruppen am C₃ und der Benzenkern an C₂ in cis-Stellung stehen, bei den Catechinen in trans-Stellung [16]. In der Abbildung 1 sind die Strukturformeln der Epicatechine dargestellt. Es wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen demonstriert,

dass die Catechine Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechin-3-gallate (ECG) und das potenteste von ihnen, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), günstige kardiovaskuläre Effekte ausüben [23, 24]. Während der Fermentation werden diese Catechine zu polymerischen Komplexen umgewandelt, die Theaflavine und Thearubigine genannt werden [17, 25]. Diese beiden Teebestandteile tragen einen großen Teil zur Farbe und zum Geschmack des schwarzen Tees bei [15]. Die Theaflavine bestehen aus Theaflavin (TF1), Theaflavin-3-monogallate (TF2A), Theaflavin-3'-monogallate (TF2B) und Theaflavin-3,3'-digallate (TF3); sie sind in Abbildung 1 dargestellt. Die Thearubigine sind eine heterogene Gruppe von Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten [17]. Je intensiver der Fermentationsprozess, desto geringer der Catechingehalt im schwarzen Tee. Bisher sind zahlreiche Studien zu Catechinen veröffentlicht. Forschungsergebnisse über kardiovaskuläre Effekte von Theaflavinen und Thearubiginen fehlen dagegen weitgehend.

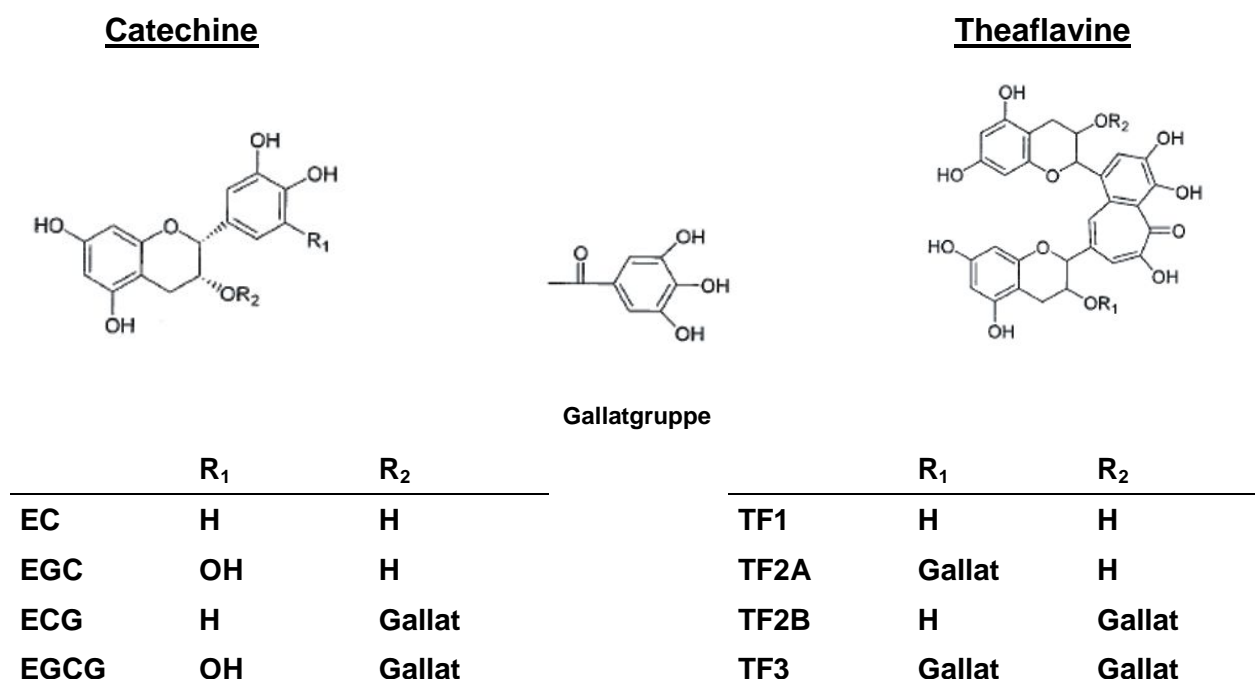


Abb. 1: Strukturformeln der Catechine und Theaflavine aus grünem und schwarzem Tee [nach 26]

Im Tee existieren viele verschiedene Verbindungen. Eine Übersicht darüber gibt die Tabelle 1 wieder. Die Polyphenole nehmen dabei eine wichtige Funktion für die gesundheitsfördernden Effekte des Tees ein und unterscheiden sich im einzelnen in ihrer Konzentration wesentlich im grünen und schwarzen Tee.

	Frische Blätter	Grüner-Tee-Aufguss	Schwarzer-Tee-Aufguss
Coffein	4	3 – 6	3 – 6
Catechine	30	30 – 42	3 – 10
Theaflavine	0	0	2 – 6
Flavonole	2	2	1
andere Polyphenole		6	23
Theanin/Aminosäuren	4	je 3	je 3
Peptide/Proteine	15	6	6
Zucker/andere Kohlenhydrate	7	7/4	7/4
Kalium	5	5	5
andere Mineralstoffe		5 – 8	5 – 8

Tab. 1: Zusammensetzung von Tee; Angaben in % der Trockenmasse [21]

Grüner und schwarzer Tee enthalten eine vergleichbare Konzentration an Coffein, ein Methylxanthin, wenn die Zubereitung mit der gleichen Menge an Blättern durchgeführt wird. Jedoch ist die Coffeinkonzentration im Tee abhängig von Ziehzeit, Temperatur, Blattgröße und Teemenge [14, 27]. Generell ist der Coffeingehalt bei Teebeuteln höher als beim Aufguss von Teeblättern [27]. Weitere Methylxanthine, die im Tee bisher in kleinen Mengen bestimmt werden konnten, sind Theophyllin und Theobromin [14].

Bei den Mineralstoffen sind Kalium, Calcium und Magnesium vorherrschend. Auch hier gibt es in der Konzentration keinen Unterschied zwischen grünem und schwarzem Tee. Tee ist zudem besonders reichhaltig an Fluor [14, 15]. Darüber hinaus unterscheiden sich grüner und schwarzer Tee in ihrem Gehalt an Vitamin C. Dieses Vitamin wurde im grünen Tee in höheren Konzentrationen gemessen [27]. Ansonsten ist Tee kein vitaminreiches Getränk [18].

Theanin ist eine von 19 Aminosäuren, die im Tee bestimmt werden konnte. Diese Aminosäure ist ein N-methyliertes Derivat von Glutamin und hauptsächlich im Tee zu finden. Der Abbau der Aminosäuren ist bei der Bildung des Aromas von Tee involviert [14, 15]. Wichtige Vorstufen des Aromas von Tee sind außerdem die Carotinoide [15].

Eines der wichtigsten Enzyme im Tee ist die Polyphenoloxidase, ein Metalloprotein, die während der Fermentation v. a. die Catechine oxidiert und so zu neuen Polyphenolen (Theaflavine, Thearubigine) umwandelt [14]. Das Enzym benötigt Kupfer als Cofaktor [15]. Es besteht die Vermutung, dass die Polyphenoloxidase Peroxide bildet, die wiederum ein weiteres Enzym aktivieren, die Peroxidase. Diese katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid zu dem korrespondierenden Alkohol [14]. Weitere Enzyme, die im Tee von Interesse sind, sind Glukosidasen, Lipooxidasen und Enzyme, die für die Synthese der Methylxanthine verantwortlich sind [15].

Tee besteht außerdem aus flüchtigen Bestandteilen, wie z. B. Alkoholen, Estern und Säuren. Mehr als 60 dieser flüchtigen Bestandteile wurden in frischen Teeblättern gefunden. Während der Teeherstellung steigt diese „Fraktion“ stark an und es entsteht eine Vielfalt an neuen Verbindungen [15].

Flavonolglykoside, z. B. Rutin, sind eine weitere Gruppe, die im Tee eine Rolle spielen. Sie bestehen aus einem Flavonoid, das an ein Kohlenhydrat gebunden ist. Ihnen werden nach einer Reihe von Untersuchungen schützende Effekte gegenüber Herzinfarkt und Schlaganfall nachgesagt [18]. Des Weiteren finden sich im Tee neben der Gallussäure und seinem Ester Theogallin auch Phenolsäuren [14].

Die Chemie von Tee ist sehr komplex. Bisher konnten noch nicht alle Inhaltsstoffe aus grünem und schwarzem Tee identifiziert werden. Eine große Rolle bei der Bestimmung von Konzentrationen einzelner Inhaltsstoffe spielen u. a. Teesorte, Aufguss- und Ziehzeit.

1.3 Atherosklerose

Zu den größten gesundheitlichen Problemen in den Industrienationen gehören kardiovaskuläre Erkrankungen, d. h. Erkrankungen des Herzens und des Kreislaufs. Dazu zählt u. a. Atherosklerose, die wichtigste und häufigste krankhafte Veränderung der Arterien mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung. Auf dem Boden einer Atherosklerose bildet sich fast immer eine KHK. Diese Krankheit ist in den Industrieländern die häufigste Todesursache [28].

Bei der KHK sind die Koronararterien durch v. a. fetthaltige Ablagerungen teilweise verengt oder blockiert. Die endotheliale Dysfunktion stellt dabei den ersten Schritt auf dem Weg zum arteriosklerotischen Plaque dar. Ursache der endothelialen Dysfunktion ist häufig eine verminderte Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) bzw. eine reduzierte Bioaktivität von NO [29]. In der Pathophysiologie der Atherosklerose begünstigt die endotheliale Dysfunktion unter Mitwirkung von Adhäsions-Glykoproteinen die Anhaftung von Monozyten bzw. Makrophagen und T-Lymphozyten, die in die Intima einwandern [30]. Durch Akkumulation von Lipiden werden die Makrophagen zu Schaumzellen umgewandelt und bilden zusammen mit den T-Zellen und glatten Muskelzellen in der Intima die atherosklerotischen Frühläsionen (*fatty streaks*) [31]. In der Folge wandern weitere Zellen ein und es kommt zur Proliferation und zu Veränderungen an den glatten Muskelzellen. Sie verlieren ihre kontraktile Eigenschaften und beginnen, Kollagen und andere Matrixglykoproteine zu synthetisieren. Durch diesen Gewebeumbau bildet sich in der Folge an der Oberfläche der Läsion eine fibröse Kappe [32]. Die geschädigte Oberfläche der Gefäßinnenwand führt zu einer Anlagerung von Thrombozyten und deren Aktivierung mit Freisetzung von Thromboxan, Kollagen und Thrombin. Unter Mitwirkung einer Vielzahl weiterer freigesetzter Wachstumsfaktoren entsteht eine komplexe Spätläsion (fibröser Plaque), die das Lumen stenosiert [31]. Diese Plaques können morphologisch in stabile und instabile Plaques eingeteilt werden. Stabile Plaques bestehen aus einem kleinen Lipidkern und werden von einer dicken fibromuskulären Kappe mit vielen glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix bedeckt. Instabile Plaques dagegen bestehen aus einem riesigen Lipidkern und einer schmalen Kappe mit vielen Entzündungszellen. Durch das Einreißen der Intima, dem daraus resultierendem Aufbrechen

dieser Plaques und Einblutung mit Thrombosierung kann ein partieller oder kompletter Koronarverschluss entstehen [28].

Bei der Atherosklerose spielt u. a. die Ernährung eine wichtige Rolle. Ein erhöhtes Atheroskleroserisiko ist bedingt durch erhöhte *low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterinwerte. Die LDL-Partikel lagern sich in die Gefäßwände ein, werden durch Oxidationsvorgänge verändert und von Makrophagen aufgenommen. Die Folge ist eine Einengung der Gefäße. Antioxidantien, die im Tee vorhanden sind, können die Oxidation der LDL-Partikel verhindern und schützen somit vor kardiovaskulären Erkrankungen. Die inverse Beziehung zwischen dem Teekonsum und der Entstehung von Karotisplaques konnte in einer Studie an älteren Frauen nachgewiesen werden [33].

1.4 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein kurzlebiges, lipophiles, gasförmiges Radikal mit der Wirkung eines lokal wirksamen Mediators. Dies bedeutet, NO ist eine Signalsubstanz, die nicht aus speziellen hormonbildenden Zellen stammt, sondern von vielen Zelltypen gebildet wird [34]. Es ist zudem das bisher einzige bekannte körpereigene Radikal, das die Rolle eines Botenstoffs besitzt [35].

NO ist eine sehr labile Verbindung. Die Halbwertszeit beträgt nur wenige Sekunden und hat dadurch seine Entdeckung 1980 durch Furchgott und Zawadzki erschwert. Ohne Wissen über die chemische Natur von NO wurde die Substanz als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) beschrieben [36]. Es wurde gezeigt, dass Acetylcholin am intakten Gefäß zu einer Vasodilatation führte, nach Entfernung des Endothels dagegen zu einer Vasokonstriktion [37]. Erst Jahre später wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander erforscht, dass EDRF eigentlich NO ist [38, 39].

1.4.1 Wirkung von NO im Organismus

Im Organismus erfüllt NO verschiedene physiologische Funktionen. Es existieren drei Funktionsbereiche von NO, mit denen sich die Forschung beschäftigt: das Nervensystem, das Immunsystem und das kardiovaskuläre System [40]. In dieser Arbeit interessiert besonders die Rolle von NO im kardiovaskulären System. NO wirkt vasoprotektiv und erfüllt mit dieser Eigenschaft viele Aufgaben, die der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten entgegenwirken.

Die bekannteste Wirkung von NO ist die Vasodilatation. Die Forschungsgruppe von Stamler et al. konnte nachweisen, dass eine pharmakologische Hemmung der endogenen NO-Synthese beim Menschen zu einer Steigerung des Blutdrucks führte [41]. Bei einem Versuch mit Mäusen führte eine Blockierung des Gens für die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in den Tieren zu einer leichten Hypertonie [42].

NO wirkt weiterhin antiaggregatorisch. Die Anlagerung der Blutplättchen an die Gefäßwand bei Läsionen spielt eine wichtige Rolle, jedoch kann diese Funktion durch vaskuläre Erkrankungen gestört sein, so dass es zu einem erhöhten Risiko von Herzinfarkten und Thrombosen kommt. NO und NO-Donatoren dagegen führen über verschiedene Wege zu einer Hemmung der Plättchenaggregation. Gemeinsames Ziel ist die Senkung der freien intrazellulären Calciumkonzentration, was letztendlich die Anlagerung der Blutplättchen an die Gefäßwand hemmt [35]. Auch die Blutplättchen geben nach ihrer Stimulierung NO ab. Diese ortsgebundene Abgabe von NO spielt eine Rolle für die Hemmung einer Thrombusentstehung [32].

Kennzeichen für geschädigtes Endothel ist die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Gefäßzellen. Diese führt zu einer Anlagerung von Leukozyten [43], die Teil der Pathogenese für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie z. B. die Atherosklerose, ist. Für die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen ist sehr wahrscheinlich erhöhter vaskulärer oxidativer Stress ein Stimulus [35]. Auch hier wirkt NO positiv, indem es in die Regulierung der Expression der Gene für die Adhäsionsmoleküle P-Selectin, E-Selectin, *vascular adhesion molecule-1* (VECAM-1) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) eingreift. Außerdem beugt

es zusätzlich der Expression des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) vor [32, 35, 43, 44, 45].

Eine weitere Schlüsselfunktion in der Pathogenese von Atherosklerose spielt die Proliferation glatter Muskelzellen [35]. Auch hier wirkt NO vasoprotektiv, indem es diese Proliferation über einen cGMP-abhängigen Mechanismus hemmt [32]. Dieser Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von NO ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird vermutet, dass eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch NO die Proliferation der glatten Muskelzellen durch Hemmung der Proteinkinase Raf-1 reduziert [35].

1.4.2 NO-Synthasen (NOS)

NO wird mit Hilfe von NOS gebildet, die im gesamten Körper zu finden sind. Sie sind in der Lage aus L-Arginin, unter Freisetzung von Citrullin, das farblose Gas NO zu bilden. Alle NOS benötigen Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und molekularen Sauerstoff (O_2) als Co-Substrate [46]. Sie stellen ein Homodimer dar. Jedes Monomer (130 – 160 kDa) besitzt an seinem N-terminalen Ende eine Oxygenase-Domäne mit einer Bindungsstelle für Häm, Tetrahydrobiopterin (BH_4) und L-Arginin. Sie ist durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsdomäne mit dem C-terminalen Ende, einer Reduktase-Domäne, verbunden. Diese beinhaltet Bindungsstellen für Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und NADPH. Zusammen bilden alle Komponenten einen katalytisch aktiven Komplex [47, 48].

Es existieren drei verschiedene Isoformen der NOS, die genetisch festgelegt sind [47]: die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS-1), welche in Nervenzellen und Skelettmuskelzellen exprimiert wird, die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS-3), welche in Endothelzellen, Epithelzellen, Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen nachgewiesen werden konnte und in dieser Arbeit einen Schwerpunkt einnimmt und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS-2). Diese wird bei entzündlichen Reaktionen beispielsweise mit Hilfe von Zytokinen in verschiedenen Zelltypen exprimiert, z. B. in Makrophagen, Hepatozyten oder Astrozyten [49]. Die Aktivität der iNOS ist Calcium-unabhängig.

eNOS und nNOS sind konstitutive Formen. Sie werden durch den intrazellulären Calciumspiegel reguliert [47]. Intrazelluläres Calcium steuert die Bindung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes an das Enzym und bewirkt so eine Konformationsänderung des Enzyms. Daraufhin wird die NOS in seine aktive Form überführt [46, 50].

Bestandteil dieser Arbeit ist die eNOS. Sie ist in den Caveolen der Zellmembran lokalisiert und im inaktiven Zustand membrangebunden. Das Caveolin ist das Hauptprotein in den Caveolen. Die Verbindung von Caveolin-1 und eNOS hemmt die Aktivität des Enzyms. Diese Interaktion wird wiederum durch Ca^{2+} /Calmodulin reguliert, d. h., sie kann dadurch aufgehoben werden [47].

Es existieren verschiedene Regulationsmechanismen, die zu einer Aktivierung der eNOS führen. Das Enzym kann auf der einen Seite langfristig durch Transkription, auf der andern Seite kurzfristig durch einen Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels und durch Phosphorylierung aktiviert werden. Ein wichtiger Freisetzungsmechanismus von NO durch die eNOS wird über die mechanische Stimulation des Endothels durch vorbeifließendes Blut vermittelt (Scherkräfte; *shear stress*). Eine Phosphorylierung der eNOS aufgrund dieser Scherkräfte wird durch die Proteinkinase Akt induziert und ist Calcium-unabhängig [47]. Auch der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), Östrogene, Sphingosin-1-Phosphat, Acetylcholin und Bradykinin stimulieren die eNOS. Dies geschieht über den Anstieg von intrazellulärem Calcium und der Aktivierung des Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes [51]. Weiterhin spielen Proteine wie das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) für die eNOS-Aktivierung eine Rolle. VEGF, Histamin oder Scherkräfte stimulieren dabei die Interaktion zwischen Hsp90 und eNOS und erhöhen so die eNOS-Aktivität [47].

An der bovinen eNOS sind bislang verschiedene Phosphorylierungsstellen bekannt, durch die das Enzym aktiviert werden kann. Diese Stellen haben folgende Bezeichnungen: Serin¹¹⁶ (Ser¹¹⁶), Ser⁶¹⁷, Ser⁶³⁵, Ser¹¹⁷⁹ und Threonin⁴⁹⁷ [52]. Die Ser¹¹⁷⁹ ist die bisher am besten untersuchte Phosphorylierungsstelle. Es ist bereits bekannt, dass das Catechin EGCG aus grünem und schwarzem Tee die eNOS in Endothelzellen aktiviert. Dies geschieht offensichtlich kurzfristig über einen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), PKA und Akt-abhängigen Signalweg, der zu einer Phosphorylierung der eNOS an

Ser¹¹⁷⁹ führt [24]. Auch schwarzer Tee erhöht die eNOS-Aktivität. Die Arbeitsgruppe von Anter et al. konnte eine Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ durch Polyphenole aus schwarzem Tee nachweisen [53]. Auf welchem Signalweg das Enzym genau aktiviert und welche Regulationsmechanismen dabei eine Rolle spielen, ist weitgehend noch ungeklärt.

1.4.3 Mechanismus der Muskelrelaxation in den Blutgefäßen durch NO

Blutgefäße sind aus konzentrischen Schichten (Tunica intima, Tunica media und Tunica adventitia) aufgebaut, die aufgrund der verschiedenen Arterientypen variieren können [54].

Die Kontraktion der glatten Muskelzellen wird durch Ca^{2+} ausgelöst. Man unterscheidet zwei verschiedene Kopplungsfunktionen des Ca^{2+} . Das ist zum einen die elektromechanische (die Aktivierung spannungsgesteuerter L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle) und zum anderen die pharmakomechanische (Wirkung über Inositoltrisphosphat (IP_3)) Kopplungsfunktion des Ca^{2+} . Ca^{2+} bildet mit Calmodulin einen Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex. Dieser aktiviert Proteinkinasen, die weitere Proteine am Aktinfilament phosphorylieren. Das führt zu einer Deblockade von Aktin, und Myosin kann sich anlagern. Der Kontraktionsvorgang beginnt [36].

Der genaue Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation ist bisher nicht vollständig aufgeklärt [35]. Unter physiologischen Bedingungen ist der wesentliche Stimulus für die endothelvermittelte Vasodilatation die Scherkraft. Das Endothel wirkt als Mechanotransduktor, der die durch den Blutstrom auf das Endothel einwirkenden Scherkräfte in chemische Stimuli, wie die Bildung von NO, umwandelt. Des Weiteren existieren rezeptorvermittelte Stimuli, wie beispielsweise Katecholamine. Sie binden an den Rezeptor der Endothelzelle und aktivieren eine Signalkaskade. Diese Bindung führt zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern [36, 55]. Durch das Ca^{2+} wird die eNOS aktiviert, die in der Folge aus Arginin NO freisetzt. NO diffundiert in die darunter liegende Gefäßmuskelzelle und aktiviert eine lösliche Guanylatcyclase, welche wiederum eine Proteinkinase vom G-Typ I (PKG I) aktiviert [34]. Diese PKG I kann verschiedene Membranproteine des sarkoplasmatischen Retikulums phosphorylieren. Die Phosphory-

lierung hebt die hemmende Funktion der ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) auf. Dies führt zu einer schnelleren Aufnahme von intrazellulären Ca^{2+} in die Speicher des sarkoplasmatischen Retikulums und reduziert die Aufnahme von extrazellulären Ca^{2+} ins Retikulum. So sinkt die freie Ca^{2+} in der Zelle, eine Vasodilatation ist die Folge [35].

