

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. Rainer H. Böger

***Optimierung des NO-Redox-Gleichgewichtes
mittels pflanzlicher Extrakte***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Chemie

der Universität Hamburg

vorgelegt von

Felix Schönfeldt

Hamburg, Februar 2017

Gutachter/in: Prof. Dr. Elke Oetjen

Prof. Dr. Rainer H. Böger

Tag der Disputation: 05. Mai 2017

*In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.*

Sir Isaac Newton

Meiner Familie

1	Einleitung	1
1.1	Endothel.....	3
1.2	Stickstoffmonoxid	5
1.2.1	NO-Stoffwechsel	6
1.2.2	Endotheliale Dysfunktion.....	7
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies	9
1.3.1	Entstehung und Produktion	10
1.3.2	Pathophysiologische Bedeutung	11
1.3.3	Abwehrmechanismen.....	12
1.3.4	Oxidativer Stress.....	14
1.4	Sekundäre Pflanzenstoffe	16
1.5	Fragestellung und Ziel der Arbeit	18
2	Methoden und Materialien	19
2.1	Zellkultur	19
2.1.1	Kultivierung von EA.hy 926 Zellen.....	19
2.1.2	Auftauen und Einfrieren von EA.hy 926 Zellen	20
2.1.3	Zellen zählen.....	20
2.1.4	Vorbereitung der Experimente.....	21
2.2	Extrakte.....	22
2.3	mRNA-Analytik.....	24
2.3.1	mRNA-Isolierung.....	24
2.3.2	Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA.....	25
2.3.3	Quantitative Real-time PCR	25

2.4	Protein-Analytik.....	27
2.4.1	Proteinisolierung	28
2.4.2	Western Blot	28
2.4.2.1	Probenaufbereitung	28
2.4.2.2	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
2.4.2.3	Proteintransfer	29
2.4.2.4	Immunoblot	30
2.4.2.5	Detektion	31
2.5	Nitrit-Messung.....	31
2.5.1	Inkubation mit Arginin-enthaltendem Medium.....	32
2.5.2	Inkubation mit L-Arginin-Supplementation.....	33
2.6	Messung der reaktiven Sauerstoffspezies.....	34
2.6.1	Intrazelluläre ROS.....	35
2.6.2	Extrazelluläre ROS.....	36
2.7	Substanzen und Reagenzien	37
2.8	Extrakte und Einzelkomponenten.....	41
2.9	Lösungen und Puffer.....	43
2.10	Kits.....	47
2.11	Antikörper.....	47
2.12	Verbrauchsmaterial und weitere Hilfsmittel.....	48
2.13	Laborgeräte.....	50
2.14	Software.....	52
3	Ergebnisse	53

3.1	Einzelextrakte	53
3.1.1	Artischocke	54
3.1.2	Grüner Tee.....	58
3.1.3	Ingwer	61
3.1.4	Japanischer Staudenknöterich	63
3.1.5	Kleines Fettblatt	66
3.1.6	Knoblauch (Pulver).....	69
3.1.7	Knoblauch (Öl)	72
3.1.8	Kurkuma	74
3.1.9	Mariendistel.....	77
3.1.10	Rosmarin.....	80
3.1.11	Weißdorn (Blätter).....	83
3.1.12	Weißdorn (Blüten/Blätter).....	85
3.1.13	Coenzym Q1	87
3.1.14	Coenzym Q10.....	89
3.1.15	Zusammenfassung.....	91
3.2	Kombinationen	93
3.2.1	mRNA-Expression.....	93
3.2.2	Protein-Expression.....	97
3.2.2.1	Zusammenfassung.....	99
3.2.3	NO-Produktion	100
3.2.3.1	Inkubation mit Arginin-enthaltendem Medium	101
3.2.3.1.1	Bradykinin.....	101

3.2.3.1.2	Calcium-Ionophor	104
3.2.3.1.3	Zusammenfassung	106
3.2.3.2	Inkubation mit L-Arginin-Supplementation	107
3.2.3.2.1	Bradykinin.....	107
3.2.3.2.2	Calcium-Ionophor	111
3.2.3.2.3	Zusammenfassung	115
3.2.4	ROS-Abbau.....	116
3.2.4.1	Intrazelluläre ROS	116
3.2.4.2	Extrazelluläre ROS.....	120
3.2.4.3	Zusammenfassung.....	123
4	Diskussion.....	124
4.1	Allgemein	124
4.2	Extrakte.....	126
4.2.1	Artischocke	126
4.2.2	Grüner Tee.....	127
4.2.3	Ingwer	128
4.2.4	Japanischer Staudenknöterich	129
4.2.5	Kleines Fettblatt	131
4.2.6	Knoblauch.....	131
4.2.7	Kurkuma	133
4.2.8	Mariendistel.....	134
4.2.9	Rosmarin.....	134
4.2.10	Weißdorn	136

4.2.11	Coenzym Q1	137
4.2.12	Coenzym Q10	138
4.3	Kombinationen	140
4.3.1	Allgemein	140
4.3.2	mRNA-Expression.....	140
4.3.3	Protein-Expression.....	141
4.3.4	NO-Produktion	142
4.3.5	ROS-Abbau.....	144
4.3.6	Schlussfolgerung.....	146
4.4	Ausblick	147
5	Zusammenfassung.....	148
6	Summary.....	149
7	Anhang.....	150
7.1	Literaturverzeichnis	150
7.2	Abkürzungsverzeichnis	167
7.3	H- und P-Sätze des GHS	171
7.4	Lebenslauf	181
7.5	Veröffentlichungen	181
7.6	Erklärung.....	182
7.7	Danksagung.....	183

Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion als Verbindung zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Atherosklerose.	2
Abbildung 2: Physiologische Effekte des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid.	5
Abbildung 3: Synthese von Stickstoffmonoxid durch die endotheliale NO-Synthase.	7
Abbildung 4: Enzymatischer Abbau des Superoxid-Anions.	13
Abbildung 5: Balance zwischen oxidativen sowie antioxidativen Kräften.	15
Abbildung 6: Aufnahme der EA.hy 926 Zellen.	19
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Abfolge der verschiedenen Lagen des Blottes.	30
Abbildung 8: Reaktion von Diaminonaphthalin mit Nitrit.	32
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Bestimmung der Arginin-unabhängigen NO-Produktion.	33
Abbildung 10: Schematische Darstellung des modifizierten Versuchsablaufs zur Bestimmung der Arginin-abhängigen NO-Produktion.	33
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Bestimmung des Abbaus der ROS.	34
Abbildung 12: Bildung von ROS durch DMNQ.	35
Abbildung 13: Bildung von ROS durch Xanthin-Oxidase.	36
Abbildung 14: Einfluss des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	54
Abbildung 15: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	55
Abbildung 16: Einfluss von Cynarin als Einzelkomponente des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA.	56
Abbildung 17: Einfluss des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA und Proteinen.	58
Abbildung 18: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA und Proteinen.	59

Abbildung 19: Einfluss von Catechin und EGCG als Einzelkomponente des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA.	60
Abbildung 20: Einfluss des Ingwer-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	61
Abbildung 21: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Ingwer-Extraktes auf die Expression von Proteinen.	62
Abbildung 22: Einfluss des Extraktes des Japanischen Staudenknöterichs auf die Expression von mRNA und Proteinen.	63
Abbildung 23: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Japanischen Staudenknöterichs auf die Expression von mRNA und Proteinen.	64
Abbildung 24: Einfluss des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	66
Abbildung 25: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA.	67
Abbildung 26: Einfluss von Bacoside A als Einzelkomponente des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA.	68
Abbildung 27: Einfluss des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA und Proteinen.	69
Abbildung 28: Konzentrationsabhängiger Einfluss des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA.	70
Abbildung 29: Einfluss von Alliin als Einzelkomponente des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA.	70
Abbildung 30: Einfluss des öligen Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA und Proteinen.	72
Abbildung 31: Konzentrationsabhängiger Einfluss des öligen Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von Proteinen.	73
Abbildung 32: Einfluss des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	74
Abbildung 33: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.	75

Abbildung 34: Einfluss von Curcumin als Einzelkomponente des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA.	76
Abbildung 35: Einfluss des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	77
Abbildung 36: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA.	78
Abbildung 37: Einfluss von Silymarin als Einzelkomponente des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA.....	79
Abbildung 38: Einfluss des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	80
Abbildung 39: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA.	81
Abbildung 40: Einfluss von Carnosolsäure als Einzelkomponente des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA.....	82
Abbildung 41: Einfluss des Extraktes der Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	83
Abbildung 42: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes der Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA.....	84
Abbildung 43: Einfluss des Extraktes der Blüten und Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA und Proteinen.	85
Abbildung 44: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes der Blüten und Blätter des Weißdorns auf die Expression von Proteinen.	86
Abbildung 45: Einfluss von Coenzym Q1 auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	87
Abbildung 46: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Coenzym Q1 auf die Expression von Proteinen.....	88
Abbildung 47: Einfluss von Coenzym Q10 auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	89
Abbildung 48: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Coenzym Q10 auf die Expression von Proteinen.....	90

Abbildung 49: Heatmap der Effekte der einzelnen Extrakte auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	91
Abbildung 50: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von mRNA.	93
Abbildung 51: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von mRNA.	95
Abbildung 52: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von Proteinen.....	97
Abbildung 53: Heatmap der Effekte der einzelnen Kombinationen auf die Expression von mRNA und Proteinen.....	99
Abbildung 54: Forcierung der NO-Produktion durch Bradykinin.....	101
Abbildung 55: Effekt der Kombinationen auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion.	102
Abbildung 56: Forcierung der NO-Produktion durch Calcium-Ionophor A23187.	104
Abbildung 57: Effekt der Kombinationen auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion.	105
Abbildung 58: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die NO-Produktion.....	106
Abbildung 59: Einfluss von L-Arginin auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion.	107
Abbildung 60: Kombiniertes Effekt von L-Arginin und Resveratrol auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion.....	108
Abbildung 61: Effekt der Kombinationen auf die Bradykinin-forcierte L-Arginin-abhängige NO-Produktion.....	109
Abbildung 62: Einfluss von L-Arginin auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion....	111
Abbildung 63: Kombiniertes Effekt von L-Arginin und Resveratrol auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion.....	112
Abbildung 64: Effekt der Kombinationen auf die Calcium-Ionophor-forcierte L-Arginin-abhängige NO-Produktion.....	113
Abbildung 65: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die L-Arginin-abhängige NO-Produktion.....	115
Abbildung 66: Intrazelluläre ROS-Produktion mittels DMNQ.....	116

Abbildung 67: Effekt von Resveratrol auf die intrazelluläre ROS-Reduktion.	117
Abbildung 68: Effekt der Kombinationen auf die intrazelluläre ROS-Reduktion.....	118
Abbildung 69: Effekt von Resveratrol auf die extrazelluläre ROS-Reduktion.	120
Abbildung 70: Effekt der Kombinationen auf die extrazelluläre ROS-Reduktion.....	121
Abbildung 71: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die ROS-Reduktion.	123

Tabelle 1: Übersicht der vom Endothel beeinflussten dynamischen Gleichgewichte.	4
Tabelle 2: Übersicht der Einteilung der reaktiven Sauerstoffspezies in radikalische und nicht-radikalische ROS anhand einiger Vertreter.	9
Tabelle 3: Übersicht physiologischer Prozesse mit Beteiligung von ROS.	10
Tabelle 4: Übersicht pathophysiologischer Prozesse mit Beteiligung von ROS.	11
Tabelle 5: Übersicht der Wirkungen der unterschiedlichen Gruppen der sekundären Pflanzenstoffe	17
Tabelle 6: Übersicht der Anzahl der ausgesäten Zellen.	21
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Extrakte.	22
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Konzentrationen der Extrakte und deren Lösungsmittel.	23
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsmixes.	25
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten TaqMan-Primer.	27
Tabelle 11: Ablauf der PCR.	27
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörper.	31
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Substanzen und Reagenzien.	40
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Extrakte und Einzelkomponenten.	42
Tabelle 15: Übersicht der hergestellten Puffer und Lösungen.	46
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Kits.	47
Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Antikörper.	47
Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie weiterer Hilfsmittel.	49
Tabelle 19: Übersicht der verwendeten Laborgeräte.	51
Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Software.	52
Tabelle 21: Liste der getesteten Enzyme und deren Bedeutung für das NO-Redox-Gleichgewicht.	53

Tabelle 22: Inhaltsstoffe der Kombinationen.....92

1 Einleitung

Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems stellen die häufigste Todesursache in Deutschland (39%) dar. Zu diesem Schluss kommt der Bericht des Robert Koch-Instituts „Gesundheit in Deutschland“ vom November 2015, welcher hauptsächlich auf Daten seines Gesundheitsmonitorings basiert. Des Weiteren sind die Kosten, die von der Gruppe der Herz-Kreislaufferkrankten verursacht werden, im Vergleich zu allen anderen Krankheitsgruppen am höchsten [1]. Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO, *engl. World Health Organization*) sind auf europäischer Ebene sogar über 50% der Todesfälle auf eine Herz-Kreislauf-Erkrankung zurückzuführen. Im Vergleich zu AIDS, Tuberkulose und Malaria zusammen sind die Prävalenz 46fach und die Kosten 11fach höher. Den größten Anteil bei den Herz-Kreislaufferkrankten nimmt sowohl hinsichtlich der Todesursache als auch der Kosten die ischämische oder auch koronare Herzkrankheit (KHK) ein [2].

Bei der KHK handelt es sich um eine Manifestation der Atherosklerose der Herzkranzgefäße, wodurch es zu einer Unterversorgung des Herzmuskelgewebes mit Sauerstoff kommen kann. Der Begriff der Atherosklerose beschreibt eine Verdickung sowie eine Verhärtung der Gefäßwände des Arteriensystems, infolgedessen es zur Verengung des Gefäßvolumens und zum Elastizitätsverlust der Gefäßwände kommt. Die chronisch fortschreitende Degeneration der Arterienwände führt zu Ablagerungen von Cholesterin, Fettsäuren, Thromben und Calciumphosphat. Des Weiteren kommt es zur Bindegewebswucherung sowie zur Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen. Häufig entwickelt sich die Erkrankung sehr progressiv. Durch das Fehlen von Symptomen wird die Erkrankung meist erst bemerkt, wenn bereits ein fortgeschrittenes Stadium erreicht wurde. Die KHK äußert sich dann als Angina pectoris, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt oder in Form von Herzrhythmusstörungen [3].

Eine große Beobachtungsstudie zur Erforschung von Herz- und Gefäßerkrankungen ist die PROCAM Studie (*engl. Prospective Cardiovascular Münster Study*). Die Studie konnte verschiedene Risikofaktoren zur Ausbildung von Atherosklerose aufzeigen. Diese können unterschieden werden in unbeeinflussbare (Geschlecht, Lebensalter, Familienanamnese) sowie beeinflussbare Faktoren (Raucherstatus, Übergewicht, Stress, Ernährung). Außerdem haben Erkrankungen wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Hypertonie eine große Bedeutung bei der Entstehung von Herz- und Gefäßerkrankungen [4-5]. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand beeinträchtigen diese Risikofaktoren die Funktion des Endothels und verursachen eine endotheliale Dysfunktion. Diese stellt einen initialen und kausalen Faktor für die Entstehung von Atherosklerose dar (*Abbildung 1*) [6-7].

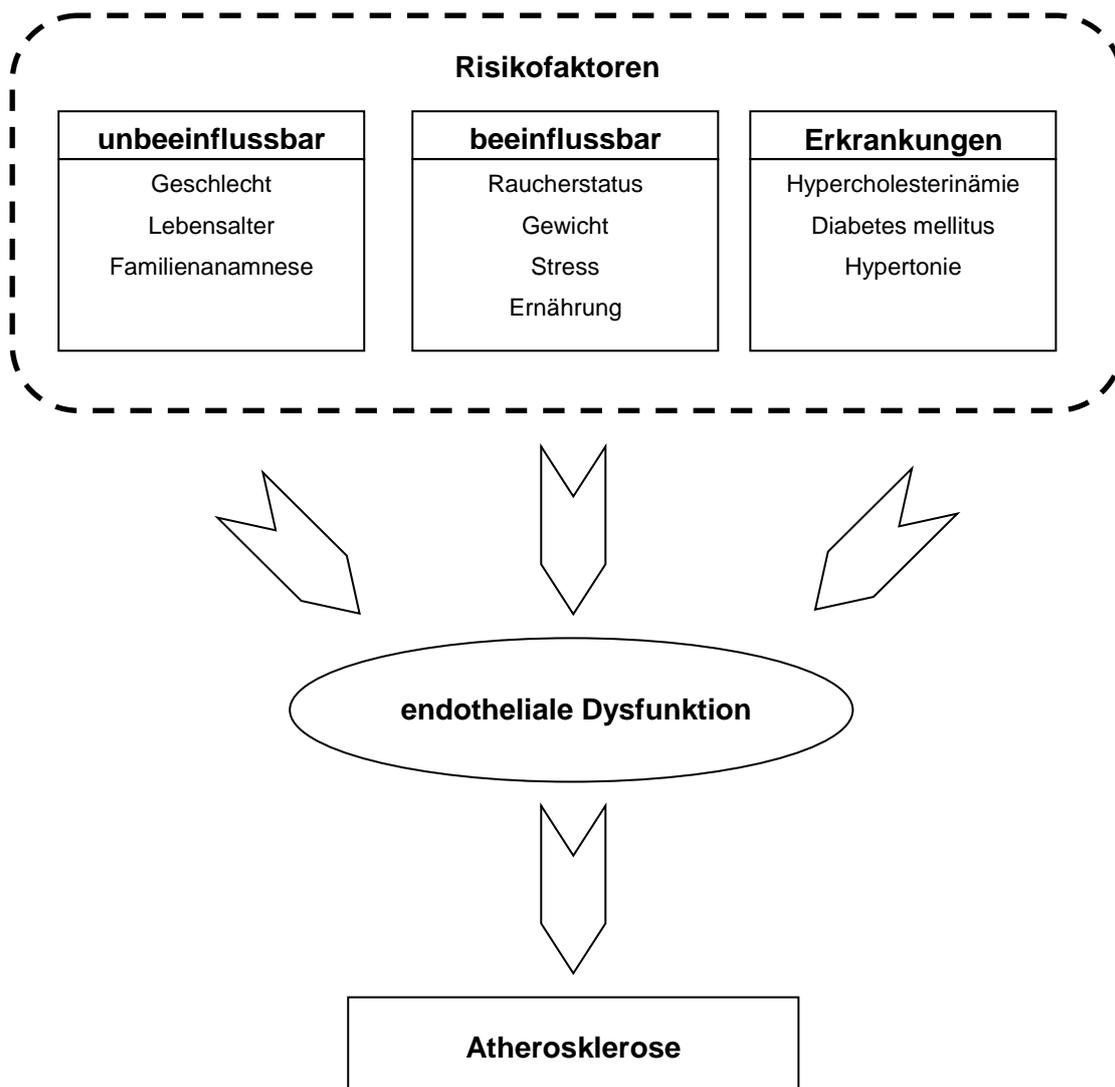


Abbildung 1: Endotheliale Dysfunktion als Verbindung zwischen kardiovaskulären Risikofaktoren und Atherosklerose. Abgebildet sind verschiedene Risikofaktoren, die nachweislich die Entstehung und das Fortschreiten der Atherosklerose begünstigen. Dabei verlinkt die endotheliale Dysfunktion die Auswirkungen der Risikofaktoren mit den veränderten physiologischen Prozessen, die mit der Atherosklerose einhergehen.

1.1 Endothel

Das Endothel ist eine einzellige Schicht aus Endothelzellen, welche die Innenseite von blutleitenden Gefäßen auskleidet. Aufgrund seiner anatomischen Lage wurde bei der Entdeckung des Endothels davon ausgegangen, dass es lediglich die Bedeutung einer physikalischen Barriere zwischen Gefäßlumen und vaskulärer Media innehat. Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1929 hat die Erforschung der Endothelzellen viele wichtige Erkenntnisse über die Bedeutsamkeit dieser Grenzschicht hervorgebracht und damit vor allem für die Atherosklerose potentielle Therapieziele eröffnet.

Da das Endothel im gesunden Zustand eine antithrombotische Oberfläche darstellt, verhindert es die Adhäsion und Aggregation der zirkulierenden Blutzellen an der Gefäßoberfläche. Damit ist das Endothel ein essentieller Bestandteil bei der Aufrechterhaltung des Blutflusses. Bei einer Verletzung der Endotheloberfläche kommt es infolge einer hämostatischen Antwort zur Bildung eines Thrombus, welcher bei einer akuten Verletzung den Verlust von Blut verhindert. Durch ein erhöhtes Thromboserisiko stellt eine chronische Beeinträchtigung der antithrombotischen Oberfläche des Endothels einen wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose dar. Unter gesunden Bedingungen kann das Endothel Makromoleküle in Abhängigkeit von deren Eigenschaften, Größe und Ladung beschleunigt oder verlangsamt durch die Endothelzellschicht transportieren. Eine Beeinträchtigung der natürlichen Funktion des Endothels als selektive permeable Barriere führt zu einem beschleunigten Transport von Lipoproteinen. Dadurch wird die Entstehung von atherosklerotischen Läsionen forciert [8].

Das Endothel hat nicht nur eine Funktion als Sensor und Empfänger, sondern kann infolge der Bildung von Stoffen ebenfalls als Signalgeber fungieren. Auf dieser Basis kann das Endothel verschiedene Gleichgewichte in beide Richtungen beeinflussen: Beispielsweise wird das Gefäß durch die Sekretion von Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin relaxiert. Demgegenüber steht die vasokonstriktive Wirkung von Endothelin-1 und Angiotensin II, welche ebenfalls vom Endothel produziert werden. Bei der Beeinflussung von Inflammation, der Hämostase und vaskulärem Wachstum sind vergleichbare Effekte zu beobachten. Das Endothel kann somit in den dynamischen Gleichgewichten sowohl den agonistischen als auch den antagonistischen Anteil verstärken (*Tabelle 1*) [9].

Relaxation	Kontraktion
<i>Gefäßtonus</i>	
<i>Stickstoffmonoxid</i>	<i>Endothelin-1</i>
<i>Prostacyclin</i>	<i>Angiotensin II</i>
<i>EDHF</i>	<i>Adrenalin</i>
Hemmung	Induktion
<i>Inflammation</i>	
<i>Stickstoffmonoxid</i>	<i>Cytokine (IL-1β, IL-1α, M-CSF, GM-CSF)</i>
<i>Prostacyclin</i>	<i>Chemokine (IL-8, MCP-1)</i>
<i>Antioxidative Enzyme</i>	<i>ELAMs</i>
<i>Komplementregulierende Faktoren</i>	<i>E-, P-Selektine, ICAM-1, VCAM-1</i>
<i>Kininase II</i>	<i>L-Selektin-Liganden</i>
<i>Thrombus</i>	
<i>Prostacyclin</i>	<i>Plättchenaktivierender Faktor</i>
<i>Thrombomodulin</i>	<i>Gewebefaktor</i>
<i>Heparin-Proteoglykane</i>	<i>Von Willebrand-Faktor</i>
<i>Gewebeplasminogenaktivator</i>	<i>Plasminogenaktivator-Inhibitor-1</i>
<i>Urogenase</i>	
<i>Wachstum</i>	
<i>TGF-β</i>	<i>BFGF</i>
<i>Heparinsulfate GAGs</i>	<i>VEGF</i>
<i>Thrombospondin</i>	<i>IGFs</i>
<i>Stickstoffmonoxid</i>	<i>PDGF</i>

Tabelle 1: Übersicht der vom Endothel beeinflussten dynamischen Gleichgewichte.

1.2 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) stellt ein bedeutendes Signalmolekül im kardiovaskulären System dar. Im Jahre 1980 konnten Furchgott *et al.* zeigen, dass die vasodilatierenden Eigenschaften von Acetylcholin (ACh) *in vitro* von der Beschaffenheit des Endothels abhängig sind [10]. Bei einer Beschädigung des Endothels wurde keine Relaxation der präparierten Gefäße gemessen. Das führte sie zu dem Schluss, dass es bei der ACh-induzierten Vasodilatation zur Ausschüttung eines endothelabhängigen Relaxationsfaktors (EDRF, engl. *Endothelium Derived Relaxing Factor*) kommen muss. Im Jahre 1987 haben Moncada *et al.* sowie Ignarro *et al.* den Beweis erbracht, dass es sich bei dem vermuteten EDRF um NO handelt [11-12].

Eine NO-induzierte Vasodilatation wird durch die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur erreicht, welche infolge der Stimulation der löslichen Guanylylcyclase und der damit einhergehenden Erhöhung der Konzentration des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) erzielt wird [13-14]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NO die Plättchenaggregation verhindert sowie die Adhäsion von Leukozyten und Monozyten hemmt [15-16]. Außerdem unterbindet es die Proliferation glatter Muskelzellen und die Oxidation von LDL (engl. *Low Density Lipoprotein*) [17-18]. Zusätzlich kommt es bei der Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu deren Inaktivierung, wodurch NO einen wesentlichen Bestandteil der antioxidativen Abwehrmechanismen darstellt (Abbildung 2) [19].

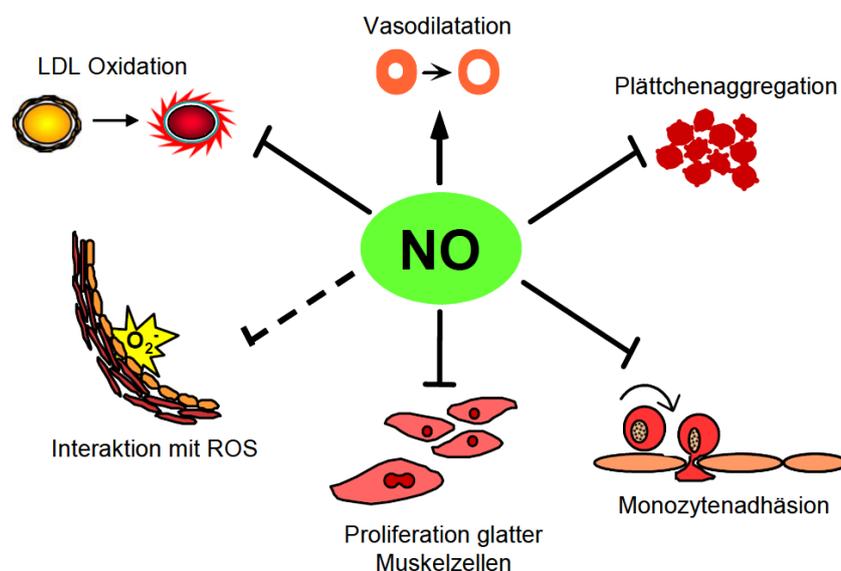


Abbildung 2: Physiologische Effekte des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid. Neben der Vasodilatation hemmt Stickstoffmonoxid die Plättchenaggregation, die Monozytenadhäsion sowie die Proliferation glatter Muskelzellen. Zusätzlich interagiert es mit reaktiven Sauerstoffspezies und inhibiert dadurch die Oxidation von LDL. Abbildung modifiziert nach Böger *et al.* [20].

1.2.1 NO-Stoffwechsel

Moncada *et al.* konnten zeigen, dass NO durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung von L-Citrullin und Wasser produziert wird [21-22]. Die Co-Faktoren Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FAM) sowie Calmodulin vermitteln die Synthese (*Abbildung 3*) [23]. Drei verschiedene Isoformen der NOS sind seither beschrieben worden. Diese unterscheiden sich unter anderem hinsichtlich ihrer Expressionsmuster in verschiedenen Geweben. Zwei Isoformen sind konstitutiv aktive, Calcium- und Calmodulin-abhängige Enzyme, deren physiologische Funktion die Signaltransduktion ist. Dabei handelt es sich um die ursprünglich im Endothel entdeckte endotheliale NOS (eNOS) sowie die zunächst im Nervensystem entdeckte neuronale NOS (nNOS). Die dritte Isoform, die induzierbare NOS (iNOS), ist Calcium-unabhängig. Sie wurde in Makrophagen nachgewiesen und ist kausal zusammenhängend mit der durch Makrophagen ausgelösten Zytotoxizität. Infolge einer Stimulierung mit Cytokinen wird die Transkriptions-regulierte Expression dieser Isoform drastisch gesteigert, infolgedessen pathologisch hohe NO-Mengen produziert werden [24-27].

Asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) ist ein durch posttranslationale Modifikation gebildeter endogener Metabolit und ein Derivat der Aminosäure Arginin. Es inhibiert die NO-Synthase kompetitiv und hemmt die Aufnahme vom NOS-Substrat L-Arginin seitens des kationischen Aminosäure-Transporters (γ^+ -Transporter) [28-31]. Es konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von ADMA im Zusammenhang mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Ereignisse und Mortalität steht [32]. Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) methylieren Arginin-Reste in Proteinen und infolge einer anschließenden Hydrolyse werden diese freigesetzt [33]. Neben dem ADMA werden auf diesem Wege auch die Derivate Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) und symmetrisches Dimethylarginin (SDMA) synthetisiert. Während L-NMMA ebenfalls die NOS kompetitiv hemmt, inhibiert SDMA wie ADMA den γ^+ -Transporter [31, 34].

ADMA wird enzymatisch durch die Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut oder direkt renal eliminiert [28, 35-36]. Von den zwei bisher beschriebenen Isoformen der DDAH ist die Isoform 1 hauptsächlich in der Leber und Niere sowie in Co-Lokalisation mit der nNOS in neuronalem Gewebe anzutreffen. Demgegenüber wird die Isoform 2 vorzugsweise im vaskulären Gewebe in Co-Lokalisation mit der eNOS exprimiert [35, 37].

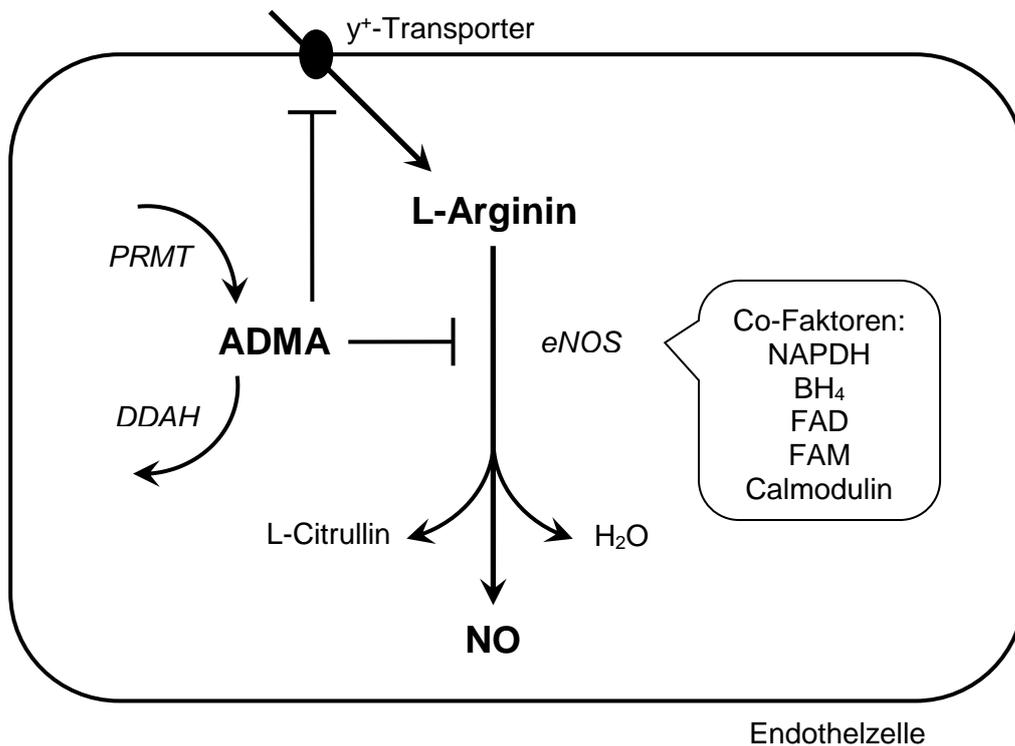


Abbildung 3: Synthese von Stickstoffmonoxid durch die endotheliale NO-Synthase. Die endotheliale NO-Synthase produziert aus der Aminosäure L-Arginin unter Abspaltung von L-Citrullin und Wasser Stickstoffmonoxid (NO). Wichtige Co-Faktoren dieser Reaktion sind Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FAM) sowie Calmodulin. Einen kompetitiven Inhibitor der eNOS stellt das Asymmetrische Dimethylarginin (ADMA) dar. Darüber hinaus hemmt ADMA die Aufnahme von L-Arginin durch den Kationentransporter (γ^+ -Transporter). Das von Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMT) synthetisierte und durch anschließende Proteolyse freigesetzte ADMA wird enzymatisch von Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolasen (DDAH) abgebaut.

1.2.2 Endotheliale Dysfunktion

Kommt es aufgrund von biochemischen Störungen oder mechanischen Verletzungen des Endothels zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit, kann das Endothel seinen physiologischen Funktionen nicht mehr nachkommen. Dann wird von einer endothelialen Dysfunktion gesprochen. Vor allem die Gefäßtonusregulation, die Permeabilität, die Thrombozytenaggregationshemmung sowie die Verhinderung der Adhäsion von Leukozyten und Monozyten sind betroffen. Diese Situation steigert massiv das Risiko für die Entstehung von atherosklerotischen Plaques und stellt damit eine Vorstufe für Atherosklerose dar. Diese Dysfunktion resultiert aus einem Mangel von NO, welcher wiederum aus einer verminderten Produktivität der eNOS stammt [38]. Eine erhöhte Konzentration des kompetitiven Inhibitors ADMA kann dafür eine Ursache sein. Klinische Studien zeigten in verschiedenen

pathologischen Zuständen, wie chronischem Nierenversagen, Hypercholesterinämie, Herzinsuffizienz, Hypertonie, koronare Herzerkrankungen, Schlaganfall und Diabetes mellitus Typ II, erhöhte ADMA-Konzentrationen [6, 28, 39-47]. Außerdem blockieren erhöhte ADMA-Konzentrationen den γ^+ -Transporter, infolgedessen es zu einem Mangel des Ausgangsproduktes der NO-Synthese L-Arginin kommt [30-31]. Dies stellt einen weiteren Auslöser für eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO dar. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass hohe Konzentrationen an ROS und damit oxidativer Stress eine Rolle spielen. Die Interaktion von NO mit ROS vermindert die Bioverfügbarkeit von NO. Des Weiteren können ROS den Co-Faktor der eNOS BH_4 oxidieren. Infolgedessen entkoppelt die eNOS und produziert anstatt des antioxidativen NO selbst Radikale in Form von Superoxid-Anionen [48-49]. Außerdem steigern ROS die Expression vom ADMA-produzierenden Enzym PRTM und senken dabei gleichzeitig die Expression des ADMA-abbauenden Enzym DDAH [50-51].

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind chemische Moleküle, die Sauerstoff beinhalten und unter physiologischen Bedingungen hochreaktiv sind. Es werden radikalische und nicht-radikalische ROS unterschieden. Die Radikale beziehen ihre Reaktionsfreudigkeit aus einem oder mehreren ungepaarten Valenzelektronen. Der physiologisch und pathophysiologisch wichtigste Vertreter dieser Gruppe ist das Superoxid-Anion. Zu der Gruppe zählen auch das Hydroxyl- sowie das Hydroperoxyl-Radikal. Demgegenüber stehen die nicht-radikalischen ROS. Diese sind vor allem aufgrund der Konfiguration ihrer Elektronen, beispielsweise deren Spin, hochreaktiv, denn dadurch können sie einen direkten oxidativen Effekt haben oder leicht in ein Radikal umgewandelt werden. Zu dieser Gruppe zählen Wasserstoffperoxid, Ozon sowie Singulett-Sauerstoff (Tabelle 2).

Radikalische		Nicht-Radikalische	
<i>Superoxid-Anionen</i>	$O_2^{\bullet-}$	<i>Wasserstoffperoxid</i>	H_2O_2
<i>Hydroxyl-Radikal</i>	OH^{\bullet}	<i>Ozon</i>	O_3
<i>Hydroperoxyl-Radikal</i>	HO_2^{\bullet}	<i>Singulett-Sauerstoff</i>	1O_2

Tabelle 2: Übersicht der Einteilung der reaktiven Sauerstoffspezies in radikalische und nicht-radikalische ROS anhand einiger Vertreter.