Es sind bislang drei Mechanismen der Vasodilatation durch NO bekannt. Welcher Mechanismus welchen Anteil an der Vasodilatation hat, ist noch nicht erforscht [35]. Es ist jedoch bekannt, dass dies das therapeutische Prinzip aller NO-freisetzenden Vasodilatoren, wie Nitroprussid oder dem zur Behandlung der akuten KHK eingesetzten Nitroglycerin, ist [36].

Um herauszufinden, ob die Vasodilatation tatsächlich auf NO zurückzuführen ist, können spezielle NOS-Inhibitoren eingesetzt werden. Es existieren verschiedene NOS-Inhibitoren, die sich in ihrer Struktur, ihrer Selektivität und ihrem Angriffspunkt an den NOS unterscheiden. Die am häufigsten eingesetzten Inhibitoren sind die L-Argininanaloga N^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), N^G -Nitro-L-Arginin (L-NNA), N^G -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) und Aminoguanidin. Sie verdrängen L-Arginin kompetitiv von seiner Bindungsstelle an der NOS und hemmen auf diesem Weg die L-Citrullinbildung [47, 56]. In dieser Arbeit wurde mit L-NAME gearbeitet.

2 ZIEL DER ARBEIT

Weltweit wird hauptsächlich schwarzer Tee konsumiert; die Produktion dieser Teesorte liegt ungefähr bei 75% [15]. Daher stellt sich die wichtige Frage, ob schwarzer Tee hinsichtlich seiner kardiovaskulären Effekte genauso protektiv wie grüner Tee ist. Studien zum grünen Tee ergaben überwiegend ein positives Ergebnis. Diese kardiovaskulären Effekte werden hauptsächlich durch die Catechine herbeigeführt.

Studien zum schwarzen Tee ergaben keine einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich seiner Wirkung auf das kardiovaskuläre System. Ihm werden sowohl protektive als auch keine oder sogar negative Effekte auf das kardiovaskuläre System zugeschrieben. Die Bestandteile des schwarzen Tees und v. a. dessen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System sind bisher kaum untersucht. Es liegt die Vermutung nahe, dass stark fermentierter schwarzer Tee die gleichen positiven Effekte auf die Gesundheit haben könnte wie grüner Tee, da beide Teesorten aus derselben Pflanze hergestellt werden und sie vergleichbare Mengen an Polyphenolen besitzen [16, 19]. Um einen direkten Vergleich herzustellen, wurden in dieser Arbeit sowohl grüner als auch schwarzer Tee und deren Wirkung auf das kardiovaskuläre System untersucht.

Es gibt Hinweise, dass beim grünen Tee die protektiven Effekte hauptsächlich auf die in diesem Tee in großen Mengen vorhandenen Catechine zurückzuführen sind. Beim Fermentationsprozess entstehen aus den Catechinen höhermolekulare Verbindungen. Daher ist zu prüfen, ob diese Substanzen im schwarzen Tee zu vergleichbaren Wirkungen wie die Catechine im grünen Tee führen.

Um diesen Ansatz genau untersuchen zu können, wird in dieser Arbeit stark fermentierter schwarzer Assam-Tee mit dem analogen grünen Assam-Tee hinsichtlich NO-Produktion und NO-vermittelnder Vasodilatation verglichen. Bei der Fermentation wird der Großteil der Catechine oxidiert; sie sind dann im schwarzen Tee nur noch in geringen Mengen vorhanden. Dafür entstehen neue Substanzen, u. a. Theaflavine und Thearubigine, deren Wirkungen noch nicht detailliert untersucht worden sind. Teesorten, die nur eine teilweise Fermentation aufweisen, sind daher für diese Untersuchungen nicht geeignet.

Eine verminderte Produktion und Bioverfügbarkeit von NO sowie eine beeinträchtigte Endothelfunktion ist ein Kennzeichen vieler kardiovaskulärer Erkrankungen [30], u. a. der Atherosklerose, der KHK oder des Schlaganfalls. Es gibt bis jetzt nur wenige Untersuchungen darüber, welche Bestandteile des Tees für die protektiven Wirkungen auf das kardiovaskuläre System verantwortlich sind. Um Teebestandteile zu identifizieren, die in die schützende Funktion des grünen und schwarzen Tees involviert sind, wurden die physiologischen Eigenschaften der einzelnen Teesubstanzen hinsichtlich NO-Produktion und endothelabhängiger Vasodilatation untersucht. Dazu mussten zunächst die Inhaltsstoffe aus grünem und schwarzem Assam-Tee quantifiziert werden, um die Konzentrationen der individuellen Substanzen in beiden Teesorten zu ermitteln. Anschließend folgten die experimentellen Arbeiten mit den beiden Tees und den einzelnen Inhaltsstoffen. Dazu wurden bovine Aortenendothelzellen (BAEC) mit verschiedenen Konzentrationen der Einzelsubstanzen stimuliert und anschließend die eNOS-Aktivität gemessen. Darüber hinaus wurde der Grad einer Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁹ untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, wie stark die jeweilige Substanz bei den verwendeten Konzentrationen die eNOS phosphoryliert und damit aktiviert. Um beurteilen zu können, wie die beiden Tees sowie individuelle Teesubstanzen direkt auf das Endothel wirken, wurden sie kumulativ zu mit Phenylephrin vorkontrahierten Rattenaortenringe gegeben. Anschließend wurde die NO-abhängige Vasodilatation gemessen.

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlussfolgert werden, welche Auswirkungen grüner und schwarzer Assam-Tee auf NO-Produktion und endothelabhängiger Vasodilatation im direkten Vergleich besitzen sowie welche Inhaltsstoffe bei den jeweiligen Tees für die Effekte verantwortlich sind.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Übersicht der verwendeten Materialien und Chemikalien

Arbeitsgeräte:

Blotkammer	Owl
Brutschrank	Haereus Instruments
Elektrophoresekammer	Carl Roth GmbH & Co
ELISA-Reader	Anthos ht III
Feinpositionierelement (Vernier Control Typ 850 N)	Hugo Sachs Elektronik
Hybridisierungsöfen	Biometra
Kontraktionskraftaufnehmer (FMI TIM 1020)	Föhr Medical Instruments GmbH
Mikroskop	Leica
Mikrozentrifuge	Eppendorf
Sterilbank (LaminAir® HBB 2448)	Integra Bioscience
Szintillationscounter	Wallac 1409
Wasserbad	Julabo

Materialien:

Glasbehälter für Organbäder (doppelwandig)	Medizinisch-Glastechnische Werkstätte P. Heinrich
Kryobehälter	Nalgene
Kryoröhrchen (steril)	Nunc
PVDF-Membran	Millipore
Säulen	BioRad
Whatman-Filterpapier	Merck
Zellen (BAEC)	Clonetics
Zellkulturflaschen (T75)	Nunc
Zellkulturschalen (6 cm)	Falcon
96-well-Platte	Nunc

Substanzen:

a) Tee

Grüner Tee (Assam)*	King´s Teegarden, Berlin
Schwarzer Tee (Assam)*	King´s Teegarden, Berlin

* in H₂O gelöst

b) Teebestandteile

Catechine (EGCG, EGC, ECG, EC)*	Sigma
Caffein*	Fluka
Propyl Gallat*	Sigma
Theaflavine (TF1, TF2A, TF2B, TF3)*	Mitsui Norin Food Research Laboratories (Japan)
Thearubigine*	Mitsui Norin Food Research Laboratories (Japan)
Theogallin*	Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
Theobromin*	Sigma

* in H₂O gelöst

c) organische und anorganische Substanzen

Dowex®	Serva Elektrophoresis
L-Arginin*	Fluka
L-NAME*	Sigma
Phenylephrin*	Sigma

* in H₂O gelöst

Chemikalien und Lösungen 1:

Aqua dest.	Braun
BCIP	Sigma
Ethanol absolute (96%)	J.T. Baker
(³ H)-Arginin	Amersham Pharmacia Biotech
NBT	Sigma
PBS	Gibco
Prestained Protein Marker, Broad Range	BioLabs
Trypsin-EDTA (In HBSS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Gibco

Chemikalien und Lösungen 2:

BCA Protein Assay Reagent Kit	BCA Reagenz A und B Albumin Standart Ampullen	Pierce
Blockierungslösung	Rotiblock 10 x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co
Einfriermedium	10% DMSO 20% FCS 70% BAEC-Medium	Merck Biochrome Cambrex
Enhanced Chemiluminescence Lösung		Amersham

Krebs-Henseleit-Lösung (modifiziert)	144 mM NaCl 5,9 mM KCl 1,6 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄ 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ⁻ 25 mM NaHCO ₃ ⁻ 11,1 mM D-Glukose 1 µM Diclophenac	Merck Merck Merck Merck Merck Merck Sigma
Medium	EBM, 500 ml	Cambrex
Mediumzusätze	EGM-MV: 25 ml Fetales Rinderserum (5%) 2 ml Rinderhirnextrakt (0,4%) 0,5 ml Gentamycin/Amphotericin-B 0,5 ml Epidermaler Wachstumsfaktor/hEGF (0,1%) 0,5 ml Hydrokortison (0,1%)	Cambrex
Szintillationscocktail	Serva Elektrophoresis	Carl Roth GmbH & Co
20 x TBS	1 M Tris 3 M NaCl	Carl Roth GmbH & Co Merck

Puffer:

AP-Puffer (pH 9,5)	1 M Tris-Cl 5 M NaCl 1 M MgCl ₂	Carl Roth GmbH & Co Merck Merck
Blotpuffer	20% Methanol 10 x SDS-Laufpuffer	Merck
Extraktionspuffer (pH 5,5)	20 mM Hepes-Na	Sigma
Hepes-Puffer (pH 7,4)	145 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 10 mM Hepes-Na 10 mM Glukose frisch zufügen: 1,5 mM CaCl ₂	Merck Merck Merck Sigma Merck Merck
Hypotonischer Puffer	10 mM Tris 10 mM KCl 2 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 1 mM EDTA frisch zufügen: 1 mM DTT 1 mM Na-molybdate 0,3 mM Na ₃ VO ₄	Merck Merck Merck Sigma Fluka Sigma Sigma Sigma
Lysepuffer 2a	100 mM NaCl 20 mM Hepes, pH 7,9 10 mM EDTA 4 mM Na-pyro-phosphate 1% Triton	Merck Sigma Fluka Sigma Merck

	frisch zufügen: 100 nM Okadaic acid 10 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 mM Pefablock 1 x Complete	Sigma Fluka Sigma Roche Roche
10 x SDS-Laufpuffer (pH 8,8)	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,01% SDS	Carl Roth GmbH & Co Merck Serva
5 x SDS-Probenpuffer (pH 6,8)	60 mM Tris 25% Glycerol 5% β-Mercaptoethanol 2% SDS 0,1% Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co Invitrogen Sigma Serva Biomol
Stopp-Puffer	D-PBS 5 mM L-Arginin 4 mM EDTA	Gibco Fluka Fluka
Waschpuffer	0,02% Tween 20 20 x TBS	Aldrich

Gel:

	Trenngel (8%, pH 8,8)	Sammelgel (pH 6,8)	
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,56 ml	-----	Carl Roth GmbH & Co
1,5 M Tris (pH 6,8)	-----	625 µl	Carl Roth GmbH & Co
40% Acrylamid	1,28 ml	625 µl	Carl Roth GmbH & Co
10% SDS	62,5 µl	50 µl	Serva Feinbiochemica
10% APS	50 µl	50 µl	Serva Feinbiochemica
TEMED	5 µl	5 µl	Serva Feinbiochemika
ddH ₂ O	3,28 ml	3,65 ml	

Antikörper:

Erstantikörper	Anti-phospho-eNOS (Ser ¹¹⁷⁹) Anti-eNOS Antikörper	Cell Signaling BD Transduction Laboratories
Zweitantikörper	Secondary anti-mouse Anti-rabbit	Santa Cruz Biotechno- logy Santa Cruz Biotechno- logy

3.2 Zellkultur

Für alle Versuche wurden BAEC der Passage P8 – P12 genutzt. Diese Primärzellkultur wurde bei der Firma Clonetics käuflich erworben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ Begasung in einem speziellen wachstumsfördernden Medium (EGM-MV). Um Kontaminationen durch die Umgebung zu vermeiden, wurden alle Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.2.1 Subkultivierung von Zellen

Die benötigten Zellen wurden flüssigem Stickstoff entnommen und zum Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad vorsichtig geschwenkt. Kurz bevor die Zellen komplett aufgetaut waren, wurden sie auf eine vorher mit 20 ml warmen Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Die Flasche wurde mit Zellentyp, Datum und Passage der Zellen beschriftet und dann in den Brutschrank gelegt. Nach 3 – 4 Stunden erfolgte unter dem Mikroskop die Kontrolle, ob sich die Zellen angehoften und mit dem Wachsen begonnen haben. Bis dahin sollten circa 80% der Zellen adhärent sein. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel. Je nach Konfluenz konnten die Zellen nach einigen Tagen auf weitere Zellkulturflaschen passagiert werden und standen für die Versuche zur Verfügung.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Dies stellte sicher, dass ihnen wiederholt die Substanzen zugeführt worden sind, die sie kontinuierlich verbrauchten oder bei 37°C im Laufe der Zeit verfielen. Das Medium wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt, dann die Zellen aus dem Brutschrank genommen. Anschließend wurde das alte Medium von den Kulturgefäßen abgesaugt und die Schalen mit 3 ml und die Flaschen mit 15 – 20 ml frischen Medium versehen. Abschließend wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt.

Um wiederholt Versuche durchführen zu können, mussten die Zellen auf neue Kulturgefäße aufgeteilt werden. Medium, Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) und Trypsin-Ethylendiaminetetraacetic-acid (EDTA) wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Trypsin-EDTA benötigt diese Temperatur, um optimal wirken zu können. Das Medium wurde vom Zellrasen abgesaugt und die Zellen gründlich mit 5 ml PBS gewaschen, da

schon geringe Mengen von Medium und dessen Zusätze die Wirkung des Trypsin-EDTA beeinträchtigen könnten. Nach dem Absaugen des PBS wurde dann 1 ml des Trypsin-EDTAs auf die Zellen gegeben und die Flaschen für 1 – 2 min in den Brutschrank gelegt. Um sicherzustellen, dass sich die Zellen von der Oberfläche gelöst haben, wurde dies unter dem Mikroskop kontrolliert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 10 ml Medium hinzugegeben, die Zellen von der Oberfläche abgespült und im Verhältnis 1 : 4 in neue Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen, die für Versuche benötigt wurden, wurden auf 6-cm-Schalen passagiert und konnten in den kommenden Tagen genutzt werden.

3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

BAEC, die sich in der Wachstumsphase befinden, können in einem speziellen Medium durch langsames, kontinuierliches Abkühlen auf -80°C eingefroren und somit längerfristig in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Um die Zellen einzufrieren, wurde ein der Passagierung analoges Verfahren genutzt. Die benötigten Materialien wurden im Wasserbad erwärmt, danach die konfluenten Zellen gründlich mit PBS gewaschen und trypsiniert. Nach 1 – 2-minütiger Inkubation wurde die Ablösung der Zellen von dem Flaschengrund durch einen Blick in das Mikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und dann in eine entsprechende Anzahl von sterilen Einfrierröhrchen aufgeteilt. Diese Röhrchen wurden in einer Einfrierbox für etwa 24 Stunden kontinuierlich auf -80°C abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3 Bestimmung der Konzentration der Teeinhaltsstoffe

Für alle Experimente wurde Assam-Tee verwendet. Es wurden 5 g Tee abgewogen und in 500 ml Wasser gekocht. Danach musste der Tee 3 min ziehen. Anschließend wurde er durch einen Teefilter gegossen. Nachdem er abgekühlt war, wurde er in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationen der Inhaltsstoffe im schwarzen und grünen Assam-Tee, wurden per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Institut für Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Leitung von Prof. Engelhardt gemessen.

Vor der Durchführung der HPLC-Messung wurden die Teeproben zunächst mit 10% Acetonitril, welches 500 µg/ml EDTA und Ascorbinsäure enthielt, verdünnt. Danach konnten sie per HPLC analysiert werden. Dazu wurde ein Agilent 1100 (Agilent Technology, San Diego) benutzt. Dieses System besteht aus einer Binärpumpe, einer thermostatisierbaren Trennsäule, einem Säulenofen, einem Fotodiodenarray-Detektor und einem Agilent Datensystem, das die Software ChemStation enthält. Die Säulen wurden konstant bei einer Temperatur von 35°C gehalten. Die binären Steigerungsbedingungen waren: 100% mobile Phase A (9% Acetonitril, 2% Essigsäure und 20 µg/ml EDTA) für 10 min, dann ein linearer Anstieg für 15 min mit 68% der mobilen Phase A und 32% der mobilen Phase B (80% Acetonitril, 2% Essigsäure und 20 µg/ml EDTA), der es erlaubt war, sich für 10 min mit 100% der mobilen Phase A auszubalancieren. Die Flussrate betrug 1,0 ml/min; der Detektor wurde bei 278 nm eingestellt. Die Signale wurden mittels eines UV-Spektrums bei Verwendung eines Diodenarray-Detektors und durch Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzpräparaten verifiziert. Die Quantifizierung wurde auf Basis des relativen Responsefaktoren (RRF)-Konzepts ISO 14505 : 2 durchgeführt. Die Ermittlung der Theaflavinkonzentration erfolgte auf dem gleichen Weg, jedoch mit folgenden Ausnahmen: ein isokratischer Eluent mit 80% der mobilen Phase A und 20% der mobilen Phase B. Die Temperatur der Säule betrug 25°C und die Kalibrierung erfolgte unter Verwendung von vier authentischen Theaflavin Standarden (3-Punkt-Kalibrierung).

3.4 Experimentelle Arbeiten

3.4.1 Zellbehandlung und Zellyse

Die Behandlung der Zellen erfolgte in 6-cm-Schalen. Zuerst wurde die Konfluenz der Zellen geprüft, dann das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 1,5 ml warmen HEPES-Puffer gewaschen. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen in 2 ml HEPES-Puffer pro Schale bei 37°C. In der Zwischenzeit wurde der Reaktionsansatz für jede Schale angefertigt (515 µl HEPES-Puffer, 15 µl L-Arginin, Tee/Teebestandteile). Im nächsten Schritt wurde den Schalen 1 ml des HEPES-Puffers entnommen, der entsprechende Reaktionsansatz bestehend aus HEPES-Puffer, L-Arginin und Tee oder Teebestandteilen hinzu- und die Zellen für 15 min zur Inkubation bei 37°C gegeben. Für die Lyse wurde der Reaktionsansatz von den Zellen abgesaugt und diese anschließend einmal mit 1,5 ml kaltem PBS und hypotonischen Puffer gewaschen. Alle Reste der beiden Waschungen mussten gründlich abgesaugt werden, damit die Lyse optimal funktioniert. Die Schalen wurden sofort auf Eis gestellt und auf jede von ihnen 80 µl Lysepuffer 2a gegeben, das 10 min einwirkte. Der Puffer enthält Phosphataseinhibitoren, was eine eventuelle Phosphorylierung der eNOS erhält. Das Lysat wurde zur weiteren Verarbeitung in einer Mikrozentrifuge für 10 min bei 10.000 U zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Ein kleiner Teil davon wurde vorher für die Proteinmessung abgenommen.

3.4.2 Proteinmessung in vorstimulierten Zellen

Die Proteinmessung wurde mit einem *BCA Protein Assay Reagent Kit* der Firma Pierce durchgeführt. Dieser Kit basiert auf einer kolorimetrischen Bestimmung und Quantifizierung der Gesamtproteinmenge. Es kommt zu einer Komplexbildung der Proteine mit Cu^{2+} (Reagenz B) in einer alkalischen Lösung. Infolge des alkalischen Milieus, das vorrangig durch Reagenz A hervorgerufen wird, wird Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert (Biuret Reaktion). Daraufhin kommt es zu einer Chelatbildung von zwei Molekülen BCA mit einem Kupfer-Kation, was einen violetten Farbkomplex zur Folge hat. Dieser wasserlösliche Farbkomplex zeigt eine starke Absorption bei 562 nm, welche sich in Bereichen von 20 µg/ml bis 2200 µg/ml Proteinkonzentration linear verhält.

Die zu vermessenden Proteinproben wurden für die Messung aus dem Eisschrank (-80°C) genommen und langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurde das Extrakt 1 : 10 mit Aqua dest verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden jeweils 10 µl als Doppelwert in die 96-well-Platte pipettiert und die Proben mit jeweils 200 µl der *working reagenz* (bestehend aus einem 1 Teil BCA Reagenz B und 50 Teilen Reagenz A) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung aller Proben in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm. Die entsprechende Eichkurve wurde vorher mit Hilfe entsprechender Proteinstandards, die in dem Kit enthalten waren, erstellt. Sie enthielt die Konzentration von 0,125 – 1,0 µg/µl; als Leerwert dienten 10 µl Aqua dest.

3.4.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel (denaturierendes Acrylamidgel nach Laemmli) auf eine Trägermembran übertragen werden. Er dient dem quantitativen Nachweis von Proteinen und Proteinveränderungen, z. B. Phosphorylierungen durch entsprechende phosphospezifische Antikörper.