Im Jahre 1900 wurden freie Radikale erstmalig von Gomberg beschrieben [52]. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität und der extremen Kurzlebigkeit wurde jahrelang davon ausgegangen, dass sie keine physiologische Bedeutung haben. Über 50 Jahre später konnten Radikale zum ersten Mal in biologischen Systemen nachgewiesen werden und wurden sofort mit verschiedenen pathophysiologischen Vorgängen in Zusammenhang gebracht [53-54]. Unter anderem veröffentlichte Harman 1956 die Theorie der Alterung durch freie Radikale (*engl. The Free Radical Theory of Aging*) [55]. Seitdem wuchsen die Erkenntnisse auf dem Gebiet des Einflusses der Radikale enorm, jedoch wurde fast immer von einer schädigenden Wirkung ausgegangen. Die Entdeckung der Superoxid-Dismutase durch McCord und Fridovich 1969 als erster enzymatischer Abwehrmechanismus unterstützte diese These [56]. In den darauffolgenden Jahren änderte sich die Auffassung der Bedeutung der ROS. Unter anderem konnte nachgewiesen werden, dass ROS bei der Bekämpfung von Infektionen durch das Immunsystem beteiligt sind [57-58]. Weitere Forschungen ergaben, dass die ROS-Produktion von Hormonen wie Insulin reguliert werden kann [59]. Daher wurde vermutet, dass die Radikale selbst ebenfalls Regulatoren wichtiger Stoffwechselwege sind

[60]. Seither konnte eindeutig belegt werden, dass ROS nicht nur schädigende Wirkungen auf den Organismus haben, sondern ebenfalls ein entscheidender Bestandteil wichtiger physiologischer Prozesse sind (*Tabelle 3*).

<i>Physiologische Bedeutungen von ROS</i>	<i>Referenz</i>
<i>Second Messenger bei Zellwachstum und -differenzierung</i>	<i>[61]</i>
<i>Abwehr von pathogenen Mikroorganismen</i>	<i>[62]</i>
<i>Förderung von Fibroblasten- und Kollagenwachstum im Rahmen der Wundheilung</i>	<i>[63-64]</i>
<i>Thyroxin Biosynthese</i>	<i>[65]</i>

Tabelle 3: Übersicht physiologischer Prozesse mit Beteiligung von ROS.

1.3.1 Entstehung und Produktion

Nachdem die Bedeutung der ROS herausgestellt wurde, entstand die Frage nach deren Produktion. Es konnte gezeigt werden, dass 90% der ROS durch fehlgeleitete Elektronen aus der Energiegewinnung in den Mitochondrien entstehen [66]. Sauerstoff dient dabei als Elektronenakzeptor und wird größtenteils zu Wasser reduziert. Kommt es zu keiner vollständigen Reduktion, entstehen Superoxid-Anionen. Außerdem produzieren im Rahmen normaler physiologischer Prozesse eine Vielzahl von Oxidoreduktasen wie Oxidasen und Dehydrogenasen ebenfalls ROS [67]. Bei Inflammation werden von Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems auch ROS hergestellt [62]. Neben den endogenen Faktoren für die Bildung von ROS spielen auch exogene Noxen und Umwelteinflüsse eine große Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass UV-Strahlung und Luftverschmutzung, aber auch Drogen, Alkohol und Rauchen, ebenso wie verschiedene Medikamente und Industriechemikalien wie Pestizide im Körper zu einer vermehrten ROS-Produktion führen.

1.3.2 Pathophysiologische Bedeutung

Während die Beteiligung von ROS bei diversen Krankheiten diskutiert wird, konnte diese jedoch bisher nicht in allen Fällen einwandfrei nachgewiesen werden. Fakt ist, dass ROS aufgrund ihrer Reaktivität bei körpereigenen Molekülen wie Nukleinsäuren, DNA, Proteinen und Lipiden strukturelle Modifikationen auslösen, was häufig zum Verlust der jeweiligen Funktion führt (*Tabelle 4*) [68-69].

<i>Pathophysiologische Bedeutungen von ROS</i>	<i>Referenz</i>
<i>Atherosklerose</i>	<i>[70-71]</i>
<i>Ischämie/Reperfusionsschaden</i>	<i>[72-73]</i>
<i>Diabetes mellitus</i>	<i>[74]</i>
<i>Krebs</i>	<i>[75-76]</i>
<i>Asthma</i>	<i>[77-78]</i>
<i>Rheumatoide Arthritis</i>	<i>[79]</i>
<i>Neurodegenerative Erkrankungen</i>	<i>[80-81]</i>
<i>Leberzirrhose</i>	<i>[82]</i>
<i>Alterung</i>	<i>[83]</i>

Tabelle 4: Übersicht pathophysiologischer Prozesse mit Beteiligung von ROS.

1.3.3 Abwehrmechanismen

Um Schäden durch ROS zu verhindern oder zu reparieren, sind Zellen mit einer Vielzahl von Abwehrmechanismen ausgestattet. Das Regulationssystem zur Neutralisierung von ROS umfasst neben antioxidativen, niedermolekularen Substanzen wie beispielsweise Vitamin C auch ROS-abbauende Enzyme. Zusätzlich ist die Zelle mit Enzymen ausgestattet, die das reduzierende Medium der Zellen aufrechterhalten sowie oxidativ geschädigte Zellbestandteile abbauen.

Der enzymatische Abbau der Superoxid-Anionen beginnt mit der Superoxid-Dismutase (SOD), indem es zwei Moleküle des Radikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff disproportioniert (*Abbildung 4*). Bisher sind drei SOD-Isoformen beschrieben worden. Die Isoformen 1 und 3 beinhalten beide sowohl Kupfer als auch Zink im aktiven Zentrum. Während sich die Isoform 1 hauptsächlich im Cytosol befindet, ist die Isoform 3 meist im extrazellulären Raum lokalisiert. Die in den Mitochondrien befindliche Isoform 2 hat im Gegensatz zu den anderen beiden Formen Mangan in ihrem aktiven Zentrum. Die Isoformen werden in allen Geweben stark exprimiert, was die elementare Bedeutung der SOD für den ROS-Schutz des Organismus unterstreicht [56].

Das bei der Disproportionierung entstandene Wasserstoffperoxid wird anschließend von der Katalase (CAT) und der Glutathion-Peroxidase (GPX) weiter abgebaut. Die Katalase disproportioniert zwei Moleküle Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Die Aktivität der Katalase ist abhängig vom Gewebe und dem jeweiligen Kompartiment [84].

Die Glutathion-Peroxidase reduziert Wasserstoffperoxid zu Wasser unter dem Verbrauch des Elektronendonators Glutathion (GSH). Bisher wurden 6 verschiedene Isoformen beschrieben. Die bedeutendste ist die Isoform 1. Sie ist im Cytosol lokalisiert und wird ubiquitär exprimiert. Neben der Leber und der Niere wurden besonders hohe Aktivitäten dieser Isoform in Erythrozyten nachgewiesen. Außerdem war die Isoform 1 der GPX das erste identifizierte Selenoprotein [85].

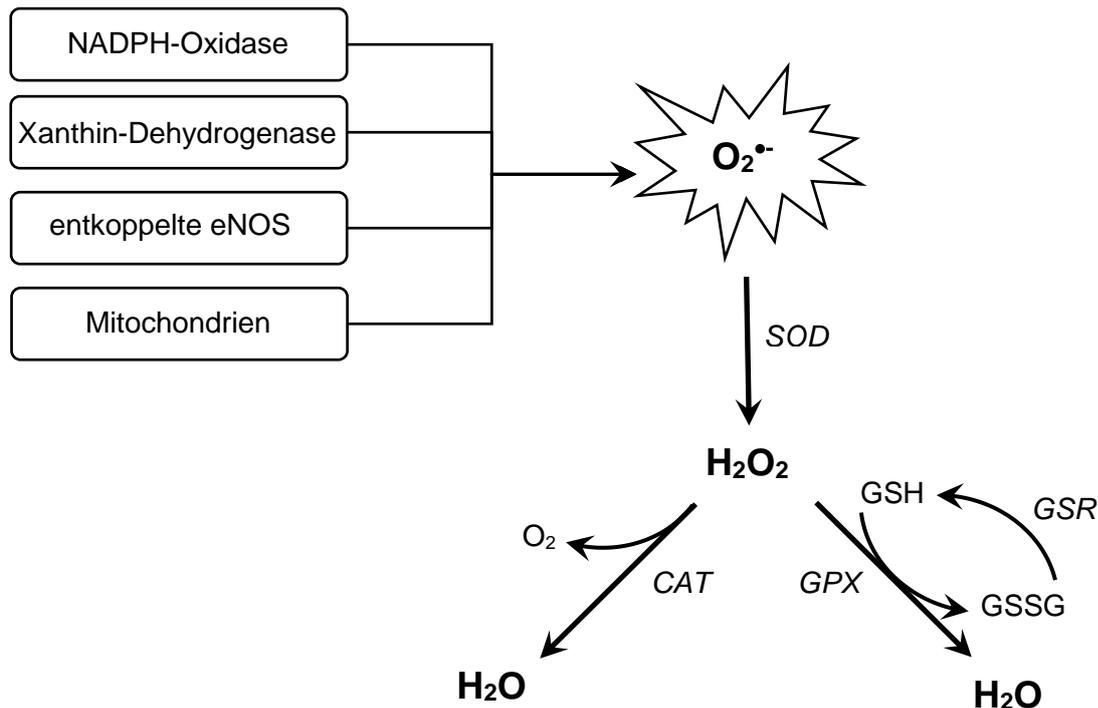


Abbildung 4: Enzymatischer Abbau des Superoxid-Anions. Superoxid-Anionen werden durch Enzyme wie NADPH-Oxidase (NOX) oder Xanthin-Dehydrogenase (XDH) physiologisch produziert. Entkoppelte eNOS kann anstatt des antioxidativ wirksamen NO ebenfalls Superoxid-Anionen bilden. Außerdem entstehen Superoxid-Anionen durch fehlgeleitete Elektronen aus der Energiegewinnung in den Mitochondrien. Die Superoxid-Dismutase (SOD) disproportioniert zwei Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2). Das entstandene Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase (CAT) und die Glutathion-Peroxidase (GPX) weiter abgebaut. Während die Katalase zwei Moleküle Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und Sauerstoff (O_2) disproportioniert, reduziert die Glutathion-Peroxidase das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) unter dem Verbrauch des Elektronendonators Glutathion (GSH). Das dabei entstandene Glutathion-Disulfid (GSSG) wird durch die Glutathion-Reduktase (GSR) wieder zu Glutathion (GSH) reduziert.

Die antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase sind in aeroben Organismen weit verbreitet. Es konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung dieser Enzyme bei Kulturzellen bzw. Versuchstieren zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress führte. Ebenso konnte der gegenteilige Effekt demonstriert werden. Bei einer Überexpression dieser Enzyme waren die Organismen gegenüber oxidativen Stressoren weniger sensibel [86-89].

1.3.4 Oxidativer Stress

Unter normalen physiologischen Bedingungen sind die beiden Seiten des dynamischen Gleichgewichtes zwischen oxidativen und antioxidativen Vorgängen ausbalanciert. Auf der einen Seite stehen die Oxidantien und die Prooxidantien, welche die Bildung von ROS fördern. Demgegenüber stehen mit den Antioxidantien Substanzen, die die ungewollte Oxidation von oxidierbaren Substanzen signifikant verlangsamen oder verhindern können [90]. Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der Oxidantien, wird von „oxidativem Stress“ gesprochen. Eine solche Verschiebung kann durch eine vermehrte Produktion von Oxidantien bzw. Prooxidantien ausgelöst werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass diese Inbalance durch eine Verminderung der Konzentration oder der Aktivität der Antioxidantien hervorgerufen wird (*Abbildung 5*) [91].

Antioxidativ		Oxidativ
<i>Enzyme (SOD, CAT, GPX)</i>	<i>endogen</i>	<i>Enzyme (NOX, XDH)</i>
<i>Niedermolekulare Substanzen (Harnsäure, Liponsäure)</i>		<i>Mitochondrien</i>
<i>Vitamine, sekundäre Pflanzenstoffe, Spurenelemente, Mineralien</i>	<i>exogen</i>	<i>UV-Strahlung, Luftverschmutzung, Drogen, Alkohol, Rauchen, Medikamente, Industriechemikalien</i>

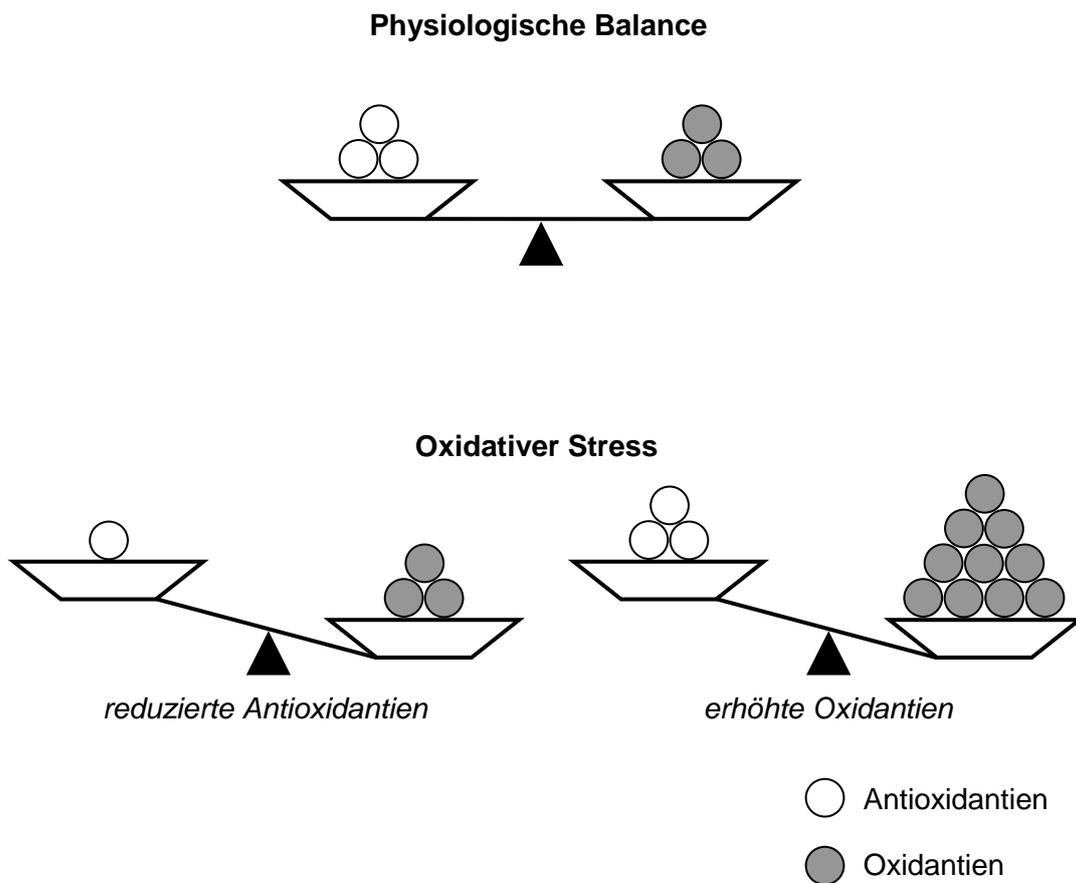


Abbildung 5: Balance zwischen oxidativen sowie antioxidativen Kräften. Im gesunden Zustand ist das dynamische Gleichgewicht zwischen den Prooxidantien und Oxidantien sowie den Antioxidantien ausbalanciert. Durch verschiedene exogene Einflüsse kann dieses Gleichgewicht kippen. Eine Ursache kann die vermehrte Produktion oder Zufuhr von ROS darstellen. Auf der anderen Seite ist es ebenfalls möglich, dass nicht genügend Antioxidantien gebildet werden oder die ROS-abbauende Enzyme inhibiert werden. In beiden Fällen können die Abwehrmechanismen des Organismus die oxidativen Kräfte nicht mehr neutralisieren und es kommt zum oxidativen Stress.

1.4 Sekundäre Pflanzenstoffe

Sekundäre Pflanzenstoffe sind Substanzen, die von Pflanzen produziert werden und ihnen neben der Farbgebung auch als Abwehrstoffe gegen Fressfeinde sowie mikrobiellen Befall und als Wachstumsregulatoren dienen. Da sie in allen pflanzlichen Bestandteilen unseres Essens vorkommen, sind sie eine feste Komponente unserer Ernährung. Trotz des Einflusses sekundärer Pflanzenstoffe auf verschiedene physiologische Prozesse unseres Körpers zählen sie nicht zu den essentiellen Nährstoffen. Von den etwa 100.000 bisher bekannten sekundären Pflanzenstoffen kommen etwa 5.000 bis 10.000 in unserer Nahrung vor. Hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und funktionellen Eigenschaften werden sie in verschiedenen Gruppen eingeteilt. Zu den bekanntesten zählen die Polyphenole, Carotinoide sowie Phytosterole. Außerdem gibt es noch Phytoöstrogene, Glucosinolate, Sulfide, Monoterpene, Saponine, Protease-Inhibitoren und Lektine. In keine dieser Gruppen lassen sich die ebenfalls zu den sekundären Pflanzenstoffen zählenden Substanzen Chlorophyll und Phytinsäure zuordnen [92].

Unterschiedliche gesundheitsfördernde Effekte werden den sekundären Pflanzenstoffen zugeschrieben (*Tabelle 5*). Neben dem Schutz vor verschiedenen Krebsarten sollen sie vor allem positive Auswirkungen auf den vaskulären Status haben, in dem sie den Blutdruck senken und die Blutgefäße erweitern. Außerdem werden sie in Verbindung gebracht mit entzündungshemmenden, antibakteriellen sowie neurologischen Wirkungen. Aufgrund der Durchführung von großen Beobachtungs- und Interventionsstudien hat sich in den letzten Jahren die wissenschaftliche Datenlage bezüglich der Auswirkungen von sekundären Pflanzenstoffen deutlich verbessert. So konnten zwei Metastudien, die insgesamt 22 prospektive Kohortenstudien einschlossen, eindeutig eine Verringerung des KHK-Risikos durch sekundäre Pflanzenstoffe demonstrieren. Dieses Erkenntnis wird durch verschiedene Interventionsstudien gestützt, die offenlegen, dass bei KHK involvierte Stoffwechselprozesse positiv beeinflusst werden [93-94].

Den größten Einfluss bezüglich einer KHK, die eine Manifestation der Atherosklerose darstellt, sowie bei antioxidativen Eigenschaften zeigten neben den Polyphenolen auch die Carotinoide, Sulfide sowie Phytosterole. Bei den Polyphenolen sind vor allem die Flavonoide und Phenolsäuren zu nennen. Daher sind diese Gruppen für eine Untersuchung des Effektes auf das NO-Redox-Gleichgewicht besonders prädestiniert.

Sekundärer Pflanzenstoff	Wirkungen
Flavonoide	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antioxidativ, antithrombotisch, blutdrucksenkend, entzündungshemmend, immunmodulierend, antibiotisch</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>kardioprotektiv, antikanzerogen</i>
Phenolsäure	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antioxidativ</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>antikanzerogen</i>
Carotinoide	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antioxidativ, immunmodulierend, entzündungshemmend</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>kardioprotektiv, bei Makula-Degeneration, antikanzerogen (in Diskussion)</i>
Phytoöstrogene	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antioxidativ, immunmodulierend</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>kardioprotektiv, blutdrucksenkend, antikanzerogen (in Diskussion) bei klimatischen Beschwerden (in Diskussion)</i>
Glucosinolate	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antioxidativ, immunmodulierend</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>antikanzerogen</i>
Sulfide	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antibiotisch, antioxidativ, antithrombotisch, blutdrucksenkend, cholesterinsenkend</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>antikanzerogen</i>
Monoterpene	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>cholesterinsenkend, antikanzerogen</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>-</i>
Saponine	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>antikanzerogen, antifungal</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>-</i>
Phytosterole	<i>im Tier/in vitro:</i> <i>cholesterinsenkend</i>
	<i>beim Menschen:</i> <i>cholesterinsenkend, kardioprotektiv (in Diskussion)</i>

Tabelle 5: Übersicht der Wirkungen der unterschiedlichen Gruppen der sekundären Pflanzenstoffe [95].

1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Laut dem Bericht „Gesundheit in Deutschland“ des Robert-Koch-Institutes und der WHO sind viele Todesfälle durch Herz-Kreislaufkrankungen als vermeidbar einzustufen. Der WHO zufolge könnte durch eine Verringerung der drei wichtigsten Risikofaktoren (Rauchen, ungesunde Ernährung sowie Bewegungsarmut) die Zahl der Todesfälle um 80% reduziert werden [1-2]. Da sich diese Risikofaktoren direkt auf die Physiologie des Endothels auswirken, sehen sowohl die WHO als auch das Robert-Koch-Institut ein großes Potential in der Prophylaxe von Atherosklerose und vor allem deren Vorstufe, der endothelialen Dysfunktion. Daher stellt es eine Option dar, die Balance zwischen Stickstoffmonoxid und reaktiven Sauerstoffspezies zu stabilisieren. Dies kann erreicht werden, indem auf der einen Seite die Bioverfügbarkeit von NO durch eine erhöhte Produktion und gleichzeitigen Abbau von Inhibitoren des produzierenden Enzyms eNOS sichergestellt wird. Auf der anderen Seite des Gleichgewichtes muss dafür gesorgt werden, dass die enzymatischen Abwehrmechanismen von ROS ausreichend vorhanden sind und parallel die Produktion von ROS vermindert ist. Durch die gezielte Stärkung wäre es möglich, dem Organismus einen Puffer gegenüber den Risikofaktoren zu geben.

Ein Bestandteil unserer Ernährung sind sekundäre Pflanzenstoffe, welche sich positiv auf den Gesundheitszustand auswirken. Zusätzlich zu der natürlichen Zufuhr werden Nahrungsmittel immer häufiger mit sekundären Pflanzenstoffen angereichert. Jedoch sind deren Mechanismen und Effekte nicht immer gesichert.

Daher sollte diese Arbeit mit Experimenten an kultivierten Endothelzellen folgende Fragestellungen beantworten:

Ist es möglich, mithilfe von pflanzlichen Extrakten die an dem NO-Redox-Gleichgewicht beteiligten Enzyme hinsichtlich der Expression von mRNA und Protein zu beeinflussen?

Kann eine Einzelsubstanz aus dem Extrakt ausfindig gemacht werden, die die beobachteten Effekte verursacht?

Ergibt eine Kombination der potentesten Extrakte eine gesteigerte Wirkung hinsichtlich der Expressionen?

Können verschiedene Kombinationen die Bioverfügbarkeit von NO verbessern sowie zu einem gesteigerten ROS-Abbau führen?

2 Methoden und Materialien

2.1 Zellkultur

Die für die Experimente verwendete endotheliale EA.hy 926 Zelllinie basiert auf der Hybridisierung von Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC, *engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) mit tiaguanin-resistenten Clonen der humanen Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie (A549). Die daraus resultierende stabile und adhären wachsende Zelllinie wird mittels der Supplementierung von Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin im Medium selektiert [96].

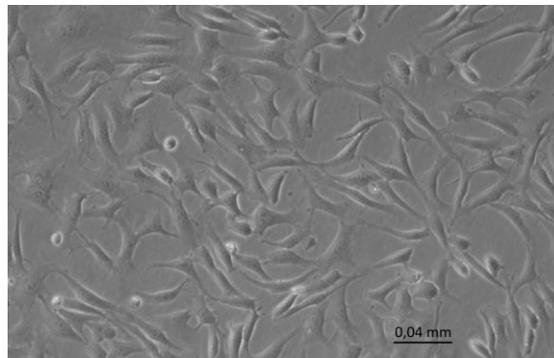


Abbildung 6: Aufnahme der EA.hy 926 Zellen. Abgebildet ist eine Fotografie der für die Experimente in Kultur genommenen EA.hy 926 Zellen.

2.1.1 Kultivierung von EA.hy 926 Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Kulturmedium war *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ergänzt mit 1 g/L Glukose, 110 mg/L Natriumpyruvat, 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin. Zur oben beschriebenen Selektierung wurde 100 µM Natriumhypoxanthin, 0,4 µM Aminopterin und 16 µM Thymidin zugeführt. (*siehe 2.9*)

Das Splitten der Zellen bei einer Konfluenz von 80%-90% erfolgte alle 2-3 Tage. Dafür wurden sie mit auf 37 °C erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, um sie mittels Trypsin/EDTA-Lösung und anschließender einminütiger Inkubation bei 37 °C von der Oberfläche zu lösen. Die Menge an Trypsin/EDTA-Lösung entsprach etwa 1/5 des sonst verwendeten Volumens an Kulturmedium. Die Reaktion des Trypsins wurde durch die Zugabe der 5fachen Menge des auf 37 °C erwärmten Kulturmediums gestoppt. Die erhaltene

Zellsuspension wurde im Anschluss zentrifugiert (100 x g, 5 Minuten, Raumtemperatur). Abschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen im Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:4 bis 1:6 erneut ausplattiert.

Für die Experimente wurden die Zellen für die jeweilige Zeit in dem entsprechenden Versuchsmedium kultiviert. Dafür wurde das Kulturmedium mit den verschiedenen Extrakten bzw. den Kombinationen oder deren Lösungsmittel Wasser bzw. Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt.

2.1.2 Auftauen und Einfrieren von EA.hy 926 Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit gewärmtem PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe des 5fachen Volumens an Kulturmedium inaktiviert und die Zellsuspension anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Um die Zellen zu pelletieren, wurde die erhaltene Zellsuspension 5 Minuten bei 4 °C mit 100 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde tropfenweise in eisgekühltem Einfriermedium (20% DMEM, 20% DMSO und 60% FCS) aufgenommen und in ein Cryogefäß überführt. Um das Einfrieren der Zellen langsam zu vollziehen, wurde das Cryogefäß in ein mit Isopropanol befülltes Einfrierbehältnis erst für 2 Stunden bei -20 °C und anschließend über Nacht bei -80 °C gelagert. Abschließend wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Um die Zellen aufzutauen und wieder in Kultur zu nehmen, wurde die gefrorene Zellsuspension im 37 °C warmen Wasserbad angetaut und in die bereits vorbereitete Kulturflasche gegeben. Diese enthielt mindestens das 10fache Volumen an gewärmtem Kulturmedium. Die Zellen wurden durch Schwenken der Flasche vollständig aufgetaut, gleichmäßig verteilt und in den Inkubator gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt.

2.1.3 Zellen zählen

Um die Zellkonzentration einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür wurde ein geputztes Deckgläschen vorsichtig auf den Objektträger gedrückt, bis die Newton'schen Ringe an den geschliffenen Kanten zu sehen waren. Anschließend wurde ein Teil der frisch homogenisierten Zellsuspension in den entstandenen Zwischenraum pipettiert. Unter dem Mikroskop wurde die jeweilige Zellzahl der 4 Gruppenquadrate bestimmt, wobei ein Gruppenquadrat aus 4 x 4 Kleinstquadraten bestand. Dabei wurden die Quadrate so ausgezählt, dass an zwei Seiten (oben und links)

die Zellen mitgezählt wurden, die die Begrenzungslinie berührten, und an zwei Seiten (unten und rechts) die Zellen, die die Begrenzungslinie berührten, nicht mitgezählt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert aus den 4 Gruppenquadraten gebildet. Da die verwendete Neubauer-Zählkammer ein definiertes Volumen (10 μL) besitzt, konnte durch den errechneten Mittelwert die Zellkonzentration der Zellsuspension ermittelt werden.

2.1.4 Vorbereitung der Experimente

24 Stunden vor dem Start der Expositionszeiten wurden die Zellen geerntet (*siehe 2.1.1*) und die Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (*siehe 2.1.3*). Anschließend wurde eine definierte Anzahl von Zellen in die Wells der entsprechenden Zellkulturplatten ausgesät (*Tabelle 6*) und bis zum Start mit dem Kulturmedium inkubiert. Vor dem Start der verschiedenen Expositionszeiten wurden die Zellen mit gewärmtem PBS gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Expositionsmedium versetzt.

<i>Kulturschale</i>	<i>Anzahl der ausgesäten Zellen</i>
<i>6-Wells</i>	<i>400.000 pro Well</i>
<i>48-Wells</i>	<i>75.000 pro Well</i>
<i>96-Wells</i>	<i>25.000 pro Well</i>

Tabelle 6: Übersicht der Anzahl der ausgesäten Zellen.

2.2 Extrakte

Extrakt	Stammpflanze	Verwendete Bestandteile	Normalisierte Komponente
Artischocke	<i>Cynara scolymus</i>	Blätter	Cynarin (2,5%)
Grüner Tee		Blätter	Polyphenole gesamt (50%) Catechin (30%) EGCG (15%) Coffein (7%)
Ingwer	<i>Zingiber officinale</i>	Rhizom	Gingerol (1%)
Japansicher Staudenknöterich	<i>Polygonum cuspidatum</i>	Wurzel	Resveratrol (95%)
Kleines Fettblatt	<i>Bacopa monnieri</i>		Bacoside (10%)
Knoblauch (Pulver)	<i>Allium sativum</i>	Zwiebel	-
Knoblauch (Öl)	<i>Allium sativum</i>	Zwiebel	Alliin (1200 ppm)
Kurkuma	<i>Curcuma longa</i>	Rhizom	Curcuminoide (95%)
Mariendistel	<i>Silybum marianum</i>		Silymarin (80%)
Rosmarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Blätter und Stiele	Carnosolsäure (10%)
Weißdorn (Blätter)	<i>Crataegus laevigata syn. Craetagus oxyacantha</i>	Blätter	Flavonoide (5%)
Weißdorn (Blüten/Blätter)	<i>Crataegus monogyna, Crataegus laevigata syn. Craetagus oxyacantha</i>	Blüten und Blätter	Vitexin-2-rhamnosid und Hyperosid (1,6 - 2,0%)
Coenzym Q1			100%
Coenzym Q10			100%

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Extrakte.

Für die Experimente wurden 14 unterschiedliche pflanzliche Extrakte und Substanzen eingesetzt. *Tabelle 7* gibt einen Überblick über die verschiedenen Extrakte, deren Stammpflanze, die für den Extrakt verwendeten Bestandteile der Pflanze und auf welche Substanz sie normalisiert wurden. Mit Hilfe der Lösungsmittel Wasser und DMSO wurden die verschiedenen Compounds in Lösung gebracht (*Tabelle 8*). Für das Versuchs- bzw. Expositionsmedium wurden die wasserlöslichen Compounds 1:100 mit dem Kulturmedium verdünnt. Damit die zelltoxische Substanz DMSO in möglichst geringer Konzentration

verwendet wurde, betrug die Verdünnung der DMSO-löslichen Compounds 1:1.000. Die erzielten Endkonzentrationen im Expositionsmedium basierten auf bisherigen Veröffentlichungen, der maximalen Löslichkeit der Extrakte bzw. der Zelltoxizität der Extrakte.

<i>Extrakt</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Endkonzentration im Medium</i>
<i>Artischocke</i>	<i>Wasser</i>	<i>100 µg/mL</i>
<i>Grüner Tee</i>	<i>DMSO</i>	<i>50 µg/mL</i>
<i>Ingwer</i>	<i>DMSO</i>	<i>50 µg/mL</i>
<i>Japansicher Staudenknöterich</i>	<i>DMSO</i>	<i>100 µM (bezogen auf Resveratrol)</i>
<i>Kleines Fettblatt</i>	<i>Wasser</i>	<i>50 µg/mL</i>
<i>Knoblauch (Pulver)</i>	<i>DMSO</i>	<i>300 µg/mL</i>
<i>Knoblauch (Öl)</i>	<i>DMSO</i>	<i>300 µg/mL</i>
<i>Kurkuma</i>	<i>DMSO</i>	<i>5 µg/mL</i>
<i>Mariendistel</i>	<i>DMSO</i>	<i>100 µg/mL</i>
<i>Rosmarin</i>	<i>DMSO</i>	<i>50 µg/mL</i>
<i>Weißdorn (Blätter)</i>	<i>DMSO</i>	<i>300 µg/mL</i>
<i>Weißdorn (Blüten/Blätter)</i>	<i>DMSO</i>	<i>300 µg/mL</i>
<i>Coenzym Q1</i>	<i>Wasser</i>	<i>100 µM</i>
<i>Coenzym Q10</i>	<i>DMSO</i>	<i>100 µM</i>

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Konzentrationen der Extrakte und deren Lösungsmittel.

2.3 mRNA-Analytik

24 Stunden vor dem Start der Inkubation mit den verschiedenen Compounds wurden die Zellen in Zellkulturplatten (6-Well-Platten) ausgesät (siehe 2.1.4). Zum Starten der Inkubationszeit wurden die Zellen nach vorsichtigem Absaugen des Kulturmediums sowie dem Waschen der Zellen mittels gewärmtem PBS mit dem jeweiligen Expositionsmedium versetzt und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde das überständige Medium verworfen und die mRNA aus den Zellen isoliert.

2.3.1 mRNA-Isolierung

Die Isolierung der mRNA erfolgte unter RNase-freien Bedingungen. Dafür wurden die Zellen mit gewärmtem PBS gewaschen und nach Zugabe von eisgekühltem *RNAzol* mittels eines Zellschabers von der Welloberfläche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen durch mehrfaches Aufziehen in eine Pipette lysiert und in ein auf Eis gelagertes Eppendorfgefäß überführt. Das im *RNAzol* enthaltene chaotrope Salz Guanidinothiocyanat zerstört durch seine denaturierende Wirkung die Zellmembranen und inaktiviert gleichzeitig Enzyme wie RNAsen. Das ebenfalls enthaltene Phenol löst die zu isolierende RNA. Durch Homogenisierung der Zellsuspension mittels eines Vortexers, der Zugabe von kaltem Chloroform und erneutem Homogenisieren mittels eines Vortexers wurden die Zellen vollständig lysiert. Somit war die mRNA zugänglich und wurde in der wässrigen Phase gelöst. Um eine Phasentrennung zu erzielen, wurden die Proben 15 Minuten auf Eis gelagert. Zur Unterstützung der Phasentrennung und zur Fällung von ungelösten Bestandteilen wurde die Lösung 15 Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. In der klaren oberen, wässrigen Phase befand sich die gelöste mRNA. Die DNA lag in der weißen Interphase und die Proteine in der blaugefärbten unteren, organischen Phase vor. Daher wurde vorsichtig die obere Phase abpipettiert und in ein mit gekühltem Isopropanol befülltes Eppendorfgefäß gegeben, um durch die veränderte Löslichkeit des Alkohol-Wasser-Gemischs die mRNA zu fällen. Um eine möglichst vollständige Fällung zu erhalten, wurden die Proben gut gemischt, über Nacht bei -20 °C gelagert und abschließend 30 Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Durch das Verwerfen des Überstandes wurde ein weiß-gelbliches Pellet gewonnen. Um das Pellet und somit die mRNA von Salzen und Lösungsmittelresten zu befreien, wurde es mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde vom Eppendorfgefäß durch Schütteln gelöst und erneut 10 Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Ethanol wurde dekantiert und der Restethanol vorsichtig mit einem Wattestäbchen ausgewischt, ohne das Pellet zu berühren. Abschließend wurde das mRNA-Pellet für 1-2 Minuten im umgedrehten Eppendorfgefäß getrocknet und in 10-15 µL

mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztem Wasser resuspendiert. Mittels eines Mikrovolumen-Spektralphotometers wurde die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen mRNA-Lösung bestimmt. Zum Abschluss wurden die Proben in der für die reverse Transkription benötigten Menge nach den Herstellerangaben des verwendeten Kits aliquotiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.3.2 Reverse Transkription zur Gewinnung von cDNA

Ein Aliquot der isolierten mRNA (siehe 2.3.1) wurde auf Eis aufgetaut und mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde in einem PCR-geeigneten Eppendorfgefäß die isolierte mRNA in Nuklease-freiem Wasser vorgelegt und anschließend der Reaktionsmix (Tabelle 9) hinzugegeben. Das erhaltene Gemisch wurde behutsam geschüttelt und kurz zentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermozykler und wurde nach den Herstellerangaben des Kits durchgeführt. Diese sind für die verwendete RNA-abhängige DNA-Polymerase optimiert. Die Probe wurde zuerst für 10 Minuten auf 25 °C erwärmt. Die Transkription erfolgte für 120 Minuten bei 37 °C. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Probe für 5 Minuten auf 85 °C erhitzt. Zum Abschluss wurde die synthetisierte cDNA aliquotiert (5 µL) und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

Reaktionsmix	
2,0 µL	10x RT Buffer
0,8 µL	25x dNTP Mix (100 mM)
2,0 µL	10x Random Primer
1,0 µL	MultiScribe Reverse Transcriptase
4,2 µL	Nuklease-freies Wasser

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsmixes.

2.3.3 Quantitative Real-time PCR

Um Veränderungen der relativen mRNA-Expression zu bestimmen, wurde eine *quantitative Real-Time PCR* durchgeführt, die bestimmte Bereiche der DNA vervielfältigt und quantitativ auswertbar macht. Bei der Polymerasen-Ketten-Reaktion (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) wurden *TaqMan Gene Expression Assays* verwendet. Diese beinhalteten eine thermostabile Polymerase, sequenzspezifische Primer sowie eine Sonde. Bei der Sonde

handelte es sich um ein Molekül, an dem am 5'-Ende ein anregbarer Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff kovalent gebunden waren. Die Quantifizierung der Vervielfältigung basierte auf dem Effekt des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Bei der intakten Sonde absorbiert der Quencher aufgrund seiner räumlichen Nähe zu dem Fluoreszenzfarbstoff dessen nach Anregung ausgestrahlte Energie strahlungsfrei. Diese Möglichkeit der Absorption verliert der Quencher, sobald er weiter vom Fluoreszenzfarbstoff entfernt ist. Diese räumliche Veränderung wurde durch einen Verdau der während der PCR an die DNA hybridisierten Sonde erzielt. Verantwortlich dafür war die zusätzliche Exonuklease-Aktivität der zur Synthese des DNA-Gegenstranges eingesetzten Taq-Polymerase. Somit konnte die zuvor vom Quencher absorbierte Strahlung des Fluoreszenzfarbstoffs detektiert werden. Die nach Anregung ausgestrahlte Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs nahm proportional zur Menge des synthetisierten PCR-Produktes zu.

In der ersten und dritten Phase der PCR ergab sich kein exponentieller Anstieg der Vervielfältigung und der damit einhergehenden detektierten Fluoreszenz. Dies lag an der am Anfang geringen Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Primer, Polymerase, Sonde und der geringen Menge an cDNA. Am Ende waren durch die hemmende Wirkung der entstandenen Produkte keine optimalen Reaktionsbedingungen mehr gegeben. Der exponentielle Anstieg wurde in der zweiten und somit quantifizierbaren Phase detektiert. Der dabei ermittelte und für die weiterführenden Berechnungen relevante *ct*-Wert (*cycle threshold*) entsprach dem Schwellenzyklus und definierte den Beginn der exponentiellen Phase. Bei diesem Zyklus unterschied sich die gemessene Fluoreszenz erstmalig signifikant gegenüber dem Hintergrund.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden mittels der $2^{-\Delta\Delta ct}$ -Methode ausgewertet. Als Bezugsgröße für die eingesetzte cDNA-Menge diente als Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Die zuvor synthetisierte cDNA (*siehe* 2.3.2) wurde für die PCR auf Eis aufgetaut und anschließend mit gekühltem Nuklease-freiem Wasser verdünnt. Die erhaltene Verdünnung wurde in eine transparente und PCR-geeignete 384-Well-Platte gegeben und mit einer gekühlten Lösung, bestehend aus einem Teil *TaqMan Gene Expression Assay* (das die genspezifischen Primer und Sonden beinhaltet) sowie je 8 Teilen Wasser und *Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix*, versetzt. Um etwaige Verunreinigungen auszuschließen, diente das für die Verdünnung der cDNA verwendete Nuklease-freie Wasser als Negativkontrolle. Die Platte wurde mittels einer Folie verschlossen und kurz zentrifugiert.

Enzym	TaqMan-Primer (Applied Biosystem)
GAPDH	Hs99999905_m1
eNOS	Hs00167166_m1
DDAH1	Hs00201707_m1
NOX4	Hs00276431_m1
SOD1	Hs00533490_m1
SOD2	Hs00167309_m1
CAT	Hs00156308_m1
GPX1	Hs00829989_gH

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten TaqMan-Primer.

Die PCR erfolgte nach folgendem Schema:

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
<i>Initiale Denaturierung</i>	95 °C	10 min	1
<i>Denaturierung</i>	95 °C	15 s	} 40
<i>Annealing</i>	60 °C	30 s	
<i>Extension</i>	72 °C	30 s	

Tabelle 11: Ablauf der PCR.

2.4 Protein-Analytik

24 Stunden vor dem Start der Inkubation mit den verschiedenen Compounds wurden die Zellen in Zellkulturplatten (6-Well-Platten) ausgesät (siehe 2.1.4). Zum Starten der Inkubationszeit wurden die Zellen nach vorsichtigem Absaugen des Kulturmediums sowie dem Waschen der Zellen mittels gewärmtem PBS mit dem jeweiligen Expositionsmedium versetzt und anschließend für 72 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Expositionszeit wurde das überständige Medium verworfen und die Proteine aus den Zellen isoliert.

2.4.1 Proteinisolierung

Zur Isolierung der Proteine wurden die Zellen mit gewärmtem PBS gewaschen und nach Zugabe von eisgekühltem sowie mit Proteaseinhibitor versetztem Lysispuffer (*siehe 2.9*) mittels eines Zellschabers von der Welloberfläche abgelöst. Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension mittels einer Pipette in ein auf Eis gelagertes Eppendorfgefäß überführt. Durch mehrfaches Aufziehen in eine Insulinspritze und die dadurch entstehenden Scherkräfte wurden die Zellen lysiert. Somit waren die Proteine zugänglich und gleichzeitig wurde die erhaltene Proteinlösung homogenisiert. Um die Proteinlösung von unlöslichen Bestandteilen zu befreien, wurden die Proben 10 Minuten mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein auf Eis gelagertes Eppendorfgefäß überführt und der Schritt der Aufreinigung gegebenenfalls wiederholt. Zum Abschluss wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Western Blot

Um Veränderungen der Protein-Expression zu bestimmen, wurden Western Blots durchgeführt. Dabei konnten die gewonnenen Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Im späteren Verlauf wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektierbar und quantitativ auswertbar gemacht.

2.4.2.1 Probenaufbereitung

Die gewonnene Probe (*siehe 2.4.1*) wurde auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Proteinlösung mit gekühltem *Load Mix* (*siehe 2.9*) sowie *Sample Buffer* (*siehe 2.9*) vermischt. Das im *Load Mix* enthaltene Glycerin erhöhte die Viskosität der gewonnenen Lösung und das ebenfalls enthaltene Bromphenolblau färbte die Lösung blau. Beides diente zur leichteren Befüllung der Gelkammern mit der Proteinlösung. Außerdem diente das Bromphenolblau als Farbstoffmarker bei der Gelelektrophorese. Durch das im *Sample Buffer* enthaltene anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, *engl. Sodium Dodecyl Sulfate*) erhielten die Proteine in Abhängigkeit zu ihrer Größe negative Ladungen, wodurch eine Auftrennung bei der Elektrophorese über das Molekulargewicht erfolgen konnte. Das ebenfalls enthaltene β -Mercaptoethanol sollte Disulfidbrücken reduzieren. Zur Denaturierung der Proteine wurde die Lösung für 5 Minuten in einem Thermomixer auf 95 °C erwärmt und abschließend 10 Minuten mit 13.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Danach konnten die Kammern des Gels vorsichtig mit der Lösung oder dem Molekulargewichtsstandard bestückt werden.

2.4.2.2 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente zur Auftrennung der einzelnen denaturierten Proteine der Probe. Dafür wurden vertikale Polyacrylamidgele verwendet. Für das 12,5%ige Trenngel (*siehe 2.9*) wurde eine Wasser-Glycerin-Lösung (50% V/V) mit einer 30%igen Acrylamid-Lösung und *4x Lower Tris Buffer* (*siehe 2.9*) vermischt. Durch die Zugabe des Polymerisationsinitiators Ammoniumpersulfat (APS) und des Polymerisationskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) vernetzten sich die Acrylamide untereinander und es entstand ein Polyacrylamidgel. Die polymerisierende Lösung wurde in eine Glaskammer gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Dadurch bildete sich eine gerade Kante im Gel, womit für alle Kammern ein gleichzeitiger Startpunkt für die anschließende Auftrennung der Proteine gegeben war. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel (*siehe 2.9*) gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. Für das Sammelgel wurde Wasser mit einer 30%igen Acrylamid-Lösung und *4x Upper Tris Buffer* (*siehe 2.9*) vermischt und anschließend durch die Zugabe von APS und TEMED die Polymerisation initiiert. Durch die Verwendung eines Sammelgels wurden die Proteine konzentriert und damit die späteren Bande geschärft.

Nach der Auspolymerisierung des Sammelgels wurde das fertige Gel in die entsprechende Apparatur eingesetzt und mit SDS-PAGE Laufpuffer (*siehe 2.9*) übergossen. Der Kammernkamm wurde entfernt und die entstandenen Kammern mit SDS-PAGE Laufpuffer ausgespült, bevor die einzelnen Kammern mit den vorbereiteten Proben (*siehe 2.4.2.1*) befüllt werden konnten.

Für die Elektrophorese wurde für die ersten ca. 15 Minuten eine Spannung von 75 Volt angelegt, bis die Proben das Sammelgel verlassen hatten. Für die Auftrennung wurde anschließend für ca. 90 Minuten die Spannung auf 150 Volt erhöht.

2.4.2.3 Proteintransfer

Nachdem die Elektrophorese beendet und damit die Auftrennung der Proteine erfolgt war, wurden die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dafür wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und zur Fixierung der Proteine für 15 Minuten im Transferpuffer (*siehe 2.9*) äquilibriert. Anschließend wurde das Gel auf die mit Transferpuffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt und von beiden Seiten mit jeweils 3 Lagen ebenfalls mit Transferpuffer durchtränktem Filterpapier und einem Schwamm bedeckt (*Abbildung 7*). Um einen vollständigen Transfer auf die Membran zu gewährleisten, durften zwischen den einzelnen Schichten keine Luftbläschen sein. Dieses Paket wurde

fixiert und in die dafür vorgesehene Apparatur eingesetzt. Die Kammer wurde mit kaltem Transferpuffer befüllt und zur Kühlung mit einem Kühlakku versehen. Anschließend wurde für den Zeitraum von einer Stunde eine konstante Stromstärke von 0,4 Ampere eingeleitet.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran waren sie durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. Das Paket wurde vorsichtig geöffnet und die Membran für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Wasser äquilibriert. Um zu testen, ob der Transfer erfolgreich war, wurden die Proteine mit Ponceau S angefärbt. Dafür wurde die Membran für 10 Minuten in eine Ponceau S-Lösung (*siehe 2.9*) gegeben und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. Die Proteinverteilung wurde mittels eines Fotos oder Scans festgehalten. Durch die nun gefärbten Proteine wurde das Schneiden der Membran für die Inkubation mit den unterschiedlichen Antikörpern erleichtert. Die für die weiteren Schritte hinderliche Ponceau S-Färbung wurde mittels *Tween 20*-enthaltender Tris-gepufferter Salzlösung (TBST) (*siehe 2.9*) vollständig entfernt.

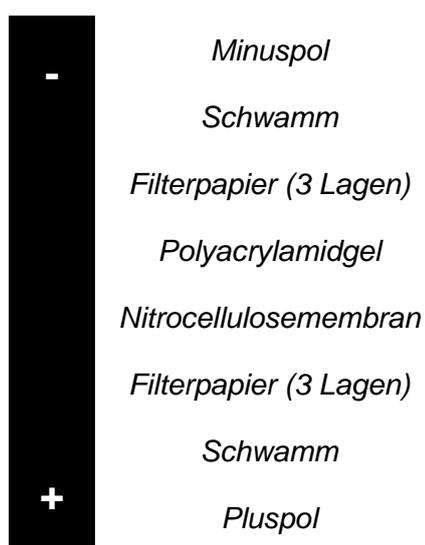


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Abfolge der verschiedenen Lagen des Blottes. Dargestellt ist die Einbettung des Gels mit der Nitrocellulosemembran in je 3 Lagen Filterpapier und eine abschließende Schicht Schwämme. Außerdem ist die Anlage von Minus- und Pluspol angegeben.

2.4.2.4 Immunoblot

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen von Antikörpern an die Membran sowie den Proteinen und um das daraus resultierende Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die verschiedenen Abschnitte der Membran in einer 5%igen Blockierlösung (*siehe 2.9*) für eine Stunde bei Raumtemperatur stetig auf einem Plattenschüttler geschwenkt. Anschließend wurden die Abschnitte mit dem antigenspezifischen primären Antikörper über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die ungebundenen primären Antikörper wurden durch Waschen mit TBST entfernt und die Abschnitte mit Meerrettich-

Peroxidase (HRP, *engl. Horse Radish Peroxidase*)-konjugierten sekundären Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

<i>Antikörper</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>
Primär		
<i>Anti-eNOS</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>1:1000</i>
<i>Anti-GAPDH</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>1:1000</i>
<i>Anti-SOD1</i>	<i>Kaninchen</i>	<i>1:1000</i>
Sekundär		
<i>Anti-Kaninchen</i>	<i>Ziege</i>	<i>1:1000</i>

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörper.

2.4.2.5 Detektion

Nachdem die ungebundenen sekundären Antikörper durch Waschen mit TBST entfernt wurden, konnte die Membran für 3 Minuten mit *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Reagenz benetzt werden. Die am sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase oxidierte das in der Lösung enthaltene Luminol. Die ausgestrahlte Energie des bei der Reaktion entstandenen anregbaren Anions wurde mittels einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-Kamera aufgenommen. Damit konnten die Banden der Proteine detektiert und quantitativ ausgewertet werden. Dabei wurden die erhaltenen Ergebnisse in Relation zur Expression des Referenzproteins GAPDH gesetzt.

2.5 Nitrit-Messung

Um Rückschlüsse auf eine Veränderung der NO-Produktivität der Zellen zu bekommen, wurde die Konzentration des stabilen NO-Metaboliten Nitrit in den jeweiligen Medienüberständen gemessen.

Die Messung der Nitritkonzentration erfolgte in einer 96-Well-Platte mit schwarzen Wänden sowie flachem, transparentem Wellboden. Dafür wurde die Probe in ein Well gegeben und mit Diaminonaphthalin (50 μM) versetzt. Die Reaktion fand im sauren Milieu statt. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe einer 2 M Natriumhydroxid-Lösung gestoppt (*Abbildung 8*).

Direkt im Anschluss wurde mit einem Photometer und der Exzitationswellenlänge 355 nm die entstehende Fluoreszenz des Reaktionsproduktes bei der Emissionswellenlänge 460 nm gemessen.

Als Kalibriergerade wurde eine Natriumnitrit-Lösung mittels einer mit Bradykinin oder Calcium-Ionophor versetzter *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (siehe 2.9) stufenweise in den Bereich von 100 μM bis 0 μM verdünnt. Anschließend wurden die Lösungen wie die Proben gehandhabt und gleichzeitig mit den Proben gemessen. Zur besseren Vergleichbarkeit der verschiedenen Messungen wurden die ermittelten Konzentrationen auf die Lösungsmittelkontrolle normalisiert.

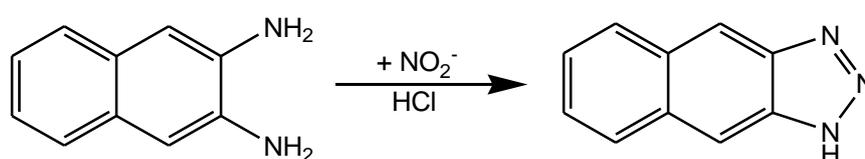


Abbildung 8: Reaktion von Diaminonaphthalin mit Nitrit. Die Reaktion von Nitrit mit Diaminonaphthalin fand im sauren Milieu statt. Durch die Zugabe von Natriumhydroxid und der damit einhergehenden Milieuänderung wurde die Reaktion gestoppt. Das entstehende Reaktionsprodukt besaß bei der Anregung durch die Exzitationswellenlänge 355 nm eine spezifische Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge 460 nm. Diese wurde mittels eines Photometers detektiert.

2.5.1 Inkubation mit Arginin-enthaltendem Medium

24 Stunden vor dem Start der Expositionszeiten wurden die Zellen in Zellkulturplatten (48-Well-Platte) ausgesät (siehe 2.1.4). Zum Starten der Inkubationszeiten wurden die Zellen nach vorsichtigem Absaugen des Kulturmediums mit gewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Expositionsmedium für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Das Expositionsmedium war mit den verschiedenen Kombinationen oder deren Lösungsmittel DMSO (0,1%) versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überständige Medium verworfen und die Zellen mit gewärmter HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit gewärmter, mit Bradykinin oder Calcium-Ionophor A23187 versetzter HBSS für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde im Anschluss in ein auf Eis gelagertes Eppendorfgefäß überführt und entweder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder aliquotiert (100 μL) und bei -80 °C aufbewahrt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Expositionszeiten zu erhalten, wurden die Zellen für die Experimente gleichzeitig ausgesät, aber der Wechsel vom Kulturmedium auf das Versuchsmedium erfolgte mit einem Zeitabstand von jeweils

24 Stunden. Dadurch endeten die verschiedenen Expositionszeiten gleichzeitig und die Proben wurden unter vergleichbaren Bedingungen gewonnen (Abbildung 9).

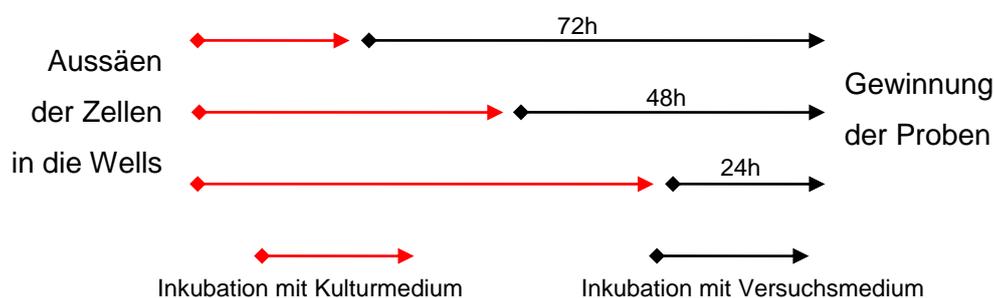


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Bestimmung der Arginin-unabhängigen NO-Produktion. Dargestellt ist der um jeweils 24 Stunden versetzte Start der unterschiedlichen Inkubationszeiten, sodass am Ende der Expositionszeit und somit zum Zeitpunkt der Probengewinnung vergleichbare Zellzahlen vorlagen.

2.5.2 Inkubation mit L-Arginin-Supplementation

Da im Kulturmedium L-Arginin enthalten war ($400 \mu\text{M}$), das sowohl Substrat als auch ein Faktor für erhöhte Expression von eNOS darstellt, wurde in einem weiteren Experiment eine mit verschiedenen Konzentrationen von L-Arginin versetzte HBSS anstelle des DMEM als Basis für die verschiedenen Versuchsmedien verwendet.

Vorversuche zeigten, dass die Zellen eine 72stündige Inkubation unter diesen Bedingungen nicht überlebten. Somit konnten nur Ergebnisse für die Expositionszeiten 24 und 48 Stunden generiert werden. Der Ablauf des Experimentes wurde dahingehend geändert, dass 24 Stunden nach dem Aussäen direkt mit dem Start der 48stündigen Inkubation begonnen wurde (Abbildung 10). Die restliche Vorgehensweise inklusive der Probengewinnung entsprach dem vorherigen Arginin-unabhängigen Experiment.

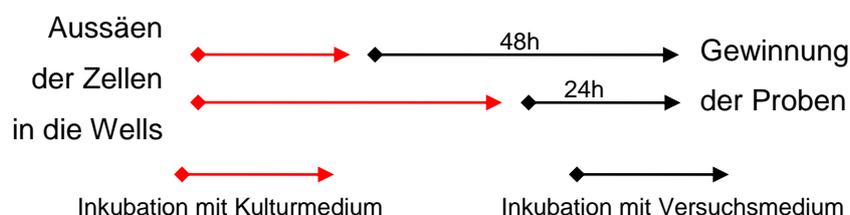


Abbildung 10: Schematische Darstellung des modifizierten Versuchsablaufs zur Bestimmung der Arginin-abhängigen NO-Produktion. Dargestellt ist der um jeweils 24 Stunden versetzte Start der unterschiedlichen Inkubationszeiten, sodass am Ende der Expositionszeit und somit zum Zeitpunkt der Probengewinnung vergleichbare Zellzahlen vorlagen.

2.6 Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

Um Rückschlüsse auf eine Veränderung des Abbaus von ROS und somit der Widerstandskraft der behandelten Zellen gegenüber oxidativem Stress zu erlangen, wurden intrazellulär und extrazellulär ROS gebildet. Diese wurden anschließend durch Chemilumineszenz angefärbt und mittel eines Photometers quantitativ erfasst.

24 Stunden vor dem Start der Expositionszeiten wurden die Zellen in Zellkulturplatten (96-Well-Platten) ausgesät (siehe 2.1.4). Zum Starten der Inkubationszeiten wurden die Zellen nach vorsichtigem Absaugen des Kulturmediums mit gewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit dem Expositionsmedium für 24, 48 oder 72 Stunden inkubiert. Das Expositionsmedium war mit den verschiedenen Kombinationen oder deren Lösungsmittel DMSO (0,1%) versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das überständige Medium verworfen und die Zellen mit gewärmter HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit gewärmter, mit Chemilumineszenz-Reagenz versetzter HBSS für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Produktion der ROS gestartet und sofort mit der Detektion der entstehenden Chemilumineszenz mittels eines Photometers begonnen.

Um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Expositionszeiten zu erhalten, wurden die Zellen für die Experimente gleichzeitig ausgesät, aber der Wechsel vom Kulturmedium auf das Versuchsmedium erfolgte mit einem Zeitabstand von jeweils 24 Stunden. Dadurch endeten die verschiedenen Expositionszeiten gleichzeitig und somit waren für die Messung der ROS vergleichbare Bedingungen gegeben (Abbildung 11).

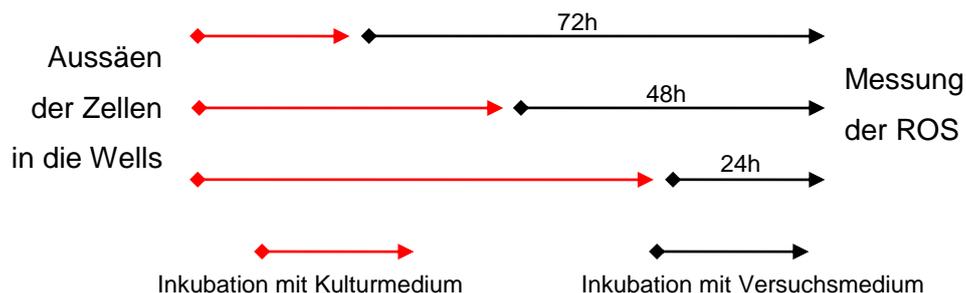


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Bestimmung des Abbaus der ROS. Dargestellt ist der um jeweils 24 Stunden versetzte Start der unterschiedlichen Inkubationszeiten, sodass am Ende der Expositionszeit und somit zum Zeitpunkt des Starts des Experimentes vergleichbare Zellzahlen vorlagen.

2.6.1 Intrazelluläre ROS

Für die Messung der intrazellulären ROS wurde das zellmembrangängige Luminol als Chemilumineszenz-Reagenz verwendet. Die Zellen wurden für 15 Minuten mit Luminol (500 μM) inkubiert und anschließend mit dem ebenfalls zellmembrangängigen 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ) versetzt. Dadurch wurde die Bildung der ROS gestartet (*Abbildung 12*) und die Signale der entstehenden Chemilumineszenz wurden für die Dauer von 60 Minuten aufgezeichnet.

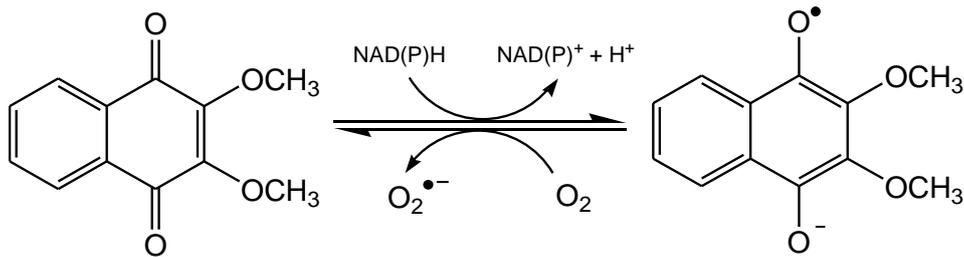


Abbildung 12: Bildung von ROS durch DMNQ. 2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon (DMNQ) wurde durch einen Ein-Elektronentransfer zu einem Semichinon-Radikal reduziert. Das zweite ungebundene Elektron, welches durch die Oxidation des Coenzym NAD(P)H entsteht, wurde auf ein zweites DMNQ-Molekül übertragen. Das entstandene Semichinon-Radikal reduziert in der Rückreaktion Sauerstoff zu Superoxid-Anionen. Dieses wiederum oxidierte das eingesetzte Chemilumineszenz-Reagenz Luminol bzw. wurde durch die Abwehrmechanismen der Zelle abgebaut.

2.6.2 Extrazelluläre ROS

Die Messung der extrazellulären ROS wurde analog zur Bestimmung der intrazellulären ROS durchgeführt. Modifiziert wurde die Ausführung lediglich hinsichtlich der Verwendung von nicht-zellmembrangängigem Lucigenin (500 μM) als Chemilumineszenz-Reagenz und eine Kombination von Xanthin (50 μM) und Xanthin-Oxidase (50 $\text{U}/\mu\text{L}$) als ROS-Bildner. Nach dem Start der Bildung der ROS (*Abbildung 13*) wurden für dieses Experiment die Signale der entstehenden Chemilumineszenz für die Dauer von 10 Minuten aufgezeichnet.

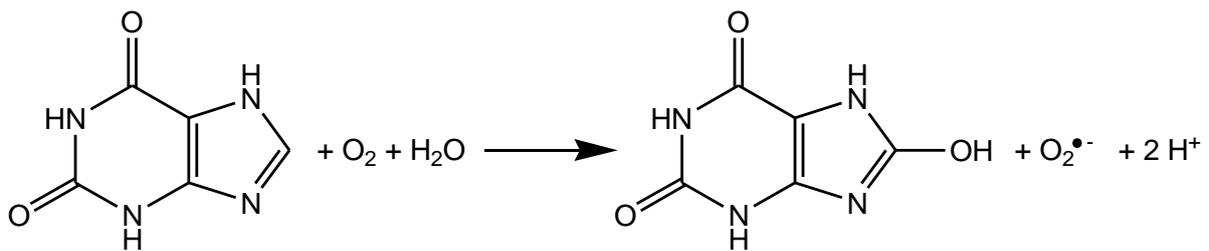


Abbildung 13: Bildung von ROS durch Xanthin-Oxidase. Das Enzym Xanthin-Oxidase setzt die Substrate Xanthin, Wasser und Sauerstoff zu Harnsäure, zwei Protonen sowie einem Molekül Superoxid-Anion um. Dieses wiederum oxidierte das eingesetzte Chemilumineszenz-Reagenz Lucigenin bzw. wurde durch die Abwehrmechanismen der Zelle abgebaut.

2.7 Substanzen und Reagenzien

Substanz, Reagenz	H- & P-Sätze	Hersteller
2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ)	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid 40%	H: 302+312-315-319-317-340-350-361f-372 P: 281-302+352-305+351+338-308+313	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammonium-peroxidsulfat (APS)	H: 272-302-315-319-334-317-335 P: 221-210-285-305+351+338-405-501	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bis(N-methyl-acridinium) (Lucigenin)	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradfordreagenz, Protein Assay Dey Reagent Concentrate	H: 226-332-314-370 P: 210-303+361+353-305+351+338-310-405-501	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bradykinin (Acetatsalz)	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Calcium-Ionophor A23187	H: 302+312+332-315-319-335-413 P: 261-208-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid (CaCl ₂ x 2 H ₂ O)	H: 319 P: 305+351+338	Merck, KGaA, Darmstadt
Chloroform	H: 351-361d-331-302-372-319-315 P: 302+352-314	Merck, KGaA, Darmstadt
D-Glukose	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Diaminonaphthalin (DAN)	H: 302-315-319-335-350 P: 201-261-305+351+338-308+313	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt

<i>Di-Natrium- hydrogenphosphat (Na₂HPO₄)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>ECL Reagenz Pierce</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte</i>
<i>Essigsäure 100% (Eisessig)</i>	<i>H: 226-290-314 P: 210-280-301+330+331- 305+351+338-308+310</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Ethanol</i>	<i>H: 225-319 P: 210-240-305+351+338-403+233</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Fetales Kälberserum (FCS)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Glycerin</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Glycin</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>HAT Supplement (50x)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>GIBCO Invitrogen, Darmstadt</i>
<i>Isopropanol</i>	<i>H: 225-319-336 P: 210-280-305+351+338</i>	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Kaliumchlorid (KCl)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Kaliumdihydrogen- phosphat (KH₂PO₄)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Luminol</i>	<i>H: 315-319-335 P: 261-305+351+338</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Magnesiumchlorid (MgCl₂ x 6H₂O)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Magnesiumsulfat (MgSO₄ x 7H₂O)</i>	<i>H: - P: -</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>
<i>Methanol</i>	<i>H: 225-301+311+331-370 P: 210-240-280-302+352-304+340- 308+310-403+233</i>	<i>Merck, KGaA, Darmstadt</i>

Milchpulver	H: - P: -	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Molekulargewichts- marker, Western Blot Ladder Page Ruker	H: - P: -	Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte
N, N, N',N'-Tetra- methylethylendiamin (TEMED)	H: 225-332-302-314 P: 210-233-280-301+330+331- 305+351+338-309+310	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	H: - P: -	Avantor Materials B.V., Deventer, Niederlande
Natriumdodecylsulfat (SDS)	H: 302-315-318-412 P: 280-301+312-302+352- 305+351+338-332+313	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natrium- hydrogencarbonat (NaHCO ₃)	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid 1 M (NaOH)	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid 2 N (NaOH)	H: 314-290 P: 280-301+330+331-305+351+338- 309+310	Merck, KGaA, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	H: 272-301-400 P: 273-309+310	Merck, KGaA, Darmstadt
Penicillin & Streptomycin-Lösung (PenStrep)	H: 317-334-360-371 P: 302+352-304+340-201-260- 333+313-261	GIBCO Invitrogen, Darmstadt
Phosphatgepuffertes Salz (PBS)	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Ponceau S	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteaseinhibitor, Complete Mini	H: - P: -	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNAzol	H: 301-311-314 P: 302+352	WAK-Chemie Medical, Steinbach/Ts.

Salzsäure 1 N (HCl)	H: 290 P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Salzsäure rauschend 37%	H: 290-314-335 P: 280-304+340-305+351+338-310	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (X942)
Trichloressigsäure	H: 314-332-412 P: 273-280-301+330+331- 305+351+338-308+310	Merck, KGaA, Darmstadt
Tris-Trizma Base	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Trizma Hydrochlorid	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin/EDTA-Lösung (10x)	H: - P: -	Merck, KGaA, Darmstadt
Tween 20	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser (Aqua Injectabila)	H: - P: -	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Xanthin (Natriumsalz)	H: 371 P: 260	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xanthin-Oxidase	H: - P: -	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β -Mercaptoethanol	H: 301+331-310-315-317-318-373-410 P: 261-280-301+310+330- 302+352+310-305+351+338+310- 403+233	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Substanzen und Reagenzien.

2.8 Extrakte und Einzelkomponenten

Substanz, Reagenz	H- & P-Sätze	Hersteller
Extrakte		
Artischocke		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Grüner Tee		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Ingwer		Draco Natural Products Inc., San Jose, USA
Japansicher Staudenknoterich		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Kleines Fettblatt		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Knoblauch (Pulver)		Draco Natural Products Inc., San Jose, USA
Knoblauch (Öl)		Euromed S.A., Mollet del Valles, Spanien
Kurkuma		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Mariendistel		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Rosmarin		Draco Natural Products Inc., San Jose, USA
Weißdorn (Blätter)		Draco Natural Products Inc., San Jose, USA
Weißdorn (Blüten/Blätter)		Euromed S.A., Mollet del Valles, Spanien
Coenzym Q1		Productos Quimicos Gonmisol S.A., Barcelona, Spanien
Coenzym Q10		Shanghai Brightol International Co. Ltd., Shanghai, China

Einzelkomponenten		
<i>Bacosid A</i>	H: - P: -	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Carnosolsäure</i>	H: - P: -	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Catechin</i>	H: 315-319-335 P: 280-302+352-305+351+338- 337+313	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
<i>Curcumin</i>	H: 315-319-335 P: 264-280-261-302+352- 332+313-362-305+351+338- 337+313-309+311-304+340	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
<i>Cynarin</i>	H: - P: -	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Epigallocatechingallat (EGCG)</i>	H: - P: -	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>L-Alliin</i>	H: 315-319-335 P: 261-305+351+338	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
<i>Silymarin</i>	H: - P: -	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Extrakte und Einzelkomponenten.

2.9 Lösungen und Puffer

allgemein

<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)</i>	9,55 g <i>Phosphat-gepuffertes Salz</i> 1 L <i>ddH₂O</i>
---	--

<i>Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	370 mg <i>Calciumchlorid Dihydrat</i> 200 mg <i>Magnesiumchlorid Hexahydrat</i> 200 mg <i>Magnesiumsulfat Heptahydrat</i> 800 mg <i>Kaliumchlorid</i> 120 mg <i>Kaliumdihydrogenphosphat</i> 700 mg <i>Natriumhydrogencarbonat</i> 16.000 mg <i>Natriumchlorid</i> 960 mg <i>Dinatriumhydrogenphosphat</i> 2.000 mg <i>D-Glukose</i> 1 L <i>ddH₂O</i>
---	---

Zellkultur

<i>Kulturmedium</i>	50 mL <i>FCS</i> 10 mL <i>PenStrep</i> 5 mL <i>HAT Supplement (50x)</i> 435 mL <i>DMEM 1g/L Glucose</i>
---------------------	--

Proteinanalytik

<i>Lysispuffer</i>	20 mg <i>Natriumdodecylsulfat</i> 1 Tablette <i>Proteaseinhibitor</i> 10 mL <i>PBS</i>
--------------------	--

Wasser-Glycerin-Lösung
(50% V/V)

50 mL Glycerin

50 mL ddH₂O

Natriumdodecylsulfat (SDS)
Lösung 20%

20 g Natriumdodecylsulfat

100 mL ddH₂O

4x Lower Tris Buffer
(pH 8,8)

18,17 g Tris-Trizma Base

2 mL SDS-Lösung 20%

98 mL ddH₂O

4x Upper Tris Buffer
(pH 6,8)

6,06 g Tris-Trizma Base

2 mL SDS-Lösung 20%

98 mL ddH₂O

Ammoniumpersulfat-Lösung
10% (APS)

100 mg Ammoniumpersulfat

1 mL ddH₂O

Trenngel 12,5%

2,71 mL Wasser-Glycerin-Lösung (50% V/V)

1,98 mL Acrylamid 40%

1,58 mL 4x Lower Tris Buffer

3 µL TEMED

32 µL APS-Lösung 10%

Sammelgel 4%

1,29 mL Wasser-Glycerin-Lösung (50% V/V)

0,2 mL Acrylamid 40%

0,5 mL 4x Upper Tris Buffer

2 µL TEMED

15 µL APS-Lösung 10%

Load Mix

20 mg *Bromphenolblau*

20 mL *Glycerol*

20 mL *ddH₂O*

Sample Buffer

2 mL *Wasser-Glycerin-Lösung (50% V/V)*

1,5 mL *SDS-Lösung 20%*

1,25 mL *4x Upper Tris Buffer*

0,5 mL *β-Mercaptoethanol*

4,75 mL *ddH₂O*

*10x Tris Glycin Puffer
(pH 8,3)*

30 g *Tris-Trizma Base*

144 g *Glycin*

1000 mL *ddH₂O*

SDS-Page Laufpuffer

100 mL *10x Tris Glycin Puffer*

5 mL *SDS-Lösung 20%*

895 mL *ddH₂O*

Transferpuffer

100 mL *10x Tris Glycin Puffer*

200 mL *Methanol*

700 mL *ddH₂O*

<i>Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)</i>	2,42 g	<i>Tris-Trizma Hydrochlorid</i>
	8,0 g	<i>NaCl</i>
	1 L	<i>ddH₂O</i>

<i>Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST)</i>	1 mL	<i>Tween 20</i>
	999 mL	<i>TBS</i>

<i>Blockierlösung</i>	2,5 g	<i>Milchpulver</i>
	50 mL	<i>TBST</i>

<i>Ponceau S-Lösung</i>	0,1 g	<i>Ponceau S</i>
	3 mL	<i>Trichloressigsäure</i>
	97 mL	<i>ddH₂O</i>

Nitritbestimmung

<i>Diaminonaphthalin-Stammlösung 100 mM</i>	15,82 mg	<i>Diaminonaphthalin</i>
	1 mL	<i>DMSO</i>

<i>Natriumnitrit-Lösung 10 mM</i>	1,38 mg	<i>Natriumnitrit</i>
	2 mL	<i>ddH₂O</i>

Tabelle 15: Übersicht der hergestellten Puffer und Lösungen.