Zu Beginn wurde das Protein mit 5 x Sodiumdodezylsulfat (SDS)-Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und danach auf ein 8%-iges Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese folgte das Blotten der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. So konnten die Proteine vollständig auf eine Membran übertragen werden. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundsignale durch freie Bindungsstellen an der Membran kam eine Blockierungslösung zum Einsatz. Die Blockierungslösung enthielt ein für den Antikörper nicht erkennbares Protein, welches die freien Bindungsstellen blockiert. So konnte sichergestellt werden, dass sich der Antikörper nur an sein spezifisches Antigen bindet. Im Anschluss wurde auf die Membran ein spezifischer Antikörper (eNOS 1 : 2500 verdünnt in Blockierungslösung) über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur gegeben. Dieser Antikörper war spezifisch gegen das Protein auf der Membran gerichtet. Abhängig vom 2. Antikörper (*horseradish peroxidase* (HRP)-Kopplung) wurden die Blots per *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Verfahren (ECL detection system, Amersham, Freiburg) entwickelt oder mit Hilfe der

alkalischen Phosphatase (AP) visualisiert. Die Membranen wurden dann am Computer gescannt und gespeichert.

3.4.4 Messung der eNOS-Aktivität in lebenden Zellen

Mit Hilfe dieser Methode kann die Aktivität der eNOS bestimmt werden. Sie beruht auf der physiologischen Umwandlung des Substrats L-Arginin zum Produkt Citrullin durch die eNOS. So kann eine Aussage über die Aktivität des Enzyms gemacht werden, da der Test mit intakten Endothelzellen durchgeführt wird und die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms erhalten bleibt.

Die Zellen wurden zweimal mit 1,5 ml 37°C warmen HEPES-Puffer (pH 7,4) gewaschen und 30 min in 2 ml HEPES-Puffer bei 37°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde der Reaktionsansatz vorbereitet (pro Gefäß 515 µl HEPES-Puffer, 15 µl 1mM L-Arginin und 5 µl (³H)-Arginin). Zu jedem Ansatz wurde zusätzlich die entsprechende Konzentration des Stimulus (Tee, Teebestandteile) zugegeben und bei 37°C warm gehalten. Den Schalen wurden 1 ml HEPES-Puffer entnommen und der Reaktionsansatz zu den Zellen gegeben. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 37°C. Zum Stoppen der Reaktion wurde der gesamte Reaktionsansatz von den Zellen abgenommen und 2 ml 4°C kalter Stopp-Puffer zugegeben. Lysiert wurden die Zellen mit 500 µl 4°C kalten Ethanol pro Schale. Um die gelösten Zellmetabolite aufzunehmen, wurden die Zellen nach Abdampfen des Ethanols mit 2 ml Extraktionspuffer versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Damit das neu gebildete Citrullin von den restlichen Zellmetaboliten getrennt werden kann, wurde das gesamte Extrakt der jeweiligen Schale auf jeweils eine gekühlte Säule überführt. Jede Säule war mit der gleichen Menge DOWEX[®] (0,5 g/ml), einem Kationenaustauscher, der vorher mit Extraktionspuffer gespült und äquilibriert wurde, gefüllt. Das Citrullin liegt bei einem pH-Wert von 5,5 in neutraler Form vor und kann so im Gegensatz zu Arginin, welches basisch ist, die Säule durchlaufen. Nachdem die Flüssigkeit die Säule passiert hat, wurde sie noch einmal mit 4 ml destilliertem Wasser gespült, um die Citrullinausbeute zu verbessern. Das nun vorhandene Volumen von 6 ml wurde mit 12 ml Szintillationscocktail aufgefüllt, verschlossen und gut gemischt. In einem Szintillationscounter erfolgte anschließend mit dem Programm *easy count* die Messung der vom ³H-markierten Citrullin abgegebenen β-Strahlung in cpm.

3.4.5 Vasodilatation in isolierten Rattenaortenringen

Mittels dieser Methode ist es möglich, die durch NO-vermittelte, endothelabhängige Vasodilatation zu erfassen. Da in den Gefäßen die eNOS für die NO-Produktion verantwortlich ist, kann durch spezifische Hemmung der eNOS nachgewiesen werden, ob die Substanzen aus dem Tee für eine NO-abhängige Vasodilatation verantwortlich sind.

Die Genehmigung für die Tötung von Tieren zur Entnahme von Organen oder Geweben (Aktenzeichen T0026/05, 14.02.2005) wurde im Vorfeld eingeholt. Die Richtlinien des Europäischen und Deutschen Gesetzes zum Gebrauch von Labortieren wurden bei allen Tieren eingehalten.

Das Einschläfern der männlichen Wistarratten (Charles Rivers Laboratories) mit einem Gewicht von ca. 300 – 350 g erfolgte intraperitoneal mit 0,3 g Thiopental/kg Körpergewicht. Die Aorta wurde fachgerecht entnommen und in eine kleine Petrischale mit Krebs-Henseleit-Lösung gelegt. Um sie von Blut und Blutbestandteilen zu befreien, musste sie zunächst mit dem Perfusat vorsichtig gespült werden. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Mikroskop in einer mit Krebs-Henseleit-Lösung (4°C) gefüllten und mit Carbogengas begasten Petrischale. Das Carbogengas sicherte einen konstanten pH-Wert von 7,4. Auf den Silikonboden wurde die Aorta festgesteckt und von Fett und Bindegewebe befreit. Danach wurde sie ein weiteres Mal durchgespült und in etwa 2 mm große Ringe geschnitten, die jeweils zwischen zwei Platinhaken in die Organbäder aufgehängt wurden. Diese Organbäder enthielten 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung, wurden mit Carbogengas begast und stetig mit 37°C warmen Wasser umspült.

Die Kontraktion bzw. Vasodilatation konnte durch Kontraktionskraftaufnehmer gemessen werden. Zuerst wurde eine Vorspannung der Ringe von ungefähr 2000 mg mit Hilfe eines Feinpositionierelementes, das mit dem Kraftaufnehmer verbunden war, eingestellt. Dies ermöglichte das Verfolgen der Spannungsänderungen als Kurven auf einem Monitor. Nachdem die Ringe im Organbad eingehängt und vorgespannt worden sind, folgte eine 5-minütige Äquilibration im Perfusat mit Zusatz von 3 M Kaliumchlorid (KCl). So konnte die rezeptorunabhängige Kontraktionsfähigkeit der Ringe getestet und eventuell funktionsuntüchtige Ringe ausgetauscht werden. Nach dreimaligem Spülen der Organbäder mit Perfusat sollten die Ringe innerhalb einer Stunde erneut auf eine

Spannung von 2000 mg zurückkehren. Gegebenfalls mussten sie nochmals nachjustiert werden. Durch die Zugabe von 50 nM des α_1 -Rezeptoragonisten Phenylephrin konnte eine Vorkontraktion der Ringe von 75% – 80% erreicht werden. Nach etwa 30 min wurde der für die Versuche benötigte *steady-state* der Vorkontraktion erreicht. Nun wurden die entsprechenden Stimuli kumulativ zu den Ringen gegeben und die Vasodilatation gemessen. Außerdem wurden einige Ringe 15 min vor der Gabe von Phenylephrin mit L-NAME (1 mM), einen Inhibitor der NOS, vorinkubiert.

Die Auswertung aller Experimente erfolgte mittels LabView und Microsoft Excel. Die Relaxation ist in den Graphen, die im Ergebnisteil folgen, als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die angeführte Anzahl der Experimente entspricht den individuellen Aortenringen. Die Experimente wurden mit jeweils 3 – 7 Tieren durchgeführt.

3.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistik-Programm SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, USA). Die Abbildungen zeigen Mittelwert und Standardfehler (SEM) von der angegebenen Anzahl von Experimenten. Zur statistischen Analyse wurden der t-Test bzw. der Mann-Whitney U-Test verwendet, Signifikanzen wurden mit $p < 0,05$ akzeptiert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Wirkung von grünem und schwarzem Assam-Tee auf endotheliale Parameter

4.1.1 Untersuchung der Inhaltsstoffe

Wie in Kapitel 2 begründet, wurde für die Durchführung der Versuche die Teesorte Assam verwendet. Da für Catechine viele biologische Eigenschaften nachgewiesen wurden, war diese Substanzgruppe ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Zunächst wurden die Konzentrationen der Catechine in grünem und schwarzem Tee gemessen.

HPLC-Messungen aus grünem und schwarzem Teeaufguss ergaben hinsichtlich des Catechingehaltes in beiden Teesorten die in Tabelle 2 dargestellten Werte. Die Summe der verschiedenen Catechine beträgt beim grünen Tee 1226,0 μM . Im Vergleich dazu ist der Anteil der Catechine beim schwarzen Tee mit einer Summe von 28,0 μM wesentlich geringer und erreicht nur einen prozentualen Wert von 2,5. Beim grünen Tee ist der höchste Einzelwert beim EGCG zu finden, beim schwarzen Tee dagegen beim ECG. Der zweithöchste Anteil von Catechinen ist beim grünen Tee EGC, jedoch beim schwarzen Tee EGCG. Auffällig ist außerdem, dass im schwarzen Tee kein EC enthalten ist. Diese unterschiedlichen Catechingehalte zwischen grünem und schwarzem Assam-Tee sind auf den starken Fermentationsprozess zurückzuführen, bei dem ein Großteil der Catechine durch Polyphenoloxidasen enzymatisch verändert wird.

Catechine	EC	EGC	ECG	EGCG	Summe Catechine
Grüner Tee	153,7 \pm 6,8	378,0 \pm 7,6	151,3 \pm 3,3	543,0 \pm 25,6	1226,0 \pm 29,0
Schwarzer Tee	0	3,7 \pm 0,3	13,0 \pm 1,2	11,3 \pm 2,0	28,0 \pm 1,5

Tab. 2: Konzentrationen der verschiedenen Catechine in grünem und schwarzem Assam-Tee (in μM). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei HPLC-Messungen.

4.1.2 Vergleich von grünem und schwarzem Assam-Tee auf die eNOS-Aktivierung

Um herauszufinden, in welchem Maß handelsüblicher grüner und schwarzer Assam-Tee auf die Endothelfunktion Einfluss nehmen, wurden BAEC 15 min mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Teesorten behandelt und anschließend die eNOS-Aktivität gemessen. Als Kontrolle dienten mit Wasser behandelte Zellen.

Als Ergebnis ist festzustellen, dass sowohl grüner als auch schwarzer Assam-Tee mit ansteigender Konzentration die eNOS in den Endothelzellen stimulierten. Der schwarze Tee war jedoch in allen Konzentrationen etwas potenter als grüner Tee. Bereits bei einer Konzentration von 25 µl stimulierte schwarzer Tee die eNOS, grüner Tee dagegen noch nicht. Ab 50 µl erreichte der grüne Tee die Potenz des schwarzen Tees bei 25 µl; schwarzer Tee war dagegen schon 3,5-fach stärker im Vergleich zur Kontrolle. 50 µl des schwarzen Tee erhöhte die Aktivität der eNOS noch einmal auf das 4-Fache der Kontrolle, wohingegen grüner Tee 3-fach so stark war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

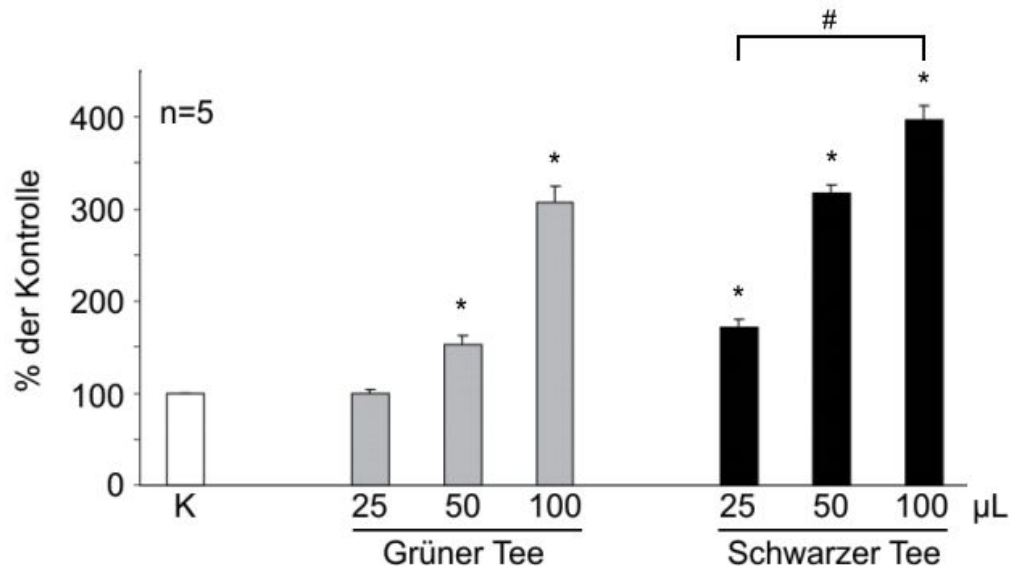


Abb. 2: Messung der eNOS-Aktivität nach Stimulation von Zellen mit grünem und schwarzem Assam-Tee. BAEC wurden 15 min mit 25 µl, 50 µl und 100 µl der beiden Teesorten behandelt. Als Kontrolle diente Wasser. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle); #: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber grünem Tee bei gleichen Konzentrationen)

Damit die eNOS aktiv werden kann, muss dieses Enzym phosphoryliert werden. Im Western Blot wurde untersucht, wie stark die beiden Teesorten die eNOS phosphorylieren und somit aktivieren. Dazu wurden die Zellen, wie im ersten Versuch, 15 min mit den gleichen Mengen von Tee behandelt und mit einem speziellen Puffer, dem Phosphataseinhibitoren zugesetzt waren, lysiert. Als Erstantikörper wurde ein Antikörper eingesetzt, der für phosphoryliertes Ser¹¹⁷⁹ der eNOS spezifisch ist. Als Ladekontrolle diente die Markierung der Gesamt-eNOS-Proteinmenge. Es kam zu einer Tee-induzierten Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch beide Teegetränke. Wiederum war diese beim schwarzen Tee etwas stärker ausgeprägt als beim grünen, wie in Abbildung 3 zu erkennen ist.

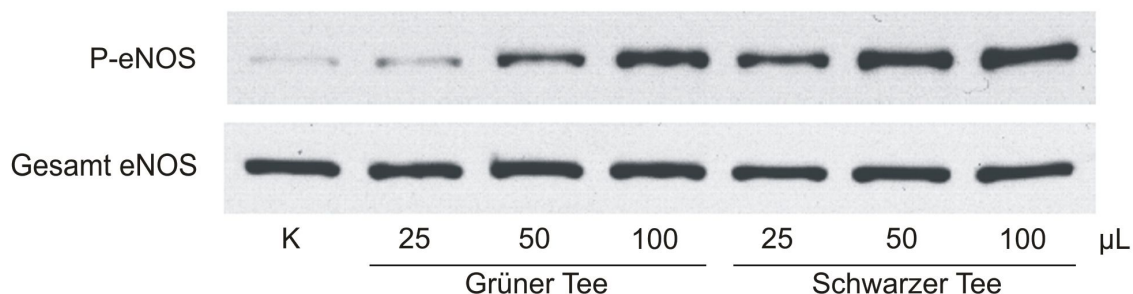


Abb. 3: Nachweis einer Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch grünen und schwarzen Assam-Tee im Western Blot. BAEC wurden 15 min mit 25 µl, 50 µl und 100 µl der beiden Teegetränke behandelt und daraufhin lysiert. Es wurde mit einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper gegen Ser¹¹⁷⁹ gearbeitet. Als Kontrolle diente ein anti-eNOS Antikörper. Dieser Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.1.3 Vergleich von grünem und schwarzem Assam-Tee auf die NO-abhängige Vasodilatation

Die bisher gewonnenen Ergebnisse sollten nun an einem intakten Organ überprüft werden. Dazu wurden mit Phenylephrin vorkontrahierte Rattenaortenringe kumulativ mit beiden Teegetränken behandelt und daraufhin die Vasorelaxation gemessen. Wiederrum wurden die Ergebnisse der ersten beiden Versuche bestätigt. Beide Teesorten erzeugten eine vergleichbare konzentrationsabhängige Vasodilatation. Die Rattenaortenringe konnten auf 60% der Vorkontraktion dilatiert werden. Diesmal wirkte der schwarze Tee nicht wesentlich stärker. L-NAME, ein spezifischer NOS-Inhibitor, verhindert bei beiden Teegetränken diese Relaxation vollständig. Als Kontrolle dienten mit Wasser behandelte Ringe (Abb. 4).

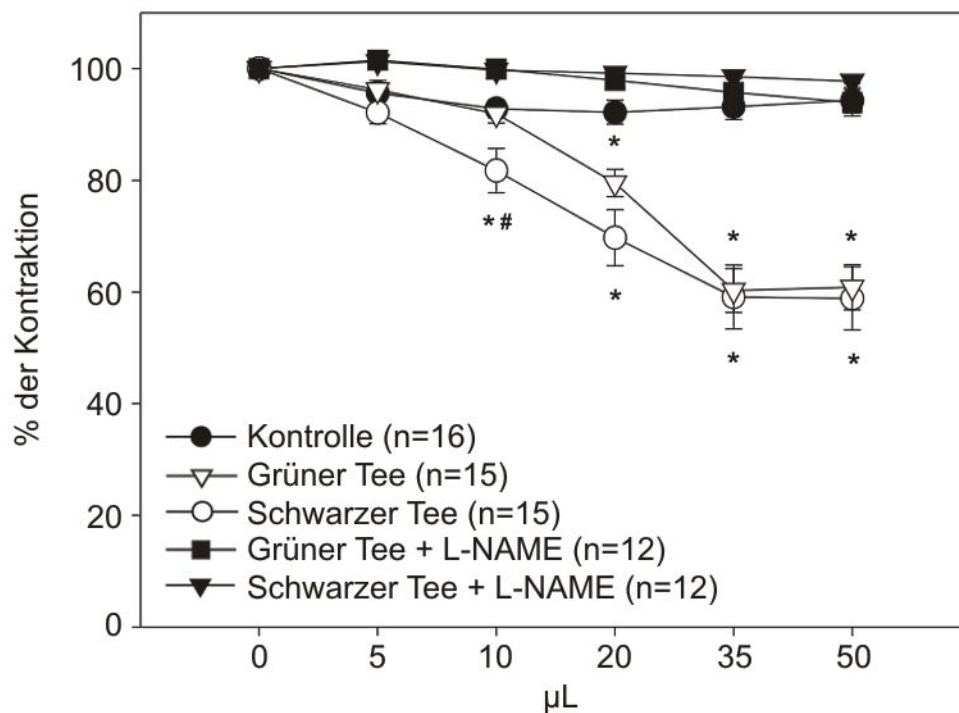


Abb. 4: Aortenrelaxation durch grünen und schwarzen Assam-Tee. Der Tee wurde kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe des Tees mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Als Kontrolle diente Wasser. Die Relaxation ist im Graph als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle); #: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber grünem Tee bei gleichen Konzentrationen)

4.2 Wirkung der individuellen Catechine auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation

Es ist bereits bekannt, dass EGCG das biologisch wirksamste Catechin im Tee ist. Um herauszufinden, ob die anderen Catechine ebenfalls an der Aktivierung der eNOS beteiligt sind, da z. B. EGC auch im hohen Maße im Tee zu finden ist (vgl. Tab. 2), wurden die vier im Tee vorhandenen Catechine untereinander hinsichtlich eNOS-Aktivierung und Vasodilatation untersucht.

Dazu wurden BAEC 15 min mit je 100 μ M EC, ECG, EGC und EGCG behandelt und die eNOS-Aktivität gemessen. Diese Konzentration wurden für den Versuch gewählt, weil bekannt ist, dass EGCG bei einer Konzentration von 100 μ M die Aktivität der eNOS gegenüber dem Basalwert auf den Maximalwert erhöht [24]. Wie in Abbildung 5 dargestellt, war EGCG bei diesem Versuch deutlich das potenteste der Catechine. Es kam

außerdem zu einer minimalen Aktivierung der eNOS durch ECG. Die anderen beiden Catechine EC und EGC zeigten jedoch keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivierung.

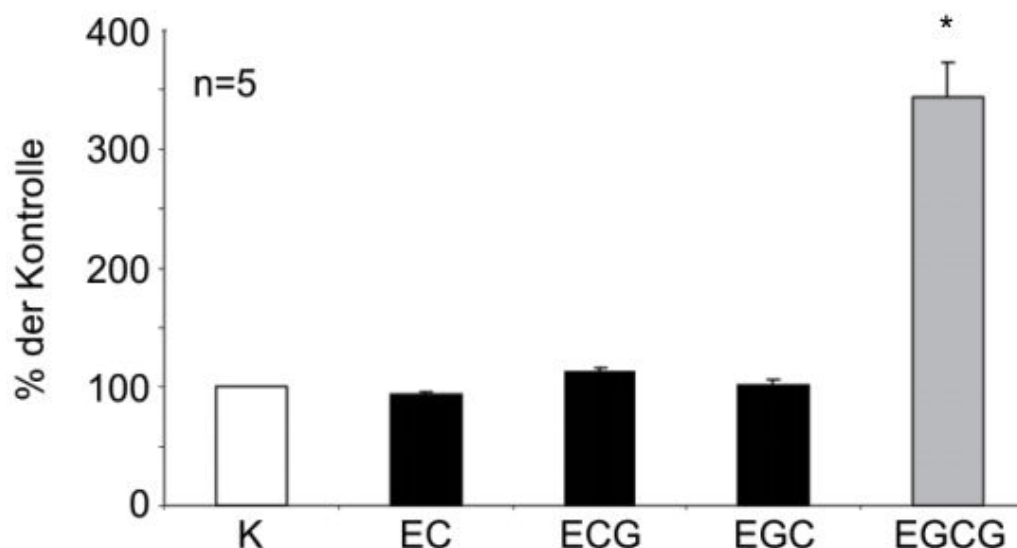


Abb. 5: Messung der eNOS-Aktivität durch Catechine in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit 100 μM der individuellen Catechine behandelt. Wasser diente als Kontrolle. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Im Western Blot sollte die Phosphorylierung der eNOS durch die Catechine untersucht werden. Es gab eine ausgeprägte Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁹ durch EGCG. Auch ECG führte hier zu einer schwachen Induktion der Phosphorylierungsstelle. Wiederum hatten EC und EGC keinen Einfluss auf diese Reaktion. Der entsprechende Western Blot ist in Abbildung 6 dargestellt.