2.10 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>TaqMan Gene Expression Assays</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
<i>Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x)</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Kits.

2.11 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Primär	
<i>eNOS (Kaninchen)</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg</i>
<i>GAPDH (Kaninchen)</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg</i>
<i>SOD1 (Kaninchen)</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg</i>
Sekundär	
<i>Anti-Kaninchen (IgG, HRP, Ziege)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Antikörper.

2.12 Verbrauchsmaterial und weitere Hilfsmittel

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Cryogefäß, Cryo Vials CryoPure 1,6 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckglas	Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Eppendorfgefäß 1,5 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorfgefäß 2 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorfgefäß Multiply strip pro 8er Kette	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Filterpapier, Whatman Chromatography paper 3mm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Kanüle, Sterican 27 G (Gr. 20)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikrotitrierplatte 96-Well-Platte schwarz	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Mikrotitrierplatte 384-Well qPCR	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Nitrocellulosemembran, Whatmann Protran BA 85	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Parafilm M IS	BEMIS Flexible Packaging, USA
Pasteurpipette	VWR International GmbH, Darmstadt
PCR-Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten, serologisch 5 mL	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Pipetten, serologisch 10 mL	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Pipetten, serologisch 25 mL	Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 100 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 5000 µL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpelklinge	Bayha GmbH, Tuttlingen
Spritze, Omnifix F 1 mL	Braun Melsungen AG, Melsungen
Wattestäbchen	Karl Beese Verbandstoffe GmbH & Co., Barsbüttel
Zellkulturflasche 25 cm ²	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

<i>Zellkulturflasche 75 cm²</i>	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
<i>Zellkulturflasche 175 cm²</i>	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
<i>Zellkulturplatte 6-Well</i>	<i>Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen)</i>
<i>Zellkulturplatte 48-Well</i>	<i>Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen)</i>
<i>Zellkulturplatte 96-Well</i>	<i>Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen)</i>
<i>Zellschaber 16cm</i>	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
<i>Zentrifugenflasche, Falcon 15 mL</i>	<i>Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen</i>
<i>Zentrifugenflasche, Falcon 50 mL</i>	<i>Greiner BIO-ONE GmbH, Frickenhausen</i>

Tabelle 18: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie weiterer Hilfsmittel.

2.13 Laborgeräte

Gerät, Bezeichnung	Hersteller
<i>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</i>	<i>Applied Biosystems Inc, Foster</i>
<i>Abzug Vintair 9000</i>	<i>Vinitex Laboratorium Einrichtungen B.V., Coswig</i>
<i>Autoklav Evo 120</i>	<i>Meditech Service GmbH, Hamburg</i>
<i>ChemiGenius2 Bioimaging System</i>	<i>Syngene, Cambridge, UK</i>
<i>Einfrrierbehältnis Nalgene Cryo Freezing container</i>	<i>Fisher Scientific GmbH, Schwerte</i>
<i>Eismaschine Scotsman AF103</i>	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>
<i>Energieversorgungsgerät PowerPac Basic Power Supply</i>	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
<i>Gefrierschrank (-20 °C)</i>	<i>Liebherr GmbH, Biberach</i>
<i>Gefriertruhe KLT 4785 (-80 °C)</i>	<i>Kryotec-Kryosafe GmbH, Hamburg</i>
<i>Inkubator HeraCell</i>	<i>Heraeus Holding GmbH, Hanau</i>
<i>Kamera Foto Speed SFCore (für Lichtmikroskop)</i>	<i>Jenoptik AG, Jena</i>
<i>Kammer, Gelelektrophorese</i>	<i>Bio-Rad Laboratories, München</i>
<i>Kammer, Western-Blot Transfer</i>	<i>Bio-Rad Laboratories, München</i>
<i>Kühlschrank (4 °C)</i>	<i>Liebherr GmbH, Biberach</i>
<i>Lichtmikroskop Axiovert 25C</i>	<i>Carl Zeiss Microscopy, Jena</i>
<i>Magnetrührer MR 3002</i>	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach</i>
<i>Mikrovolumen-Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000</i>	<i>Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA</i>
<i>Neubauer-Zählkammer</i>	<i>Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim</i>
<i>pH-Meter FiveEasy FE20</i>	<i>Mettler Toledo AG, Schwerzenbach</i>
<i>Photometer Tecan Safire II - Basic</i>	<i>Tecan, Grodig, Austria</i>
<i>Pipette 0,1-2,5 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipette 0,5-10 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

<i>Pipette 100-1000 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipette 10-100 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipette 500-5000 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipette, Achtfachpipette 300 µL Research</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Pipette, Multipipette Handystep</i>	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
<i>Pipettierhilfe accu- jet pro</i>	<i>Brand GmbH & Co. KG, Wertheim</i>
<i>Rollenmischer RM5-V</i>	<i>Labortechnik Frödel GmbH, Lindau</i>
<i>Schwenkmischer Heidolph Duomax 1030</i>	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach</i>
<i>Sterile Werkbank Hood HERASafe</i>	<i>Heraeus Holding GmbH, Hanau</i>
<i>Stickstofftank, Alarm Liquid Nitrogen Tank</i>	<i>Taylor-Wharton, Husum</i>
<i>Thermomagnetrührer MR heiTec</i>	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach</i>
<i>Thermomischer Thermomixer Compact</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Thermozykler Mastercycler ep gradient</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Tischzentrifugen (Eppendorfgefäße) MC6</i>	<i>Sarstedt AG & Co., Nümbrecht</i>
<i>Vortexmischer Reax Control</i>	<i>Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach</i>
<i>Waage, Analysenwaage CP 225</i>	<i>Satorius AG, Göttingen</i>
<i>Waage, Digitalwaage BP3100S</i>	<i>Satorius AG, Göttingen</i>
<i>Wasseraufbereitungssystem Mili-Q Plus</i>	<i>Millipore GmbH, Schwalbach</i>
<i>Wasserbad GFL</i>	<i>GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel</i>
<i>Zentrifuge (Eppendorfgefäße) 5415R</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Zentrifuge (Eppendorfgefäße) 5424R</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>
<i>Zentrifuge (Falcons) Rotina 35R</i>	<i>Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen</i>
<i>Zentrifuge (Platten) 5810R</i>	<i>Eppendorf AG, Hamburg</i>

Tabelle 19: Übersicht der verwendeten Laborgeräte.

2.14 Software

Programm	Anwendung	Hersteller
<i>GeneSnap 6.03.01</i>	<i>Visualisierung Western Blot</i>	<i>SynGene, Cambridge, UK</i>
<i>GeneTools 4.02.03</i>	<i>Auswertung Western Blot</i>	<i>SynGene, Cambridge, UK</i>
<i>GraphPad Prism 5.02</i>	<i>Abbildung und Statistik</i>	<i>GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA</i>
<i>Nano Drop 1000 3.8.1</i>	<i>DNA Konzentration</i>	<i>Fisher Thermo Scientific GmbH, Schwerte</i>
<i>ProgRes CapturePro 2.8.8</i>	<i>Fotographie Mikroskop</i>	<i>Jenoptik AG, Jena</i>
<i>Safire2</i>	<i>Auswertung Photometer</i>	<i>Tecan, Grodig, Austria</i>
<i>Sequence Detection Systems (SDS) 2.3</i>	<i>q-RT-PCR</i>	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Software.

3 Ergebnisse

3.1 Einzelextrakte

Verschiedene pflanzliche Extrakte sowie sekundäre Pflanzenstoffe zeigten in Studien bereits antioxidative Effekte. Häufig wurden jedoch die Angriffspunkte nicht geklärt. Daher wurde als erster Arbeitsschritt für jeden einzelnen Extrakt ein Screening von sieben im NO-Redox-Gleichgewicht involvierten Enzymen durchgeführt (Tabelle 21). Anschließend wurden detektierte Effekte auf ihre Konzentrationsabhängigkeit überprüft, in dem der Extrakt in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt wurde. Die Konzentration wurde dabei zweimal jeweils um das 10fache verringert. Nach der gleichen Vorgehensweise wurden die Effekte der Extrakte auf die Protein-Expression analysiert. Für die Ergebnisse des Konzentrationsversuches wurden die Resultate für die hohe Konzentration des vorherigen Experimentes miteinbezogen.

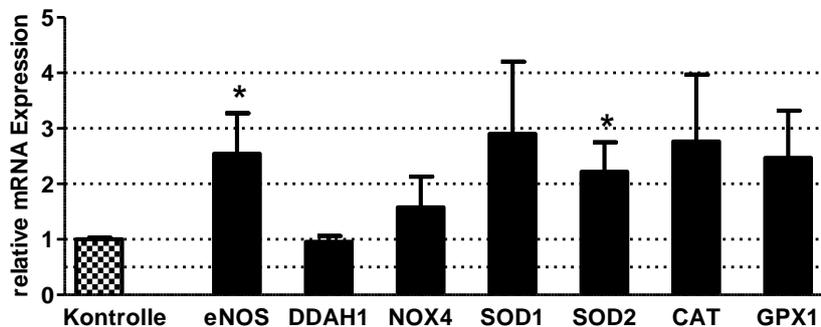
Bei der Detektion von signifikanten Effekten folgten weitergehende Untersuchungen. In den folgenden Experimenten wurde versucht, eine für die beobachteten Veränderungen verantwortliche Einzelsubstanz herauszufinden. Die Ergebnisse der Einzelkomponenten wurden den Resultaten des gesamten Extraktes aus dem Konzentrationsversuch gegenübergestellt.

Enzym	Bedeutung
<i>eNOS</i>	<i>Produktion von NO</i>
<i>DDAH1</i>	<i>Abbau des eNOS-Inhibitors ADMA</i>
<i>NOX4</i>	<i>Produktion von Superoxid-Anionen</i>
<i>SOD1</i>	<i>Abbau von Superoxid-Anionen</i>
<i>SOD2</i>	<i>Abbau von Superoxid-Anionen</i>
<i>CAT</i>	<i>Abbau des vom SOD entstandenen Wasserstoffperoxid</i>
<i>GPX1</i>	<i>Abbau des vom SOD entstandenen Wasserstoffperoxid</i>

Tabelle 21: Liste der getesteten Enzyme und deren Bedeutung für das NO-Redox-Gleichgewicht.

3.1.1 Artischocke

A



B

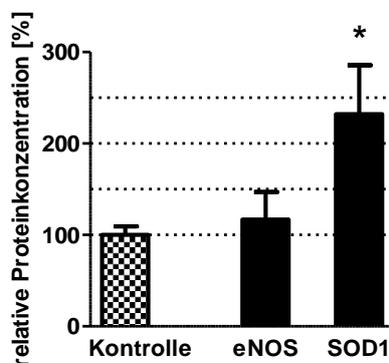


Abbildung 14: Einfluss des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 100 µg/mL Artischocken-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Durch den Artischocken-Extrakt wurde die mRNA-Expression (*Abbildung 14A*) von eNOS ($2,5 \pm 0,7$; $p=0,0161$) und SOD2 ($2,2 \pm 0,5$; $p=0,0152$) erhöht. Die Expressionen von SOD1 ($2,9 \pm 1,3$; $p=0,3939$), CAT ($2,8 \pm 1,2$; $p=0,3358$) und GPX1 ($2,5 \pm 0,9$; $p=0,3939$) zeigten eine starke Tendenz. Die beobachteten Tendenzen waren aufgrund der hohen Schwankungen nicht signifikant. Diese Veränderungen wurden in den folgenden Experimenten weiter untersucht, um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass Enzyme zu früh auszuschließen und damit Effekte übersehen werden. Bei den Proteinen (*Abbildung 14B*) erhöhte sich die Expression von SOD1 ($232\% \pm 54\%$; $p=0,0087$) signifikant. Bei beiden Experimentabläufen wurde der Artischocken-Extrakt mit einer Konzentration von

100 µg/mL eingesetzt. Als Kontrolle diente das zur Lösung des Extraktes verwendete Wasser (1%).

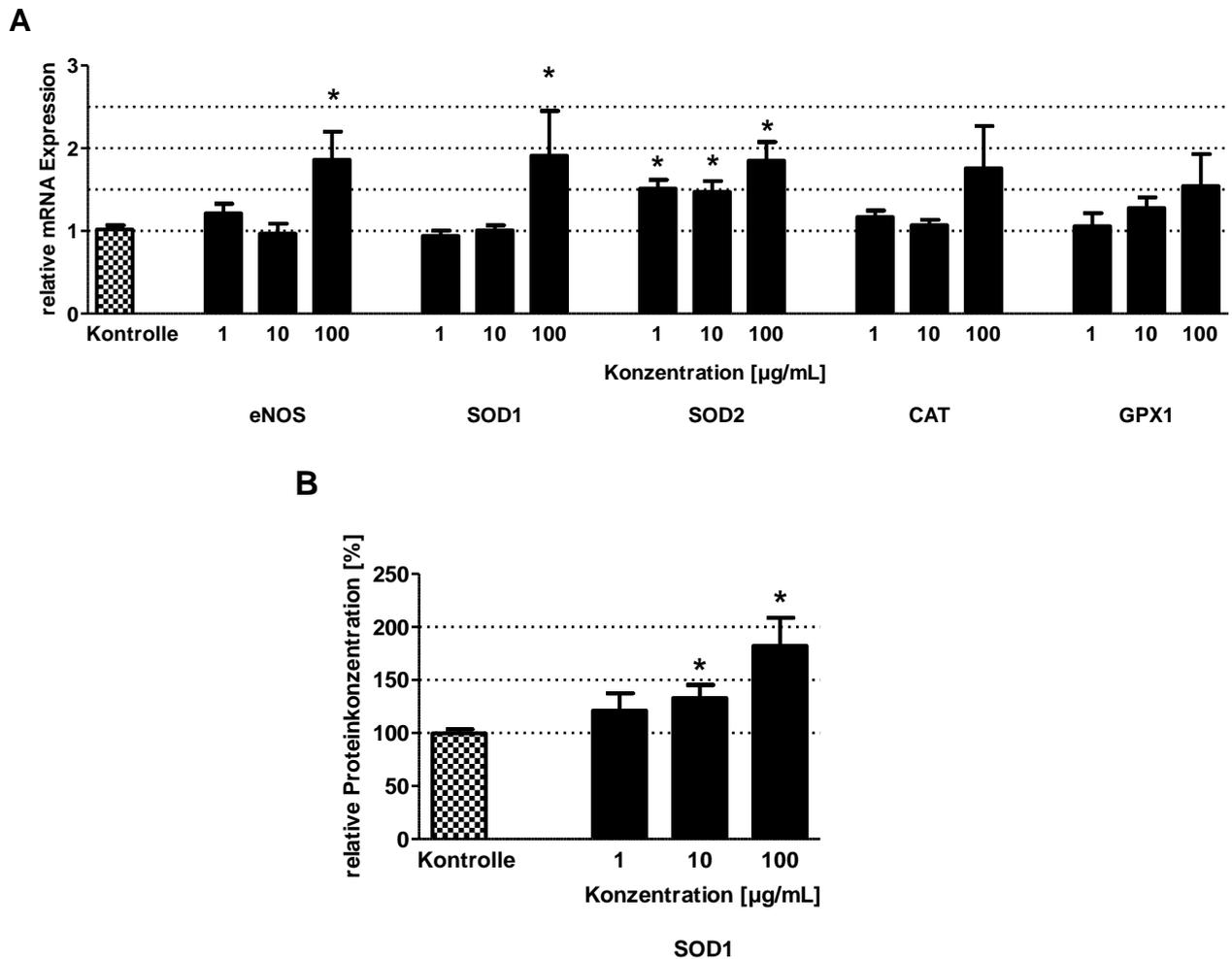


Abbildung 15: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 1 µg/mL, 10 µg/mL sowie 100 µg/mL Artischocken-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren, wurden die Experimente wiederholt und der Artischocken-Extrakt in den Konzentrationen 1 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL eingesetzt. Die beobachtete Veränderung der Expression (Abbildung 15A) von eNOS war im Vergleich zum vorherigen Experiment bei der hohen Konzentration ($1,9 \pm 0,3$; $p=0,0107$) etwas geringer. Der Effekt der hohen Konzentration unterschied sich zusätzlich gegenüber der mittleren Konzentrationen ($p=0,0216$). Bei den

niedrigen Konzentrationen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Kontrolle (1 µg/mL: $1,2 \pm 0,1$; $p=0,1439$; 10 µg/mL: $1,0 \pm 0,1$; $p=0,8113$). Während sich bei dem vorherigen Experiment für SOD1 lediglich eine starke Tendenz zeigte, konnte in diesem Fall die Schwankung verringert und somit für die hohe Konzentration eine signifikante Erhöhung ($1,9 \pm 0,5$; $p=0,0488$) detektiert werden. Dabei unterschied sich dieser Effekt nicht gegenüber der mittleren Konzentration ($p=0,0836$), aber gegenüber der niedrigen Konzentration ($p=0,0318$). Bei den niedrigen Konzentrationen gab es wie bei der Expression von eNOS keine nachweisbaren Veränderungen gegenüber der Kontrolle (1 µg/mL: $0,9 \pm 0,1$; $p=0,4035$; 10 µg/mL: $1,0 \pm 0,1$; $p=0,8579$). Bei der Expression von SOD2 konnten signifikante Erhöhungen bezüglich der Kontrolle für die niedrige ($1,5 \pm 0,1$; $p=0,0006$), die mittlere ($1,5 \pm 0,1$; $p=0,0042$) sowie die hohe Konzentration ($1,9 \pm 0,2$; $p<0,0001$) detektiert werden. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen festgestellt werden (1 µg/mL vs. 10 µg/mL: $p=0,8946$; 1 µg/mL vs. 100 µg/mL: $p=0,4380$; 10 µg/mL vs. 100 µg/mL: $p=0,2699$). Für CAT und GPX1 erbrachte die Erhöhung der Experimentenanzahl eine Verringerung der Schwankungen, aber es konnten gegenüber der Kontrolle für die hohe Konzentration keine Unterschiede (CAT: $1,8 \pm 0,5$; $p=0,3193$; GPX1: $1,5 \pm 0,4$; $p=0,8519$) detektiert werden.

Der Effekt der Protein-Expression (*Abbildung 15B*) bei der hohen Konzentration von SOD1 war im Vergleich zum vorherigen Experiment etwas geringer ($182\% \pm 26\%$; $p=0,0048$). Außerdem konnte bei der mittleren Konzentration ein Effekt ($133\% \pm 12\%$; $p=0,0233$) gezeigt werden, der sich nicht von der hohen ($p=0,2964$) oder der niedrigen Konzentration ($p=0,4894$) unterschied.

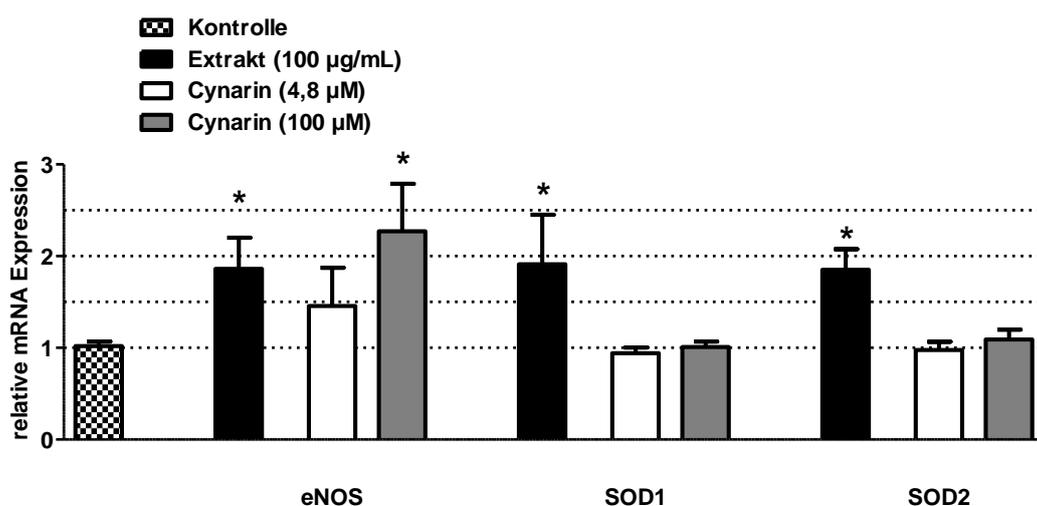


Abbildung 16: Einfluss von Cynarin als Einzelkomponente des Artischocken-Extraktes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 µg/mL Artischocken-Extrakt, 4,8 µM bzw. 100 µM Cynarin oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im

Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der verwendete Artischocken-Extrakt war auf die Einzelkomponente Cynarin normalisiert. Die Konzentration von Cynarin im Extrakt wurde mit 2,5% angegeben. Daher wurde für das Experiment zum Nachweis der für die Effekte verantwortlichen Einzelkomponente eine Konzentration (4,8 μ M) gewählt, die der im Extrakt enthaltenen Menge Cynarin entsprach. Zusätzlich wurde die Konzentration 100 μ M verwendet, um etwaige Konzentrationsabhängigkeiten zu unterscheiden oder Einflüsse kategorisch auszuschließen. Dieser Versuch demonstrierte (*Abbildung 16*), dass die niedrige Konzentration des Cynarins bei der mRNA-Expression von eNOS die gleiche Tendenz ($1,5 \pm 0,4$; p=0,8579) wie der gesamte Extrakt zeigte, die Veränderung aber nicht signifikant gegenüber der Kontrolle war. Demgegenüber war der Effekt der hohen Konzentration ($2,3 \pm 0,5$; p=0,0103) auf dem Niveau des Extraktes. Für die Expression von SOD1 und SOD2 konnten für die niedrige (SOD1: $0,9 \pm 0,1$; p=0,4035; SOD2: $1,0 \pm 0,1$; p=0,1794) sowie die hohe Konzentration (SOD1: $1,0 \pm 0,1$; p=0,8579; SOD2: $1,1 \pm 0,1$; p=0,6330) von Cynarin keine Unterschiede bezüglich der Kontrolle detektiert werden.

Dementsprechend kann Cynarin einen Anteil am Effekt der erhöhten Expression von eNOS haben. Jedoch zeigten die Experimente, dass Cynarin keinen Effekt auf SOD1 und SOD2 hat.

3.1.2 Grüner Tee

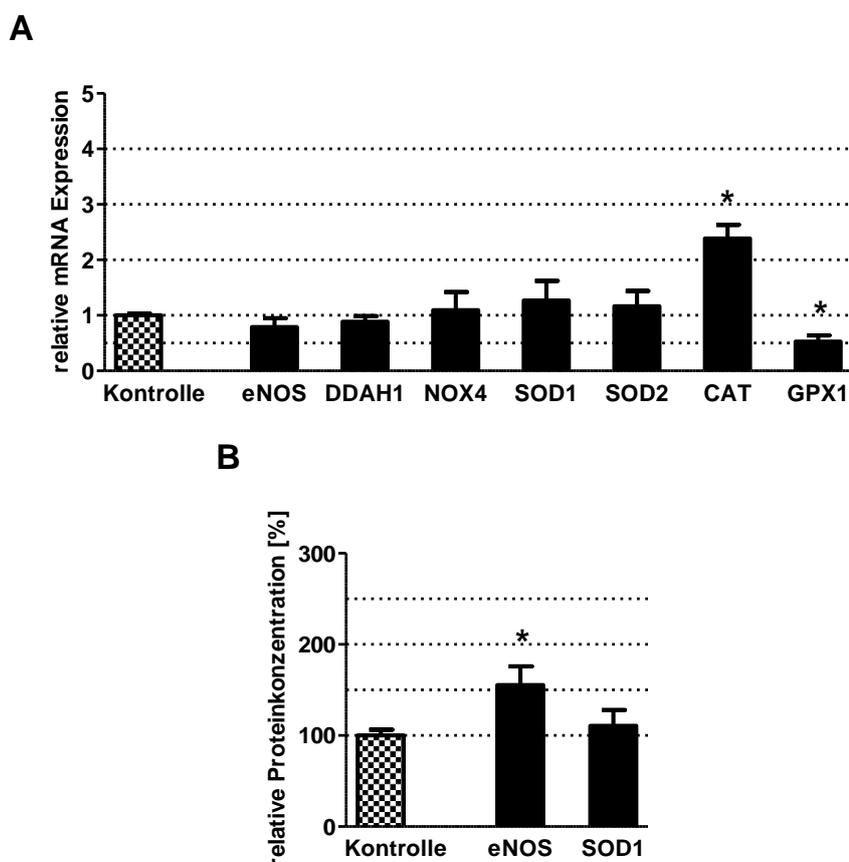


Abbildung 17: Einfluss des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 50 µg/mL Grünem Tee-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Durch die Inkubation mit dem Extrakt des Grünen Tees veränderte sich lediglich die mRNA-Expression (*Abbildung 17A*) von CAT und GPX1 signifikant. Dabei wurde die Expression von CAT ($2,4 \pm 0,2$; $p=0,0022$) erhöht und von GPX1 verringert ($0,5 \pm 0,1$; $p=0,0022$). Bei den Proteinen (*Abbildung 17B*) wurde die Expression von eNOS erhöht ($155\% \pm 21\%$; $p=0,0411$). Der Extrakt des Grünen Tees wurde in einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

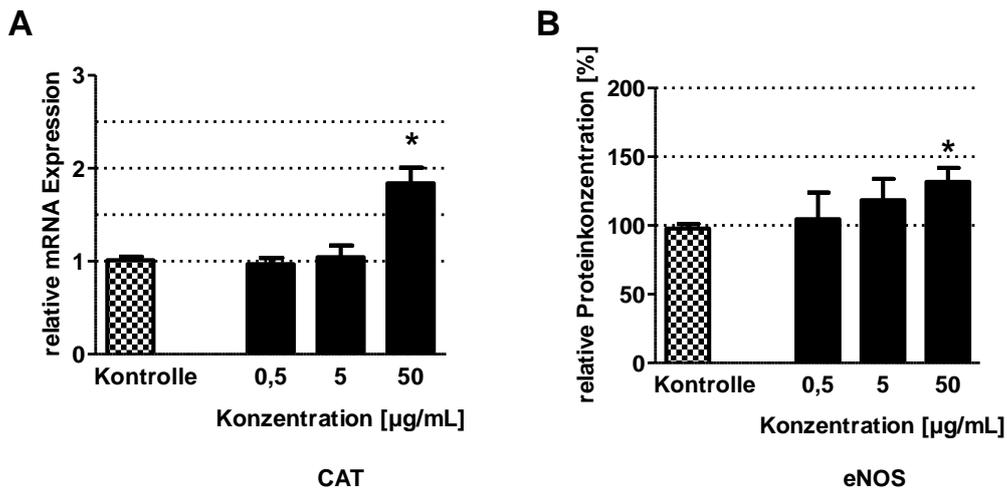


Abbildung 18: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL Grünem Tee-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation mit den abgestuften Konzentrationen des Extraktes (0,5 µg/mL, 5 µg/mL und 50 µg/mL) konnten für die niedrigen Konzentrationen bezüglich der Kontrolle keine Unterschiede (0,5 µg/mL: $1,0 \pm 0,1$; $p=0,4557$; 5 µg/mL: $1,0 \pm 0,1$; $p=0,6763$) in der mRNA-Expression (Abbildung 18A) von CAT detektiert werden. Bei der hohen Konzentration war der Effekt ($1,8 \pm 0,2$; $p<0,0001$) im Vergleich zum vorherigen Experiment etwas geringer. Dieser Effekt war gegenüber der Kontrolle sowie gegenüber der mittleren ($p=0,0003$) und niedrigen Konzentration ($p=0,0035$) signifikant. Bei der Expression der Proteine (Abbildung 18B) konnten für die niedrigen Konzentrationen ebenfalls keine Veränderungen (0,5 µg/mL: $105\% \pm 19\%$; $p=0,8814$; 5 µg/mL: $113\% \pm 16\%$; $p=0,4742$) detektiert werden. Der Effekt der hohen Konzentration ($132\% \pm 10\%$; $p=0,0037$) fiel im Vergleich zum vorherigen Experiment geringer aus und unterschied sich nicht bezüglich der niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: $p=0,3249$; 5 µg/mL: $p=0,3397$).

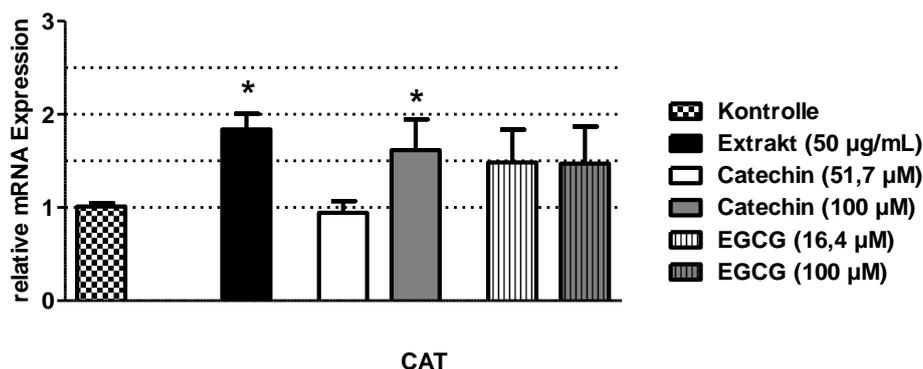


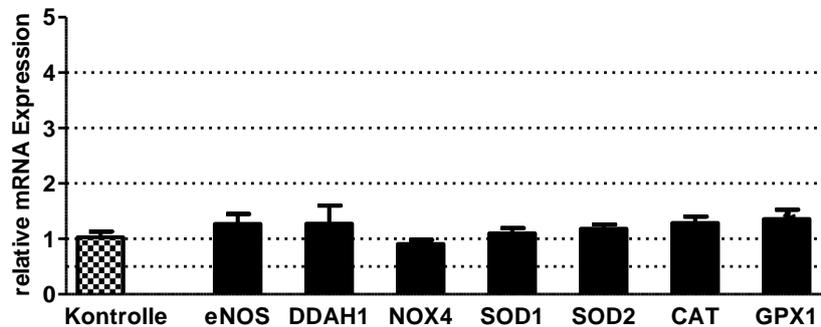
Abbildung 19: Einfluss von Catechin und EGCG als Einzelkomponente des Extraktes des Grünen Tees auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µg/mL Grünen Tee-Extrakt, 51,7 µM bzw. 100 µM Catechin, 16,4 µM bzw. 100 µM EGCG oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Extrakt des Grünen Tees war auf 50% Gesamt-Polyphenole normalisiert, darunter fielen 30% Catechin und 15% Epigallocatechingallat (EGCG). Außerdem enthielt der Extrakt 5% Coffein. Verschiedene Studien konnten bereits offenlegen, dass die antioxidative Wirkung des Grünen Tees vor allem auf den Polyphenolen Catechin und EGCG beruht. Daher wurden für die Versuche Catechin und EGCG in den Konzentrationen eingesetzt, in denen sie im Extrakt enthalten waren. Zusätzlich wurde erneut, um etwaige Konzentrationsabhängigkeiten zu unterscheiden oder Effekte kategorisch auszuschließen, die Konzentration 100 µM für beide Einzelkomponenten gewählt (Abbildung 19). Die Expression von CAT wurde lediglich bei der hohen Konzentration von Catechin gesteigert ($1,6 \pm 0,3$; $p=0,0234$). Bei EGCG ergab sich eine tendenzielle Erhöhung der Expression (16,4 µM: $1,5 \pm 0,4$; $p=0,8813$; 100 µM: $1,5 \pm 0,4$; $p=0,4739$). Diese war aber konzentrationsunabhängig ($p=0,8633$).

Dementsprechend konnte durch die Experimente gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte des Grünen Tee-Extraktes durch keinen der beiden Polyphenole alleine verursacht werden.

3.1.3 Ingwer

A



B

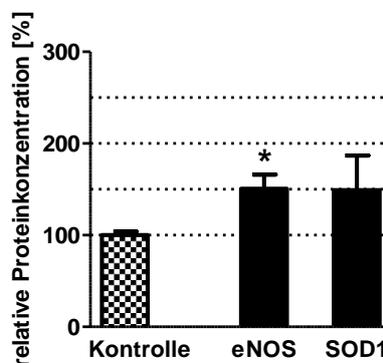


Abbildung 20: Einfluss des Ingwer-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 50 µg/mL Ingwer-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei dem Ingwer-Extrakt wurden für die Expression der mRNA (*Abbildung 20A*) keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Bei den Proteinen (*Abbildung 20B*) war die Expression von eNOS (151%±16%; p=0,0043) erhöht. Die Expression von SOD1 war auf dem gleichen Niveau wie die von eNOS, aber nur tendenziell vergrößert (149%±38%; p=0,3939). Auch in diesem Fall wurde SOD1 für die weiterführenden Experimente nicht ausgeschlossen. Der Extrakt des Ingwers wurde in einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

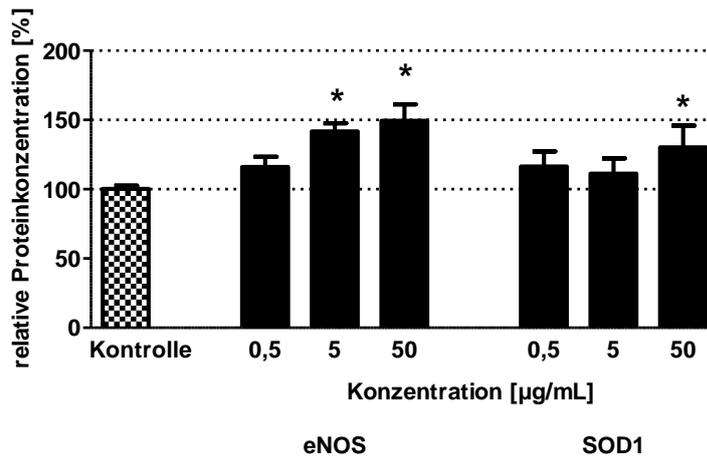


Abbildung 21: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Ingwer-Extraktes auf die Expression von Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit 0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL Ingwer-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die Experimente der Konzentrationsabhängigkeit wurde der Ingwer-Extrakt in den Konzentrationen 0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL verwendet (Abbildung 21). Der Einfluss der höchsten Konzentration auf die Expression von eNOS (149%±12%; p=0,0032) konnte aus dem vorherigen Experiment bestätigt werden. Dieser Effekt unterschied sich allerdings nicht gegenüber den niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: p=0,0950; 5 µg/mL: p=0,7882). Zusätzlich führte die Inkubation mit der mittleren Konzentration zu einer Erhöhung (142%±6%; p=0,0001) bezüglich der Kontrolle. Diese Erhöhung unterschied sich signifikant gegenüber der niedrigen Konzentration (p=0,0216). Die niedrige Konzentration zeigte hingegen keinen nachweisbaren Effekt (116%±7%; p=0,0602). Bei der Expression von SOD1 wurde durch die Erhöhung der Experimentenanzahl die Schwankung verringert. Somit konnte ein Einfluss der hohen Konzentration nachgewiesen werden (130%±16%; p = 0,0143). Dieser Effekt unterschied sich ebenfalls nicht gegenüber den niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: p=0,6546; 5 µg/mL: p=0,3106). Die beiden niedrigen Konzentrationen zeigten keine signifikanten Veränderungen (0,5 µg/mL: 116%±11%; p=0,2444; 5 µg/mL: 111%±11%; p=0,8578).

Da die Veränderungen des Ingwer-Extraktes für die weiterführenden Experimente als nicht relevant genug bewertet werden mussten, wurde auf den Nachweis der für die Effekte zuständigen Einzelkomponente verzichtet.