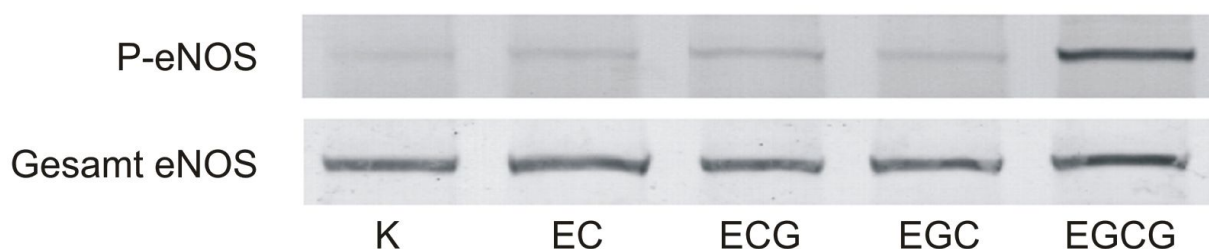


Abb. 6: Nachweis einer Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch Catechine im Western Blot. BAEC wurden 15 min mit 100 μM EC, ECG, EGC und EGCG behandelt und daraufhin lysiert. Es wurde mit einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper gegen Ser¹¹⁷⁹ gearbeitet. Als Kontrolle diente ein anti-eNOS Antikörper. Dieser Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend am physiologischen Modell gearbeitet. EGCG löste bei Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM eine NO-abhängige Vasodilatation aus, welche bis zu 40% der Vorkontraktion reichte. Einige Aortenringe wurden mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. In diesem Fall konnte die Relaxation der Ringe vollständig gehemmt werden (Abb. 7). Als Kontrolle diente Wasser.

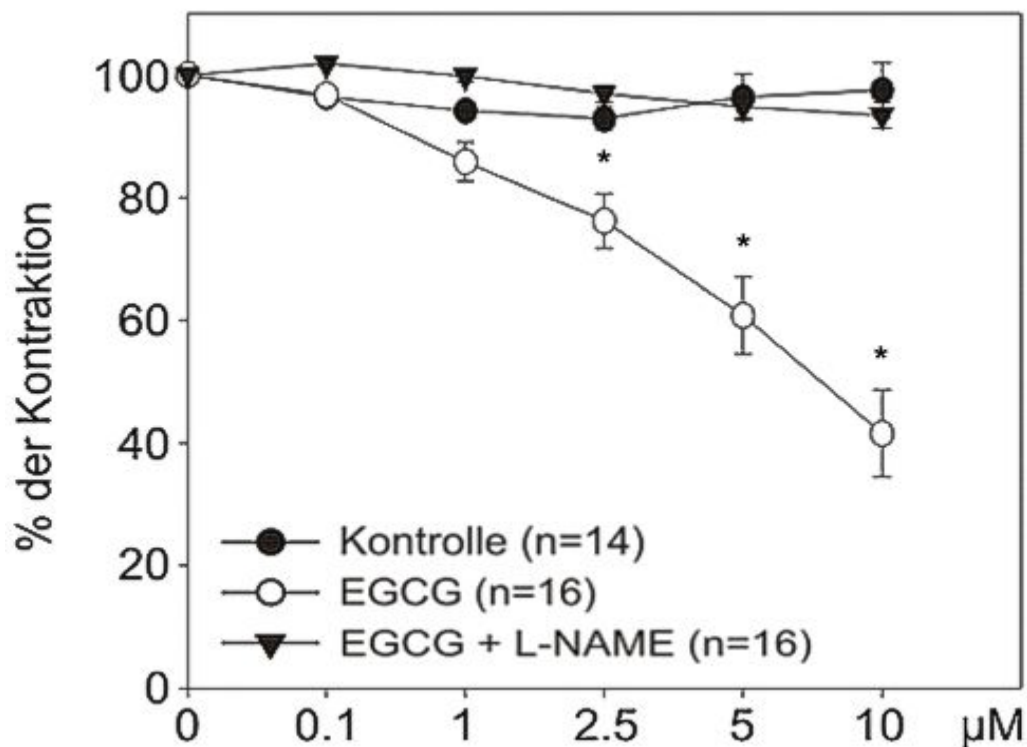


Abb. 7: Aortenrelaxation durch EGCG. EGCG wurde kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe von EGCG mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Wasser diente als Kontrolle. Im Graph ist die Relaxation als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Wie in Abbildung 8 dargestellt, führte auch ECG bei 10 μM in diesem Versuch zu einer Vasodilatation, die jedoch im Gegensatz zu EGCG nur 60% der Kontraktion betrug. Wiederum konnten die Aortenringe, die mit L-NAME vorbehandelt wurden, nicht durch ECG relaxiert werden. Die Catechine EC und EGC zeigten auch bei Konzentrationen bis 10 μM keinen Effekt auf die Vasodilatation im Endothel (Abb. nicht gezeigt).

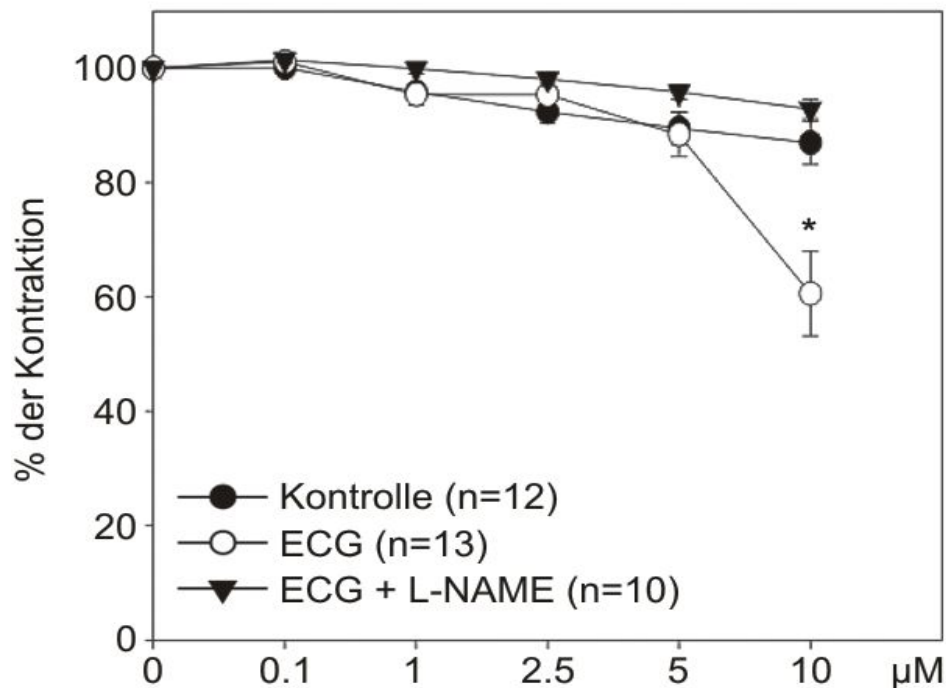


Abb. 8: Aortenrelaxation durch ECG. ECG wurde kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Einige Ringe wurden vor Zugabe von ECG mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Als Kontrolle diente Wasser. Die Relaxation ist graphisch als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

4.3 Wirkung der individuellen Theaflavine auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation

Da schwarzer Assam-Tee weitaus weniger Catechine besitzt als grüner, müssen andere Inhaltsstoffe in diesem Getränk für die eNOS-Aktivierung und Vasodilatation verantwortlich sein. Nahe liegend ist, dass dieser Effekt von den Theaflavinen hervorgerufen wird, die während des Fermentationsprozesses aus den Catechinen entstehen. Theaflavine sind definierte Verbindungen, die orange-rot gefärbt sind und zur Farbe des schwarzen Tees beitragen [15]. HPLC-Messungen ergaben die in Tabelle 3 dargestellten Konzentrationen von Theaflavinen, die der gekochte schwarze Assam-Tee enthält. Dabei fällt auf, dass die Menge an Theaflavinen ($40,2 \mu\text{M}$) weitaus geringer ist, als der Gehalt der Catechine im grünen Tee ($1226,0$; vgl. Tab. 2)

Unter den Theaflavinen ist TF2A mit einer Konzentration von 12,7 μM am meisten vertreten, gefolgt von TF3 mit 11,1 μM , TF1 mit 8,9 μM und TF2B mit 7,6 μM .

	TF1	TF2A	TF2B	TF3	Summe Theaflavine
Schwarzer Tee	8,9 \pm 0,5	12,7 \pm 0,6	7,6 \pm 0,6	11,1 \pm 0,4	40,2 \pm 1,9

Tab. 3: Konzentrationen der verschiedenen Theaflavine im schwarzen Assam-Tee (in μM). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei HPLC-Messungen.

Die Untersuchung der Theaflavine auf deren biologische Wirksamkeit erfolgte im gleichen Rahmen wie bei den Catechinen. Zuerst wurde die Messung der eNOS-Aktivität in lebenden Zellen durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse diente 100 μM EGCG und als Kontrolle mit Wasser behandelte Zellen. BAEC wurden wiederum mit steigenden Konzentrationen der Theaflavine für 15 min behandelt. Die maximale Konzentration der Theaflavine betrug 100 μM . Abbildung 9 zeigt, dass der Stimulus durch TF1 jedoch auch bei dieser Konzentration zu keiner Steigerung der eNOS-Aktivität in BAEC führte.

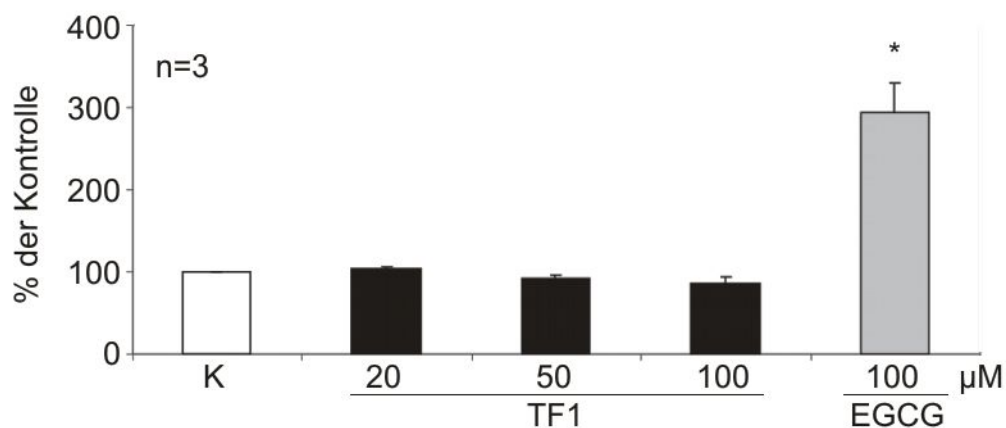


Abb. 9: Messung der eNOS-Aktivität durch TF1 in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit 20 μM , 50 μM und 100 μM TF1 behandelt. Als Kontrolle diente Wasser und als Vergleich EGCG. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Alle anderen Theaflavine dagegen zeigten eine höhere Potenz in der eNOS-Aktivierung als EGCG. So erhöhte TF2A die NO-Produktion bereits bei 60 μM , TF2B bei 30 μM und TF3 bei 20 μM im gleichen Ausmaß wie EGCG bei 100 μM . TF2A war somit 1,5-fach, TF2B 3-fach und TF3 sogar 5-fach potenter in der eNOS-Aktivierung als EGCG (Abb. 10).

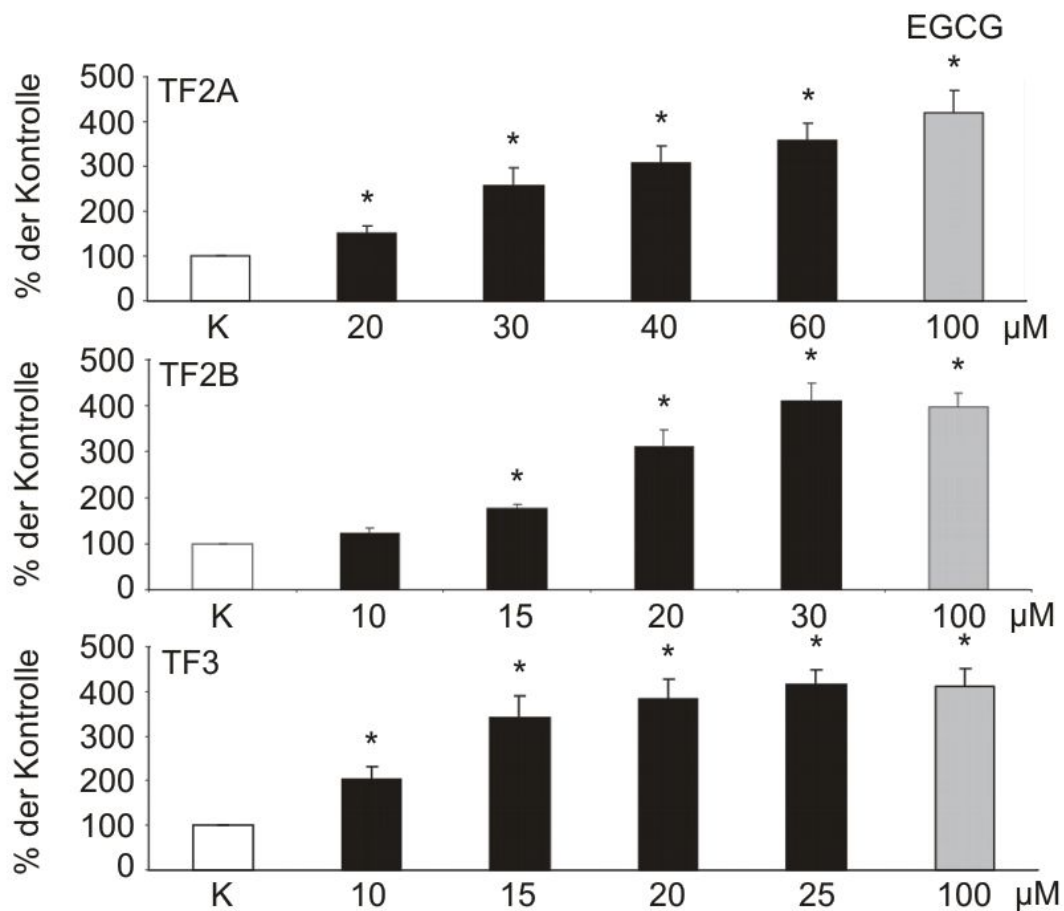


Abb. 10: Messung der eNOS-Aktivität durch TF2A, TF2B und TF3 in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit verschiedenen Theaflavinen behandelt. Als Vergleich dienten 100 µM EGCG und als Kontrolle Wasser. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Der durchgeführte Western Blot zum Nachweis der Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁹ wurde mit TF1 100 µM, TF2A 60 µM, TF2B 30 µM, TF3 20 µM und EGCG 100 µM durchgeführt, d. h. mit den äquipotenten Konzentrationen aus dem eNOS-Aktivitätstest. Er bestätigte die Wirkung der Theaflavine im Vergleich zu EGCG und ist in Abbildung 11 dargestellt. Auch hier zeigte sich wiederum, dass TF1 keinen Einfluss auf die eNOS-Phosphorylierung hat.

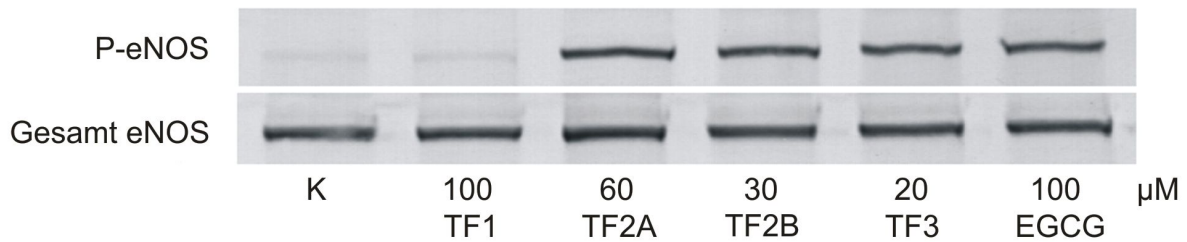


Abb. 11: Nachweis einer Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch Theaflavine und EGCG im Western Blot. BAEC wurden 15 min mit verschiedenen Konzentrationen von Theaflavinen und 100 μM EGCG behandelt und dann lysiert. Es wurde mit einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper gegen Ser¹¹⁷⁹ gearbeitet. Als Kontrolle diente ein anti-eNOS Antikörper. Der Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Anschließend wurden die Theaflavine und deren Einfluss auf die Vasodilatation an isolierten Rattenaortenringen untersucht. Abbildung 12 zeigt die entsprechenden Ergebnisse. TF2A und TF2B führten zu einer dosisabhängigen (0,1 – 10 μM) Vasodilatation, welche durch eine Vorbehandlung mit L-NAME blockiert wurde. Bei einer Konzentration von 5 μM TF2A und 2,5 μM TF2B erreichten die Aortenringe eine Vasodilatation auf nahezu 40% in Bezug auf die vorkontrahierten Ringe (100%). Diesen Wert erreichte EGCG dagegen erst bei einer Konzentration von 10 μM (vgl. Abb. 7).

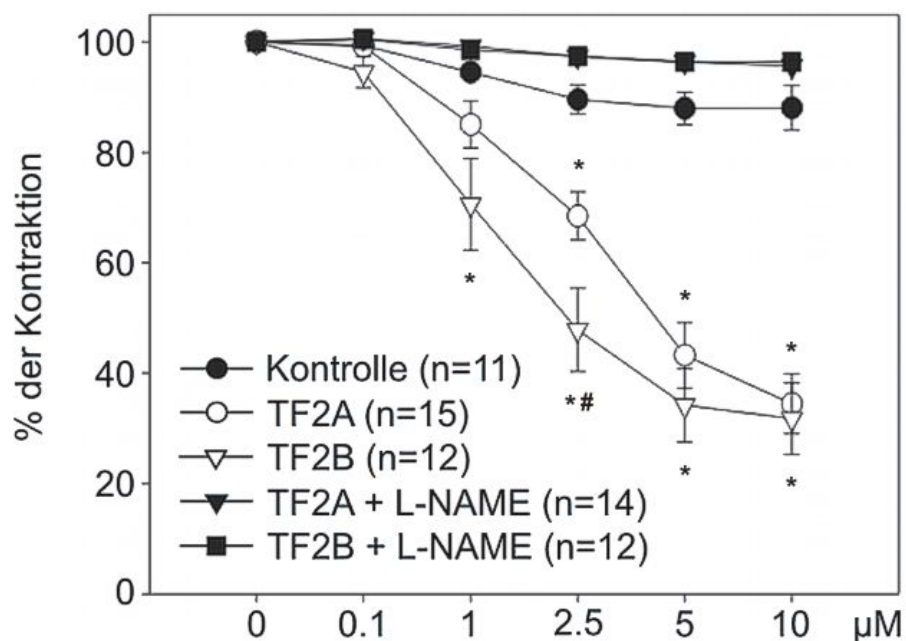


Abb. 12: Aortenrelaxation durch TF2A und TF2B. Theaflavine wurden kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Einige ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe von TF2A und TF2B mit 1 mM L-NAME, einem spezifischen NOS-Inhibitor, vorinkubiert. Wasser diente als Kontrolle. Im Graph ist die Relaxation als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle); #: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber TF2A bei gleichen Konzentrationen)

In einem nächsten Versuch sollte nun das potenteste Catechin (EGCG) dem potentesten Theaflavin (TF3) direkt gegenübergestellt werden. Da TF3 in den vorherigen Experimenten im Vergleich zu EGCG 5-fach potenter war, wurde TF3 in 1 : 5 verdünnter Konzentration zu den Aortenringen gegeben. Es zeigte sich eine gleich starke Vasodilatation durch beide Substanzen, obwohl die Konzentration von TF3 maximal 2 μM und von EGCG 10 μM betrug. Beide Kurven folgen einem konstanten Verlauf, was darauf hinweist, dass mit ansteigender Konzentration von TF3 und EGCG die NO-Produktion durch die eNOS in den Endothelzellen zunimmt. Der NOS-Inhibitor L-NAME konnte wiederum die durch TF3 hervorgerufene Vasodilatation vollständig hemmen (Abb. 13).

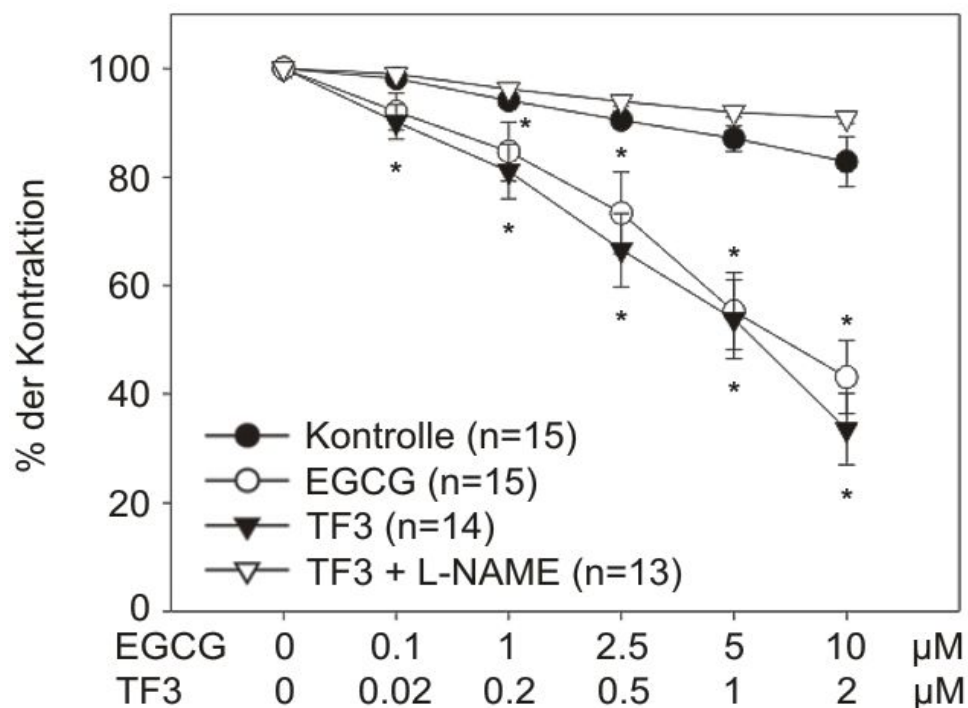


Abb. 13: Aortenrelaxation durch TF3 und EGCG. TF3 und EGCG wurden kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe von TF3 und EGCG mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Als Kontrolle diente Wasser. Die Relaxation ist im Graph als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

4.4 Wirkung weiterer Teebestandteile auf die eNOS-Aktivierung

Zusätzlich zu den Catechinen und Theaflavinen sind einige weitere Inhaltsstoffe im Tee identifiziert worden. Um herauszufinden, inwiefern diese an der in der Literatur beschriebenen biologischen Wirksamkeit des Teegetränkes beteiligt sind, wurden sie an den BAEC hinsichtlich Stimulierung der eNOS-Aktivität untersucht. Es handelte sich dabei um Caffein (=Coffein), Theobromin und Theogallin. Auch diese Substanzen wurden per HPLC-Analyse in grünem und schwarzem Assam-Tee bestimmt. Die Werte sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Darüber hinaus wurde auch Propyl Gallat und seine Wirkung auf die eNOS-Aktivierung untersucht.

	Caffein	Theobromin	Theogallin
Grüner Tee	909,0 ± 10,8	136,0 ± 1,0	173,0 ± 5,1
Schwarzer Tee	1399,3 ± 35,2	185,7 ± 2,6	67,7 ± 0,9

Tab. 4: Konzentrationen weiterer Inhaltsstoffe im grünen und schwarzen Assam-Tee (in μM). Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM von drei HPLC-Messungen.

Caffein (=1,3,7-trimethylxanthin) gehört zu der Gruppe der Alkaloide. Es ist eine Schlüsselkomponente in vielen Getränken, z. B. Tee und Kaffee, und hat sowohl antioxidative als auch oxidative Eigenschaften. Es wird jedoch vermutet, dass dieses Alkaloid eher zu den allgemeinen antioxidativen Eigenschaften koffeinhaltiger Getränke beiträgt [57]. In einer anderen Studie wurde ein vasodilatierender Effekt von Caffein auf die Endothelfunktion in Menschen beschrieben [58]. Aufgrund dieser Befunde sollte Caffein auf seine Fähigkeit, die eNOS-Aktivität zu stimulieren, getestet werden. Um einen Vergleich herzustellen, wurden die Zellen zudem mit 100 μM EGCG behandelt. Caffein wurde in Konzentrationen von 10 μM , 50 μM und 100 μM getestet. Bei keiner der benutzten Konzentrationen konnte eine Aktivitätssteigerung der eNOS beobachtet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 14 dargestellt.

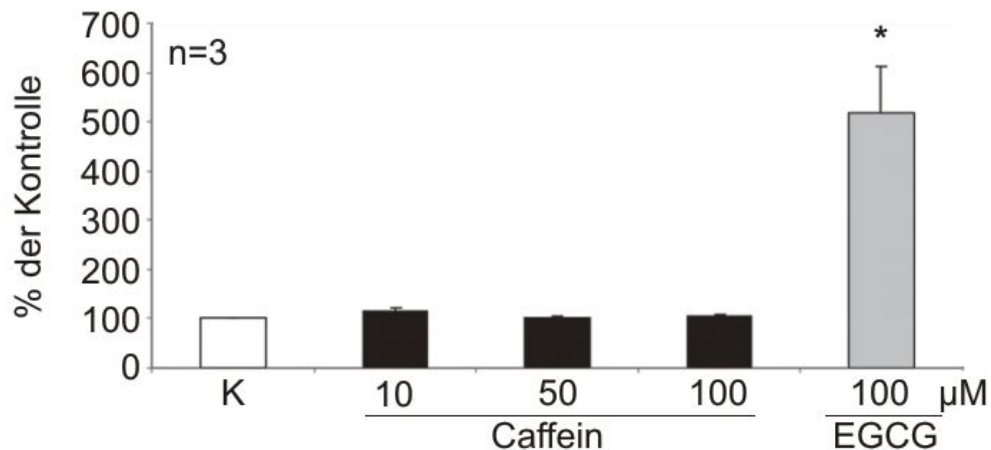


Abb. 14: Messung der eNOS-Aktivität durch Caffein in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit verschiedenen Konzentrationen von Caffein behandelt. Als Vergleich diente 100 μM EGCG und als Kontrolle diente Wasser. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Theobromin (1,3-dimethylxanthin) ist ein weiteres Methylxanthin, das neben Tee vermehrt im Kakao vorkommt. Um die eNOS-Aktivität zu messen, wurden BAEC 15 min mit je 20 μM , 50 μM und 100 μM Theobromin inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente Wasser und als Positiv-Kontrolle wiederum 100 μM EGCG. Es kam auch diesmal zu keinem Anstieg der eNOS-Aktivität, eher konnte im Vergleich zur Kontrolle keine Änderung der Aktivität des Enzyms registriert werden (Abb. 15).

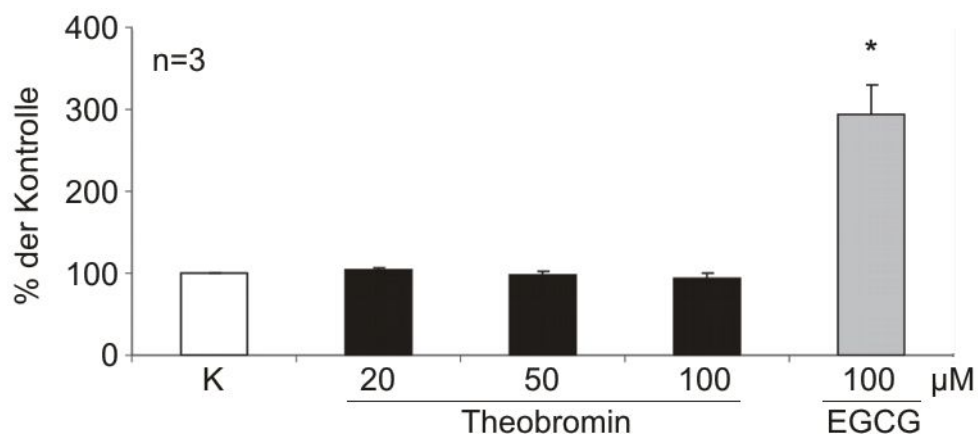


Abb. 15: Messung der eNOS-Aktivität durch Theobromin in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit 20 μM , 50 μM und 100 μM Theobromin behandelt. Als Kontrolle diente Wasser und als Vergleich EGCG. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Theogallin ist ein Ester der Gallussäure. Seine Bestimmung in verschiedenen Teesorten lässt eine Aussage über die Qualität des Tees zu [16]. Die eingesetzten Konzentrationen betragen 20 μM , 50 μM und 100 μM . Wie in Abbildung 16 dargestellt, wurde jedoch keine Aktivierung der eNOS in den BAEC beobachtet.

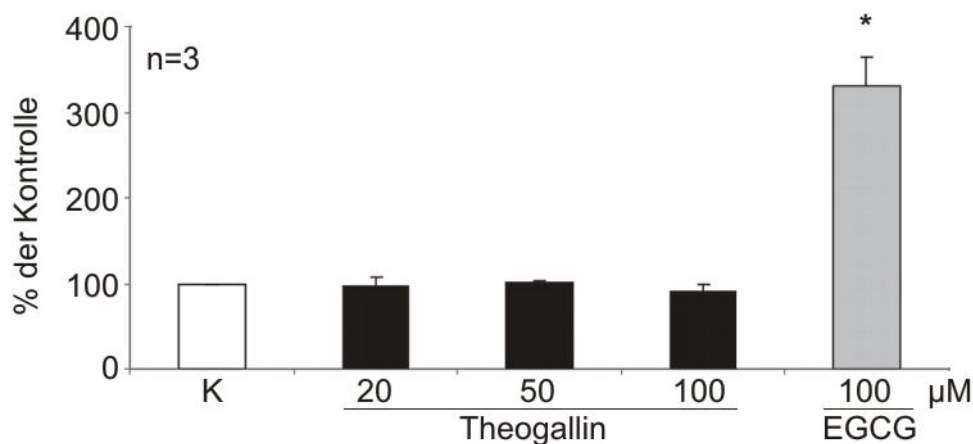


Abb. 16: Messung der eNOS-Aktivität durch Theogallin in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit 20 μM , 50 μM und 100 μM Theogallin behandelt. Als Vergleich diente 100 μM EGCG und als Kontrolle diente Wasser. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Des Weiteren wurde Propyl Gallat, ein Antioxidanz, auf die eNOS-Aktivität getestet. Es besitzt wie einige Catechine und Theaflavine eine Gallatgruppe und wurde in Konzentrationen zwischen 10 und 100 μM eingesetzt. Der Versuch stützt sich auf die Vermutung, dass die Gallatgruppen möglicherweise für die biologische Wirksamkeit einiger Polyphenole verantwortlich sind. In einer Studie von Wang et al. konnte nachgewiesen werden, dass die Catechine mit den Gallatgruppen (ECG und EGCG) Einfluss auf die Fettsäure Synthase (FS) hatten. Auch Propyl Gallat als Analogon eines Gallatrestes führte zu einer Reaktion [59]. Um die Ergebnisse zu vergleichen, wurden die Zellen in unserem Versuch auch mit EGCG behandelt. Wie in Abbildung 17 präsentiert, führte Propyl Gallat allerdings zu keiner eNOS-Aktivierung.

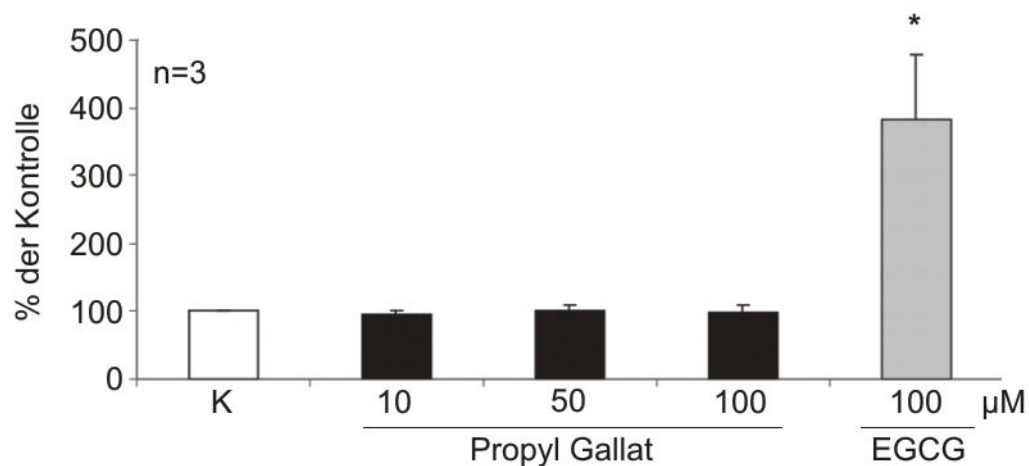


Abb. 17: Messung der eNOS-Aktivität durch Propyl Gallat in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit 10 μM , 50 μM und 100 μM Propyl Gallat behandelt. Als Kontrolle diente Wasser und als Vergleich 100 μM EGCG. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

4.5 Wirkung von Polyphenolgemischen aus grünem und schwarzem Assam-Tee

4.5.1 Herstellung der Polyphenolgemische

Um herauszufinden, ob die hohe physiologische Wirksamkeit der Theaflavine im schwarzen Assam-Tee das Fehlen der Catechine kompensieren kann, wurde ein Polyphenolgemisch aus in den Tabellen 2 und 3 aufgeführten Catechinen und Theaflavinen in den jeweiligen Konzentrationen, wie sie auch im Originalteegetränk zu finden sind, hergestellt. Das Polyphenolgemisch A (PG A) enthält nur Catechine und Wasser (entspricht grünem Tee) und das Polyphenolgemisch B (PG B) Theaflavine, die nicht oxidierten restlichen Catechine und Wasser (entspricht schwarzem Tee). Die Inhaltsstoffe aus Tabelle 4 wurden nicht berücksichtigt, weil sie in den einzelnen Versuchen zu keiner Aktivierung der eNOS führten. Mit diesen beiden Polyphenolgemischen wurden dieselben Experimente durchgeführt wie für die handelsüblichen Assam-Teesorten beschrieben.

4.5.2 Vergleich der Polyphenolgemische auf die eNOS-Aktivierung

Die PG A und B mit den Konzentrationen der Inhaltsstoffe wie in den originalen Teegetränken, hatte keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität (Abb. nicht gezeigt). Daraufhin wurde die Konzentration der Catechine und Theaflavine der beiden Polyphenolgemische verdreifacht, die Versuche wiederholt und die ermittelten Werte den Werten der Originalteegetränke (GT, ST) gegenübergestellt und verglichen. Abbildung 18 präsentiert die Ergebnisse. Das 3-fach konzentrierte PG A aus dem grünen Assam-Tee verursachte in den BAEC eine deutliche, konzentrationsabhängige Erhöhung der eNOS-Aktivität. Jedoch führt es erst bei einer Konzentration von 200 μL zu einer vergleichbaren Aktivität des Enzyms, die der Originaltee bei 100 μL hervorruft. Das ebenfalls 3-fach konzentrierte PG B aus dem schwarzen Assam-Tee kommt dagegen nicht einmal bei einer Konzentration von 200 μL an die Werte des Originaltees bei 100 μL heran. Hier zeigt sich zwar ebenfalls eine konzentrationsabhängige Erhöhung der eNOS-Aktivität, jedoch ist diese weniger stark ausgeprägt als beim PG A. Im Vergleich zum PG B hatte das PG A einen größeren Einfluss auf die eNOS-Aktivität. Die beiden Originalteegetränke zeigten bei 100 μL einen vergleichbaren Anstieg der eNOS-Aktivität.

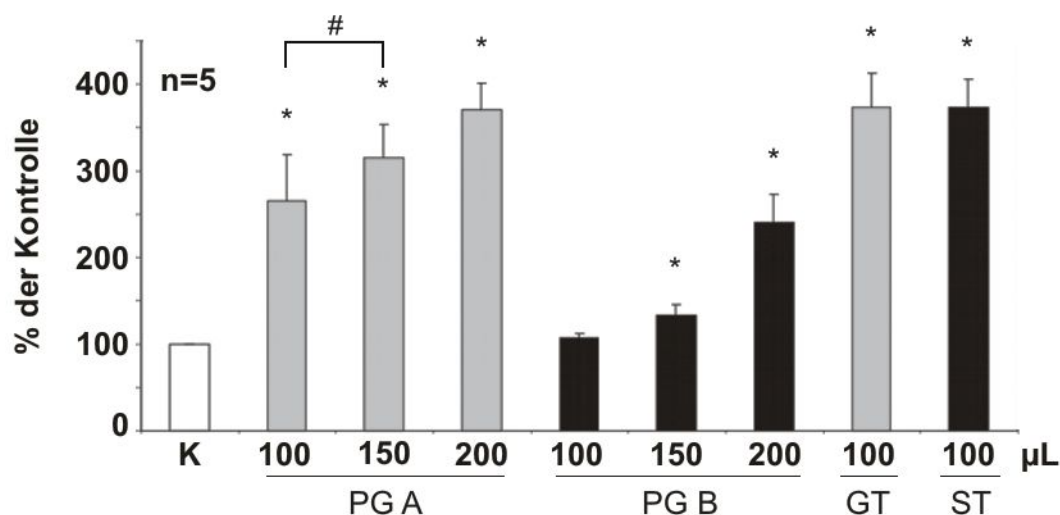


Abb. 18: Messung der eNOS-Aktivität durch Polyphenolgemische in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit verschiedenen Konzentrationen der PG A und B behandelt. 100 μL des grünen (GT) und schwarzen (ST) Originaltees dienten als Vergleich, als Kontrolle diente Wasser. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle), #: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber PG B bei gleichen Konzentrationen)

Im Vergleich mit den Originalteegetränken, die in einer Konzentration von 100 µl auf die Zellen gegeben wurden, wird deutlich, dass noch andere Bestandteile des Teegetränkes an der biologischen Wirksamkeit des Originalteegetränkes beteiligt sein müssen (vgl. Abb. 2).

Der Western Blot ergab ein vergleichbares Ergebnis wie der eNOS-Aktivitätstest. Auch hier stimulierte das 3-fach konzentrierte PG A die eNOS stärker als das PG B. Im Vergleich zu den Originalteegetränken konnte die eNOS weder vom PG A noch vom PG B so stark phosphoryliert werden (Abb. 19).

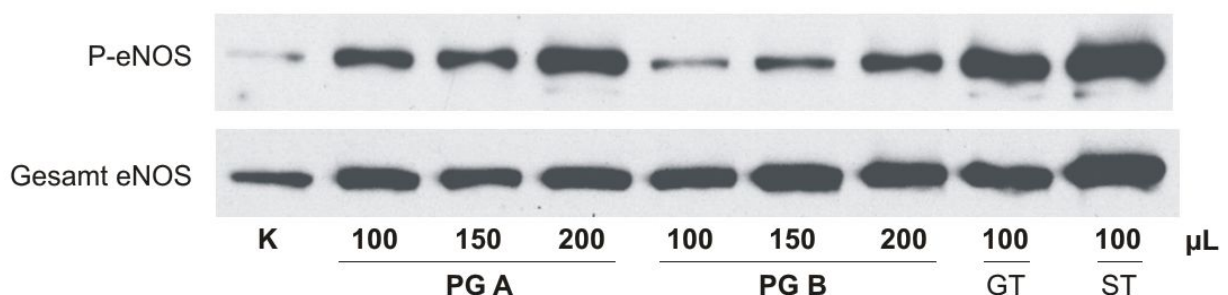


Abb. 19: Nachweis einer Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch Polyphenolgemische im Western Blot. BAEC wurden 15 min mit verschiedenen Konzentrationen der PG A und B behandelt und dann lysiert. Zum Vergleich dienten 100 µl der grünen (GT) und schwarzen (ST) Originaltees, als Kontrolle diente Wasser. Es wurde mit einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper gegen Ser¹¹⁷⁹ gearbeitet. Als Ladekontrolle diente ein anti-eNOS Antikörper. Dieser Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.5.3 Vergleich der Polyphenolgemische auf die NO-abhängige Vasodilatation

Um die Ergebnisse zu verifizieren, wurden beide Polyphenolgemische im physiologischen Modell vergleichend untersucht. Zur Kompensation der offenbar schwächeren biologischen Wirksamkeit des PG B gegenüber dem PG A wurde das PG B zusätzlich zur 3-fachen Konzentration mit einem 3-fach höheren Volumen im Vergleich zum PG A eingesetzt. Wie in Abbildung 20 dargestellt, führte trotz dieser Volumenerhöhung das PG A zu einer Vasodilatation von ungefähr 30%, das PG B jedoch nur zu knapp über 60% der Ausgangskontraktion. Aortenringe, die mit L-NAME vorinkubiert und danach mit den Polyphenolgemischen behandelt wurden, führten dagegen zu keiner NO-abhängigen Vasodilatation.

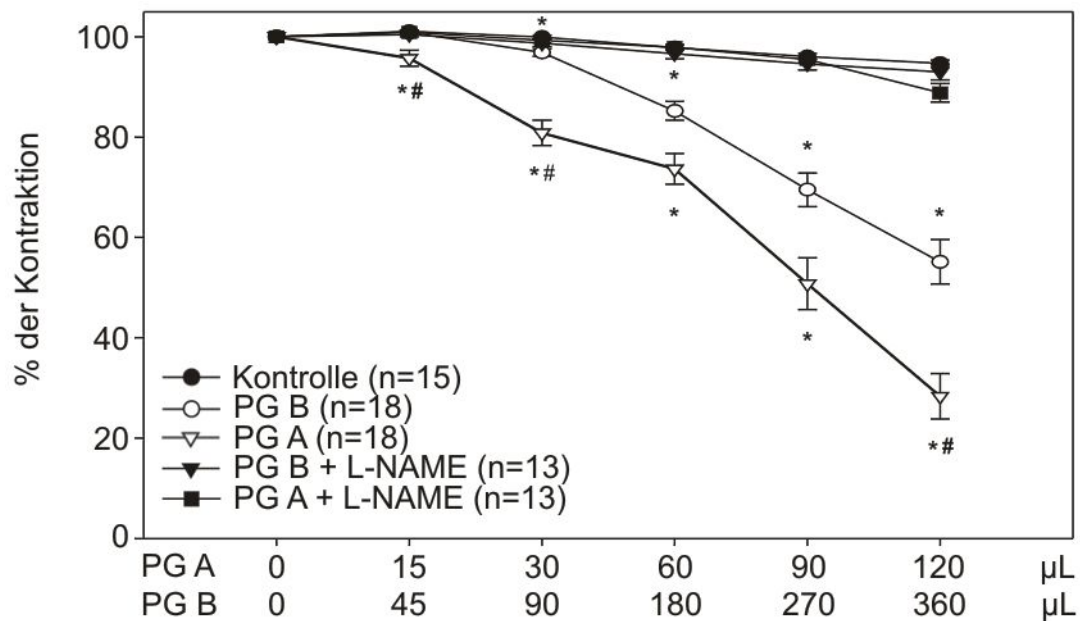


Abb. 20: Aortenrelaxation durch Polyphenolgemische. Die PG A und B wurden kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Einige Ringe wurden vor Zugabe der Polyphenolgemische mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Als Kontrolle diente Wasser. Die Relaxation ist im Graph als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle); #: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber PG B bei gleichen Konzentrationen)

4.6 Wirkung von Thearubigenen auf eNOS-Aktivierung und NO-abhängige Vasodilatation

Wie unter 4.5 erwähnt, liegt die Vermutung nahe, dass noch andere Substanzen zu der biologischen Wirksamkeit des Assam-Tees beitragen, da sowohl das PG A aus dem grünen Assam-Tee als auch das PG B aus dem schwarzen Assam-Tee nicht die Werte der Originalteegetränke erreichten. Zudem hatte das PG B sehr viel weniger Einfluss auf die eNOS-Aktivität und Vasodilatation als das PG A. Aufgrund dessen muss es im schwarzen Tee noch andere Inhaltsstoffe geben, die dessen biologische Wirksamkeit unter 4.1 erklären. Er enthält noch eine weitere Substanzgruppe in großen Mengen, die Thearubigine, die in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht wurden. Der Begriff Thearubigine bezieht sich auf eine Gruppe polymerischer Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten [60]. Aus diesem Grund werden die Konzentrationen in den Versuchen in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.