3.1.4 Japanischer Staudenknöterich

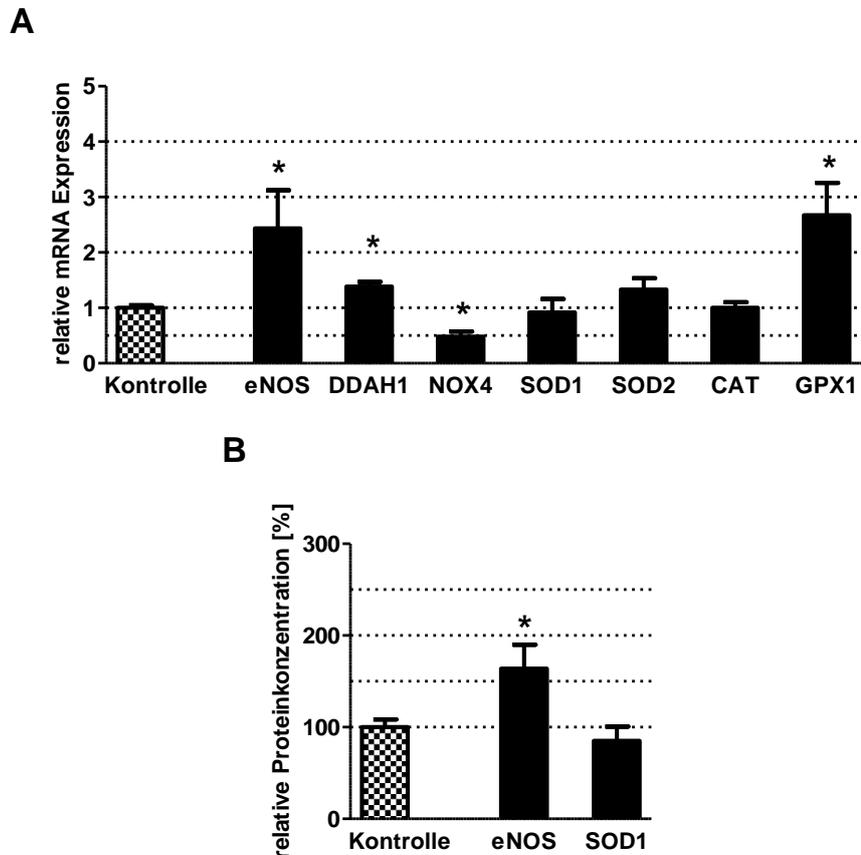


Abbildung 22: Einfluss des Extraktes des Japanischen Staudenknöterichs auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 100 μM des im Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs enthaltenen Resveratrol oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=6$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs war auf 95% Resveratrol normalisiert und wurde mit einer Konzentration von 100 μM (bezogen auf Resveratrol) eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%). Die Inkubation erhöhte die Expression der mRNA (*Abbildung 22A*) von eNOS ($2,4\pm 0,7$; $p=0,0367$), DDAH1 ($1,4\pm 0,1$; $p=0,0050$) sowie GPX1 ($2,7\pm 0,6$; $p=0,0367$) und verringerte gleichzeitig die Expression von NOX4 ($0,5\pm 0,1$; $p=0,0050$). Zusätzlich erhöhte Resveratrol die Protein-Expression (*Abbildung 22B*) von eNOS ($164\%\pm 26\%$; $p=0,0260$).

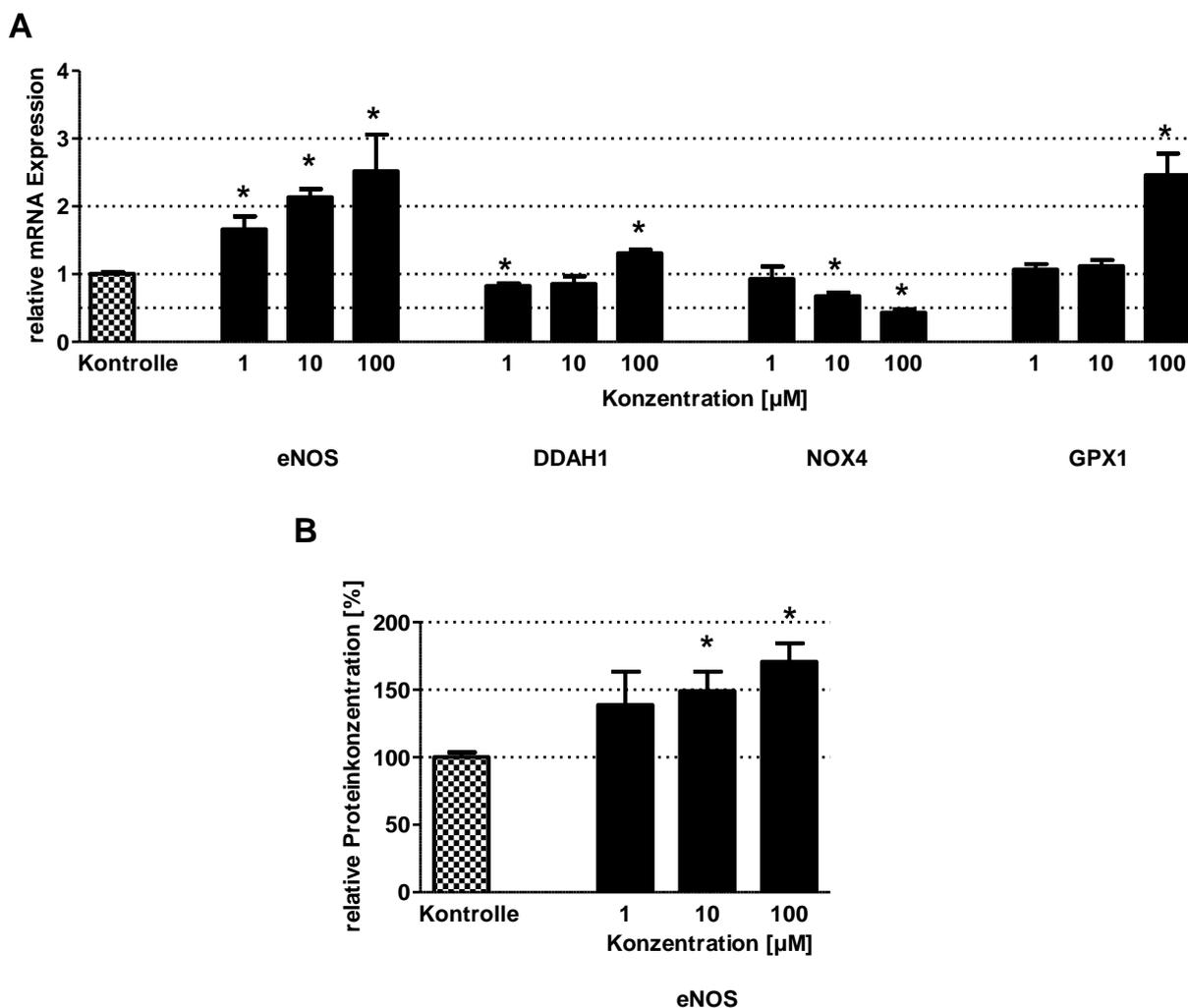


Abbildung 23: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Japanischen Staudenknöterichs auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 1 µM, 10 µM sowie 100 µM des im Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs enthaltenen Resveratrol oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren, wurde der Extrakt in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (1 µM, 10 µM und 100 µM). Bei der mRNA-Expression (*Abbildung 23A*) von eNOS konnte für alle Konzentrationen eine Erhöhung bezüglich der Kontrolle detektiert werden (1 µM: $1,7 \pm 0,2$; p=0,0005; 10 µM: $2,1 \pm 0,1$; p<0,0001; 100 µM: $2,5 \pm 0,5$; p=0,0006). Die Effekte unterschieden sich allerdings nicht voneinander (1 µM/10 µM: p=0,1447; 1 µM/100 µM: p=0,5118; 10 µM/100 µM: p=0,4207). Die Expression von DDAH1 wurde im Bezug zur Kontrolle bei der hohen Konzentration vergrößert ($1,3 \pm 0,05$; p<0,0001) und bei der niedrigen Konzentration

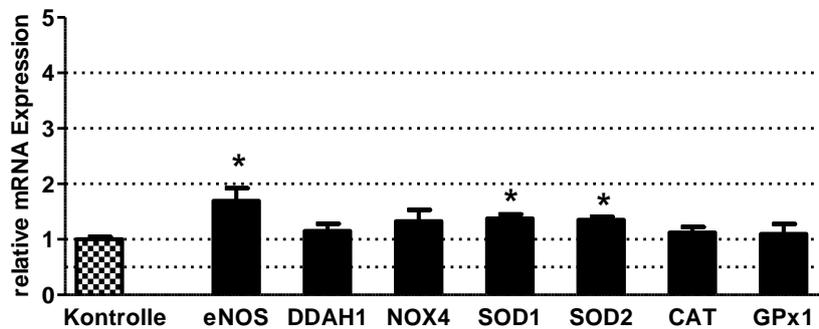
verringert ($0,8 \pm 0,04$; $p=0,0021$). Die mittlere Konzentration zeigte keine Veränderung ($0,9 \pm 0,1$; $p=0,1433$). Der Effekt der hohen Konzentration unterschied sich gegenüber der mittleren ($p=0,0046$) sowie der niedrigen Konzentration ($p<0,0001$). Zwischen der mittleren und der niedrigen Konzentration gab es keinen Unterschied ($p=1,0000$). Bei der Veränderung der Expression von NOX4 konnte das Ergebnis des vorherigen Experimentes bestätigt werden ($0,4 \pm 0,1$; $p<0,0001$). Für die mittlere Konzentration wurde ebenfalls eine Verringerung detektiert ($0,7 \pm 0,01$; $p<0,0001$). Der Effekt der hohen Konzentration unterschied sich gegenüber der mittleren ($p=0,0066$) und der niedrigen Konzentration ($p=0,0051$). Lediglich die niedrige Konzentration zeigte keinen Effekt ($0,9 \pm 0,2$; $p=0,0836$). Das Niveau der Expressionserhöhung von GPX1 konnte bei der hohen Konzentration ($2,5 \pm 0,3$; $p<0,0001$) ebenfalls bestätigt werden. Die mittlere und die niedrige Konzentration zeigten bezüglich der Kontrolle keine Veränderungen (1 μM : $1,1 \pm 0,1$; $p=0,0687$; 10 μM : $1,1 \pm 0,1$; $p=0,6759$). Wie bei der Expression von NOX4 unterschied sich der Effekt der hohen Konzentration gegenüber der mittleren ($p=0,0061$) sowie der niedrigen Konzentration ($p=0,0318$).

Bezüglich der Protein-Expression (*Abbildung 23B*) ergab die Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen eine Erhöhung der Expression von eNOS bei der höchsten ($171\% \pm 14\%$; $p<0,0001$) und mittleren Konzentration ($149\% \pm 14\%$; $p=0,0012$). Die Effekte zeigten untereinander keine signifikanten Unterschiede ($p=0,3709$). Die niedrige Konzentration erbrachte keine Veränderung ($139\% \pm 25\%$; $p=0,4381$).

Da mit Resveratrol die Hauptkomponente des Extraktes bereits auf 95% normalisiert war und damit der Reinheit eines Einzelstoffes entsprach, wurde auf die Experimente zum Nachweis der für die Effekte zuständigen Einzelkomponente verzichtet.

3.1.5 Kleines Fettblatt

A



B

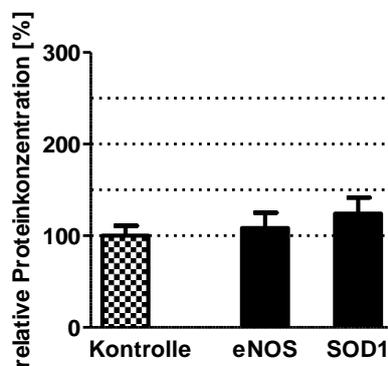


Abbildung 24: Einfluss des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 50 µg/mL Kleinem Fettblatt-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Durch den Extrakt des Kleinen Fettblattes wurde die mRNA-Expression (*Abbildung 24A*) von eNOS ($1,7 \pm 0,2$; $p=0,0152$), SOD1 ($1,4 \pm 0,1$; $p=0,0022$) und SOD2 ($1,4 \pm 0,1$; $p=0,0022$) erhöht. Demgegenüber konnten keine signifikanten Veränderungen der Protein-Expression (*Abbildung 24B*) nachgewiesen werden. Die Inkubation erfolgte mit einer Konzentration von 50 µg/mL. Als Kontrolle diente das zur Lösung des Extraktes verwendete Wasser (1%).

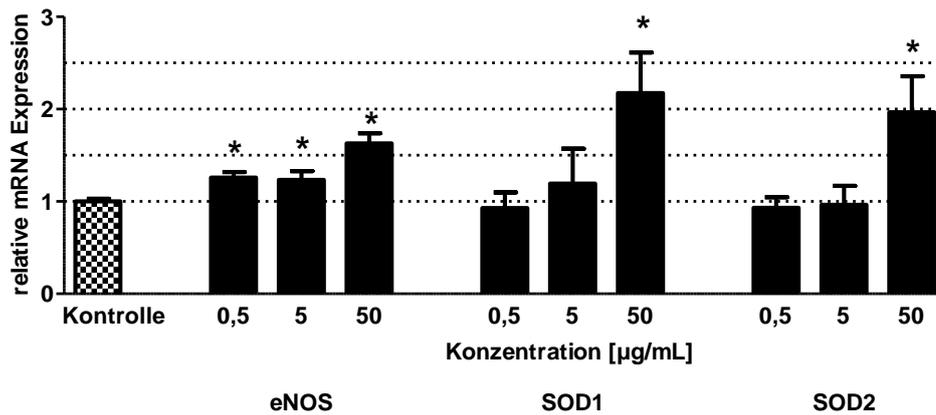


Abbildung 25: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL Kleinem Fettblatt-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9-15$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation (*Abbildung 25*) mit den drei verschiedenen Konzentrationen (0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL) erhöhte sich die mRNA-Expression von eNOS. Bei den beiden niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: $1,3 \pm 0,1$; $p=0,0013$; 5 µg/mL: $1,2 \pm 0,1$; $p=0,0199$) fiel dieser Effekt geringer aus als bei der hohen Konzentration ($1,6 \pm 0,1$; $p<0,0001$). Die Veränderungen der beiden niedrigen Konzentrationen unterschieden sich nicht voneinander ($p=1,0000$), hingegen der Effekt der hohen Konzentration zu den jeweiligen niedrigen (0,5 µg/mL: $p=0,0395$; 5 µg/mL: $p=0,0395$). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Expression von SOD1 lediglich bei der hohen Konzentration ($2,2 \pm 0,4$; $p=0,0037$). Diese Erhöhung unterschied sich ebenso von den niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: $p=0,0200$; 5 µg/mL: $p=0,0369$). Die beiden niedrigen Konzentrationen zeigten keine Veränderungen (0,5 µg/mL: $0,9 \pm 0,2$; $p=0,2563$; 5 µg/mL: $1,2 \pm 0,4$; $p=0,2098$). Die Expression von SOD2 zeigte ein ähnliches Bild. Hier konnte ebenfalls lediglich die hohe Konzentration die Expression steigern ($2,0 \pm 0,4$; $p=0,0054$) und dieser Effekt unterschied sich auch gegenüber den niedrigen Konzentrationen (0,5 µg/mL: $p=0,0342$; 5 µg/mL: $p=0,0457$). Wie schon bei der Expression von SOD1 zeigten die niedrigen Konzentrationen bei SOD2 keine Veränderungen (0,5 µg/mL: $0,9 \pm 0,1$; $p=0,1434$; 5 µg/mL: $1,0 \pm 0,2$; $p=0,2324$).

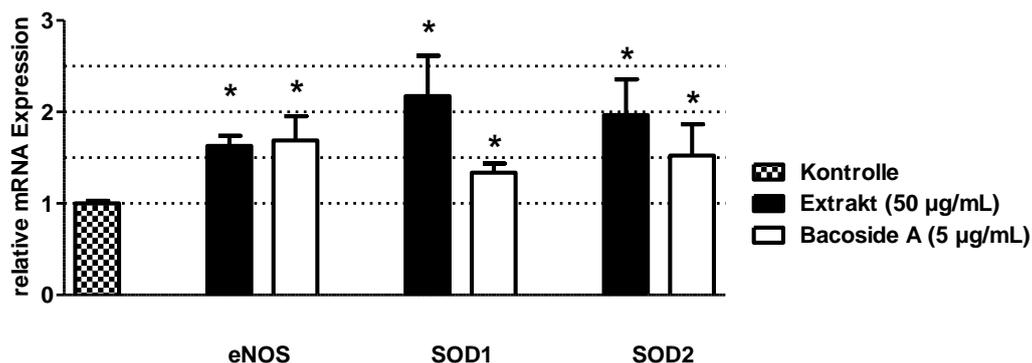


Abbildung 26: Einfluss von Bacoside A als Einzelkomponente des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µg/mL Kleinem Fettblatt-Extrakt, 5 µg/mL Bacoside A oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Extrakt des Kleinen Fettblattes war auf 10% Bacosid A normalisiert. Dies ist ein Gemisch, das unter anderem die Saponine Bacosid A3, Bacopasid II, Bacopasid X und Bacopasaponin C enthält. Dementsprechend wurde für die Experimente keine Stoffmengenkonzentration gewählt, sondern 0,5 µg/mL des Gemisches Bacosid A eingesetzt (Abbildung 26). Eine nennenswerte Steigerung der Konzentration des Stoffgemisches war aufgrund seiner beobachteten Zelltoxizität nicht möglich. Das Stoffgemisch erhöhte die Expression von eNOS ($1,7 \pm 0,3$; $p=0,0011$), SOD1 ($1,3 \pm 0,1$; $p=0,0007$) sowie SOD2 ($1,5 \pm 0,3$; $p=0,0028$). Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Effekten des Stoffgemisches gegenüber denen des gesamten Extraktes (eNOS: $p=0,6547$; SOD1: $p=0,3107$; SOD2: $p=0,2448$).

Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die beobachteten Effekte des Kleinen Fettblatt-Extraktes durch das Stoffgemisch Bacosid A verursacht werden.

3.1.6 Knoblauch (Pulver)

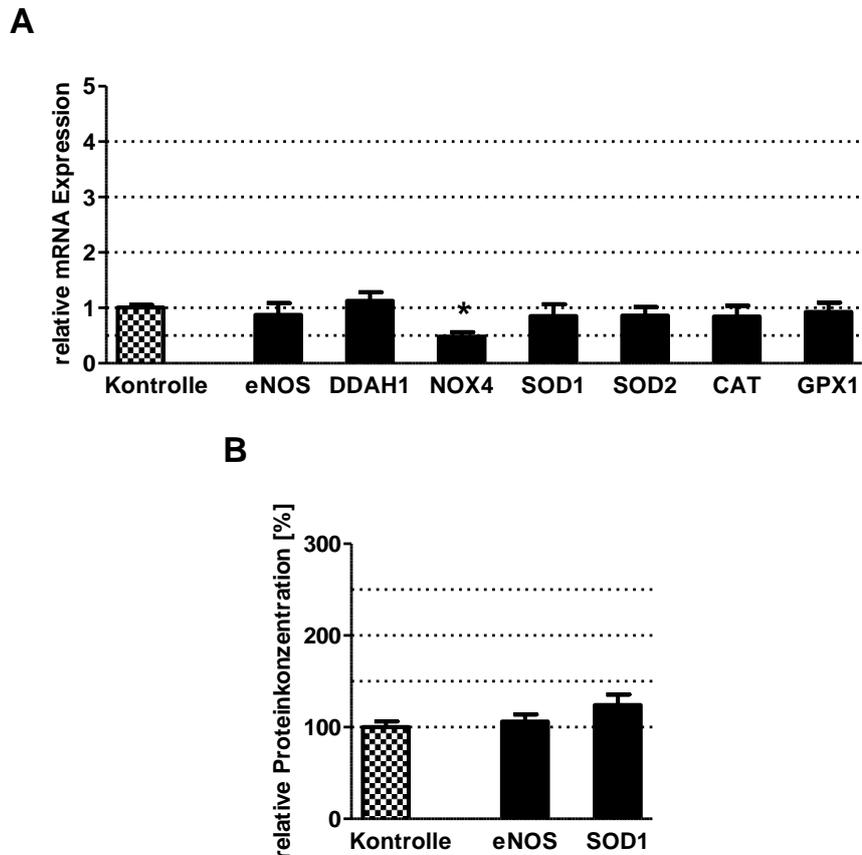


Abbildung 27: Einfluss des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 300 µg/mL pulverisiertem Knoblauch-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation mit dem pulverisierten Extrakt des Knoblauchs veränderte sich nur die mRNA-Expression (*Abbildung 27A*) von NOX4 signifikant ($0,5 \pm 0,1$; $p=0,0022$). Auf die Protein-Expression (*Abbildung 27B*) hingegen hatte der Extrakt keinen Einfluss. Der pulverisierte Extrakt des Knoblauchs wurde in einer Konzentration von 300 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

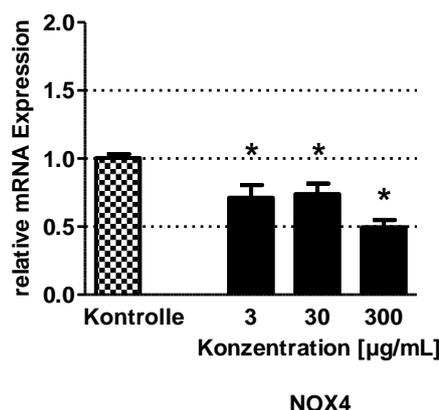


Abbildung 28: Konzentrationsabhängiger Einfluss des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL pulverisiertem Knoblauch-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit des Effektes wurde der Knoblauch-Extrakt in den Konzentrationen 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL eingesetzt (Abbildung 28). Alle drei Konzentrationen verringert die mRNA-Expression von NOX4 (3 µg/mL: $0,7 \pm 0,1$; $p=0,0023$; 30 µg/mL: $0,7 \pm 0,1$; $p=0,0029$; 300 µg/mL: $0,5 \pm 0,1$; $p<0,0001$). Der Effekt der hohen Konzentration unterschied sich gegenüber der mittleren Konzentration ($p=0,0184$). Zwischen den beiden niedrigen Konzentrationen konnte keine Veränderung nachgewiesen werden ($p=0,5354$).

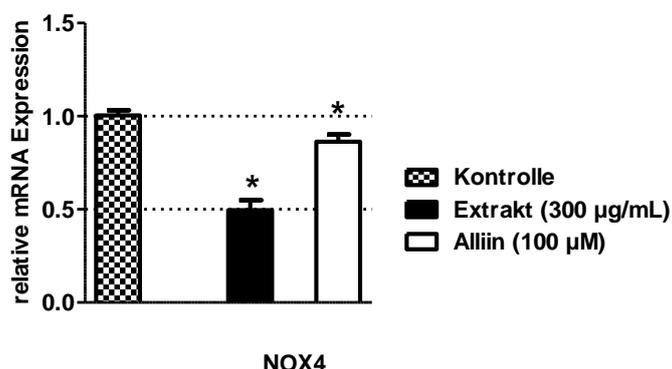


Abbildung 29: Einfluss von Alliin als Einzelkomponente des pulverisierten Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 300 µg/mL pulverisiertem Knoblauch-Extrakt, 100 µM Alliin oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse

der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * $p < 0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der pulverisierte Extrakt des Knoblauchs war auf keine Einzelkomponente normalisiert. Deshalb kam mit Alliin eine Substanz zur Anwendung, die nachweislich antioxidative Wirkung hat und vermehrt im Knoblauch enthalten ist [97]. Da keine Konzentration bekannt war, in der das Alliin in dem verwendeten Extrakt vorkam, wurde lediglich die Inkubation mit 100 μ M durchgeführt (*Abbildung 29*). Dabei verringerte das Alliin die mRNA-Expression von NOX4 ($0,9 \pm 0,1$; $p = 0,0157$) signifikant. Jedoch war dieser Effekt schwächer als der vom gesamten Extrakt ($0,5 \pm 0,1$; $p < 0,0001$) und unterschied sich signifikant von diesem ($p = 0,0005$).

Dementsprechend kann Alliin eine wesentliche Rolle bei dem Effekt des pulverisierten Knoblauch-Extraktes zugesprochen werden, jedoch scheint es noch andere wichtige Komponenten zu geben.

3.1.7 Knoblauch (Öl)

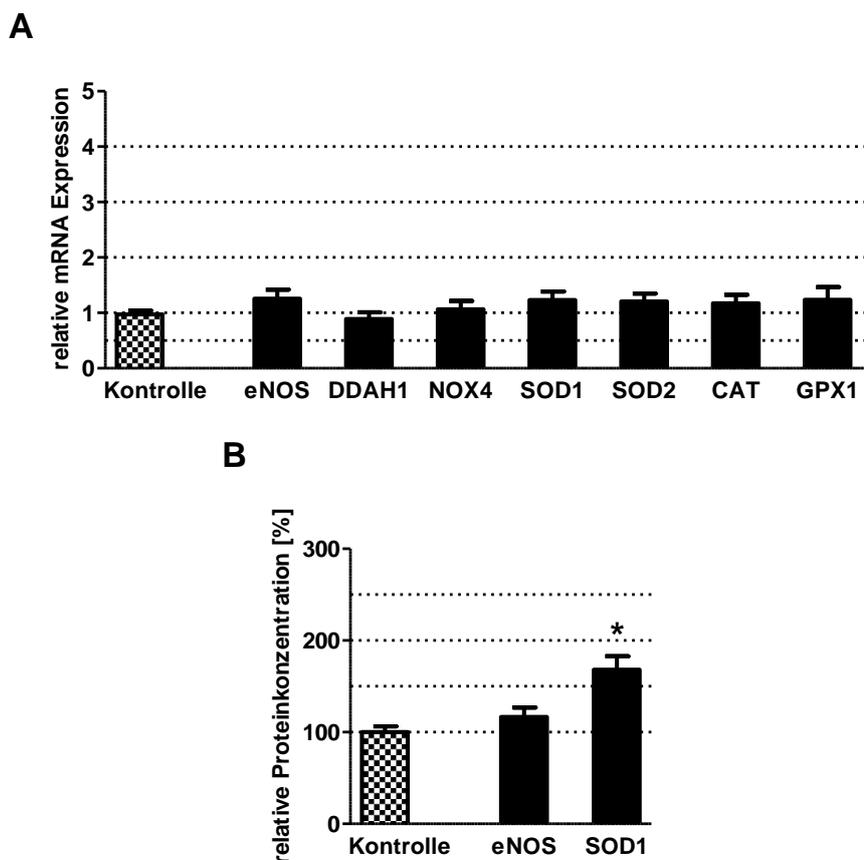


Abbildung 30: Einfluss des öligen Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 300 µg/mL öligen Knoblauch-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Im Gegensatz zum pulverisierten Extrakt konnten beim öligen Extrakt des Knoblauchs keine Veränderungen der mRNA-Expressionen (*Abbildung 30A*) detektiert werden. Bei der Protein-Expression (*Abbildung 30B*) konnte eine Erhöhung von SOD1 (168% \pm 15%; p=0,0022) gezeigt werden. Der ölige Extrakt des Knoblauchs wurde, wie auch der pulverisierte Extrakt des Knoblauchs, in der Konzentration 300 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

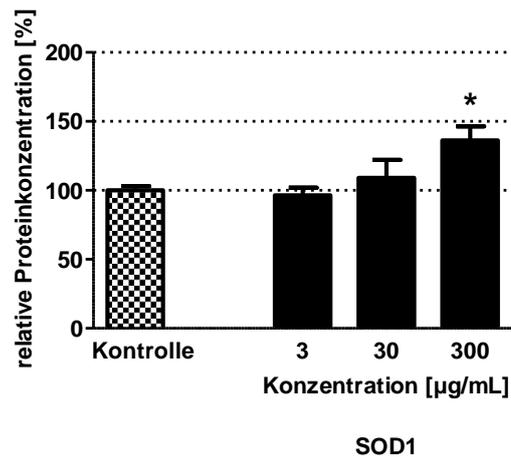


Abbildung 31: Konzentrationsabhängiger Einfluss des öligen Extraktes des Knoblauchs auf die Expression von Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL öligen Knoblauch-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Wie bei dem pulverisierten Extrakt des Knoblauchs wurden für die Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit des Effektes die Konzentrationen 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL gewählt (*Abbildung 31*). Der Effekt der hohen Konzentration konnte im Vergleich zum vorherigen Experiment bestätigt werden, wenngleich dieser geringer ausfiel (136%±10%; p=0,0006). Diese Veränderung unterschied sich ebenso gegenüber der niedrigen Konzentration (p=0,0035). Die beiden niedrigen Konzentrationen zeigten keinen nachweisbaren Einfluss (3 µg/mL: 96%±6%; p=0,7883; 30 µg/mL: 109%±13%; p=0,9050).

Da die Veränderungen des öligen Extraktes vom Knoblauch für die weiterführenden Experimente als nicht relevant genug bewertet werden mussten, wurde auf den Nachweis der für die Effekte zuständigen Einzelkomponente verzichtet.

3.1.8 Kurkuma

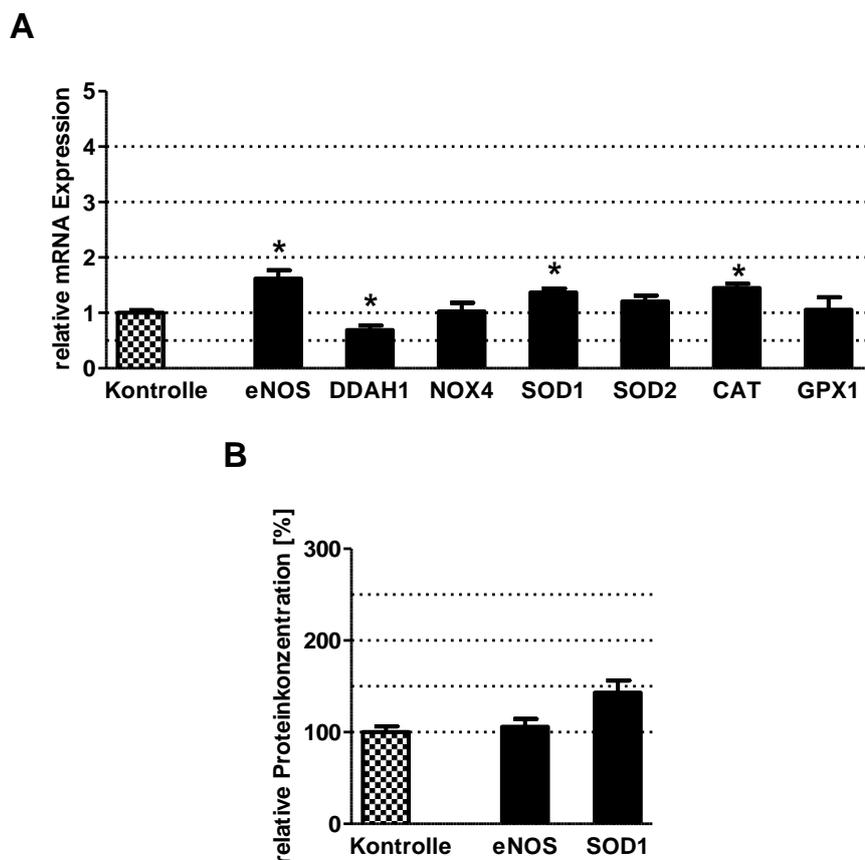


Abbildung 32: Einfluss des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 5 µg/mL Kurkuma-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Durch den Kurkuma-Extrakt erhöhte sich die mRNA-Expression (*Abbildung 32A*) von eNOS ($1,6 \pm 0,1$; $p=0,0043$), SOD1 ($1,4 \pm 0,1$; $p=0,0022$) sowie CAT ($1,4 \pm 0,1$; $p=0,0022$). Gleichzeitig verringerte sich die Expression von DDAH1 ($0,7$; $p=0,0152$). Bei den Proteinen (*Abbildung 32B*) zeigte die Expression von SOD1 eine Tendenz ($143\% \pm 13\%$; $p=0,0649$). Für die folgenden Experimente wurde diese Tendenz weiter untersucht. Der Kurkuma-Extrakt wurde in einer Konzentration von 5 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

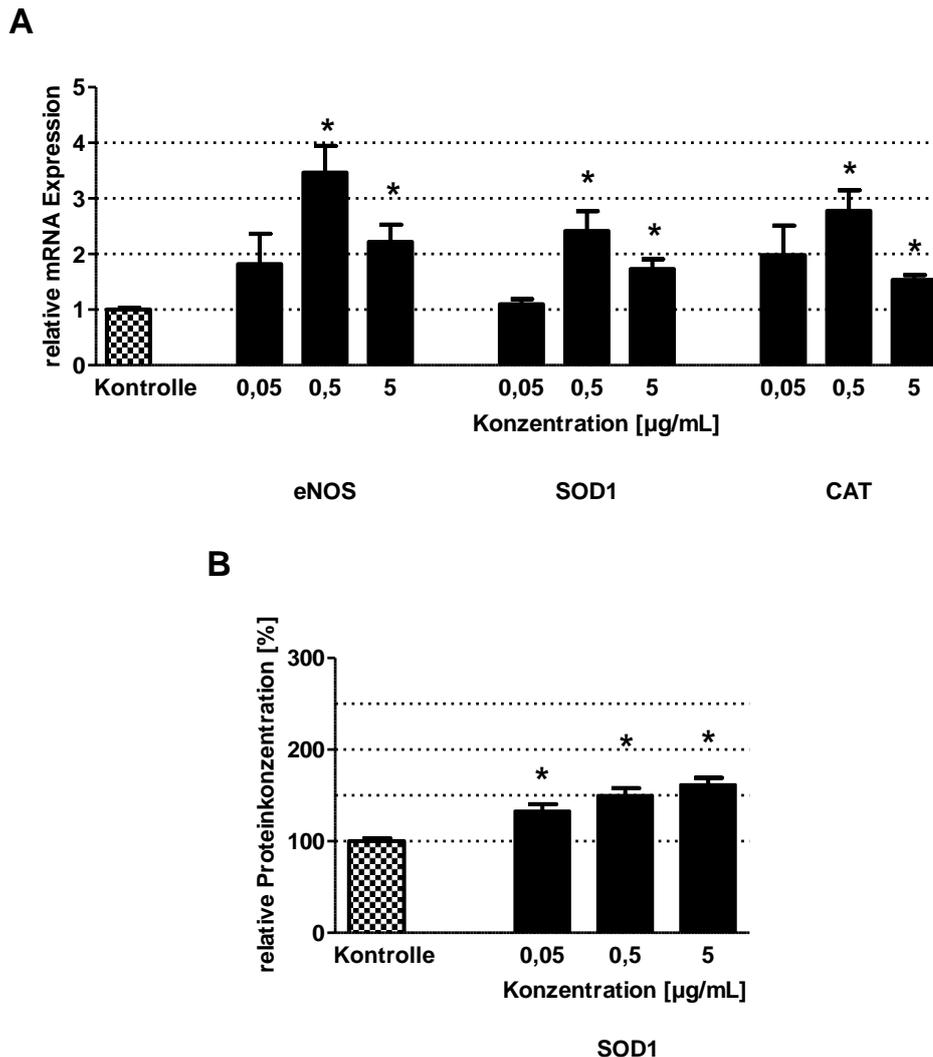


Abbildung 33: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL sowie 5 µg/mL Kurkuma-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9-15$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren, wurden die Experimente wiederholt und der Kurkuma-Extrakt in den Konzentrationen 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL und 5 µg/mL eingesetzt. Die beobachtete Veränderung (Abbildung 33A) von eNOS verstärkte sich bei der hohen Konzentration ($2,2 \pm 0,3$; $p<0,0001$) im Vergleich zum vorherigen Versuch. Interessanterweise war der Effekt der mittleren Konzentration ($3,5 \pm 0,5$; $p=0,0019$) größer als der Effekt der hohen Konzentration und unterschied sich zu diesem ($p=0,0200$). Zusätzlich unterschied sich die Veränderung ebenso in Bezug auf die

niedrige Konzentration ($p=0,0381$). Diese zeigte allerdings keine signifikante Erhöhung ($1,8\pm0,5$; $p=0,2213$). Bei der Expression von SOD1 ergab sich ein ähnliches Bild. Erneut war die Veränderung der hohen Konzentration größer als im vorherigen Versuch ($1,7\pm0,2$; $p<0,0001$). Ebenso war der Effekt der mittleren Konzentration ($2,4\pm0,4$; $p=0,0008$) höher als der der hohen Konzentration. Im Gegensatz dazu unterschieden sich in diesem Fall die Effekte der beiden höheren Konzentrationen nicht signifikant voneinander ($p=0,0735$). Beide Steigerungen unterschieden sich bezüglich der niedrigen Konzentration ($0,5 \mu\text{g/mL}$: $p=0,0046$; $5 \mu\text{g/mL}$: $p=0,0023$). Diese wies erneut keine signifikante Veränderung auf ($1,1\pm0,1$; $p=0,1700$). Bei der Expression von CAT hatten die Konzentrationen einen vergleichbaren Einfluss. Der Effekt der mittleren Konzentration ($2,8\pm0,4$; $p=0,0019$) war größer als der der hohen Konzentration ($1,5\pm0,1$; $p<0,0001$), wobei sich beide voneinander unterschieden ($p=0,0035$). Von der niedrigen Konzentration unterschieden sich diese Effekte allerdings nicht ($0,5 \mu\text{g/mL}$: $p=0,1022$; $5 \mu\text{g/mL}$: $p=0,8114$). Auch in diesem Fall zeigte die niedrige Konzentration keine signifikante Veränderung ($2,0\pm0,5$; $p=0,1609$).