BAEC wurden 15 min mit steigenden Konzentrationen von Thearubigenen behandelt und nachfolgend die eNOS-Aktivität in den Zellen gemessen. Vergleichend wurden zudem die Zellen mit 100 μM EGCG und 100 μl schwarzem Assam-Tee (ST) behandelt. Es kam zu einem potenten konzentrationsabhängigen Anstieg der eNOS-Aktivität in den BAEC. 30 $\mu\text{g/ml}$ Thearubigine aktivierten die eNOS ungefähr im gleichen Maße wie 100 μM EGCG und 100 μl schwarzer Assam-Tee (Abb. 21).

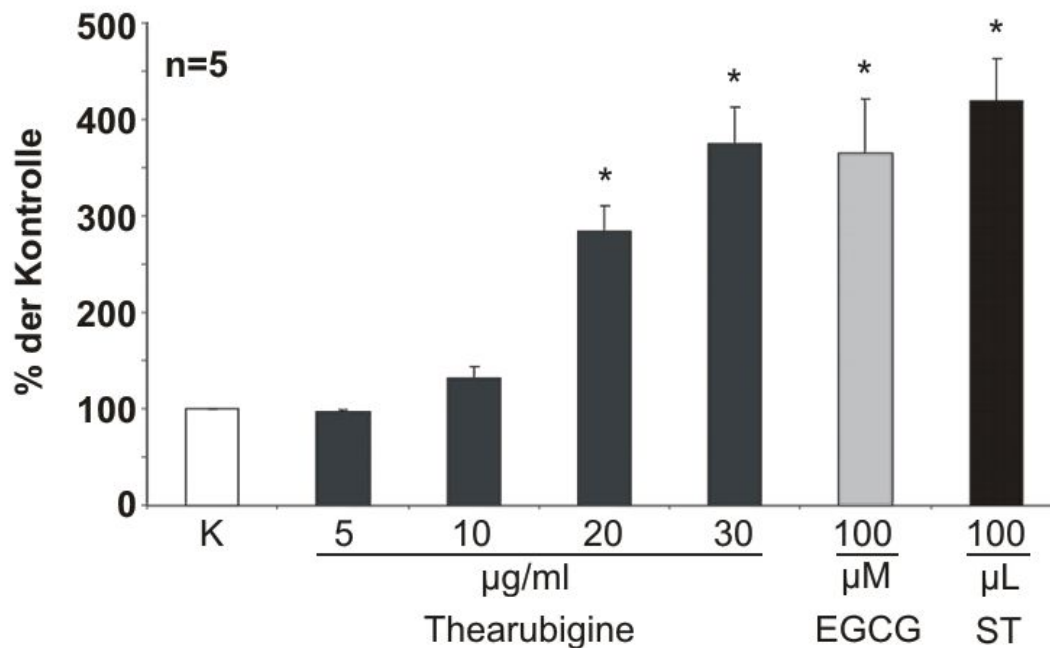


Abb. 21: Messung der eNOS-Aktivität durch Thearubigine in lebenden Zellen. BAEC wurden 15 min mit Thearubigenen behandelt. Als Kontrolle diente Wasser und als Vergleich 100 μl schwarzer Assam-Tee (ST) sowie 100 μM EGCG. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: $p < 0,05$ (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

Im Western Blot sollte die Phosphorylierung des Enzyms, das verantwortlich ist für die Produktion von NO, an Ser¹¹⁷⁹ untersucht werden. Auch hier ergaben sich gleiche Ergebnisse, wie beim vorher geschilderten Versuch. In Abbildung 22 ist zu sehen, dass die eNOS an Ser¹¹⁷⁹ ab 20 $\mu\text{g/ml}$ Thearubigine im gleichen Ausmaß phosphoryliert wurde wie bei 100 μM EGCG und 100 μl schwarzem Assam-Tee. Wasser und 5 $\mu\text{g/ml}$ Thearubigine führten dagegen zu keiner Phosphorylierung des Enzyms.

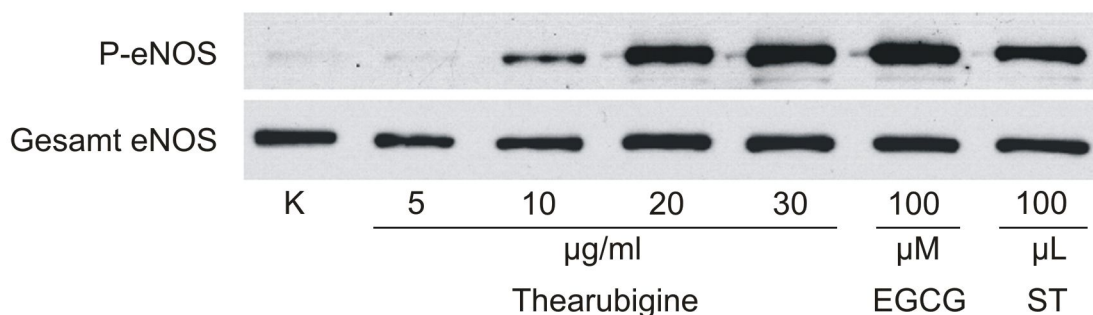


Abb. 22: Nachweis einer Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ durch Thearubigine im Western Blot. BAEC wurden 15 min mit Thearubiginen behandelt und daraufhin lysiert. Als Vergleich diente 100 µM EGCG und 100 µl schwarzer Assam-Tee (ST). Es wurde mit einem phosphospezifischen eNOS-Antikörper gegen Ser¹¹⁷⁹ gearbeitet. Als Kontrolle diente ein anti-eNOS Antikörper. Der Western Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Auch im physiologischen Modell erzeugten die Thearubigine eine sehr ausgeprägte Vasodilatation. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml wurden die Ringe bis zu 20% der Vorcontraktion dilatiert. Die gesamte Relaxation konnte wiederum durch eine Vorinkubation der Aortenringe mit dem spezifischen NOS Inhibitor L-NAME verhindert werden (Abb. 23).

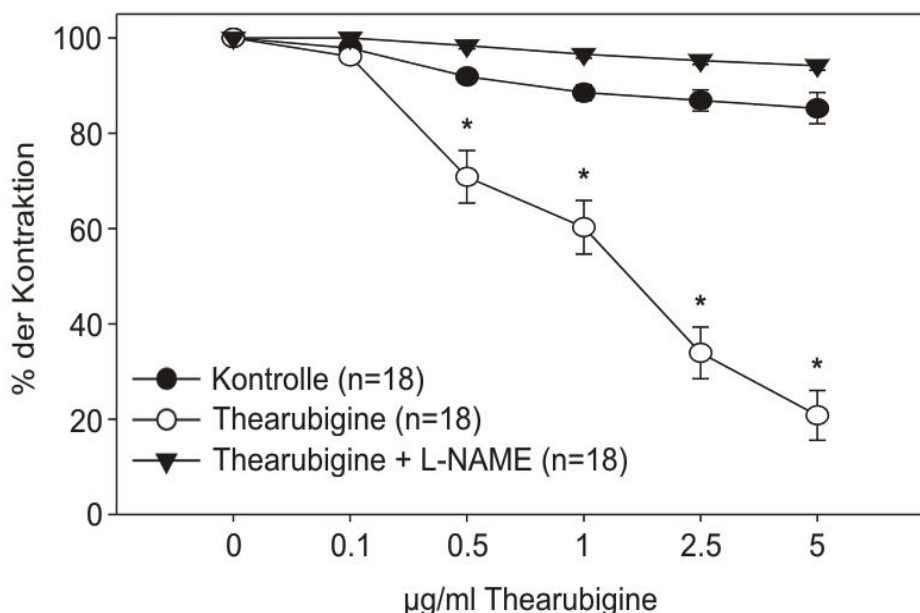


Abb. 23: Aortenrelaxation durch Thearubigine. Thearubigine wurden kumulativ zu den mit Phenylephrin vorkontrahierten Ringen gegeben. Ausgewählte Ringe wurden vor Zugabe von Thearubiginen mit 1 mM L-NAME vorinkubiert. Als Kontrolle diente Wasser. Graphisch ist die Relaxation als prozentualer Anteil der maximalen Phenylephrin-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von der genannten Anzahl von Experimenten. *: p < 0,05 (Signifikanz gegenüber der Kontrolle)

5 DISKUSSION

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass stark fermentierter schwarzer Assam-Tee in Bezug auf endotheliale Parameter wie NO-Produktion und Vasodilatation genauso potent ist wie grüner Assam-Tee. Die Wirksamkeit des grünen Tees ist, wie in vielen Studien bereits beschrieben, nachweislich an das Vorhandensein von Catechinen gebunden. Während im grünen Assam-Tee Catechine in großen Mengen zu finden sind, enthält der schwarze Assam-Tee kaum Catechine. Deshalb ist das in dieser Arbeit nachgewiesene Untersuchungsergebnis, dass der schwarze Assam-Tee vergleichsweise eine ähnliche Wirkung auf die Endothelfunktion zeigt, von besonderer Bedeutung.

5.1 Wirkung von Tee auf kardiovaskuläre Erkrankungen

5.1.1 Grüner Tee

Die zahlreichen Studien bezüglich des gesundheitsfördernden Effektes von grünem Tee scheinen generell relativ einheitlich zu sein. Viele Studien zeigen eine inverse Beziehung zwischen der Aufnahme von grünem Tee und der Entstehung bzw. Progression von kardiovaskulären Erkrankungen [61].

Sato et al. führten erstmals eine vierjährige Kohorten-Studie an 5910 Japanern durch. Sie wiesen nach, dass der Konsum von grünem Tee signifikant die Entwicklung eines Schlaganfalls senkt [62]. Die Forschungsgruppe von Nakachi et al. begutachtete 11 – 13 Jahre lang in einer prospektiven Kohorten-Studie mit 8552 Probanden u. a. das relative Risiko, an einer kardiovaskulären Krankheit zu sterben. Dabei sank dieses Risiko mit ansteigendem Konsum von grünem Tee [63]. Sasazuki et al. untersuchten die Beziehung zwischen dem Trinken von Tee und der Entwicklung einer KHK bei Frauen und Männern. Sie fanden heraus, dass grüner Tee zumindest bei den Männern einen protektiven Effekt besitzt [64]. Eine tendenzielle Assoziation zwischen grünem Tee und Mortalitätsrate zeigten Iwai et al. in ihren Untersuchungen. Dass es in dieser Studie keine signifikanten Effekte auf das kardiovaskuläre System gab, könnte daran liegen, dass die Anzahl der Probanden zu gering war [65]. Sano et al. beobachteten in einer Studie an Japanern, dass mit steigendem Teekonsum ein verringertes Risiko für die Entwick-

lung einer KHK besteht. Jedoch räumen sie ein, dass der antiatherosklerotische Effekt auch mit der Ernährung der Japaner zusammenhängen könnte [5]. Die groß angelegte „Ohsaki Studie“ von Kuriyama et al. zeigte, dass Trinken von grünem Tee mit einem reduzierten kardiovaskulären Risiko und einer Senkung der Gesamt-Mortalitätsrate verbunden ist [8]. Diese prospektive Kohorten-Studie bestätigt die bisherigen Schlussfolgerungen aus kleineren Kohorten-Studien über den inversen Zusammenhang zwischen kardiovaskulären Erkrankungen und der Aufnahme von grünem Tee.

Der Wert der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass über die Untersuchungsergebnisse der hier aufgeführten Studien hinaus nachgewiesen wurde, dass bestimmte Inhaltsstoffe aus grünem Assam-Tee die eNOS-Aktivität in Endothelzellen steigern und in Rattenaortenringen eine Vasodilatation auslösen. Es ist anzunehmen, dass so u. a. der protektive Effekt von grünem Tee auf die Endothelfunktion entsteht und kardiovaskulären Erkrankungen vorgebeugt wird.

5.1.2 Schwarzer Tee

(1) Epidemiologische Studien

Betrachtet man die Studien bezüglich der Wirkung von schwarzem Tee auf das kardiovaskuläre System, sind diese zum Teil widersprüchlich. Während einige Studien protektive Effekte von schwarzem Tee auf das kardiovaskuläre System beschreiben, werden in einer Reihe anderer Studien gegenteilige Auffassungen vertreten. Es existieren zudem weitaus weniger Studien zu diesem Thema als beim grünen Tee.

Zu den Studien, die einen protektiven Effekt von schwarzem Tee nachgewiesen haben, gehört die „Rotterdam-Studie“, die in den 90er Jahren von Geleijnse et al. durchgeführt wurde. In dieser Studie konnte eine statistisch signifikante entgegengesetzte Beziehung zwischen schwarzem Teekonsum und fortgeschrittener Atherosklerose der Aorta, v. a. bei Frauen, nachgewiesen werden [6]. D. h., je mehr Tee konsumiert wurde, desto weniger Atherosklerose trat bei den Probandinnen auf. Außerdem gab es einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen niedrigem Teekonsum und dem schwersten Grad der Atherosklerose der Aorta. Bei der Auswertung der „Zutphen-Elderly-Studie“ in

den Niederlanden fanden Hertog et al. eine negative Korrelation zwischen der Mortalität aufgrund KHK und der Teeaufnahme der Probanden [66]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die „Boston-Area-Health-Studie“. Männer und Frauen, die ein Jahr lang eine oder mehrere Tassen Tee tranken, hatten ein 44% geringeres Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, als die Kaffee trinkenden Probanden [67]. Obwohl in dieser Studie die Teesorte, die konsumiert worden ist, nicht benannt wurde, ist davon auszugehen, dass die Männer und Frauen schwarzen Tee getrunken haben, denn die Autoren begründen den protektiven Effekt des Tees auf das kardiovaskuläre System u. a. mit Flavonoiden aus schwarzem Tee. Mukamal et al. fanden in ihrer prospektiven, multizentrischen Studie heraus, dass der selbst angegebene Teekonsum Überlebender eines akuten Myokardinfarkts im Jahr vor dem Infarkt mit einer niedrigeren Mortalität nach dem Infarkt verbunden war. Dieses Ergebnis galt für die Gesamtmortalität als auch für die kardiovaskuläre Mortalität. Allerdings wird in dieser Studie darauf hingewiesen, dass dieser Effekt weder eindeutig dem grünen noch dem schwarzen Tee zugeordnet werden kann, da die Teeart nicht differenziert wurde. Jedoch wurde zur Zeit der Studie in den USA hauptsächlich schwarzer Tee konsumiert [4]. In einer Studie von Hakim et al. konnte gezeigt werden, dass bereits das Trinken von mehr als sechs Tassen schwarzem Tee am Tag die Prävalenz der KHK signifikant senkt [68].

Im Unterschied zu den eben aufgeführten Studien gibt es Studien, wie z. B. die Kohorten-Studie von Sesso et al., die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Konsum von schwarzem Tee und einem reduzierten Risiko für das Auftreten von kardiovaskulären Krankheiten nachweisen konnten [69]. Woodward et al. beschrieben eine schwach positive Assoziation von schwarzem Teekonsum auf die Herzinfarkt-Mortalität in einer schottischen Herzgesundheitsstudie [13]. Des Weiteren wurde bei einer Studie von Hertog et al. in einer walisischen Population gezeigt, dass der Konsum von schwarzem Tee positiv mit der Inzidenz der ischämischen Herzkrankheit korreliert [70]. Die Autoren diskutierten hier, dass der Zusatz von Milch im schwarzen Tee, wie es im Vereinigten Königreich weit verbreitet ist, möglicherweise eine Erklärung für das Fehlen des protektiven Effektes des Tees in ihrer Studie sein könnte. An dieser Vermutung setzten Studien, wie z. B. die Studie von Lorenz et al. an, die nachweist, dass die Zugabe von Milch in den schwarzen Tee seine gesundheitsfördernden Effekte auf die Endothelfunktion und NO-Produktion verhindert [71]. Andere Studien, wie beispielswei-

se die Studie von Kyle et al., zeigten, dass der Zusatz von Milch keinen Einfluss auf die antioxidative Kapazität von Polyphenolen aus schwarzem Tee hat. Zudem fanden sie heraus, dass die Aufgusszeit die Bioverfügbarkeit der Polyphenole stark beeinflusst [72]. Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse ist zu prüfen, ob einzelne Gewohnheiten der Teetrinker, wie z. B. der Zusatz von Milch in den Tee oder die Aufgusszeit, in den oben genannten Studien berücksichtigt wurden. Zudem fehlen Studien, die den Zusammenhang zwischen Teekonsum und Milchzugabe näher untersuchen. Hakim et al. wiesen in ihrer Studie bereits auf das Problem hin, dass aufgrund z. B. verschiedener Teesorten oder Teezubereitungsmöglichkeiten unterschiedliche Polyphenolkonzentrationen im Tee vorkommen. Sie erstellten eine Teedatenbank nach der Analyse von 40 Teeproben von schwarzem Tee und zeigten damit, dass die Teeblattkonzentration und die Aufgusszeit einen großen Einfluss auf die Polyphenolkonzentration in heißen Teegetränken haben. Ihrer Meinung nach sollten in allen Studien Informationen über den Teetyp, die Teezubereitung und die Menge des Teekonsums zu finden sein [73]. Andere Autoren diskutierten, dass der Zeitraum, in dem die Studien durchgeführt wurden, zu kurz sei. So zeigten Mukamal et al., dass Teekonsum in einem Zeitraum von sechs Monaten noch nicht zur Senkung von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z. B. Lipide oder Adhäsionsmoleküle, führt. In dieser Studie wurden Probanden mit entweder Diabetes oder kardiovaskulären Risikofaktoren in zwei Gruppen eingeteilt und sollten sechs Monate lang jeden Tag drei Tassen Wasser oder drei Tassen schwarzem Tee trinken. Die kardiovaskulären Risikofaktoren wurden am Anfang und am Ende der sechs Monate gemessen [74]. Zu einem ähnlichem Ergebnis kam die Studie von Bingham et al.. Hier konnte nach einem Zeitraum von vier Wochen ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen dem Einfluss von schwarzem Tee und Placebo auf Blutdruck und Blutfette festgestellt werden [75]. Ein völlig anderes Ergebnis erhielten Yokozawa et al.. Sie untersuchten die Auswirkungen von japanischem schwarzem Tee auf die Cholesterinwerte im Blut von Ratten. Die Tiere erhielten eine cholesterinhaltige Kost. Dazu wurde ihnen täglich 20 Tage lang in Wasser gelöster Tee zugeführt, eine Kontrollgruppe erhielt dagegen nur Wasser. Die Forschungsgruppe stellte fest, dass die Cholesterinwerte in den Ratten, die den schwarzen Tee erhielten, signifikant gesenkt wurden. Gleiche Effekte wurden auch bei den LDL-Cholesterinwerten im Blut festgestellt [76].

Aufgrund der inkonsistenten Studien von schwarzem Tee in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko verglichen einige Autoren mehrere Studien miteinander, um herauszufinden, ob schwarzer Tee einen protektiven Effekt besitzt oder nicht. Auch hier ergaben sich unterschiedliche Resultate. Eine Meta-Analyse von Peters et al. zeigte ein mit vermehrtem Teekonsum ansteigendes Risiko für die KHK im Vereinigten Königreich und für den Schlaganfall in Australien [12]. Gardner et al. verglichen klinische und epidemiologische Studien zum Thema Tee in dem Zeitraum von 1990 bis 2004. Sie kamen dagegen zu dem Ergebnis, dass der schwarze Tee generell einen positiven Effekt auf die kardiovaskuläre Gesundheit hat. Eine klare Aussage wurde für die KHK gefunden. Die Forscher konnten Belege dafür finden, dass bereits drei Tassen schwarzer Tee pro Tag das Risiko der KHK senken. Der Gehalt an Antioxidantien verbesserte sich ab einem Konsum von sechs Tassen schwarzen Tee pro Tag [77].

Die in der hier vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse deuten ebenfalls darauf hin, dass stark fermentierter schwarzer Assam-Tee bezüglich gesundheitsfördernder Effekte die gleichen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System hat wie grüner Tee. Ob der Zusatz von Milch oder andere Faktoren möglicherweise die protektiven Effekte von schwarzem Tee mindert, ist noch nicht abschließend geklärt; er könnte aber teilweise die fehlenden Effekte auf das kardiovaskuläre System in einigen Studien erklären. Eine andere Ursache für die zum Teil widersprüchlichen epidemiologischen Ergebnisse von schwarzem Tee könnte im geringen Gehalt von Catechinen liegen. Zudem variiert dieser in den verschiedenen schwarzen Teesorten häufig. Vergleicht man z. B. die Konzentrationen der Catechine im schwarzen Tee aus der Studie von Jochmann et al. mit denen in dieser Arbeit, so findet sich im schwarzen Darjeeling-Tee nach der Fermentation ein höherer Gehalt an Catechinen (560 μM) als im schwarzen Assam-Tee (28,0 μM) [11]. Jedoch überwiegen beim schwarzen Assam-Tee im Vergleich zu den Catechinen (28,0 μM) die Theaflavine (40,2 μM). Die Konzentrationen der Catechine sind in dem in dieser Arbeit verwendeten schwarzen Assam-Tee sehr gering, da sie während der Fermentation fast vollständig oxidiert wurden. Durch den Fermentationsprozess entstanden vier verschiedene Theaflavine. Diese waren jedoch in geringeren Konzentrationen vorhanden (40,2 μM) als die Catechine im grünen Assam-Tee (1226,0 μM) wie man aus Tabelle 2 und 3 entnehmen kann.

(2) Studien zur Endothelfunktion

Weitere Forschungsgruppen haben sich mit den Auswirkungen des schwarzen Tees auf die Endothelfunktion beschäftigt.