Die gleichen Konzentrationen wurden für die Versuche der Expression der Proteine (*Abbildung 33B*) verwendet. Dort konnte durch die Erhöhung der Experimentenanzahl die Tendenz des vorherigen Versuchs bestätigt werden. Der Effekt wurde dadurch nachweisbar ($162\%\pm7\%$; $p<0,0001$). Die beiden niedrigen Konzentrationen zeigten ebenfalls signifikante Veränderungen ($0,05 \mu\text{g/mL}$: $133\%\pm8\%$; $p=0,0017$; $0,5 \mu\text{g/mL}$: $150\%\pm7\%$; $p<0,0001$). Zusätzlich unterschied sich der Einfluss der hohen Konzentration von der niedrigsten ($p=0,0122$).

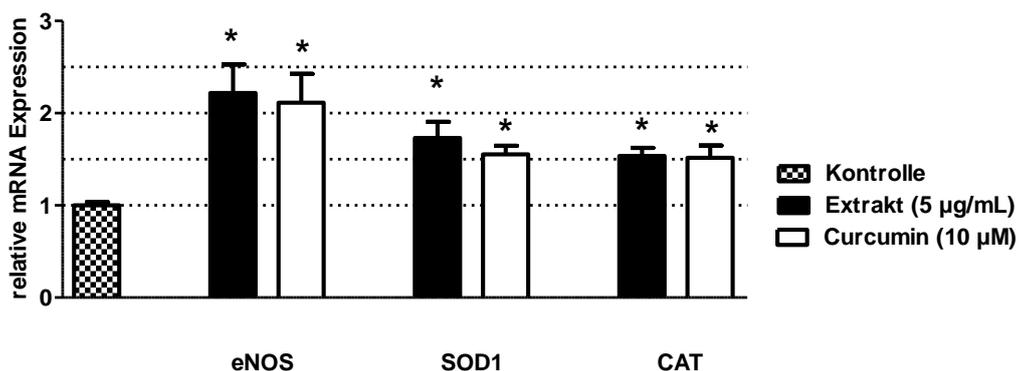


Abbildung 34: Einfluss von Curcumin als Einzelkomponente des Kurkuma-Extraktes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit $5 \mu\text{g/mL}$ Kurkuma-Extrakt, $10 \mu\text{M}$ Curcumin oder der Lösungsmittelkontrolle ($0,1\%$ DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9-15$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Kurkuma-Extrakt war auf 90% Curcuminoiden normalisiert. Zu den Curcuminoiden zählen Curcumin, Cyclocurcumin, Demethoxycurcumin sowie Bisdemethoxycurcumin. Curcumin ist der bedeutendste Vertreter dieses Gemisches und wurde daher als Einzelkomponente in der im Extrakt enthaltenen Konzentration (10 μM) verwendet (Abbildung 34). Eine Erhöhung der Konzentration auf 100 μM war aufgrund der Zelltoxizität nicht möglich. Die Inkubation mit Curcumin zeigte vergleichbare Effekte auf die Expression der mRNA von eNOS ($2,1 \pm 0,3$; $p=0,0019$), SOD1 ($1,6 \pm 0,1$; $p=0,0001$) sowie CAT ($1,5 \pm 0,1$; $p=0,0007$). Diese beobachteten Veränderungen unterschieden sich nicht von denen des gesamten Extraktes (eNOS: $p=0,8580$; SOD1: $p=0,5913$; SOD2: $p=0,7655$).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass Curcumin die beobachteten Effekte des Kurkuma-Extraktes verursacht.

3.1.9 Mariendistel

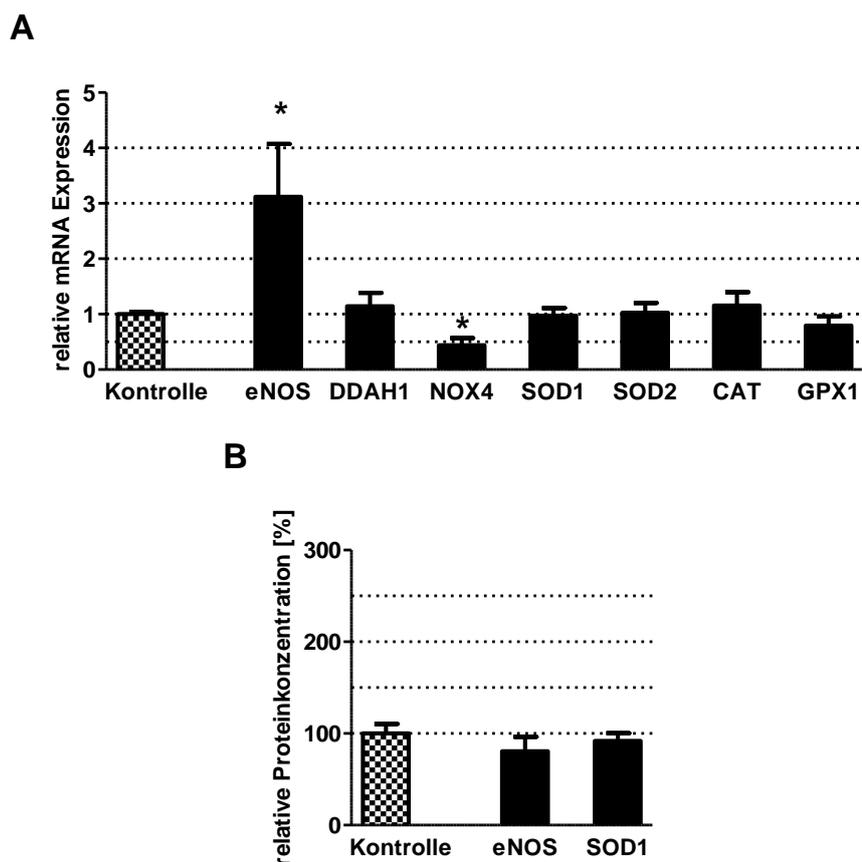


Abbildung 35: Einfluss des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mariendistel-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der

Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Die Inkubation mit dem Mariendistel-Extrakt veränderte die mRNA-Expression (*Abbildung 35A*) von eNOS sowie NOX4. Die Expression von eNOS ($3,1 \pm 1,0$; p=0,0152) wurde erhöht und die von NOX4 ($0,4 \pm 0,1$; p=0,0247) verringert. Auf die Expression der Proteine (*Abbildung 35B*) hatte der Mariendistel-Extrakt keinen Einfluss. Der Mariendistel-Extrakt wurde in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

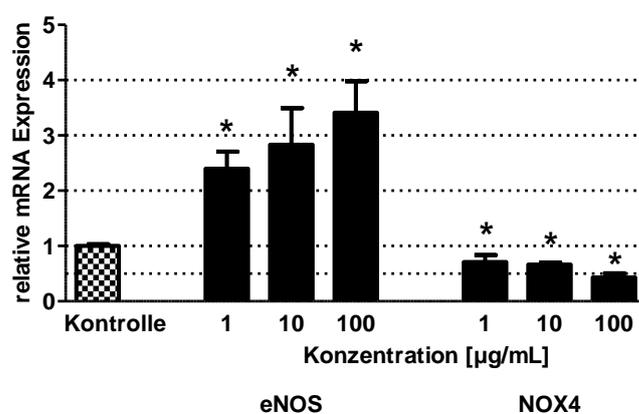


Abbildung 36: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sowie 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Mariendistel-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die weiteren Experimente wurde der Mariendistel-Extrakt in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sowie 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt (*Abbildung 36*). Alle Konzentrationen veränderten die mRNA-Expression von eNOS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $2,4 \pm 0,3$; p=0,0019; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $2,8 \pm 0,7$; p=0,0273; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $3,4 \pm 0,6$; p=0,0002). Die Effekte zeigten keine Unterschiede zueinander (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: p=0,8633; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: p=0,4560; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vs 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: p=0,5119). Auf die Expression von NOX4 hatten ebenfalls alle Konzentrationen einen signifikanten Einfluss (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $0,7 \pm 0,1$; p=0,0171; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $0,7 \pm 0,03$; p<0,0001; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$: $0,4 \pm 0,1$; p=0,0002). Hier stellte sich zusätzlich ein Unterschied zwischen der mittleren und der hohen Konzentration (p=0,0035) heraus.

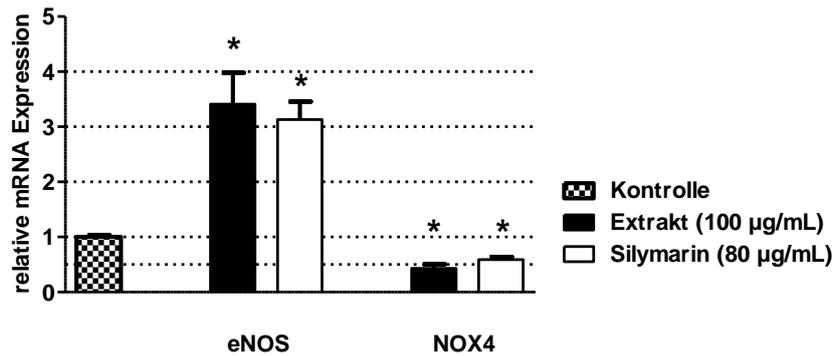


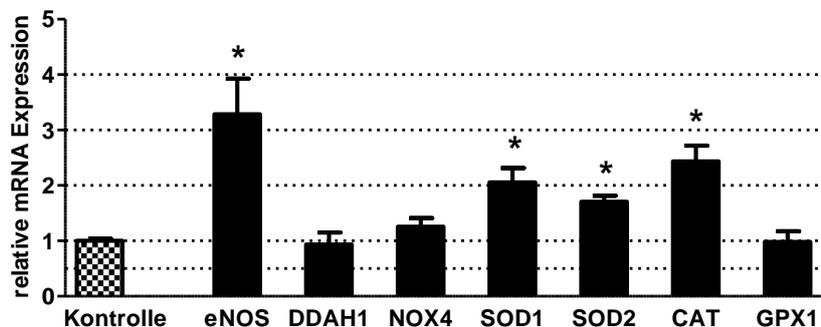
Abbildung 37: Einfluss von Silymarin als Einzelkomponente des Mariendistel-Extraktes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 100 µg/mL Mariendistel-Extrakt, 80 µg/mL Silymarin oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9-15$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Mariendistel-Extrakt war auf 80% Silymarin normalisiert. Silymarin besteht aus einem Gemisch aus Silybinin, Isosilybin, Silychristin und Silydianin. Diese wiederum stellen jeweils Gemische aus Enantiomeren bzw. Diastereomeren dar. Da das Gesamtgemisch Silymarin als Arzneistoff zugelassen ist und die Leitsubstanz der Mariendistel darstellt, wurde dieses dementsprechend für die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Da der Extrakt auf 80% normiert war, wurde Silymarin in der Konzentration von 80 µg/mL eingesetzt (*Abbildung 37*). Silymarin zeigte vergleichbare Veränderungen auf die Expression von eNOS ($3,1\pm 0,3$; $p<0,0001$) sowie NOX4 ($0,6\pm 0,05$; $p<0,0001$). Im Gegensatz zu den Effekten der Expression von eNOS ($p=1,0000$) unterschied sich die Veränderung der Expression von NOX4 vom Silymarin gegenüber dem Effekt des gesamten Extraktes ($p=0,0086$).

Dementsprechend konnte nachgewiesen werden, dass das Stoffgemisch Silymarin die Effekte des Mariendistel-Extraktes verursacht.

3.1.10 Rosmarin

A



B

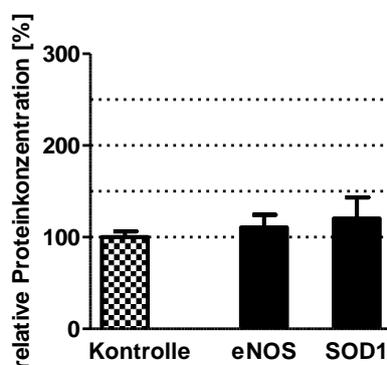


Abbildung 38: Einfluss des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 50 µg/mL Rosmarin-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Mithilfe des Rosmarin-Extraktes konnte die Expression der mRNA (*Abbildung 38A*) von eNOS ($3,3 \pm 0,6$; $p=0,0022$), SOD1 ($2,1 \pm 0,3$; $p=0,0022$), SOD2 ($1,7 \pm 0,1$; $p=0,0022$) sowie CAT ($2,4 \pm 0,3$; $p=0,0022$) erhöht werden. Bei der Expression der Proteine (*Abbildung 38B*) ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Der Rosmarin-Extrakt wurde in einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

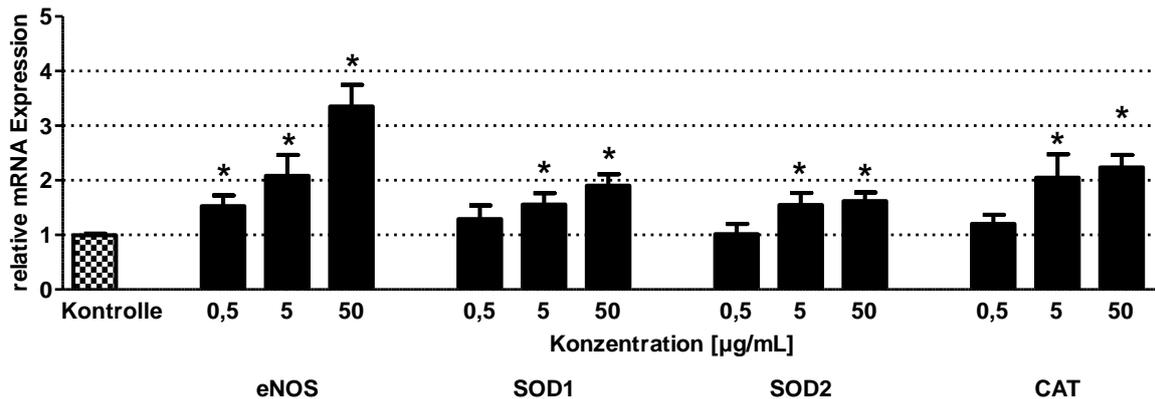


Abbildung 39: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA.

Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 0,5 µg/mL, 5 µg/mL sowie 50 µg/mL Rosmarin-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren, wurden die Experimente wiederholt und der Rosmarin-Extrakt in den Konzentrationen 0,05 µg/mL, 0,5 µg/mL und 5 µg/mL eingesetzt (Abbildung 39). Die Expression von eNOS erhöhte sich bei der niedrigen ($1,5 \pm 0,2$; $p=0,0035$), der mittleren ($2,1 \pm 0,4$; $p=0,0157$) sowie der hohen Konzentration ($3,4 \pm 0,4$; $p<0,0001$). Der Effekt der hohen Konzentration unterschied sich von dem der niedrigen ($p=0,0021$) und der mittleren Konzentration ($p=0,0369$). Bei der Expression von SOD1 konnte nur bei der mittleren ($1,6 \pm 0,2$; $p=0,0051$) und der hohen ($1,9 \pm 0,2$; $p=0,0014$) Konzentration eine Steigerung nachgewiesen werden. Die niedrige Konzentration zeigte keine Veränderung ($1,3 \pm 0,2$; $p=0,9524$). In diesem Fall unterschieden sich die verschiedenen Konzentrationen nicht voneinander (0,5 µg/mL vs 5 µg/mL: $p=0,3865$; 0,5 µg/mL vs 50 µg/mL: $p=0,0645$; 5 µg/mL vs 50 µg/mL: $p=0,3107$). Die Expression von SOD2 stieg ebenfalls bei der mittleren ($1,5 \pm 0,2$; $p=0,0122$) und der hohen Konzentration ($1,6 \pm 0,2$; $p=0,0010$) nachweisbar an. Hier unterschied sich der Effekt der hohen Konzentration bezüglich der niedrigen ($p=0,0235$). Diese wies keine signifikante Veränderung in Bezug zur Kontrolle auf ($1,0 \pm 0,2$; $p=0,5117$). Ähnliche Auswirkungen der Konzentrationen zeigten sich bei der Expression von CAT. Erneut konnte für die niedrige Konzentration kein Einfluss nachgewiesen werden ($1,2 \pm 0,2$; $p=0,3709$). Die Expression bei der mittleren ($2,0 \pm 0,4$; $p=0,0038$) und der hohen Konzentration ($2,2 \pm 0,2$; $p<0,0001$) stieg signifikant an. Ebenfalls unterschied sich der Effekt der hohen Konzentration bezüglich der niedrigen Konzentration ($p=0,0035$).

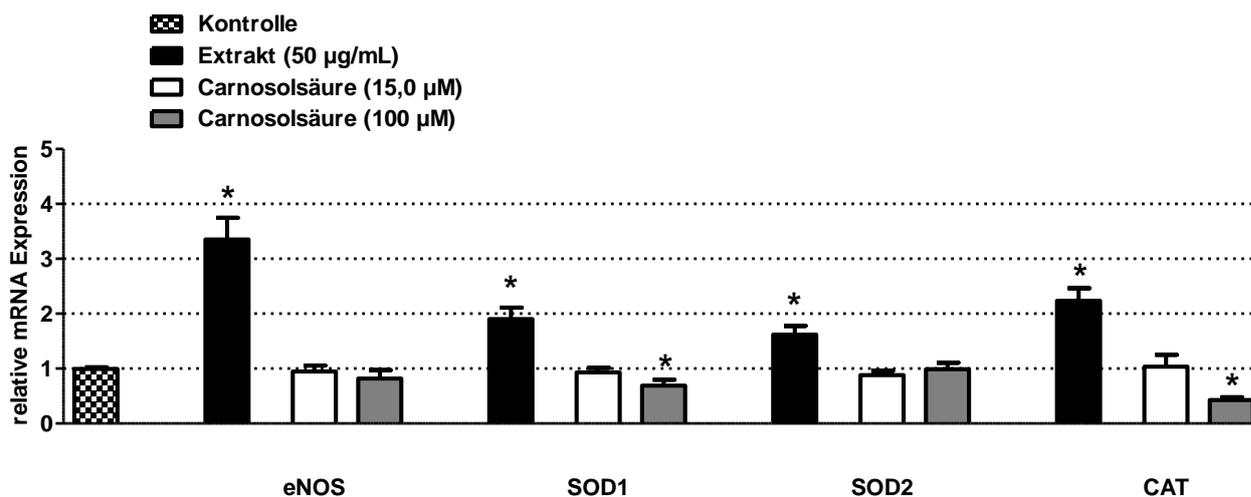


Abbildung 40: Einfluss von Carnosolsäure als Einzelkomponente des Rosmarin-Extraktes auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 50 µg/mL Rosmarin-Extrakt, 15,0 µM bzw. 100 µM Carnosolsäure oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Rosmarin-Extrakt war auf 10% Carnosolsäure normalisiert. Eingesetzt wurde die Substanz daher in der im Extrakt enthaltenen Konzentration (15,0 µM) und zudem in der Konzentration 100 µM (*Abbildung 40*). Nur die hohe Konzentration der Carnosolsäure konnte die Expression von SOD1 ($0,7 \pm 0,1$; $p < 0,0001$) sowie CAT ($0,4 \pm 0,1$; $p < 0,0001$) signifikant verändern. Im Gegensatz zum gesamten Extrakt verringerte die Einzelsubstanz die Expression.

Das Experiment konnte zeigen, dass der Rosmarin-Extrakt verschiedene Effekte aufweist, diese aber nicht von der Leitsubstanz Carnosolsäure verursacht werden.

3.1.11 Weißdorn (Blätter)

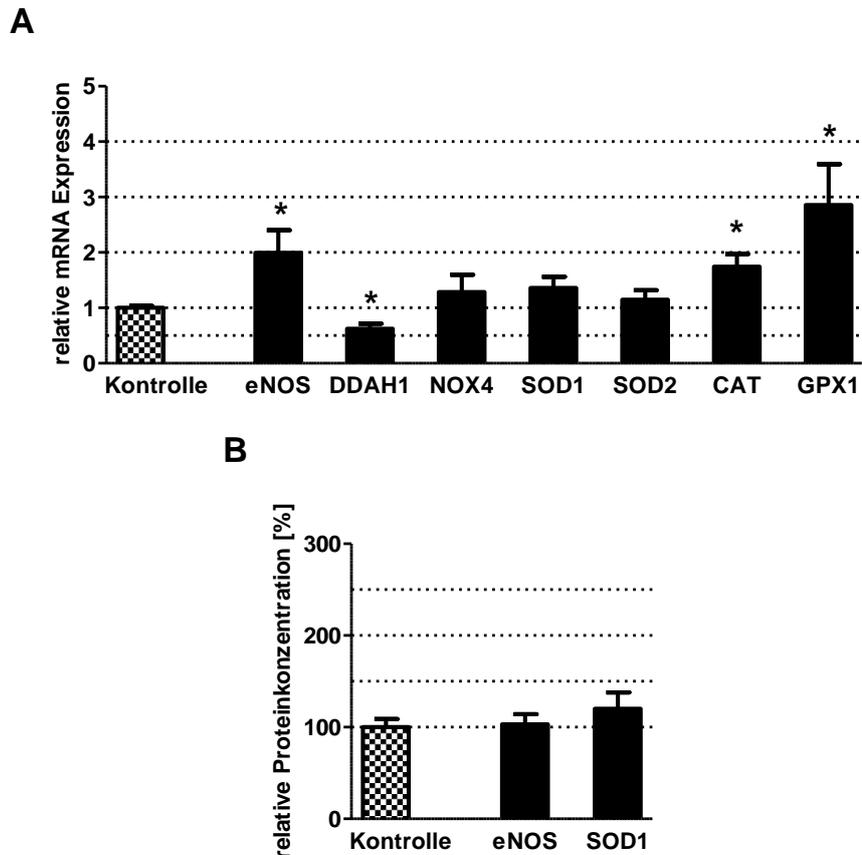


Abbildung 41: Einfluss des Extraktes der Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 300 µg/mL Weißdornblätter-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Der Extrakt der Blätter vom Weißdorn erhöhte die Expression der mRNA (*Abbildung 41A*) von eNOS ($2,0 \pm 0,4$; $p=0,0022$), CAT ($1,7 \pm 0,2$; $p=0,0022$) und GPX1 ($2,9 \pm 0,7$; $p=0,0022$). Gleichzeitig verringerte sich die Expression von DDAH1 ($0,6 \pm 0,1$; $p=0,0087$). Auf die Expression der Proteine (*Abbildung 41B*) hatte der Extrakt keinen Einfluss. Der Extrakt der Blätter vom Weißdorn wurde in der Konzentration 300 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

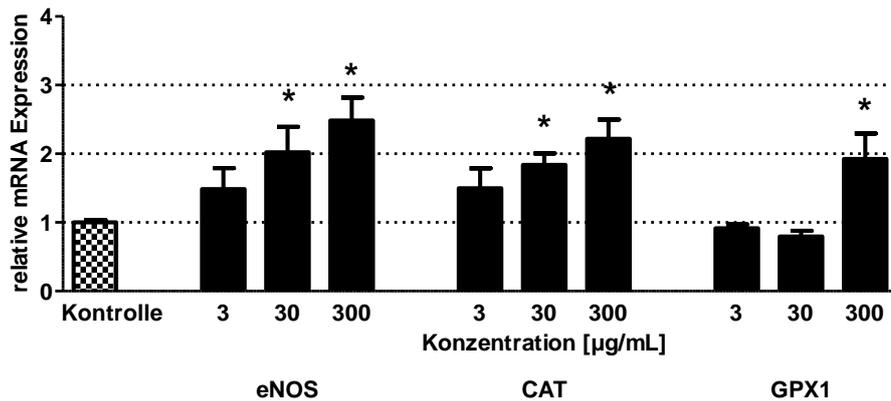


Abbildung 42: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes der Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL Weißdornblätter-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die Konzentrationsversuche wurden die Konzentrationen 3 µg/mL, 30 µg/mL und 300 µg/mL gewählt (Abbildung 42). Die mittlere ($2,0 \pm 0,4$; $p=0,0019$) und die hohe Konzentration ($2,5 \pm 0,3$; $p<0,0001$) steigerten die Expression von eNOS. Zusätzlich war der Effekt der hohen Konzentration signifikant unterschiedlich bezüglich der niedrigen Konzentration ($p=0,0491$). Diese wies keine nachweisbare Veränderung auf ($1,5 \pm 0,3$; $p=0,2570$). Ein ähnlicher Einfluss der verschiedenen Konzentrationen zeigte sich bei der Expression von CAT. Erneut steigerten die mittlere ($1,8 \pm 0,2$; $p=0,0011$) und die hohe Konzentration ($2,2 \pm 0,3$; $p<0,0001$) die Expression. Die niedrige Konzentration zeigte auch hier keinen Einfluss ($1,5 \pm 0,3$; $p=0,2324$), die Effekte der verschiedenen Konzentrationen unterschieden sich nicht voneinander (3 µg/mL vs 30 µg/mL: $p=0,2831$; 3 µg/mL vs 300 µg/mL: $p=0,1210$; 30 µg/mL vs 300 µg/mL: $p=0,5510$). Bei der Expression von GPX1 zeigte die hohe Konzentration ($1,9 \pm 0,4$; $p=0,0070$) einen nachweisbaren Einfluss. Bei der niedrigen ($0,9 \pm 0,1$; $p=0,1280$) sowie der mittleren Konzentration ($0,8 \pm 0,1$; $p=0,0834$) konnte keine Veränderung detektiert werden. In diesem Falle unterschied sich die hohe Konzentration bezüglich der niedrigen ($p=0,0123$) und der mittleren Konzentration ($p=0,0112$).

Der Extrakt der Blätter vom Weißdorn war auf 5% der Klasse der Flavonoide normalisiert. Dazu zählen unter anderem die Inhaltsstoffe Ursolsäure und Rutin (Glycosid von Quercetin). Da die Effekte von Ursolsäure sowie Rutin und Quercetin gegenüber eNOS und CAT bereits in der Literatur beschrieben wurden [98-99], wurde an diesem Punkt auf den Nachweis der verantwortlichen Einzelkomponente verzichtet.

3.1.12 Weißdorn (Blüten/Blätter)

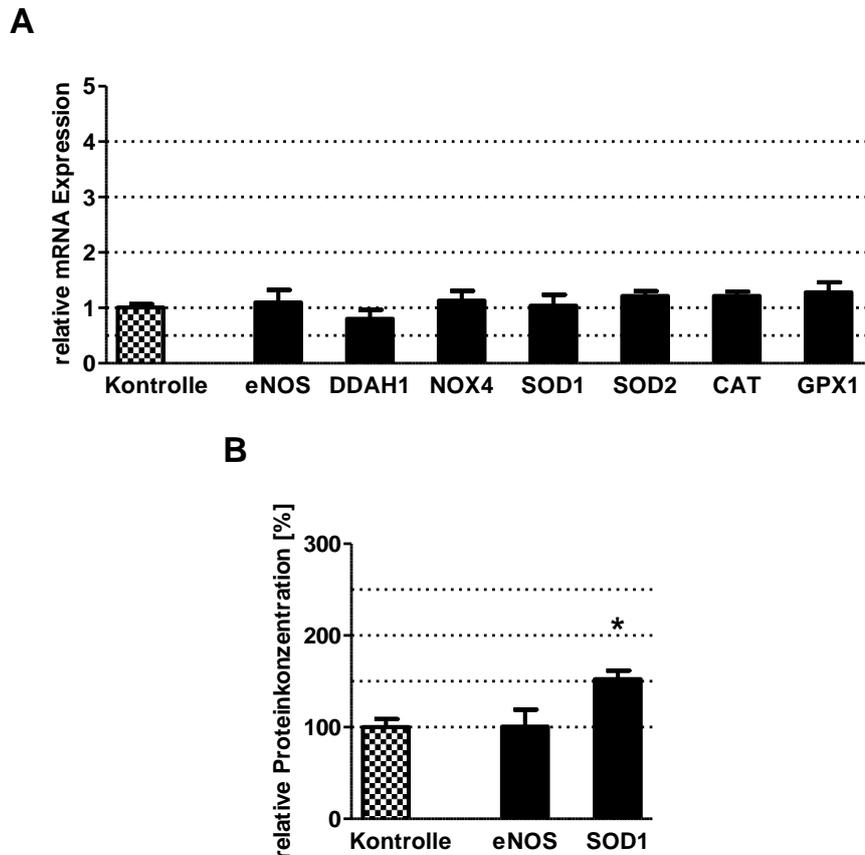


Abbildung 43: Einfluss des Extraktes der Blüten und Blätter des Weißdorns auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 300 µg/mL Weißdornblüten/-blätter-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Im Gegensatz zum Extrakt der Blätter vom Weißdorn hatte der Extrakt der Blüten und Blätter keinen nachweisbaren Einfluss auf die Expression der mRNA (Abbildung 43A). Bezüglich der Proteine (Abbildung 43B) erhöhte der Extrakt die Expression von SOD1 (152% \pm 9%; p=0,0043). Der Extrakt der Blüten und Blätter vom Weißdorn wurde ebenfalls in der Konzentration 300 µg/mL eingesetzt. Das zur Lösung des Extraktes verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

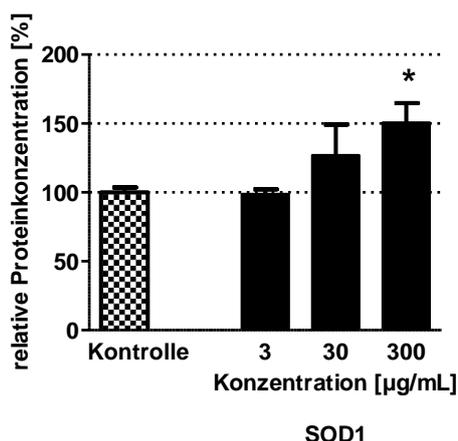


Abbildung 44: Konzentrationsabhängiger Einfluss des Extraktes der Blüten und Blätter des Weißdorns auf die Expression von Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit 3 µg/mL, 30 µg/mL sowie 300 µg/mL Weißdornblüten/-blätter-Extrakt oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9-15, * $p < 0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die Konzentrationsversuche wurden wie bei dem Extrakt der Blätter die Konzentrationen 3 µg/mL, 30 µg/mL und 300 µg/mL gewählt (Abbildung 44). Die niedrige ($99\% \pm 3\%$; $p = 1,0000$) und die mittlere Konzentration ($127\% \pm 22\%$; $p = 0,9051$) zeigten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Protein-Expression von SOD1. Lediglich die hohe Konzentration steigerte die Expression ($151\% \pm 14\%$; $p = 0,0039$) und zeigte zusätzlich einen Unterschied gegenüber der niedrigen Konzentration ($p = 0,0143$).

Da der Effekt des Extraktes für die weiterführenden Experimente als nicht relevant genug bewertet werden mussten, wurde auf den Nachweis der für die Effekte zuständigen Einzelkomponente verzichtet.

3.1.13 Coenzym Q1

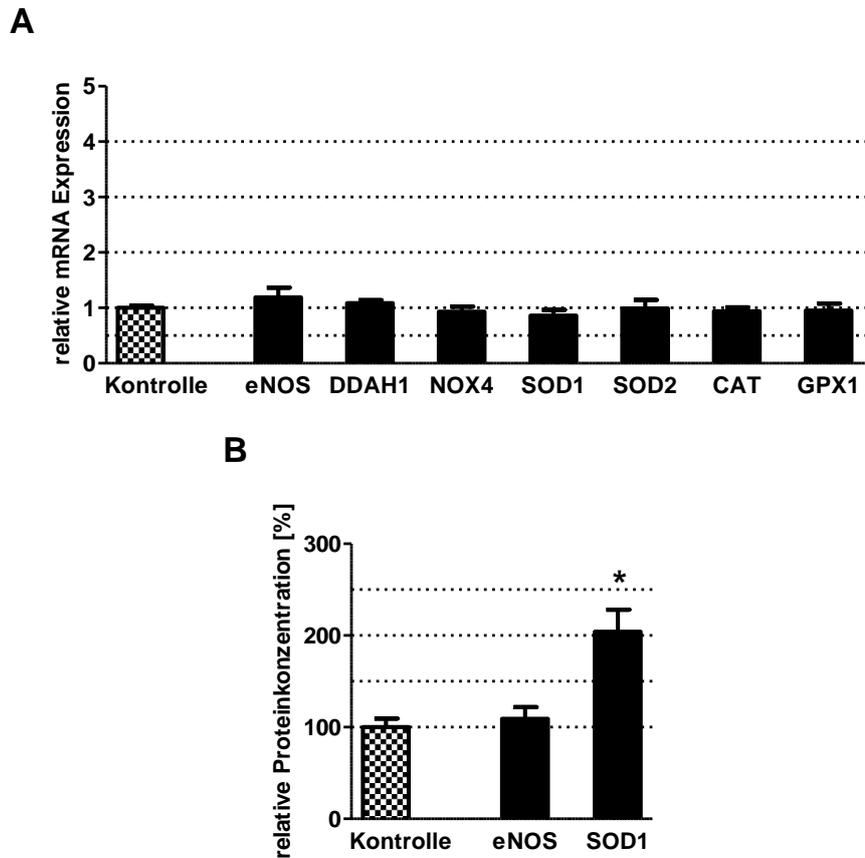


Abbildung 45: Einfluss von Coenzym Q1 auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 100 μ M Coenzym Q1 oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Die Inkubation mit Coenzym Q1 hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression (Abbildung 45A). Bei den Proteinen (Abbildung 45B) erhöhte sich die Expression von SOD1 (204% \pm 44%; p=0,0043). Coenzym Q1 wurde mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Als Kontrolle diente das zur Lösung des Compounds verwendete Wasser (1%).

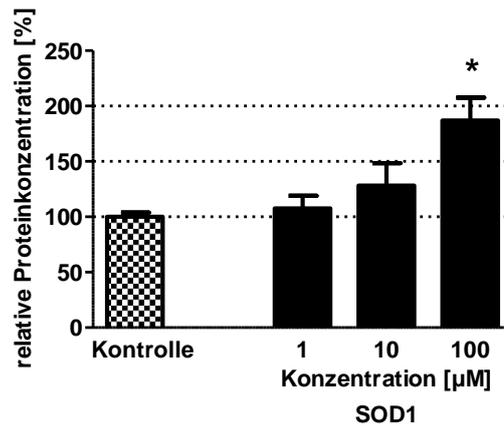


Abbildung 46: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Coenzym Q1 auf die Expression von Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit 1 µM, 10 µM sowie 100 µM Coenzym Q1 oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) behandelt. Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Zur Überprüfung, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren, wurde Coenzym Q1 in drei unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 10 µM sowie 100 µM) eingesetzt (*Abbildung 46*). Die niedrige (108%±11%; p=0,9287) und die mittlere Konzentration (129%±20%; p=0,4206) zeigten keinen Einfluss. Lediglich die hohe Konzentration erhöhte die Expression von SOD1 (187%±21%; p=0,0016). Gleichzeitig war der Effekt der hohen Konzentration bezüglich der niedrigen Konzentration signifikant unterschiedlich (p=0,0103).

3.1.14 Coenzym Q10

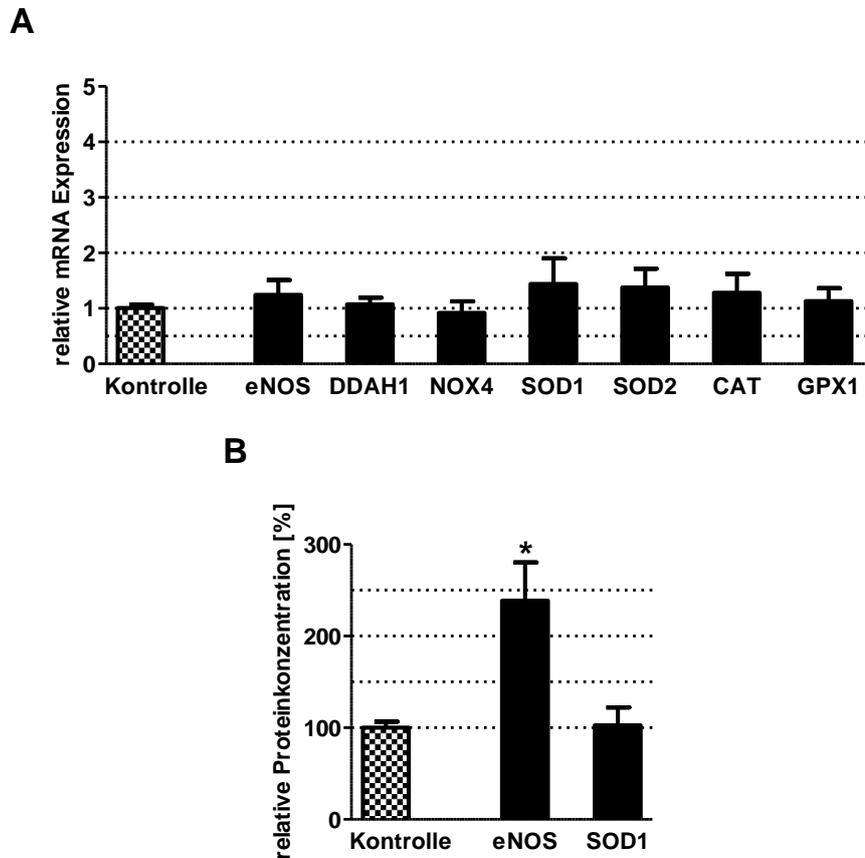


Abbildung 47: Einfluss von Coenzym Q10 auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden (mRNA) bzw. 72 Stunden (Proteine) mit 100 μ M Coenzym Q10 oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression (A) wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR und die Protein-Konzentration (B) mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 (mRNA) bzw. 100% (Protein) gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation mit Coenzym Q10 zeigte sich bezüglich der mRNA-Expression (*Abbildung 47A*) kein nachweisbarer Einfluss. Bei den Proteinen (*Abbildung 47B*) steigerte Coenzym Q10 die Expression von eNOS (239% \pm 42%; p=0,0152). Coenzym Q10 wurde mit einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Das zur Lösung des Compounds verwendete DMSO diente als Kontrolle (0,1%).

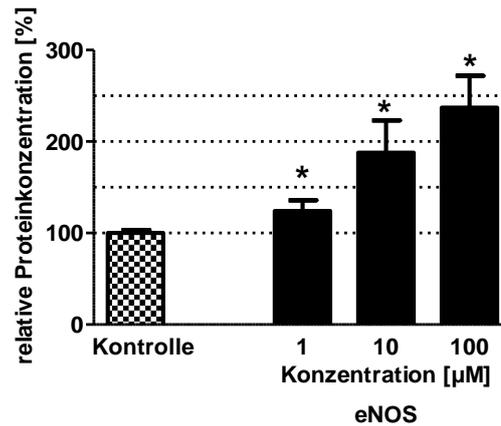


Abbildung 48: Konzentrationsabhängiger Einfluss von Coenzym Q10 auf die Expression von Proteinen.

Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit 1 µM, 10 µM sowie 100 µM Coenzym Q10 oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert ± SEM, n=9-15, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Für die weiteren Experimente wurde Coenzym Q10 in drei unterschiedlichen Konzentrationen (1 µM, 10 µM sowie 100 µM) eingesetzt (*Abbildung 48*). In diesem Fall erhöhten die niedrige (124%±12%; p=0,0026), die mittlere (188%±35%; p=0,0273) sowie die hohe Konzentration (237%±35%; p=0,0003) die Protein-Expression von eNOS. Die Effekte der verschiedenen Konzentration unterschieden sich jedoch nicht voneinander (1 µM vs 10 µM: p=0,3770; 1 µM vs 100 µM: p=0,1796; 10 µM vs 100 µM: p=0,3400).

3.1.15 Zusammenfassung

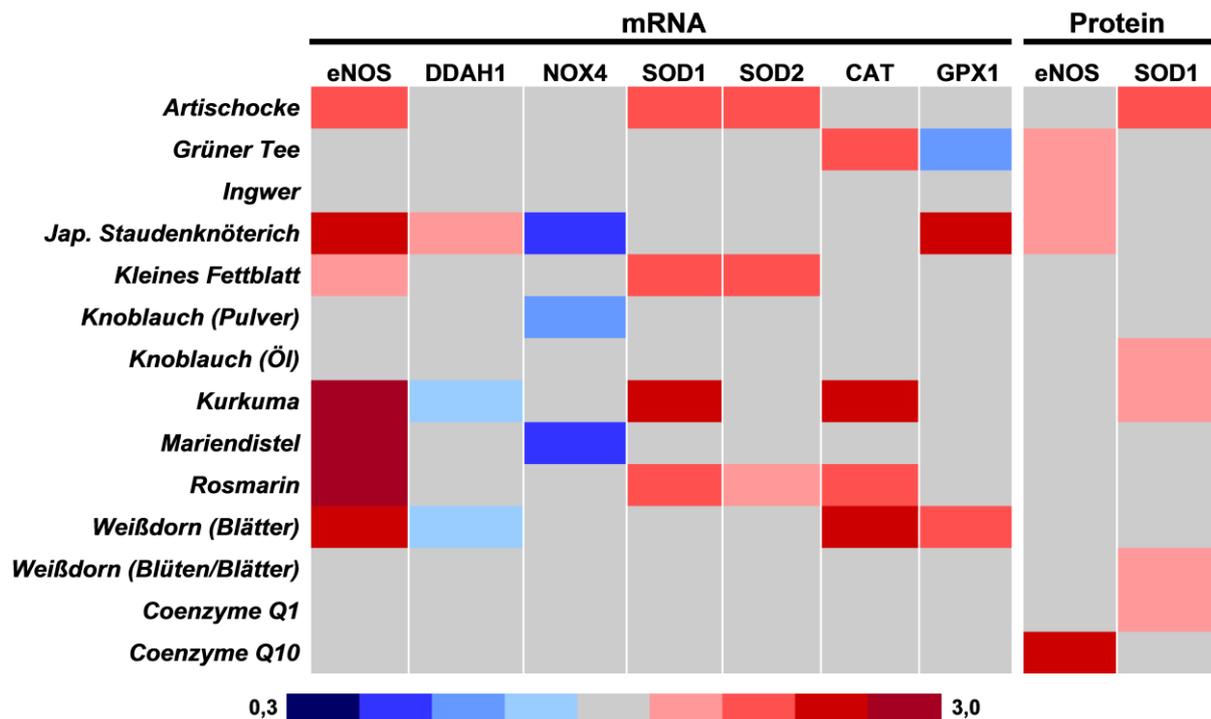


Abbildung 49: Heatmap der Effekte der einzelnen Extrakte auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die Heatmap bietet einen Überblick der beobachteten Einflüsse der verschiedenen Extrakte auf die Expression von mRNA und Proteinen der analysierten Enzyme. Abgebildet sind die Effekte der höchsten Konzentration der einzelnen Extrakte, die Farben repräsentieren eine Erhöhung (rot) oder Verringerung (blau) der Expression. Der Score ergibt sich aus der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Die zuvor bestimmten Effekte ergaben in der Übersicht ein Wirkungsprofil für die einzelnen Extrakte (Abbildung 49). Auf Grundlage dieser Profile wurde eine Kombination zusammengestellt, welche die Extrakte mit dem größten Wirkungspotential vereinte. Ziel war es, herauszufinden, ob eine Kombination bessere Resultate zeigen könnte als die einzelnen Extrakte. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurden die Extrakte der Artischocke, des Japanischen Staudenknöterichs, des Kleinen Fettblattes, von Kurkuma, der Mariendistel, dem Rosmarin, der Blätter des Weißdorns und Coenzym Q10 am aussichtsreichsten bewertet. Prinzipiell von Bedeutung waren ebenfalls der Extrakt des Grünen Tees und der pulverisierte Extrakt des Knoblauchs. Da bei diesen beiden Extrakten das Wirkungspotential als unsicher bewertet werden musste, wurden Kombinationen gebildet, die diese enthielten bzw. nicht enthielten. Die Kombination 1 stellte die Grundmischung der acht relevantesten Extrakte dar. Bei der Kombination 2 bzw. 3 wurde zusätzlich noch der Extrakt des Grünen Tees bzw. des Knoblauchs hinzugenommen. Letztlich bildete die gemeinsame Zugabe von beiden Extrakten die Kombination 4 (Tabelle 22).

Kontrolle	Kombination 1	Kombination 2	Kombination 3	Kombination 4
<i>DMSO (0,1%)</i>	<i>Artischocke</i>	<i>Artischocke</i>	<i>Artischocke</i>	<i>Artischocke</i>
	<i>Jap. Staudenknöt.</i>	<i>Jap. Staudenknöt</i>	<i>Jap. Staudenknöt</i>	<i>Jap. Staudenknöt</i>
	<i>Kleines Fettblatt</i>	<i>Kleines Fettblatt</i>	<i>Kleines Fettblatt</i>	<i>Kleines Fettblatt</i>
	<i>Kurkuma</i>	<i>Kurkuma</i>	<i>Kurkuma</i>	<i>Kurkuma</i>
	<i>Mariendistel</i>	<i>Mariendistel</i>	<i>Mariendistel</i>	<i>Mariendistel</i>
	<i>Rosmarin</i>	<i>Rosmarin</i>	<i>Rosmarin</i>	<i>Rosmarin</i>
	<i>Weißdorn (Blätter)</i>	<i>Weißdorn (Blätter)</i>	<i>Weißdorn (Blätter)</i>	<i>Weißdorn (Blätter)</i>
	<i>Coenzym Q10</i>	<i>Coenzym Q10</i>	<i>Coenzym Q10</i>	<i>Coenzym Q10</i>
		<i>Grüner Tee</i>		<i>Grüner Tee</i>
			<i>Knoblauch (Pulver)</i>	<i>Knoblauch (Pulver)</i>

Tabelle 22: Inhaltsstoffe der Kombinationen. Die Tabelle zeigt die Zusammenstellung der verschiedenen Kombinationen basierend auf den Wirkprofilen der einzelnen Extrakte.

3.2 Kombinationen

3.2.1 mRNA-Expression

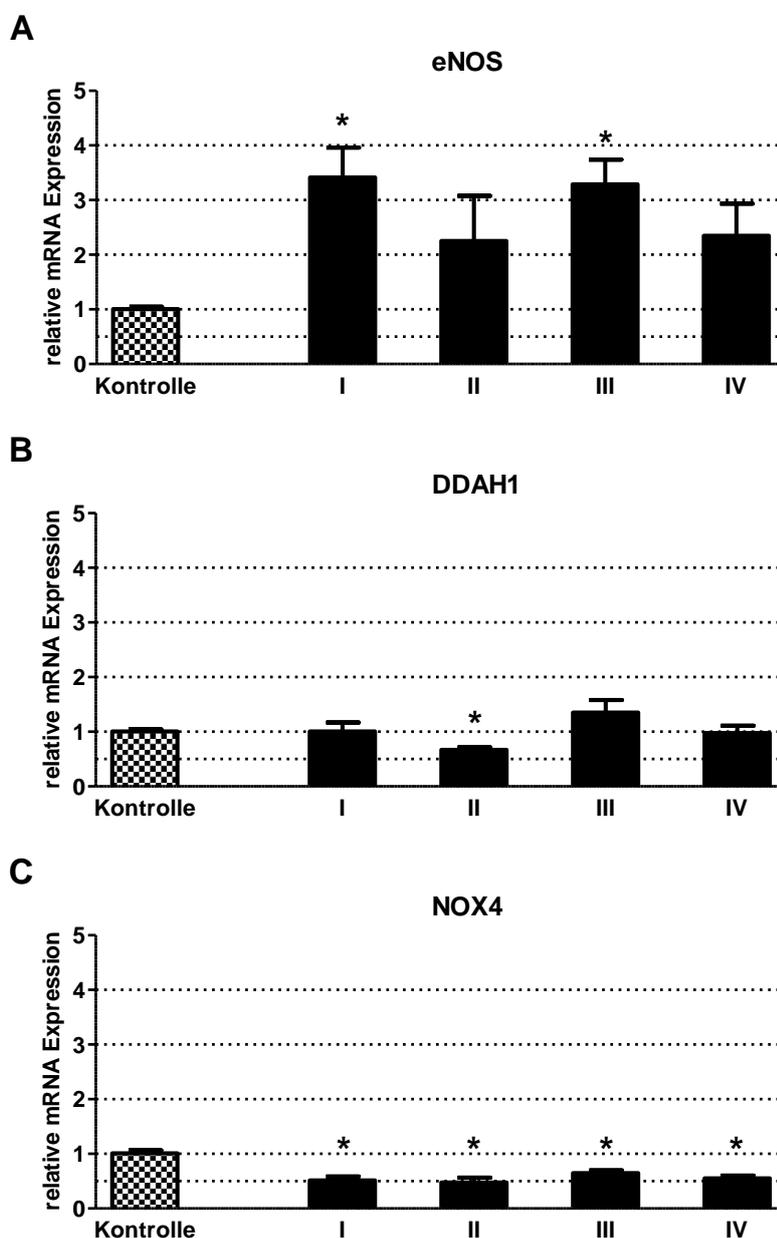


Abbildung 50: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Die Expression von eNOS (*Abbildung 50A*) wurde durch die Kombinationen 1 ($3,4 \pm 0,5$; $p < 0,0001$) und 3 ($3,3 \pm 0,5$; $p < 0,0001$) erhöht. Bei den beiden Kombinationen, die den Extrakt des Grünen Tees enthielten (Kombination 2 und 4), war jeweils eine Tendenz erkennbar. Es konnten aber keine signifikanten Veränderungen detektiert werden (2: $2,3 \pm 0,8$; $p = 0,5457$; 4: $2,3 \pm 0,6$; $p = 0,2581$). Die Expression von DDAH1 (*Abbildung 50B*) wurde lediglich durch Kombination 2 beeinflusst. Dieser Effekt war jedoch negativ, denn die Kombination verringerte die Expression ($0,7 \pm 0,1$; $p = 0,0007$). Eine signifikante Verringerung der Expression von NOX4 (*Abbildung 50C*) war bei allen Kombinationen zu beobachten. Die Effekte traten auf vergleichbarem Niveau auf (1: $0,5 \pm 0,1$; $p = 0,0011$; 2: $0,5 \pm 0,1$; $p = 0,0020$; 3: $0,6 \pm 0,1$; $p = 0,0004$; 4: $0,6 \pm 0,1$; $p = 0,0004$). Bei der Expression von SOD1 (*Abbildung 51A*) zeigte sich das gleiche Bild wie bei DDAH1. Ein Einfluss konnte lediglich bei Kombination 2 detektiert werden, welcher allerdings erneut negativ war ($0,7 \pm 0,2$; $p = 0,0336$). Die Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die Expression von SOD2 (*Abbildung 51B*) ähnelten denen von eNOS. Erneut erhöhten die Kombinationen 1 ($1,6 \pm 0,1$; $p = 0,0019$) und 3 ($1,5 \pm 0,1$; $p = 0,0008$) die Expression. Die den Extrakt des Grünen Tees enthaltenden Kombinationen 2 ($1,0 \pm 0,2$; $p = 0,7304$) und 4 ($1,1 \pm 0,2$; $p = 0,7237$) zeigten hingegen keinen nachweisbaren Einfluss. Bei der Expression von CAT (*Abbildung 51C*) hatten wiederum die Kombinationen 1 ($1,7 \pm 0,2$; $p = 0,0028$) und 3 ($1,9 \pm 0,3$; $p = 0,0054$) einen Effekt. Demgegenüber veränderten die Kombinationen 2 ($1,0 \pm 0,3$; $p = 0,1331$) und 4 ($1,3 \pm 0,3$; $p = 0,4265$) die Expression nicht. Die Inkubation mit den verschiedenen Kombinationen zeigte auf die Expression von GPX1 (*Abbildung 51D*) keinerlei signifikante Auswirkungen.

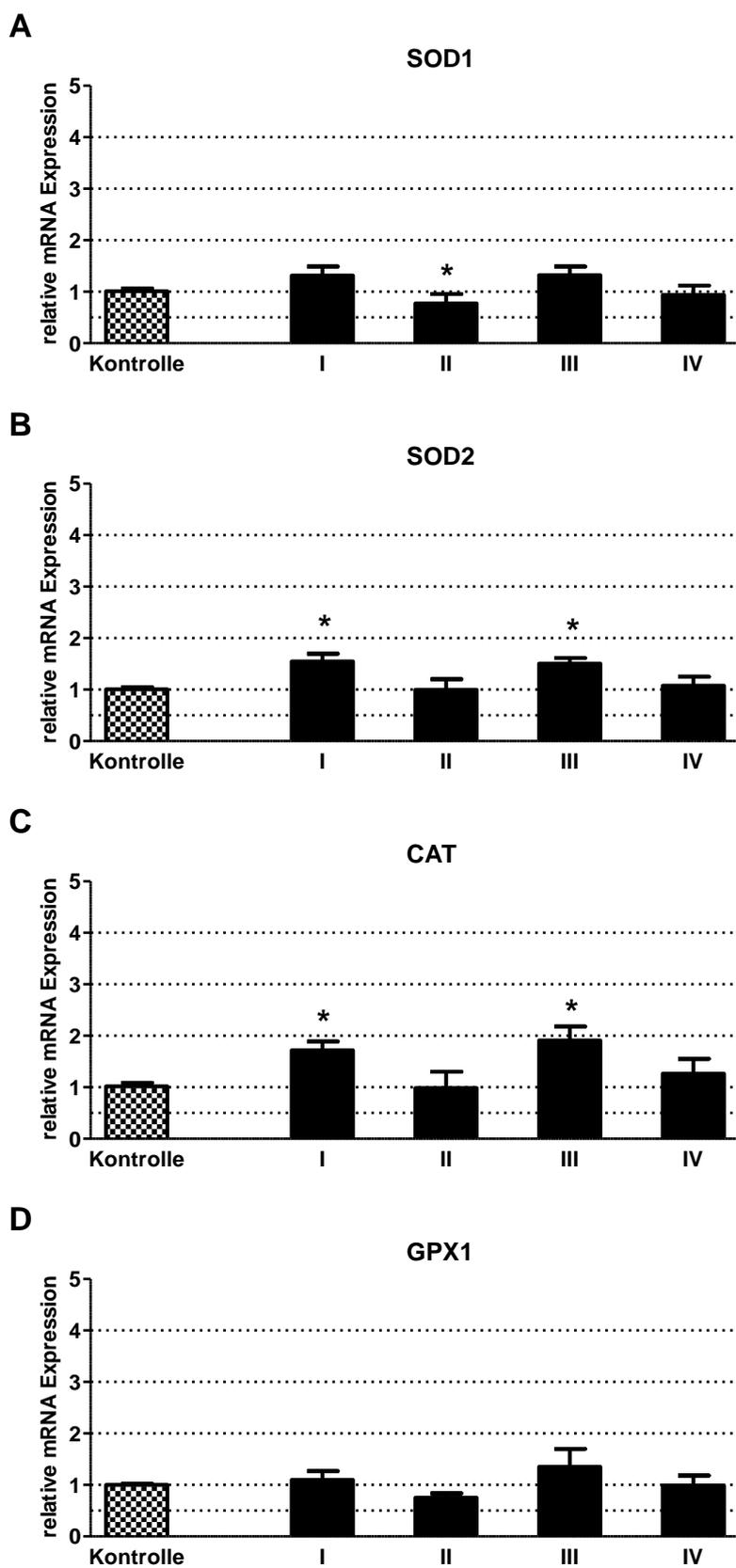


Abbildung 51: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von mRNA. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 24 Stunden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt. Die mRNA-Expression wurde im Anschluss mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle

wurden gleich 1 gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

3.2.2 Protein-Expression

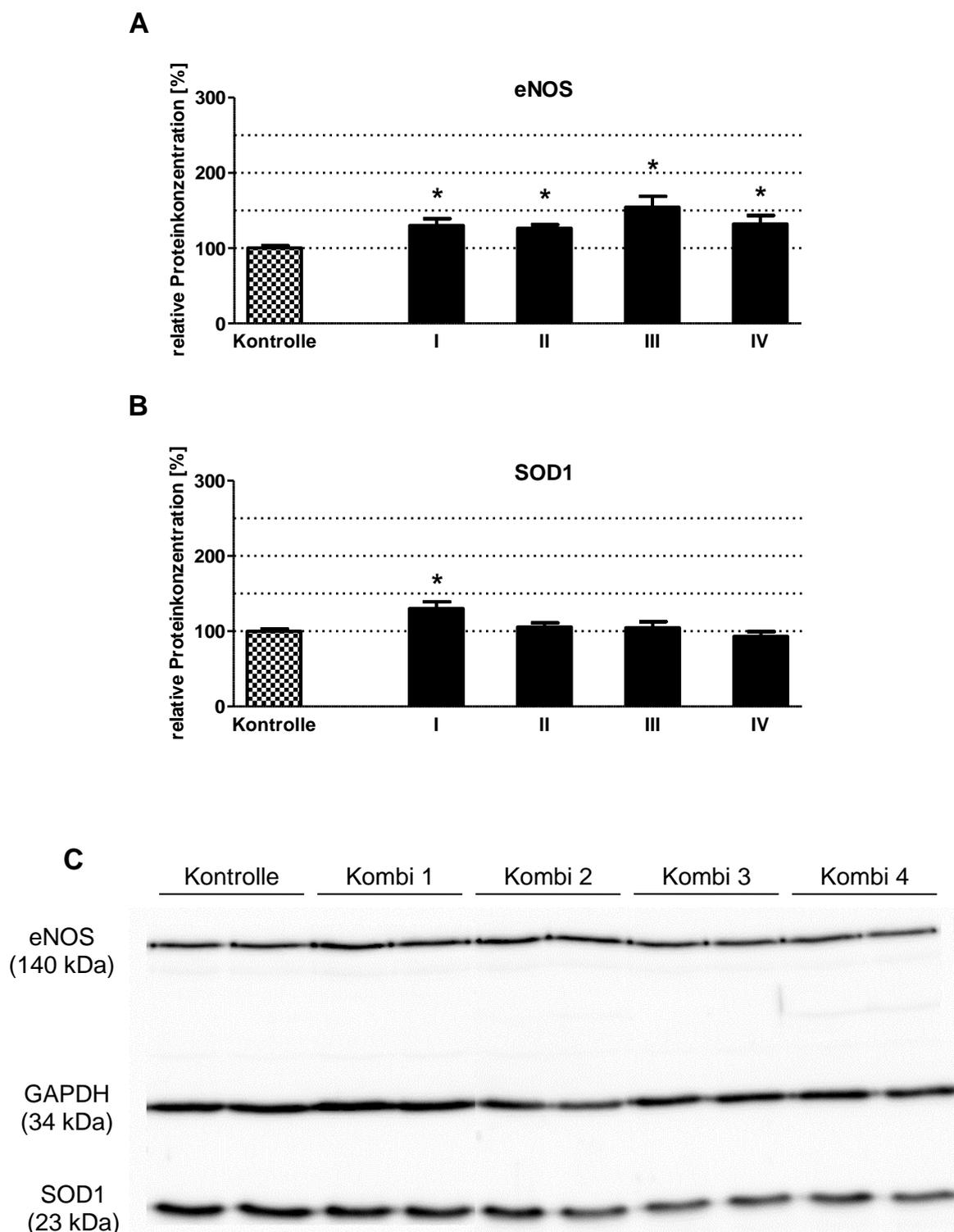


Abbildung 52: Einfluss der Kombinationen auf die Expression von Proteinen. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 72 Stunden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) behandelt.

Die Protein-Konzentration wurde im Anschluss mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Alle Kombinationen erhöhten die Protein-Konzentration von eNOS (*Abbildung 52A*). Die Effekte der verschiedenen Kombinationen waren auf einem vergleichbaren Niveau (1: 130% \pm 9%; p=0,0104; 2: 126% \pm 5%; p=0,0014; 3: 154% \pm 14%; p=0,0008; 4: 132% \pm 11%; p=0,0466). Bei der Expression von SOD1 (*Abbildung 52B*) hingegen zeigte nur die Inkubation mit Kombination 1 einen Einfluss (130% \pm 9%; p=0,0116).

3.2.2.1 Zusammenfassung

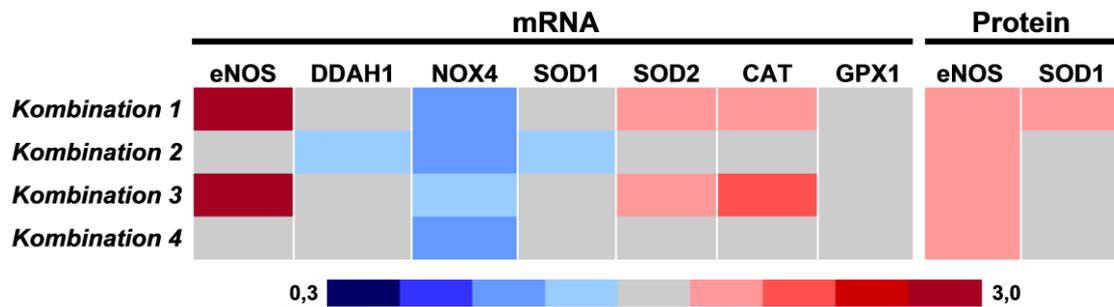


Abbildung 53: Heatmap der Effekte der einzelnen Kombinationen auf die Expression von mRNA und Proteinen. Die Heatmap bietet einen Überblick der beobachteten Einflüsse der verschiedenen Kombinationen auf die Expression von mRNA und Proteinen der analysierten Enzyme. Abgebildet sind die Effekte der einzelnen Kombinationen, die Farben repräsentieren eine Erhöhung (rot) oder Verringerung (blau) der Expression. Der Score ergibt sich aus der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Die Zusammenfassung (*Abbildung 53*) zeigt einen Überblick der Effekte der verschiedenen Kombinationen. Dabei stellt sich sehr deutlich heraus, dass Kombination 1 das beste Wirkungsprofil ergibt. Zusätzlich konnte ermittelt werden, dass durch eine Kombination der potentesten Extrakte die Wirkungen erweitert und optimiert wurden. Zusätzlich demonstriert die Abbildung, dass Grüner Tee (Kombination 2 und 4) den Einfluss deutlich verschlechtert. Während für die Enzyme eNOS, SOD2 und CAT keine Veränderung detektierbar waren, verringerte sich die Expression von DDAH1 und SOD1 sogar. Auf der anderen Seite brachte die Zugabe von Knoblauch (Kombination 3) keine weitere Verstärkung der Effekte.

3.2.3 NO-Produktion

Mittels der Messung der NO-Produktion konnte demonstriert werden, wie die verschiedenen Kombinationen die Bioverfügbarkeit von NO beeinflussen. Eine Produktionssteigerung kann durch eine erhöhte Aktivität von eNOS oder durch eine vermehrte Expression des NO-bildenden Enzyms eNOS erzielt werden. Bei dem Experiment wurde mittels des Griess-Assays nicht das extrem kurzlebige NO direkt gemessen, sondern der wesentlich stabilere Metabolit Nitrit. Um die Messung nicht mit bereits produziertem NO bzw. Nitrit oder dem im Kulturmedium enthaltenen Nitrit zu verfälschen, wurde das Versuchsmedium nach der Inkubation verworfen und durch HBSS ersetzt. Da die Aktivität von eNOS Calcium-abhängig ist, wurde die Produktion von NO durch einen erhöhten Calciumionen-Einstrom forciert. Dieser Calciumionen-Einstrom wurde durch die Verwendung von Bradykinin sowie einem Calcium-Ionophor vermittelt. Bradykinin stellte die Rezeptor-gebundene Öffnung der Calcium-Kanäle dar und der Calcium-Ionophor erhöhte in seiner Eigenschaft als mobiler Ionen-Carrier die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration.

Da L-Arginin nicht nur Substrat von eNOS sondern ebenfalls einen Induktor für eine erhöhte eNOS-Expression darstellt, wurde in einem zweiten Versuchsansatz HBSS nicht nur bei der Forcierung der NO-Produktion verwendet, sondern bereits für die Inkubation mit den Kombinationen eingesetzt.

3.2.3.1 Inkubation mit Arginin-enthaltendem Medium

3.2.3.1.1 Bradykinin

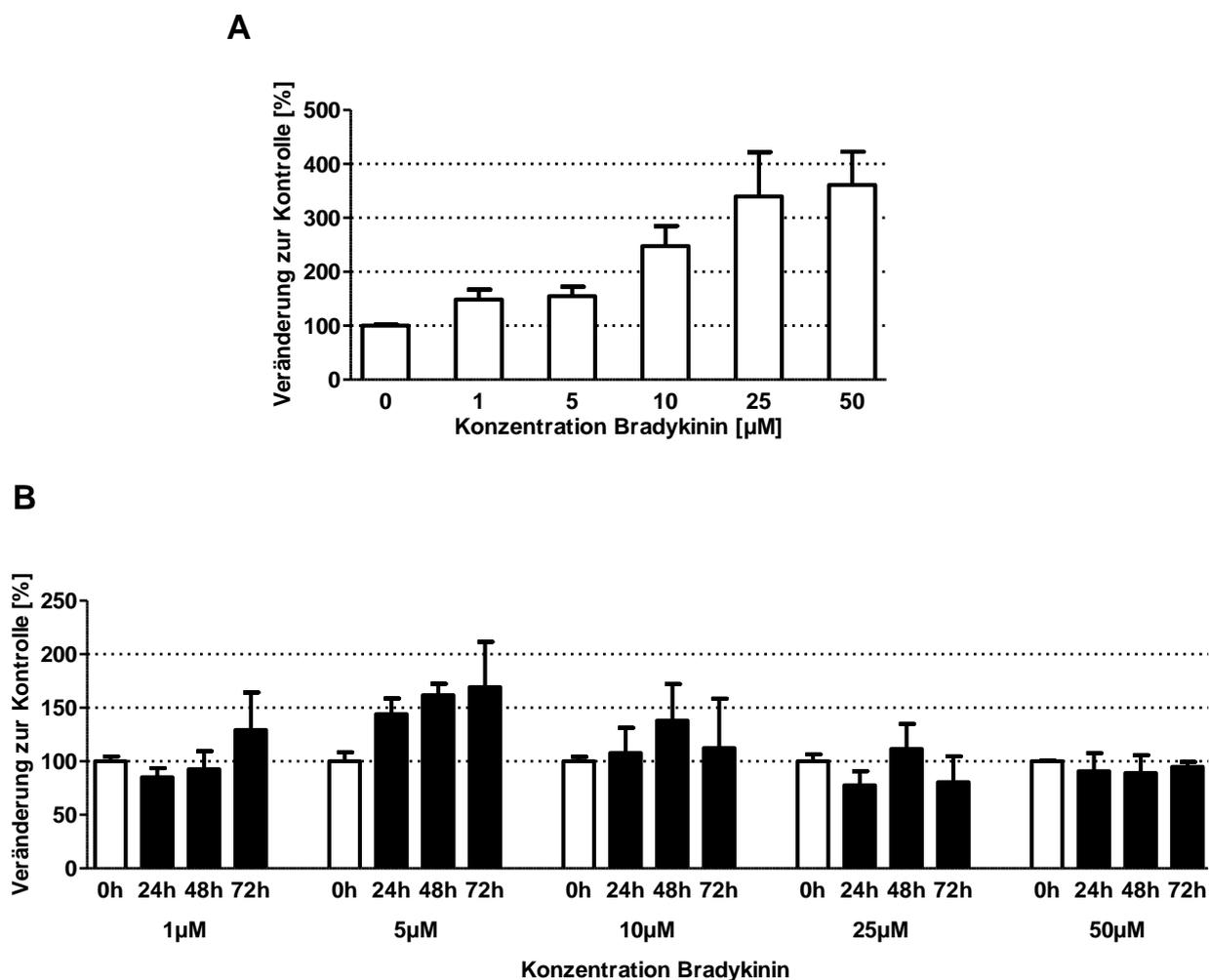


Abbildung 54: Forcierung der NO-Produktion durch Bradykinin. (A) Die EA.hy 926 Zellen wurden ohne Vorinkubation für 10 Minuten mit verschiedenen Bradykinin-Konzentrationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,5 mM Essigsäure) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6. (B) Die EA.hy 926 Zellen wurden mit Resveratrol (100 μ M) für unterschiedliche Dauer inkubiert und danach für 10 Minuten mit verschiedenen Bradykinin-Konzentrationen stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der 0 Stunden Inkubation wurden für jede Bradykinin-Konzentration gleich 100% gesetzt und die anderen Inkubationszeiten der gleichen Konzentration darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=6.

Bei diesem Versuchsaufbau wurde die Produktion von eNOS nach der Inkubation mit den verschiedenen Kombination oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) durch Bradykinin forciert. Da eine maximale Steigerung der Produktion das Detektieren möglicher Effekte der

Kombinationen überlagert, war es zunächst wichtig, die richtige Konzentration von Bradykinin zu ermitteln. Dafür wurden unbehandelte Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von Bradykinin versetzt (*Abbildung 54A*). Eine Konzentration von 1 μM reichte bereits aus, um erhöhte Nitrit-Konzentrationen zu messen. Zusätzlich verdeutlichte dieses Experiment, dass die Produktion nicht unermesslich gesteigert werden kann. Ab einer Konzentration von 25 μM blieb die relative Steigerung gleich. Als Positivkontrolle für eine Aktivitätssteigerung von eNOS diente Resveratrol (100 μM). Die positiven Effekte von Resveratrol auf die Bioverfügbarkeit von NO sind bereits in der Literatur beschrieben [100]. Die Ergebnisse der verschiedenen Bradykinin-Konzentrationen aus dem ersten Teil des Vorversuchs wurden gleich 100% gesetzt. Damit entsprachen sie nun den Werten für eine Inkubation von 0 Stunden und somit den jeweiligen Kontrollen (*Abbildung 54B*). Eine Resveratrol-bedingte Steigerung der Produktion konnte ab einer Bradykinin-Konzentration von 10 μM nicht mehr nachgewiesen werden. Da die größten Unterschiede bei einer Konzentration von 5 μM detektiert werden konnten, wurde diese Konzentration für die nachfolgenden Versuche ausgewählt.

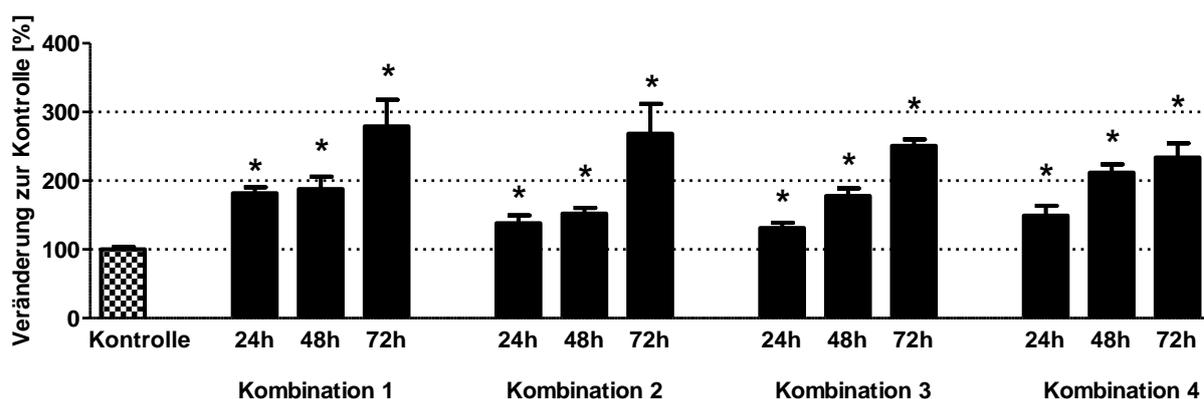


Abbildung 55: Effekt der Kombinationen auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) mit unterschiedlicher Dauer inkubiert und danach für 10 Minuten mit Bradykinin (5 μM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation mit den verschiedenen Kombinationen (*Abbildung 55*) zeigte sich, dass jede Kombination die NO-Produktion bereits nach 24 Stunden steigerte. Bei Kombination 1 (24 h: 182% \pm 9%; p=0,0004; 48 h: 188% \pm 18%; p=0,0008; 72 h: 280% \pm 38%; p=0,0004) unterschied sich die Veränderung nach 72 Stunden zusätzlich zu denen nach 24 (p=0,0078) und 48 Stunden (p=0,0244). Bei Kombination 2 fielen die Effekte für

24 (138%±11%; p=0,0061) und 48 Stunden (152%±8%; p=0,0008) gegenüber denen der Kombination 1 geringer aus. Die Steigerung nach 72 Stunden (269%±43%; p=0,0004) hingegen war gegenüber der Kombination 1 auf vergleichbarem Niveau und unterschied sich ebenfalls zu den Veränderungen der Kombination 2 nach 24 (p=0,0104) und 48 Stunden (p=0,0468). Eine eindeutige Zeitabhängigkeit des Einflusses konnte bei Kombination 3 nachgewiesen werden. Bei dieser Kombination war die Steigerung nach 48 Stunden (178%±11%; p=0,0004) gegenüber der nach 24 Stunden (131%±8%; p=0,0009) signifikant höher (p=0,0012). Der Einfluss nach 72 Stunden (251%±10%; p=0,0004) stieg im Bezug zu 48 Stunden weiter an (p=0,0013). Bei Kombination 4 unterschied sich die Veränderung nach 24 Stunden (149%±14%; p=0,0011) von den Effekten nach 48 (212%±12%; p=0,0004) und 72 Stunden (234%±21%; p=0,0004) jeweils signifikant (48 h: p=0,0078; 72 h: p=0,0106). Zwischen 48 und 72 Stunden gab es keinen nachweisbaren Unterschied (p=0,3401).