Dass schwarzer Tee und die darin enthaltenen Polyphenole die eNOS-Aktivität erhöhen, zeigten Anter et al. bereits an kultivierten Endothelzellen, jedoch haben sie die einzelnen Bestandteile nicht quantifiziert und die Polyphenole als Fraktion verwendet [53]. Des Weiteren existieren Studien zu schwarzem Tee, die dessen Effekte auf die Endothelfunktion in vivo untersuchten. Es wurden auch hier gesundheitsfördernde kardiovaskuläre Effekte beschrieben. Duffy et al. zeigten in ihrer Studie, dass der Konsum von schwarzem Tee die endotheliale Dysfunktion an Patienten mit dokumentierter KHK vermindert. Dabei untersuchten sie sowohl einen kurzfristigen als auch einen langfristigen Effekt des Tees. Der kurzfristige Effekt wurde zwei Stunden nach Konsum von 450 ml schwarzem Tee per Gefäßultraschall an der A. brachialis erfasst. Die Vergleichsgruppe dagegen trank die gleiche Menge Wasser. Der Konsum von 900 ml schwarzem Tee oder Wasser täglich über vier Wochen sollte den langfristigen Effekt darstellen. Die Relaxation der Arterie verbesserte sich sowohl durch kurzfristigen als auch langfristigen Konsum von schwarzem Tee im Vergleich zum Wasserkonsum [9]. Hogdson et al. stellten fest, dass schwarzer Tee das kardiovaskuläre Risiko reduziert und die vasodilatierende Funktion von Gefäßen verbessert [10]. Eine Studie von Jochmann et al. zeigt, dass grüner und schwarzer Tee den gleichen Effekt auf die Verbesserung der Endothelfunktion haben [11]. Neben Messung der Vasodilatation an der A. brachialis per Ultraschall wurden wie in der hier vorliegenden Arbeit die eNOS-Aktivierung und die Vasorelaxation in Rattenaortenringen untersucht. Beide Teesorten zeigten vergleichbare Effekte hinsichtlich NO-Produktion und Vasodilatation. Die Forschungsgruppe verwendete für ihre Untersuchungen die Teesorte Darjeeling. Bei dieser Teesorte werden die Catechine während der Fermentation nicht vollständig zu Theaflavinen und Thearubiginen oxidiert. Die Konzentration von EGCG verringerte sich bei der schwarzen Teesorte nach der Fermentation jedoch um die Hälfte. In der Studie wird bereits vermutet, dass die Theaflavine und Thearubigine aus dem schwarzen Darjeeling-Tee das Fehlen der Catechine ausgleichen könnten. Auf der anderen Seite kann aufgrund des hohen Catechingehaltes in der schwarzen Teesorte nicht ausgeschlossen

werden, dass der gesundheitsfördernde Endotheleffekt in der Studie durch die Catechine unterstützt wird.

Die Vermutung von Jochmann et al. [11], dass die Theaflavine und Thearubigine das Fehlen der Catechine im schwarzen Tee ausgleichen könnten, kann in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da der schwarze Assam-Tee weit weniger Catechine enthält als der schwarze Darjeeling-Tee und trotzdem die gleiche Wirkung hat wie der grüne Assam-Tee. Jedoch wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Wirkung des Assam-Tees auf die Endothelfunktion in vivo nicht untersucht.

5.2 Wirkung einzelner Teeinhaltsstoffe auf das kardiovaskuläre System

5.2.1 Catechine

(1) Protektive Wirkung der Catechine

Da viele epidemiologische Studien darauf hindeuten, dass die Catechine aus dem Tee einen großen Teil zu den protektiven Effekten auf das kardiovaskuläre System beitragen, wurden sie bezüglich ihrer Wirkung an Gefäßen bereits von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht.

In vivo führte eine Konzentration von 300 mg EGCG nach zwei Stunden in der menschlichen A. brachialis zu einer Vasodilatation [78]. Dazu muss jedoch erwähnt werden, dass dies eine Konzentration des EGCG ist, bei der man sehr viel Tee pro Tag trinken muss, um im Blut diese Mengen messen zu können. Aus diesem Grund wäre der Einsatz von EGCG in der Pharmakotherapie eine Option. In der Studie von Huang et al., die die vier Catechine (EC, ECG, EGC und EGCG) an Mesenterialgefäßen auf Vasorelaxation testeten, führte EGCG unter allen anderen Catechinen zu der ausgeprägtesten Vasodilatation an mit Phenylephrin vorkontrahierten Rattenaortenringen [23].

In der hier vorliegenden Arbeit löste EGCG bei Konzentrationen von 0,1 bis 10 μM eine NO-abhängige Vasodilatation an Rattenaortenringen aus, die bis zu 40% der Vorkontraktion reichte. Interessant war zudem, dass auch ECG zu einer geringen Aktivierung der eNOS und zu einer Vasodilatation in den Rattenaortenringen führte (siehe Abb. 5, 6

und 8). Das könnte daran liegen, dass sowohl EGCG als auch ECG eine Gallatgruppe in 3-Position am C-Ring besitzen (siehe Abb. 1), die anderen beiden Catechine jedoch nicht [79]. In mehreren Studien wurde beschrieben, dass die beiden Catechine mit den Gallatgruppen in 3-Position am C-Ring physiologisch potenter sind als die übrigen Catechine [26, 80 – 82].

(2) Problem der Bioverfügbarkeit

Die Bioverfügbarkeit von Catechinen aus grünem Tee ist generell gering [83]. Im Plasma besitzen Catechine eine kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Stunden [84].

Manach et al. untersuchten Daten von 97 Studien, die die Kinetik und das Ausmaß der Polyphenolabsorption bei Erwachsenen nach Aufnahme von einzelnen Polyphenoldosen als reine Substanz, als Pflanzenextrakt oder als Getränk/Nahrung untersuchten. Sie fanden heraus, dass sich die Bioverfügbarkeit zwischen den einzelnen Catechinen unterscheidet. Die Catechine, die eine Gallatgruppe besitzen, werden weniger resorbiert, als Catechine ohne Gallatgruppe. EGCG ist außerdem das Catechin, das im Plasma meist in ungebundener Form vorliegt. Die anderen Catechine sind mit Glucuronsäure und/oder mit Sulfatgruppen konjugiert. Insgesamt werden Catechine schnell aus dem Körper eliminiert [85]. In einer Studie von Warden et al. wurde die Bioverfügbarkeit von Catechinen aus schwarzem Tee untersucht. Auch hier war festzustellen, dass die Bioverfügbarkeit der Catechine eher gering ist. EGCG, das von den Catechinen am meisten im schwarzen Tee vorhanden war, hatte die geringste Plasmakonzentration. Es ist anzunehmen, dass die Catechine zudem metabolisiert wurden und so nicht mehr nachweisbar waren [86].

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die Konzentrationen der einzelnen Catechine in den Zellkulturexperimenten sehr hoch waren und nach Konsum von grünem Assam-Tee im menschlichen Plasma nicht erreicht werden können. Jedoch übten bereits viel geringere Konzentrationen der Inhaltsstoffe an den Rattenaortenringen eine Vasodilatation aus, was in vorherigen Studien auch bereits gezeigt worden ist [24]. EGCG, beispielsweise, relaxierte die Aortenringe schon bei 1 und 2,5 μM . Dies

sind Konzentrationen, die nach dem Trinken von Tee oder oraler EGCG-Gaben im menschlichen Plasma gemessen wurden [87, 88].

5.2.2 Theaflavine

(1) Protektive Wirkung der Theaflavine

Da schwarzer Assam-Tee weniger Catechine enthält als grüner, ist es nahe liegend, dass Theaflavine, die während des Fermentationsprozesses aus den Catechinen entstehen, für die eNOS-Aktivierung und die NO-abhängige Vasodilatation verantwortlich sind.

Theaflavine besitzen, wie ebenfalls auch die Catechine, starke antioxidative Eigenschaften, die bereits von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht wurden [89 – 91]. Dabei wurde gezeigt, dass TF3 von allen Theaflavinen die stärksten antioxidativen Eigenschaften besitzt. Leung et al. fanden heraus, dass TF3 sogar eine höhere antioxidative Potenz bezüglich der Oxidation von menschlichen LDL besitzt als EGCG [92]. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Theaflavine bei anderen biologischen Eigenschaften, beispielsweise bei der Hemmung der HIV-I Replikation, eine größere Wirkung zeigten als die Catechine [93]. Die stärkere biologische Aktivität von TF3 wurde des Weiteren von Liang et al. beschrieben. TF3 erwies sich als potenter in der Hemmung der Krebszellproliferation als EGCG [94]. TF3 besitzt zudem gegenüber EGCG eine höhere antifungale Wirkung [95]. Bezogen auf die antibakterielle Wirkung sind EGCG und TF3 jedoch gleich stark [96 – 98].

In Bezug auf die eNOS-Aktivierung konnte bei den Theaflavinen im Vergleich zu den Catechinen eine höhere Potenz festgestellt werden (siehe Abb. 5 und 10). Bei der Stimulierung der eNOS war TF2A 1,5-fach, TF2B 3-fach und TF3 5-fach potenter als EGCG. TF1 hatte keine Wirkung, was eventuell daran liegen könnte, dass TF1 als einziges Theaflavin keine Gallatgruppe besitzt. TF3 besitzt dagegen als einziges Theaflavin zwei Gallatgruppen und war in diesen Versuchen am potentesten. Aus den in Kapitel 4.3 der hier vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen lässt sich schließen, dass die Umwandlung der Catechine in Theaflavine während des Fermentationsprozesses

deren biologische Aktivität nicht negativ beeinflusst, sondern eher noch verstärkt. Trotz der höheren Potenz der Theaflavine gegenüber den Catechinen hinsichtlich der eNOS-Aktivierung und der NO-abhängigen Vasodilatation sind sie, da sie nur in geringen Konzentrationen im schwarzen Tee vorhanden sind, vermutlich allein nicht ausreichend, um das Fehlen der Catechine im schwarzen Tee auszugleichen. Möglicherweise sind noch andere Teeinhaltsstoffe für die positiven kardiovaskulären Wirkungen des schwarzen Tees verantwortlich.

(2) Problem der Bioverfügbarkeit

Es existieren nur wenige Studien über den Plasmaspiegel von Theaflavinen beim Menschen. Dennoch konnte im Rahmen der Studie von Mulder et al., in der zwei gesunde Probanden 700 mg Theaflavine zu sich nahmen, was ca. 30 Tassen schwarzem Tee entsprach, nach zwei Stunden die höchste Plasmakonzentration von 1,0 µg/l per HPLC-Massenspektrometer gemessen werden. Inwiefern sich dieser Konsum auf die Gefäßfunktion auswirkte, wurde jedoch nicht untersucht. Außerdem wurde nicht zwischen den einzelnen Theaflavinen differenziert [99].

In Auswertung der hier vorliegenden Untersuchung muss festgestellt werden, dass, ähnlich wie bei den Catechinen, durch den Konsum von schwarzem Assam-Tee im Normalfall keine so hohen Konzentrationen der einzelnen Theaflavine im menschlichen Plasma erreicht werden, wie sie in den Zellkulturexperimenten eingesetzt wurden. Jedoch relaxierte TF3 bereits bei einer Konzentration von 0,2 µM die Rattenaortenringe. EGCG dagegen dilatierte die Aortenringe erst bei 1 µM und 2,5 µM (siehe Abb. 13). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Theaflavine eine wichtige Substanzgruppe im schwarzen Tee darstellen.

5.2.3 Thearubigine

Im schwarzen Tee entstehen neben den Theaflavinen durch den Fermentationsvorgang Thearubigine in großen Mengen.

Der Begriff Thearubigine bezieht sich auf eine heterogene Gruppe von Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten. Daher war es für die hier vorliegende Arbeit nicht möglich, die Substanz in Molarität anzugeben. Es existiert zudem keine anerkannte Methode für die Messung von Thearubiginkonzentrationen in schwarzem Tee [100]. Deshalb konnten die Thearubigine auch nicht in der Konzentration, wie sie im Assam-Tee vorzufinden wären, in den Versuchen eingesetzt werden. Die Thearubigine sind eine Fraktion, die per HPLC-Analyse nicht eindeutig quantifizierbar ist. Bekannt ist jedoch, dass Thearubigine ca. 60% der Teefeststoffe ausmachen. Sie werden für die typische rot-braune Farbe des schwarzen Tees verantwortlich gemacht [60]. Wie viele andere Substanzen aus dem Tee besitzen auch die Thearubigine antioxidative Eigenschaften [17, 101]. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit tragen auch sie zur biologischen Wirksamkeit des schwarzen Tees bei; sie führten in den vorliegenden Versuchen zu einer starken eNOS-Aktivität und Vasodilatation in Endothelzellen. Bisher gibt es neben Untersuchungen hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaften Studien zu antiklastogenen, antimutagenen, antikanzerogenen und antiinflammatorischen Eigenschaften der Thearubigine [102 – 105].

5.2.4 Weitere Teebestandteile

Um herauszufinden, inwiefern neben Catechinen, Theaflavinen und Thearubiginen noch andere Teeinhaltsstoffe an der in der Literatur beschriebenen biologischen Wirksamkeit des Teegetränkes beteiligt sind, wurden in der hier vorliegenden Arbeit weitere im grünen und schwarzen Assam-Tee vorkommende Bestandteile auf Aktivierung der eNOS getestet. Es wurden dabei Teeinhaltsstoffe gewählt, deren Konzentrationen per HPLC-Analyse bestimmt werden konnten: Caffein, Theobromin und Theogallin.

(1) Caffein

Wie in Kapitel 1.2 bereits erwähnt, hängt der Gehalt der Caffeine im Tee von mehreren Faktoren ab [14, 15]. Caffein besitzt ein relativ breites Wirkungsspektrum. Dieses Alkaloid, welches das zentrale Nervensystem stimuliert, den Puls steigert, die Organdurchblutung verbessert, zur Bronchodilatation führt, und die Harnbildung sowie die Darmperistaltik anregt [106], kommt sowohl im grünen als auch im schwarzen Tee vor. Somit ist zu vermuten, dass das Caffein einen Anteil an den günstigen kardiovaskulären Eigenschaften von grünem und schwarzem Tee hat. Chemisch ähnelt es dem Adenosin. Es besetzt dieselben Rezeptoren und wirkt somit als Antagonist. Daraus resultieren die meisten pharmakologischen Wirkungen von Caffein, v. a. die zentral erregende Wirkung [107]. Obwohl in einer Studie von Umemura et al. Untersuchungen auf eine endothelabhängige Vasodilatation durch einen Anstieg der NO-Produktion in den Blutgefäßen des Unterarms durch Caffein hindeuten [58], führte Caffein in der hier vorliegenden Arbeit zu keiner eNOS-Aktivierung. Somit muss diese Dilatation entweder auf einem anderen Mechanismus beruhen oder nur hohe Konzentrationen von Caffein, die jedoch nicht mehr physiologisch sind, aktivieren die eNOS in den Endothelzellen. Andere Studien weisen Caffein eher einen vasokontraktiven Effekt an Blutgefäßen des Armes zu [108]. Karatzis et al. stellten fest, dass die orale Zufuhr von Caffein an der Aorta zu höheren Blutdruckwerten führt, an peripheren Blutgefäßen jedoch keine Blutdruckänderung festzustellen ist [109]. So scheinen die Ergebnisse auch bei dieser Substanz auseinander zu gehen. Auch wenn Caffein einen vasodilatierenden Effekt haben sollte, so ist dieser Effekt vermutlich nicht über die Aktivierung der eNOS zurückzuführen. Eine Studie von Tabrizchi et al. zeigt, dass die Vasodilatation in Mesenterialgefäßen über Adenosin und seinen Adenosinrezeptor ausgelöst wird [110]. Daraus lässt sich ableiten, dass Caffein in diesem Fall eventuell als Agonist wirken könnte.

(2) Theobromin

Das Alkaloid Theobromin ist die unmittelbare Vorstufe von Caffein [111]. Ihm werden, ebenso wie Caffein, zentral erregende, gefäßdilatierende und entwässernde Eigenschaften zugeschrieben, die aber schwächer ausgeprägt sind [16, 106]. Zusätzlich besitzt Theobromin noch antitussive Eigenschaften [112]. Die für diese Arbeit interessan-

ten gefäßerweiternden Eigenschaften beziehen sich jedoch eher auf das Bronchialsystem. Dort wurde Theobromin wirksam auf seine bronchodilatierenden Eigenschaften bei Personen mit Asthma eingesetzt [113]. Es existieren jedoch keine Studien zu einem vasodilatierenden Effekt von Theobromin auf Endothelzellen. Ein anderes Methylxanthin-Derivat, Pentoxifyllin, führt jedoch zu dieser Relaxation [114]. In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte Theobromin in den BAEC die eNOS nicht stimulieren. Es kam eher zu einer Abnahme der eNOS-Aktivität. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Theobromin keinen Anteil an der Wirkung von Tee auf NO-Produktion in BAEC und Vasodilatation in isolierten Rattenaortenringen hat.

(3) Theogallin

Theogallin (Galloylchinasäure) ist ein Ester der Gallussäure, dessen Bestimmung in verschiedenen Teesorten eine Aussage über die Qualität zulässt [16]. Zu diesem Inhaltsstoff des Tees gibt es bisher sehr wenige Studien. Im Assam-Tee ist der Gehalt an Theogallin eher gering, denn die für diese Verbindung nötige Gallussäure kommt in dieser Teesorte zu 93% ungebunden vor [115]. Auch die Catechine EGCG und ECG sind mit Gallussäure verestert. So lag der Schluss nahe, dass ein Teil dieser chemischen Struktur für die biologische Wirksamkeit des Tees mitverantwortlich ist. Dies konnte in den Versuchen nicht gezeigt werden. Auch dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass sich ein komplexes Zusammenspiel der einzelnen Inhaltsstoffe aus dem Tee positiv auf den Körper auswirkt.

(4) Propyl Gallat

Um die Effekte von Gallat zu untersuchen, wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein Analogon (Propyl Gallat) eingesetzt, um herauszufinden, ob die Gallatgruppe Bedeutung bei der eNOS-Aktivierung hat. Wang et al. zeigten bereits, dass nur die Catechine mit einer Gallatgruppe biologisch aktiv sind und eine FS hemmen können. Um herauszufinden, ob dies an den Gallaten liegen könnte, untersuchten sie ein Analogon: Propyl Gallat, das auch die FS hemmte [59]. Daher lag es nahe, dass die Gallatgruppe für die gesundheitsfördernden Effekte der Polyphenole im Tee eine Rolle spielt, da auch nur die Catechine (ECG, EGCG) und Theaflavine (TF2A, TF2B, TF3) zu einer eNOS-

Aktivität und Vasodilatation führten, die eine oder mehrere Gallatgruppen in 3-Position bzw. 3'-Position am C-Ring besitzen. Propyl Gallat hatte jedoch in der hier vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität. Die Substanz besteht aus Gallussäure und Propanolon. Sie ist keine reine Gallatgruppe. Diese chemische Struktur könnte der Grund für die fehlende Wirkung der Substanz in diesem Versuch sein. D. h., dass die Gallatgruppe zwar biologisch aktiv ist, im Zusammenhang mit Propyl jedoch nicht. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Gallatgruppe, abhängig davon, in welcher Position und wie oft sie sich im Catechin- oder Theaflavingerüst befindet, einen wesentlichen Anteil an der positiven Auswirkung auf das kardiovaskuläre System besitzt.

Da die oben genannten Teebestandteile zu keiner eNOS-Aktivierung in den BAEC führten, wurde auf weitere Untersuchungen wie den Western Blot und die Vasodilatation in isolierten Rattenaortenringen verzichtet. Die hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass weder Caffein, Theobromin noch Theogallin einen protektiven Effekt auf die Endothelfunktion haben.

5.2.5 Polyphenolgemische

Nachdem die Untersuchungen von Caffein, Theobromin, Theogallin und Propyl Gallat zeigten, dass die Substanzen keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität haben, war zu prüfen, ob die hohe physiologische Wirksamkeit der Theaflavine im schwarzen Assam-Tee das Fehlen der Catechine kompensieren kann. Dabei konnten die Thearubigine nicht berücksichtigt werden, da sie wie oben bereits erwähnt, eine heterogene Gruppe von Substanzen mit verschiedenen Molekulargewichten darstellen.

Wie unter Kapitel 4.5 beschrieben, wurden zwei Polyphenolgemische mit den Konzentrationen der Catechine und Theaflavine hergestellt, wie sie auch im Originalteegetränk zu finden sind. Die Polyphenolgemische erreichten nicht die biologische Aktivität der Original Assam-Teegetränke. Dies führt zu der Annahme, dass noch weitere, bisher unbekannte Substanzen aus dem Tee für die biologische Wirksamkeit des Tees mit verantwortlich sind. Negishi et al. untersuchten, ob die Polyphenole aus grünem oder aus schwarzem Tee den Blutdruck in spontan hypertensiven Ratten mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko effektiver senken. Das Polyphenolgemisch aus dem grünen Tee be-

stand aus Wasser, Catechinen, Flavonolen und polymerischen Flavonoiden. Das Polyphenolgemisch aus dem schwarzen Tee setzte sich dagegen aus Wasser, Thearubiginen, Theaflavinen, Flavonolen und einem kleinen Teil Catechinen zusammen. Beide Gemische senkten den Blutdruck gleich stark [116]. Auf der einen Seite beweisen die Ergebnisse von Negishi et al., dass das Polyphenolgemisch aus dem schwarzen Tee im Vergleich mit dem Polyphenolgemisch des grünen Tees gleich effektiv ist. Auf der anderen Seite werden die Polyphenole im Ganzen betrachtet und nicht differenziert. Werden die beiden Teesorten wie in der hier vorliegenden Arbeit jedoch hinsichtlich einzelner bekannter biologisch aktiver Polyphenole (Catechine und Theaflavine) verglichen und ein individuelles Polyphenolgemisch (= PG A und B) kreiert, können die von Negishi et al. gefundenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. In der hier vorliegenden Arbeit war das PG A potenter als das PG B. Somit lässt sich vermuten, dass neben Catechinen und Theaflavinen noch weitere Polyphenole einen wesentlichen Teil zu den vasodilatierenden Eigenschaften von Tee beitragen. Bisher sind keine genauen Zahlen über die Inhaltsstoffe aus dem Tee bekannt. Sano et al. konnten per HPLC-Analyse allein 12 verschiedene Catechine und deren Derivate aus dem Tee differenzieren [117]. Auch bei den Theaflavinen gibt es mindestens 12 Verbindungen [21]. Die Chemie von Tee ist somit sehr komplex. Es könnten noch viele andere Teebestandteile eine NO-Produktion und Vasodilatation in Endothelzellen auslösen. Diese sind jedoch nach heutigem Forschungsstand noch nicht quantifizierbar. Ein anderer wichtiger Grund für die geringe Wirksamkeit der beiden Polyphenolgemische auf die NO-Produktion und Vasodilatation könnte wahrscheinlich an der kurzen Halbwertszeit der Catechine und Theaflavine im Zellkulturmedium und Puffer liegen [118, 119]. Tee enthält sehr viele Antioxidantien, die die biologisch aktiven Komponenten gegen schnelle Oxidation schützen können. Diese sind in den Polyphenolgemischen nicht vertreten und die biologisch aktiven Komponenten hatten keinen Schutz vor Oxidation. Es ist daher zu diskutieren, ob ein synthetisch hergestellter Tee mit allen bisher identifizierten Bestandteilen eine andere Wirkung auf die in Kapitel 4.5 durchgeführten Experimente in dieser Arbeit gehabt hätte. Andere Inhaltsstoffe aus dem Tee wurden nicht berücksichtigt, weil es zu prüfen galt, ob die Theaflavine, die während der Fermentation bei der Herstellung von schwarzem Tee aus den Catechinen entstehen, das Fehlen der Catechine in diesem Tee kompensieren können. Dies war nicht der Fall und lässt darauf schließen, dass außer den Catechinen

und Theaflavinen noch andere wichtige Inhaltsstoffe, wie beispielsweise die Thearubigine, zu den positiven kardiovaskulären Eigenschaften des schwarzen Tees beitragen.

5.3 Fazit der Diskussion

Trotz nicht einheitlicher epidemiologischer Ergebnisse bezüglich der kardiovaskulären Wirkungen des schwarzen Tees geht aus dieser Arbeit hervor, dass stark fermentierter schwarzer Assam-Tee eine vergleichbare Wirkung auf das Gefäßsystem hat wie grüner Assam-Tee. Mit den Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Theaflavine und Thearubigine aus dem schwarzen Tee den Mangel an Catechinen im schwarzen Assam-Tee größtenteils ausgleichen. Die Bedeutsamkeit der Untersuchungsergebnisse resultiert aus der Tatsache, dass weltweit mehr schwarzer Tee, insbesondere in Europa, Nord Amerika und Nord Afrika [120], getrunken wird als grüner Tee.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Untersuchung liefert die ersten experimentellen Beweise, dass stark fermentierter schwarzer Tee im Vergleich zu grünem Tee im Hinblick auf die Induktion der NO-Produktion in Endothelzellen und Vasodilatation in Aortenringen eine vergleichbare Potenz aufweist.

Grüner und schwarzer Assam-Tee führten zu einer vergleichbaren konzentrationsabhängigen Vasorelaxation in vorkontrahierten Rattenaortenringen. Diese konnte durch Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NAME vollständig verhindert werden. Dies deutet auf eine NO-abhängige Vasodilatation hin. In Zellkulturexperimenten mit BAEC zeigte sich, dass beide Teesorten dosisabhängig die eNOS aktivieren, wobei der schwarze Tee eine geringfügig höhere Potenz aufwies. Im Western Blot zeigten beide Teegetränke eine etwa gleich starke Phosphorylierung der eNOS an Ser¹¹⁷⁹, die zu einer Aktivierung des Enzyms führt. Bei der Analyse der individuellen Teecatechine auf ihre Effekte auf die zelluläre NO-Produktion aktivierte EGCG die eNOS am stärksten, wohingegen ECG das Enzym nur leicht stimulierte. Sowohl im Western Blot als auch bei der Aortenrelaxation besaß ECG im Vergleich zu EGCG einen geringeren Effekt. Bei allen untersuchten Wirkungen (eNOS-Aktivität, eNOS-Phosphorylierung und Vasodilatation) zeigten die anderen Catechine keinerlei Effekte. Im schwarzen Tee werden die Catechine nach der Fermentation in Theaflavine umgewandelt. Von den individuellen Theaflavinen im schwarzen Tee ergab sich bei der Wirkung auf NO-Produktion, eNOS-Phosphorylierung und Vasodilatation folgende Reihenfolge: TF3 > TF2B > TF2A. TF1 dagegen bewirkte keine Steigerung der NO-Produktion oder Induktion einer Vasodilatation. Weitere Inhaltsstoffe des grünen und schwarzen Tees, wie Caffein, Theobromin und Theogallin, hatten keinen Einfluss auf die eNOS-Aktivität. Deswegen wurde auf weitere Versuche zum Nachweis einer Phosphorylierung und Vasodilatation verzichtet. Die in anschließenden Versuchen getesteten Polyphenolgemische aus grünem und schwarzem Tee (PG A enthielt nur Catechine und Wasser und PG B Theaflavine, die nicht oxidierten restlichen Catechine und Wasser) zeigten eine Aktivierung der eNOS, die beim PG A stärker ausgeprägt war. Ein vergleichbares Ergebnis wurde auf eNOS-Phosphorylierung und Aortenrelaxation beobachtet. Darüber hinaus bewirkten die Thearubigine, die während der Fermentation neben Theaflavinen entstehen, einen potenten konzentrationsabhängigen Anstieg der eNOS-Aktivität in Endothelzellen. Im Western

Blot zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁹ nach Behandlung der Zellen mit dieser Substanzgruppe. Thearubigine relaxierten zudem konzentrationsabhängig die Rattenaortenringe mit starker Potenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wesentliche Inhaltsstoffe identifiziert, die zu den endothelverbessernden Effekten von grünem und schwarzem Tee beitragen. Eine starke Differenzierung zwischen grünem und schwarzem Tee in Bezug auf die Wirkung der Tees auf Endothelfunktion ist nicht gerechtfertigt. Inwiefern noch andere Inhaltsstoffe an der biologischen Wirksamkeit von Tee beteiligt sind, muss in Zukunft weiter untersucht werden. Die Tatsache, dass weltweit der Teekonsum hauptsächlich aus schwarzem Tee besteht, unterstreicht die Bedeutung dieser Ergebnisse im Hinblick auf die beschriebenen kardiovaskulär-protektiven Effekte des Tees.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A. brachialis	Arteria brachialis
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium persulfate
BAEC	Bovine aortic endothelial cells (bovine Aortenendothelzellen)
BCA	Bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
Ca ²⁺	Calciumionen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
³ H	Tritium
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechin-3-gallate
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic-acid
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechin-3-gallate
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase (endotheliale Nitritoxidsynthase)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetal calf serum
FMN	Flavinmononukleotid
FS	Fettsäure-Synthase
GT	Grüner Assam-Tee
H ₂ O	Wasser

HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRS	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Hsp90	Heat-shock proteine 90 (Hitzeschockprotein 90)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (induzierbare Nitritoxidsynthase)
IP ₃	Inositoltrisphosphat
IRAG	IP ₃ receptor associated cGMP kinase substrate
K	Kontrolle
K ⁺	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄ ⁻	Kaliumdihydrogencarbonat
LDL	Low density lipoprotein
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Argininmethylester
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginin
mA	Milliamper
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃ ⁻	Natriumhydrogencarbonat
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NBT	Nitro blue tetrazolium
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase (neuronale Nitritoxidsynthase)
NO	Stickstoffmonoxid

NOS	Nitric oxide synthase (Nitritoxidsynthase)
O ₂	Molekularer Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PG A	Polyphenolgemisch A
PG B	Polyphenolgemisch B
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKG I	Proteinkinase G I
ppm	Parts per million = 10 ⁻⁶ (Teile pro Million)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rest
RRF	Relative response factors (relative Responsefaktoren)
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler)
Ser	Serin
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
ST	Schwarzer Assam-Tee
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
TF1	Theaflavin
TF2A	Theaflavin-3-monogallate
TF2B	Theaflavin-3`-monogallate
TF3	Theaflavin-3,3`-digallate
U	Units
VECAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	Watt
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Körner M. German tea market: high standards, moderate consumption. *Tea & Coffee Trade Journal* 2007;179.
2. Riemersma RA, Rice-Evans CA, Tyrrell RM, Clifford MN, Lean MEJ. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM* 2001;94:277-82.
3. Stensvold I, Tverdal A, Solvoll K, Foss OP. Tea consumption. Relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality. *Prev Med* 1992;21:546-53.
4. Mukamal KJ, Maclure M, Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA. Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 2002;105:2476-81.
5. Sano J, Inami S, Seimiya K, et al. Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circ J* 2004;68:665-70.
6. Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HA, Witteman JC. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. *Arch Intern Med* 1999;159:2170-4.
7. Sumpio BE, Cordova AC, Berke-Schlessel DW, Qin F, Chen QH. Green tea, the "Asian paradox", and cardiovascular disease. *J Am Coll Surg* 2006;202:813-25.
8. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA* 2006;296:1255-65.
9. Duffy SJ, Keaney JF Jr, Holbrook M, et al. Short- and long-term black tea consumption reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001;104:151-6.
10. Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Watts GF, Beilin LJ. Regular ingestion of black tea improves brachial artery vasodilator function. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:195-201.
11. Jochmann N, Lorenz M, Krosigk A, et al. The efficacy of black tea in ameliorating endothelial function is equivalent to that of green tea. *Br J Nutr* 2008;99:863-8.
12. Peters U, Poole C, Arab L. Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2001;154:495-503.
13. Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *J Epidemiol Community Health* 1999;53:481-7.

14. Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997;37:693-704.
15. Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 1992;21:334-50.
16. Ternes W, Täufel A, Tunger L, Zobel M: *Lebensmittel-Lexikon*, Hamburg 2005
17. Menet MC, Sang S, Yang CS, Ho CT, Rosen RT. Analysis of theaflavins and thearubigins from black tea extract by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2004;52:2455-61.
18. Engelhardt UH. Grüner und schwarzer Tee – Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *W.I.T.* 1999;2:1-8.
19. Stangl V, Lorenz M, Stangl K. The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Mol Nutr Food Res* 2006;50:218-28.
20. Chen D, Milacic V, Chen MS, et al. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol* 2008;23:487-96.
21. Engelhardt UH. Polyphenole im Tee. *W.I.T.* 1998;1:1-10.
22. Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr* 2003;133:3248S-54S.
23. Huang Y, Zhang A, Lau CW, Chen ZY. Vasorelaxant effects of purified green tea epicatechin derivatives in rat mesenteric artery. *Life Sci* 1998;63:275-83.
24. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, et al. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem* 2004;279:6190-5.
25. Subramanian N, Venkatesh P, Ganguli S, Sinkar VP. Role of polyphenol oxidase and peroxidase in the generation of black tea theaflavins. *J Agric Food Chem* 1999;47:2571-8.
26. Henning SM, Niu Y, Lee NH, et al. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1558-64.
27. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea – a review. *J Am Coll Nutr* 2006;25:79-99.
28. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2003;10:63-71.
29. Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *J Kardiol* 2002;9:556-62.

30. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15:265-79.
31. Crowther MA. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005;436-41.
32. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26:33-65.
33. Debette S, Courbon D, Leone N, et al. Tea consumption is inversely associated with carotid plaques in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:353-9.
34. Koolmann, Jan und Röhm, Klaus-Heinrich: Taschenatlas der Biochemie, Stuttgart 2003.
35. Müller S, Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotektion durch vaskuläres NO. Molekulare Grundlagen antiatherosklerotischer Wirkungen. *Med Monatsschr Pharm* 2002;25:45-51.
36. Klinke, Rainer und Silbernagl, Stefan: Lehrbuch der Physiologie, Stuttgart 2003.
37. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
38. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
39. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:9265-9.
40. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006;147:193-201.
41. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994;89:2035-40.
42. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995;377:239-42.
43. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-5.
44. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995;76:980-6.

45. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9114-9.
46. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993;268:12231-4.
47. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
48. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991;266:6259-63.
49. Hemmens B, Meyer B. Enzymology of nitric oxide synthases. In: Titherage MA, eds. *Methods in molecular biology*. Vol. 100. Nitric Oxide Protocols Totowa, New Jersey 1998, S.1-32.
50. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994;269:13725-8.
51. Boo YC, Hwang J, Sykes M, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser⁶³⁵ by a protein kinase A-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:1819-28.
52. Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2001;276:17625-8.
53. Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF Jr. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem* 2004;279:46637-43.
54. Welsch, Ulrich: *Lehrbuch Histologie*, Jena 2003.
55. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, et al. Mechanism of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 2000;87:825-30.
56. Salerno L, Sorrenit V, Di Giacomo C, Romeo G, Siracusa MA. Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr Pharm Des* 2002;8:177-200.
57. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit* 2003;9:325-30.
58. Umemura T, Ueda K, Nishioka K, et al. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *Am J Cardiol* 2006;98:1538-41.
59. Wang X, Song KS, Guo QX, Tian WX. The galloyl moiety of green tea catechins is the critical structural feature to inhibit fatty-acid synthase. *Biochem Pharmacol* 2003;66:2039-47.

60. Haslam E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* 2003;64:61-73.
61. Jochmann N, Baumann G, Stangl V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:758-65.
62. Sato Y, Nakatsuka H, Watanabe T, et al. Possible contribution of green tea drinking habits to the prevention of stroke. *Tohoku J Exp Med* 1989;157:337-43.
63. Nakachi K, Matsuyama S, Miyake S, Suganuma M, Imai K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Biofactors* 2000;13:49-54.
64. Sasazuki S, Kodama H, Yoshimasu K, et al. Relation between green tea consumption and the severity of coronary atherosclerosis among Japanese men and women. *Ann Epidemiol* 2000;10:401-8.
65. Iwai N, Ohshiro H, Kurozawa Y, et al. Relationship between coffee and green tea consumption and all-cause mortality in a cohort of a rural Japanese population. *J Epidemiol* 2002;12:191-8.
66. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993;342:1007-11.
67. Sesso HD, Gaziano JM, Burning JE, Hennekens CH. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol* 1999;149:162-7.
68. Hakim IA, Alsaif MA, Alduwaihy M, Al-Rubeaan K, Al-Nuaim AR, Al-Attas OS. Tea consumption and the prevalence of coronary heart disease in Saudi adults: results from a Saudi national study. *Prev Med* 2003;36:64-70.
69. Sesso HD, Paffenbarger RS Jr, Oguma Y, Lee IM. Lack of association between tea and cardiovascular disease in college alumni. *Int J Epidemiol* 2003;32:527-33.
70. Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1489-94.
71. Lorenz M, Jochmann N, von Krosigk A, et al. Addition of milk prevents vascular protective effects of tea. *Eur Heart J* 2007;28:219-23.
72. Kyle JA, Morrice PC, McNeill G, Duthie GG. Effects of infusion time and addition of milk on content and absorption of polyphenols from black tea. *J Agric Food Chem* 2007;55:4889-94.
73. Hakim IA, Hartz V, Harris RB, et al. Reproducibility and relative validity of a questionnaire to assess intake of black tea polyphenols in epidemiological studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:667-78.

74. Mukamal KJ, MacDermott K, Vinson JA, Oyama N, Manning WJ, Mittleman MA. A 6-month randomized pilot study of black tea and cardiovascular risk factors. *Am Heart J* 2007;154:724.e1-6.
75. Bingham SA, Vorster H, Jerling JC, et al. Effect of black tea drinking on blood lipids, blood pressure and aspects of bowel habit. *Br J Nutr* 1997;78:41-55.
76. Yokozawa T, Dong E, Nakagawa T, Kim DW, Hattori M, Nakagawa H. Effects of Japanese black tea on atherosclerotic disorders. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62:44-8.
77. Gardner EJ, Ruxton CH, Leeds AR. Black tea – helpful or harmful? A review of the evidence. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:3-18.
78. Widlansky ME, Hamburg NM, Anter E, et al. Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Nutr* 2007;26:95-102.
79. Stangl V, Dreger H, Stangl K, Lorenz M. Molecular targets of tea polyphenols in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2007;73:348-58.
80. Caturla N, Vera-Samper E, Villalaín J, Mateo CR, Micol V. The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes. *Free Radic Biol Med* 2003;34:648-62.
81. Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, et al. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J Nutr* 2005;135:155-9.
82. Bigelow RL, Cardelli JA. The green tea catechins, (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and (-)-Epicatechin-3-gallate (ECG), inhibit HGF/Met signaling in immortalized and tumorigenic breast epithelial cells. *Oncogene* 2006;25:1922-30.
83. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1025-32.
84. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:243S-55S.
85. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005;81:230S-42S.
86. Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001;131:1731-7.

87. Yang CS, Chen L, Lee MJ, Balentine D, Kuo MC, Schantz SP. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7:351-4.
88. Ullmann U, Haller J, Decourt JD, Girault J, Spitzer V, Weber P. Plasma-kinetic characteristics of purified and isolated green tea catechin epigallocatechin gallate (EGCG) after 10 days repeated dosing in healthy volunteers. *Int J Vitam Nutr Res* 2004;74:269-78.
89. Xie B, Shi H, Chen Q, Ho CT. Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 1993;17:77-84.
90. Shiraki M, Hara Y, Osawa T, Kumon H, Nakayama T, Kawakishi S. Antioxidative and antimutagenic effects of theaflavins from black tea. *Mutat Res* 1994;323:29-34.
91. Miller NJ, Castelluccio C, Tijburg L, Rice-Evans C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters - radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett* 1996;392:40-4.
92. Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 2001;131:2248-51.
93. Liu S, Lu H, Zhao Q, et al. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim Biophys Acta* 2005;1723:270-81.
94. Liang YC, Chen YC, Lin YL, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Suppression of extracellular signals and cell proliferation by the black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate. *Carcinogenesis* 1999;20:733-6.
95. Okubo S, Toda M, Hara Y, Shimamura T. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against *Trichophyton*. *Nippon Saikingaku Zasshi* 1991;46:509-14.
96. Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Nippon Saikingaku Zasshi* 1991;46:839-45.
97. Chosa H, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Antimicrobial and microbicidal activities of tea and catechins against *Mycoplasma*. *Kansenshogaku Zasshi* 1992;66:606-11.
98. Nakayama M, Suzuki K, Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res* 1993;21:289-99.

99. Mulder TP, van Platerink CJ, Wijnand Schuyt PJ, van Amelsvoort JM. Analysis of theaflavins in biological fluids using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;760:271-9.
100. Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem* 2000;48:2848-52 .
101. Halder J, Bhaduri AN. Protective role of black tea against oxidative damage of human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:903-7.
102. Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK. Inhibition of benzo[a]pyrene induced mutagenicity and genotoxicity by black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in multiple test systems. *Food Chem Toxicol* 2005;43:591-7.
103. Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK. Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 2006;20:608-13.
104. Maity S, Ukil A, Karmakar S, et al. Thearubigin, the major polyphenol of black tea, ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 2003;470:103-12.
105. Das M, Chaudhuri T, Goswami SK, et al. Studies with black tea and its constituents on leukemic cells and cell lines. *J Exp Clin Cancer Res* 2002;21:563-8.
106. Donovan JL, DeVane CL. A primer on caffeine pharmacology and its drug interactions in clinical psychopharmacology. *Psychopharmacol Bull* 2001;35:30-48.
107. Fredholm BB. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 1995;76:93-101.
108. Papamichael CM, Aznaouridis KA, Karatzis EN, et al. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:55-60.
109. Karatzis E, Papaioannou TG, Aznaouridis K, et al. Acute effects of caffeine on blood pressure and wave reflections in healthy subjects: should we consider monitoring central blood pressure. *Int J Cardio* 2005;98:425-30.
110. Tabrizchi R, Lupichuk SM. Vasodilatation produced by adenosine in isolated rat perfused mesenteric artery: a role for endothelium. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1995;352:412-8.
111. Suzuki T, Takahashi E. Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts. Enzymic formation of theobromine from 7-methylxanthine and of caffeine from theobromine. *Biochem J* 1975;146:87-96.

112. Usmani OS, Belvisi MG, Patel HJ, et al. Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J* 2005;19:231-3.
113. Simons FE, Becker AB, Simons KJ, Gillespie CA. The bronchodilator effect and pharmacokinetics of theobromine in young patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1985;76:703-7.
114. Berkenboom G, Fang ZY, Unger P, Goldman M, Fontaine J. Endothelium-dependent effects of pentoxifylline in rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1991;193:81-6.
115. Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 2001;131:1207-10.
116. Negishi H, Xu JW, Ikeda K, Njelekela M, Nara Y, Yamori Y. Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2004;134:38-42.
117. Sano M, Tabata M, Suzuki M, Degawa M, Miyase T, Maeda-Yamamoto M. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst* 2001;126:816-20.
118. Hong J, Lu H, Meng X, Ryu JH, Hara Y, Yang CS. Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62:7241-46.
119. Jhoo JW, Lo CY, Li S, et al. Stability of black tea polyphenol, theaflavin, and identification of theanaphthoquinone as its major radical reaction product. *J Agric Food Chem* 2005;53:6146-50.
120. Cabrera C, Giménez R, López MC. Determination of tea components with antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2003;51:4427-35.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Professor Dr. med Gert Baumann für die Möglichkeit der Arbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie, Charité, Campus Mitte.

Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl für die Vergabe dieses Themas.

Dr. rer. nat. Mario Lorenz für seine geduldige Betreuung und das Erwecken meines wissenschaftlichen Interesses mit ständigen Anregungen zu neuen Überlegungen und Diskussionen.

Angelika Vietzke, Kerstin Daemen, Wanda Michaelis, Thomas Düsterhoff, Angela Zepp und anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Kardiologischen Forschungslabors für das Beibringen der Methoden, die zuverlässige Hilfe und die nützlichen Tipps.

Und meiner Familie (speziell meinen Eltern), die mein Vorhaben stets unterstützt, mich immer wieder neu motiviert haben und denen ich die Möglichkeit zur Absolvierung meines Studiums überhaupt verdanke.

Des Weiteren danke ich Viola, auf die ich mich in jeder Situation verlassen kann und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite steht.

ERKLÄRUNG

„Ich, Janka Urban, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‘Vergleich von grünem und schwarzem Tee auf NO-Produktion und Endothelfunktion’ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 22.02.2009

LEBENS LAUF

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

PUBLIKATIONSLISTE

Lorenz M, Urban J, Engelhardt U, Baumann G, Stangl K, Stangl V. Green and black tea are equally potent stimuli of NO production and vasodilatation: new insights into tea ingredients involved. *Basic Res Cardiol* 2009;104:100-10.