3.2.3.1.2 Calcium-Ionophor

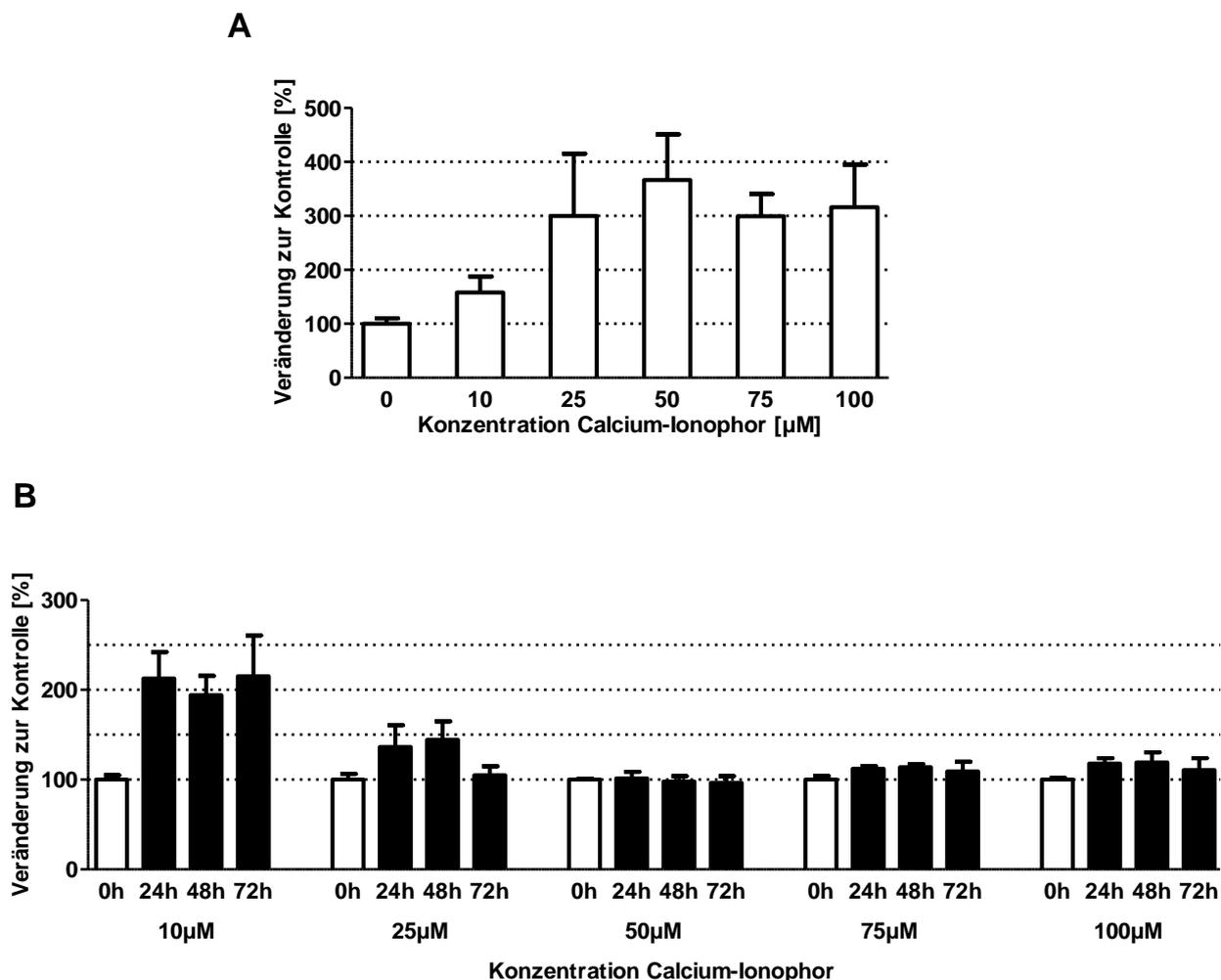


Abbildung 56: Forcierung der NO-Produktion durch Calcium-Ionophor A23187. (A) Die EA.hy 926 Zellen wurden ohne Vorinkubation für 10 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Calcium-Ionophor A23187 oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griß-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=6$. (B) Die EA.hy 926 Zellen wurden mit Resveratrol (100 μ M) für unterschiedliche Dauer inkubiert und danach für 10 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Calcium-Ionophor A23187 stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griß-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der 0 Stunden Inkubation wurden für alle Konzentrationen von Calcium-Ionophor A23187 gleich 100% gesetzt und die anderen Inkubationszeiten der gleichen Konzentration darauf bezogen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=6$.

Das Vorgehen, um die geeignete Konzentration für Bradykinin herauszufinden, wurde für die Stimulation mit Calcium-Ionophor analog wiederholt. Erneut wurden zu Beginn unbehandelte Zellen verschiedenen Konzentrationen des Calcium-Ionophors ausgesetzt (Abbildung 56A). Dabei stellte sich heraus, dass ab einer Konzentration von 25 μ M keine steigenden

Nitrit-Konzentrationen mehr nachweisbar waren. Resveratrol (100 μM) diente erneut als Positivkontrolle (*Abbildung 56B*). Als Ergebnis für die optimale Bedingung stellte sich hierbei eine Konzentration von 10 μM heraus, denn bei dieser Konzentration wurde die NO-Produktion forciert und Resveratrol-bedingte Effekte blieben nachweisbar.

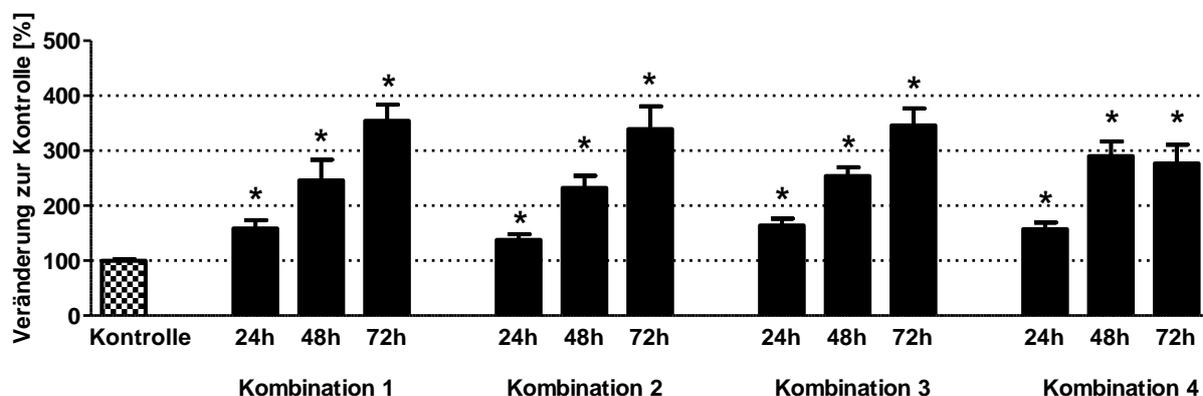


Abbildung 57: Effekt der Kombinationen auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für unterschiedliche Dauer inkubiert und danach für 10 Minuten mit dem Calcium-Ionophor (10 μM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der forcierten Produktion durch Calcium-Ionophor (*Abbildung 57*) zeigten erneut alle Kombinationen bereits nach 24 Stunden eine Steigerung. Bei Kombination 1 verstärkte sich im Verlauf der Zeit der Einfluss (24 h: 159% \pm 15%; p=0,0015; 48 h: 246% \pm 37%; p=0,0005; 72 h: 355% \pm 29%; p=0,0004). Der Effekt nach 72 Stunden unterschied sich gegenüber denen nach 24 (p=0,0006) sowie 48 Stunden (p=0,0340). Eine eindeutige Zeitabhängigkeit des Einflusses konnte bei Kombination 2 nachgewiesen werden. Bei dieser Kombination war die Steigerung nach 48 Stunden (232% \pm 22%; p<0,0001) gegenüber der nach 24 Stunden (138% \pm 11%; p=0,0019) signifikant höher (p=0,0041). Der Einfluss nach 72 Stunden (339% \pm 41%; p<0,0001) stieg bezüglich dem nach 48 Stunden weiter an (p=0,0244). Wie bei Kombination 2 konnte bei Kombination 3 durch den jeweiligen Unterschied der Effekte der verschiedenen Inkubationszeiten ein eindeutiger zeitabhängiger Einfluss demonstriert werden. In diesem Fall unterschied sich der Effekt nach 48 Stunden (254% \pm 16%; p<0,0001) gegenüber dem nach 24 (164% \pm 13%; p<0,0001) und 72 Stunden (246% \pm 31%; p<0,0001) signifikant (24 h: p=0,0005; 72 h: p=0,0468). Wie bei der Forcierung durch Bradykinin veränderte sich bei Kombination 4 die Steigerung nach 24 Stunden (157% \pm 12%; p=0,0005) von den Effekten nach 48 (290% \pm 27%; p<0,0001) und 72 Stunden (277% \pm 34%; p<0,0001)

jeweils signifikant (48 h: $p=0,0004$; 72 h: $p=0,0040$). Zwischen 48 und 72 Stunden gab es keinen nachweisbaren Unterschied ($p=0,9648$).

3.2.3.1.3 Zusammenfassung

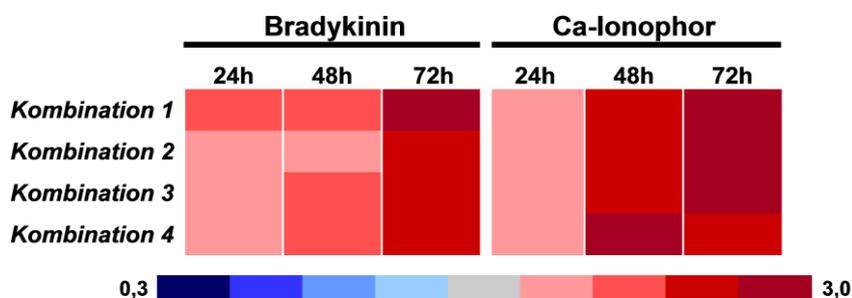


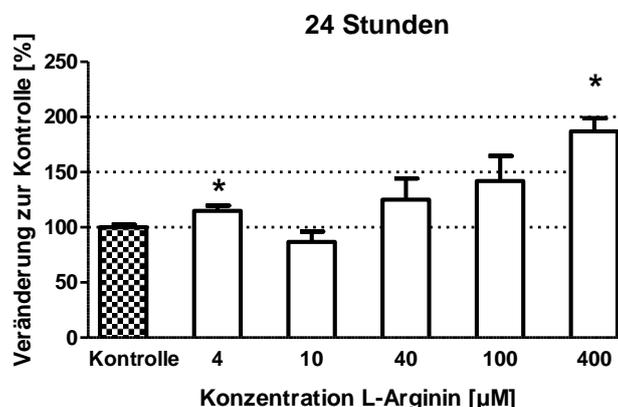
Abbildung 58: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die NO-Produktion. Die Heatmap bietet einen Überblick der beobachteten Einflüsse der verschiedenen Kombinationen auf die forcierte NO-Produktion durch Bradykinin und Calcium-Ionophor. Abgebildet sind die Effekte der einzelnen Kombinationen von den unterschiedlichen Inkubationszeiten, die Farben repräsentieren eine Erhöhung (rot) oder Verringerung (blau) der gemessenen Nitrit-Konzentrationen. Der Score ergibt sich aus der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Die Zusammenfassung (*Abbildung 58*) zeigt, dass alle Kombinationen die NO-Produktion steigerten. Dabei nahm der Effekt im Verlauf der Zeit stets zu. Einzige Ausnahme war hierbei Kombination 4, da die Steigerung der NO-Produktion bei der Forcierung durch Calcium-Ionophor nach 72 Stunden etwas abnahm. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Veränderungen durch die Forcierung durch Calcium-Ionophor im Vergleich zu Bradykinin höher waren. Schlussendlich waren die Unterschiede zwischen den Effekten der verschiedenen Kombinationen nur schwach ausgeprägt.

3.2.3.2 Inkubation mit L-Arginin-Supplementation

3.2.3.2.1 Bradykinin

A



B

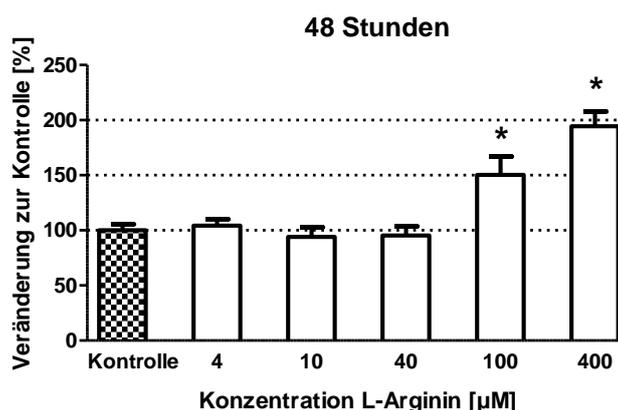


Abbildung 59: Einfluss von L-Arginin auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) für 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) inkubiert und danach für 10 Minuten mit Bradykinin (5 μM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

In einem Vorversuch wurde zuerst die Konzentration von L-Arginin bestimmt, bei der eine signifikante Steigerung in der NO-Produktion nachgewiesen werden konnte. Die maximale Konzentration wurde auf 400 μM festgelegt, da dies der L-Arginin-Konzentration des verwendeten Kulturmediums DMEM entsprach. Inkubiert wurden die Zellen mit L-Arginin versetzter HBSS. Während nach 48 Stunden die Ergebnisse unauffällig waren und die Zellen sich morphologisch unverändert zeigten, waren die Zellen nach 72 Stunden größtenteils

abgestorben. Daher konnten nur für die Inkubationszeiten 24 und 48 Stunden Ergebnisse erhoben werden.

Nach 24 Stunden Inkubation (*Abbildung 59A*) mit den verschiedenen Konzentrationen von L-Arginin führten die Konzentrationen 4 μM ($115\% \pm 5\%$; $p=0,0375$) und 400 μM ($187\% \pm 12\%$; $p<0,0001$) zu einer Veränderung der NO-Produktion. Nach 48 Stunden (*Abbildung 59B*) war bei 4 μM ($105\% \pm 6\%$; $p=0,6905$) kein Effekt mehr nachweisbar. Die Konzentrationen 100 μM ($150\% \pm 17\%$; $p=0,0039$) und erneut 400 μM ($195\% \pm 13\%$; $p=0,0004$) führten hingegen zu einer Steigerung der NO-Konzentration. Da der Effekt mit einer Konzentration von 400 μM bei beiden Inkubationszeiten bestand, wurde diese Konzentration für die folgenden Versuche ausgewählt.

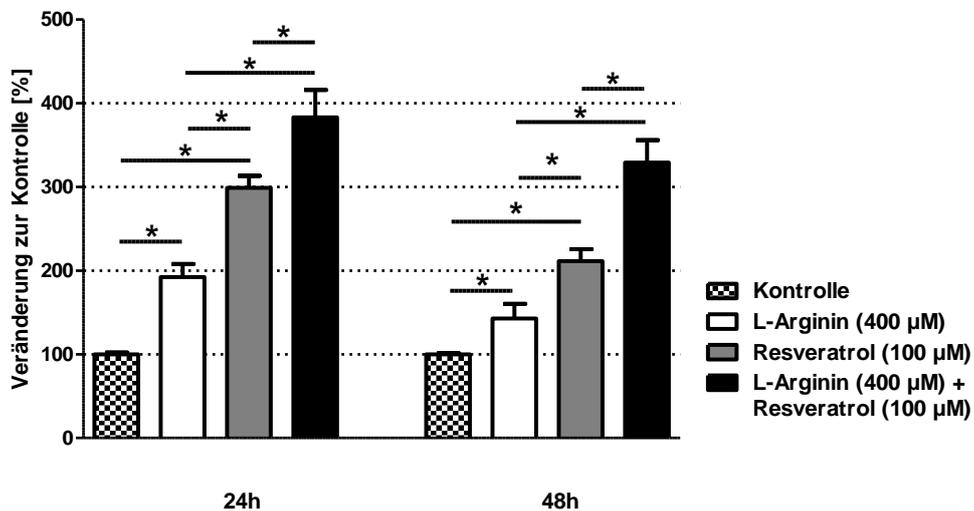


Abbildung 60: Kombiniertes Effekt von L-Arginin und Resveratrol auf die Bradykinin-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit L-Arginin (400 μM), Resveratrol (100 μM), einer Kombination aus beiden oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert und danach für 10 Minuten mit Bradykinin (5 μM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9$, * $p<0,05$, Mann-Whitney U-Test.

Als Positivkontrolle zum Nachweis einer L-Arginin-unabhängigen Produktionssteigerung von NO (*Abbildung 60*) diente erneut Resveratrol (100 μM). Bei beiden Inkubationszeiten hatten L-Arginin (24 h: $192\% \pm 16\%$; $p=0,0026$; 48 h: $143\% \pm 17\%$; $p=0,0061$) sowie Resveratrol (24 h: $299\% \pm 14\%$; $p=0,0004$; 48 h: $211\% \pm 14\%$; $p=0,0004$) als jeweilige Einzelgabe einen Einfluss auf die NO-Produktion. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass der Effekt von Resveratrol signifikant höher war als der des L-Arginins (24 h: $p=0,0015$; 48 h: $p=0,0134$). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass zu beiden Inkubationszeiten die Steigerung

einer kombinierten Gabe von L-Arginin sowie Resveratrol (24 h: $383\% \pm 33\%$; $p=0,0004$; 48 h: $329\% \pm 27\%$; $p=0,0004$) sich gegenüber der Einzelgabe von L-Arginin (24 h: $p=0,0015$; 48 h: $p=0,0015$) und Resveratrol (24 h: $p=0,0400$; 48 h: $p=0,0019$) unterschied.

Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Versuchsaufbau für die Fragestellung nach dem Einfluss von pflanzlichen Substanzen auf die NO-Produktion verwendet werden kann.

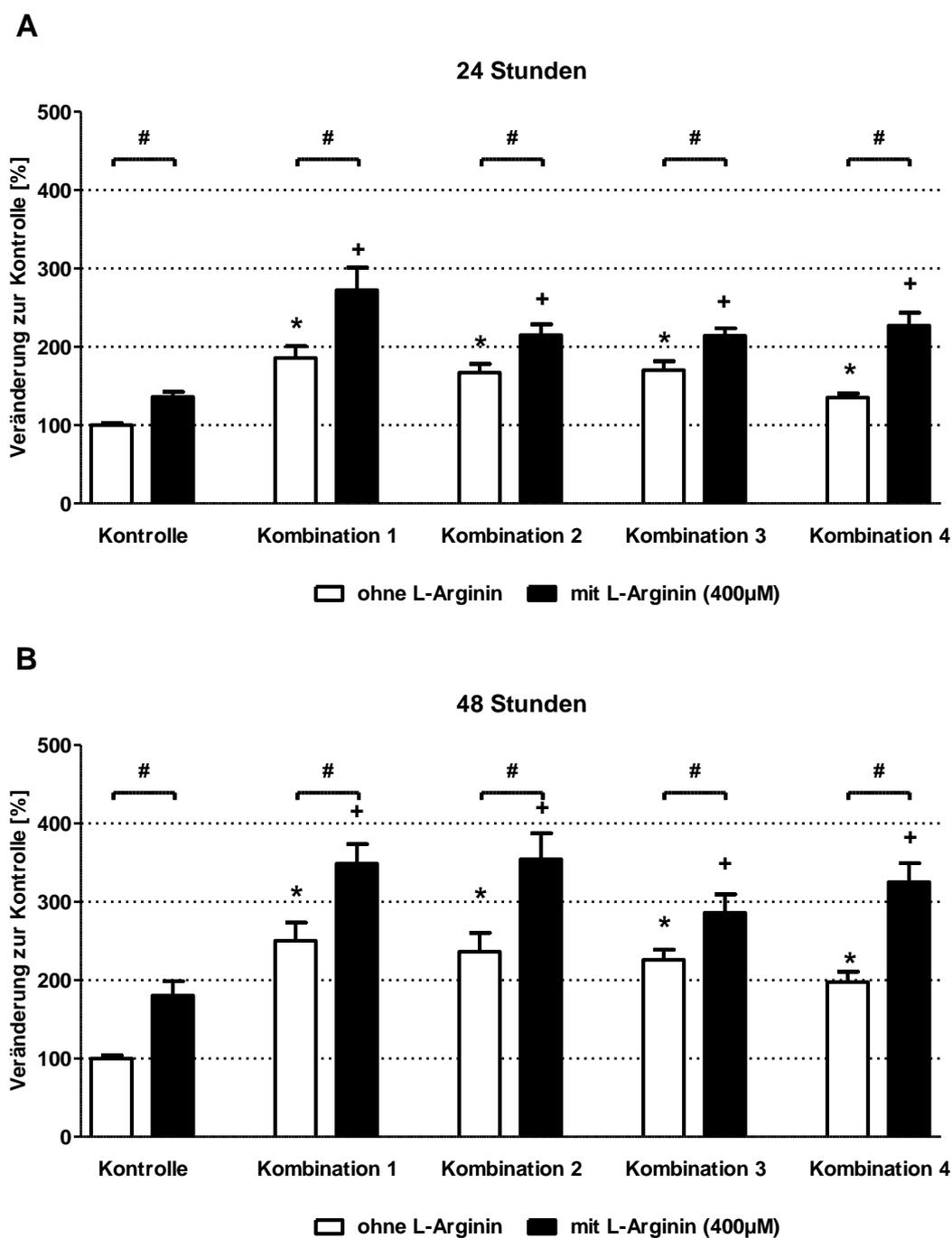


Abbildung 61: Effekt der Kombinationen auf die Bradykinin-forcierte L-Arginin-abhängige NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) inkubiert. Die Inkubation erfolgte

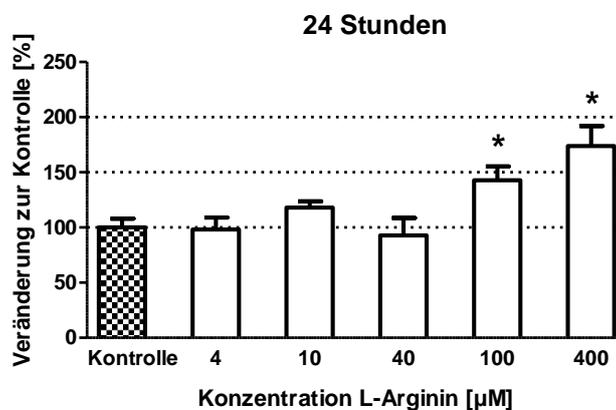
sowohl bei Abwesenheit als auch bei Anwesenheit von L-Arginin (400 μ M). Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit Bradykinin (5 μ M) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrollen ohne L-Arginin wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle ohne L-Arginin, + p<0,05 bezüglich der Kontrolle mit L-Arginin, # p<0,05, Mann-Whitney U-Test.

Nach 24 Stunden Inkubation (*Abbildung 61A*) mit den verschiedenen Kombinationen in An- bzw. Abwesenheit von L-Arginin ergaben sich folgende Ergebnisse: L-Arginin (136% \pm 6%; p=0,0006) und die alleinige Gabe der unterschiedlichen Kombinationen zeigten einen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Nitrit-Konzentrationen und damit auf die Produktion von NO (1: 186% \pm 15%; p=0,0004; 2: 167% \pm 11%; p=0,0004; 3: 170% \pm 11%; p=0,0004; 4: 135% \pm 5%; p=0,0006). Die Veränderungen der gleichzeitigen Gabe von L-Arginin und den verschiedenen Kombinationen (1: 272% \pm 29%; p=0,0036; 2: 215% \pm 14%; p=0,0004; 3: 214% \pm 10%; p=0,0004; 4: 227% \pm 16%; p=0,0004) unterschieden sich gegenüber der Einfachgabe von L-Arginin (1: p=0,0062; 2: p=0,0011; 3: p=0,0008; 4: p=0,0027) sowie gegenüber dem Effekt der jeweiligen Kombination in Abwesenheit von L-Arginin (1: p=0,0142; 2: p=0,0188; 3: p=0,0171; 4: p=0,0026).

Nach 48 Stunden Inkubation (*Abbildung 61B*) waren die erlangten Ergebnisse mit den Resultaten der 24stündigen Inkubation vergleichbar. Erneut steigerten L-Arginin (180% \pm 18%; p=0,0027) sowie die alleinige Gabe der verschiedenen Kombinationen die Produktion von NO signifikant (1: 250% \pm 23%; p=0,0004; 2: 236% \pm 24%; p=0,0004; 3: 226% \pm 13%; p=0,0004; 4: 198% \pm 13%; p=0,0004). Unterschiede konnten ebenfalls zwischen den Effekten der gleichzeitigen Gabe von L-Arginin und den verschiedenen Kombinationen (1: 349% \pm 25%; p=0,0004; 2: 354% \pm 33%; p=0,0004; 3: 286% \pm 24%; p=0,0004; 4: 325% \pm 24%; p=0,0004) gegenüber der Einfachgabe von L-Arginin (1: p<0,0001; 2: p=0,0005; 3: p=0,0019; 4: p=0,0003) sowie gegenüber dem Effekt der jeweiligen Kombination ohne L-Arginin (1: p=0,0188; 2: p=0,0142; 3: p=0,0303; 4: p=0,0003) gezeigt werden.

3.2.3.2.2 Calcium-Ionophor

A



B

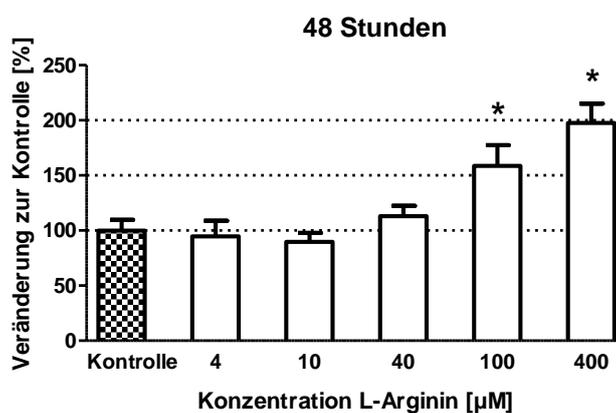


Abbildung 62: Einfluss von L-Arginin auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen L-Arginin-Konzentrationen oder der Lösungsmittelkontrolle (1% Wasser) für 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) inkubiert und danach für 10 Minuten mit Calcium-Ionophor (10 µM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Wie bei dem Arginin-unabhängigen Versuchsaufbau wurde in einem zweiten Experiment die NO-Produktion mittels Calcium-Ionophor als anderweitiger Stimulus forciert. In einem Vorversuch wurde die Konzentration von L-Arginin bestimmt, bei der eine signifikante Steigerung der NO-Produktion nachweisbar war. Dieser wurde analog zum entsprechenden Vorversuch für die Stimulation mit Bradykinin durchgeführt. Hier konnten aufgrund des Absterbens der Zellen nach 72 Stunden ebenso nur für die Inkubationszeiten 24 und 48 Stunden Ergebnisse erhoben werden.

Im Gegensatz zur Stimulierung mit Bradykinin zeigten in diesem Fall nach 24 Stunden Inkubation mit L-Arginin (*Abbildung 62A*) die Konzentrationen 100 μM ($143\% \pm 12\%$; $p=0,0464$) und 400 μM ($174\% \pm 18\%$; $p=0,0014$) einen Einfluss. Diese Effekte war ebenfalls nach 48 Stunden (*Abbildung 62B*) nachweisbar (100 μM : $159\% \pm 19\%$; $p=0,0106$; 400 μM : $198\% \pm 17\%$; $p=0,005$). Daher kamen für diesen Versuchsaufbau die Konzentrationen 100 μM und 400 μM L-Arginin für die folgenden Versuche in Frage. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Stimulation mit Bradykinin zu erreichen, wurde die Konzentration von 400 μM L-Arginin in den folgenden Versuchen verwendet.

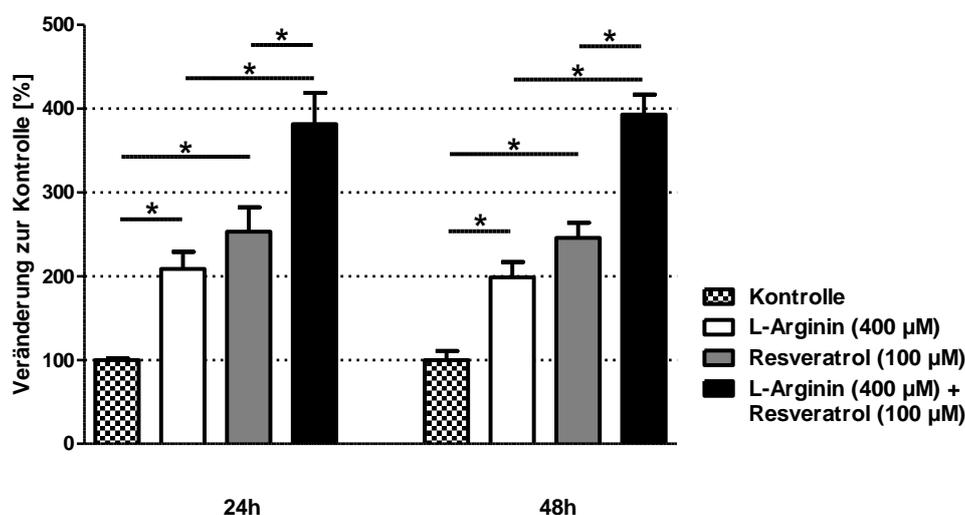


Abbildung 63: Kombiniertes Effekt von L-Arginin und Resveratrol auf die Calcium-Ionophor-forcierte NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit L-Arginin (400 μM), Resveratrol (100 μM), einer Kombination aus beiden oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für 24 bzw. 48 Stunden inkubiert und danach für 10 Minuten mit Calcium-Ionophor (10 μM) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=9$, * $p<0,05$, Mann-Whitney U-Test.

Bei dem Versuch mit Calcium-Ionophor als Stimulus (*Abbildung 63*) diente erneut Resveratrol (100 μM) als Positivkontrolle zum Nachweis einer L-Arginin-unabhängigen NO-Produktionssteigerung. Bei beiden Inkubationszeiten hatten L-Arginin (24 h: $209\% \pm 20\%$; $p=0,0004$; 48 h: $199\% \pm 18\%$; $p=0,0011$) sowie Resveratrol (24 h: $253\% \pm 29\%$; $p=0,0004$; 48 h: $246\% \pm 18\%$; $p=0,0004$) als Einzelgabe einen Einfluss auf die NO-Produktion. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass sich zu beiden Zeitpunkten der Effekt der kombinierten Gabe von L-Arginin und Resveratrol (24 h: $382\% \pm 37\%$; $p=0,0004$; 48 h: $393\% \pm 24\%$; $p=0,0004$) gegenüber der Einzelgabe von

L-Arginin (24 h: $p=0,0012$; 48 h: $p=0,0006$) sowie Resveratrol (24 h: $p=0,0188$; 48 h: $p=0,0015$) unterschied.

Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Versuchsaufbau für die Fragestellung nach dem Einfluss von pflanzlichen Substanzen auf die NO-Produktion verwendet werden kann.

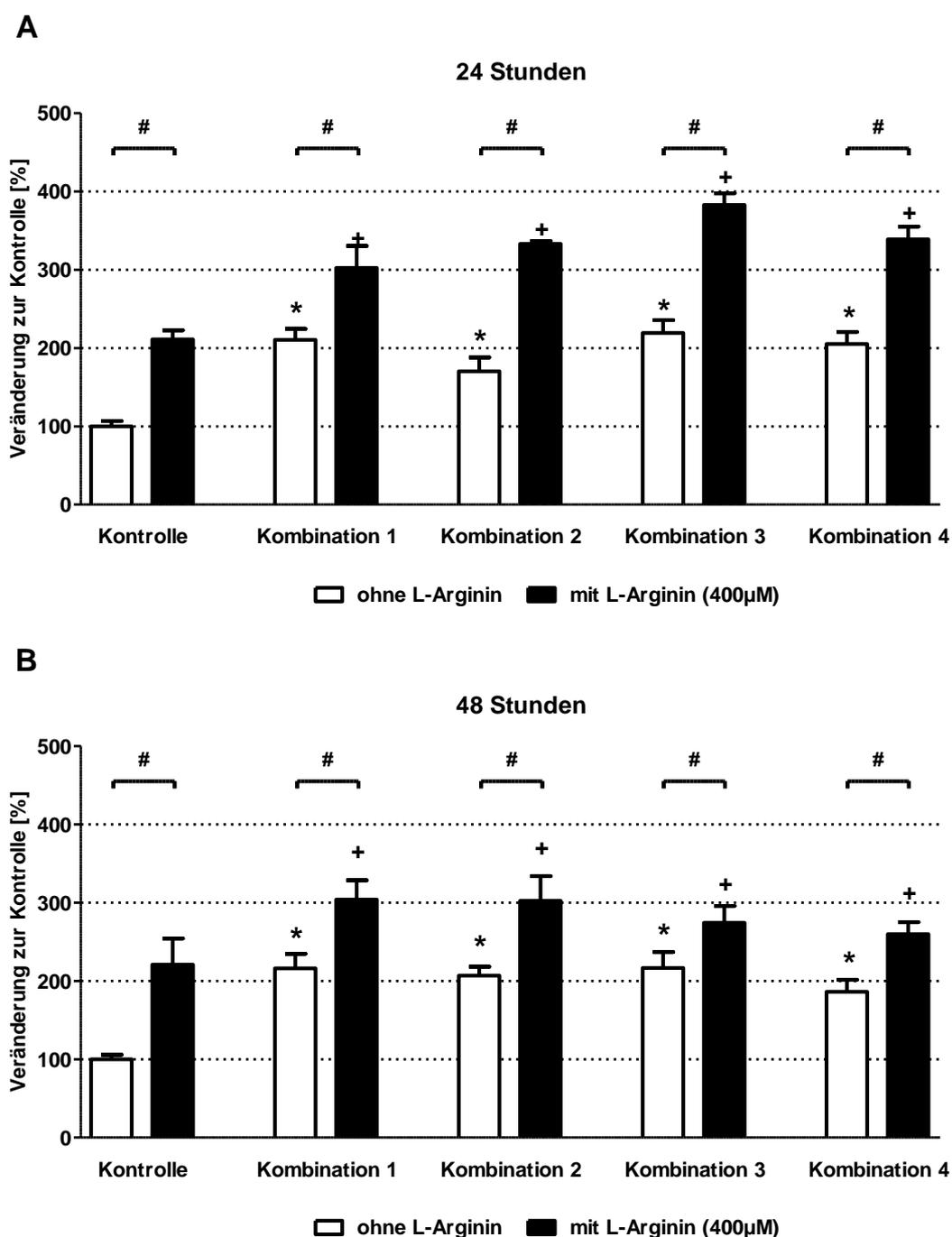


Abbildung 64: Effekt der Kombinationen auf die Calcium-Ionophor-forcierte L-Arginin-abhängige NO-Produktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für 24 (A) bzw. 48 Stunden (B) inkubiert. Die Inkubation erfolgte sowohl bei Abwesenheit als auch bei Anwesenheit von L-Arginin (400 µM). Danach wurden die Zellen für 10 Minuten mit

Calcium-Ionophor (10 μ M) stimuliert. Der stabile NO-Metabolit Nitrit wurde im Anschluss mittels Griess-Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Kontrolle ohne L-Arginin wurden gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, n=9, * p<0,05 bezüglich der Kontrollen ohne L-Arginin, + p<0,05 bezüglich der Kontrolle mit L-Arginin, # p<0,05, Mann-Whitney U-Test.

Nach 24 Stunden Inkubation (*Abbildung 64A*) mit den verschiedenen Kombinationen in An- bzw. Abwesenheit von L-Arginin ergaben sich folgende Ergebnisse: L-Arginin (211% \pm 12%; p=0,0006) und die alleinige Gabe der unterschiedlichen Kombinationen zeigten einen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Nitrit-Konzentrationen und damit auf die Produktion von NO (1: 211% \pm 14%; p=0,0004; 2: 170% \pm 18%; p=0,0080; 3: 219% \pm 16%; p=0,0008; 4: 205% \pm 15%; p=0,0008). Die Veränderungen der gleichzeitigen Gabe von L-Arginin und den verschiedenen Kombinationen (1: 302% \pm 28%; p=0,0004; 2: 333% \pm 4%; p=0,0004; 3: 383% \pm 15%; p=0,0004; 4: 339% \pm 16%; p=0,0004) unterschieden sich gegenüber der Einfachgabe von L-Arginin (1: p=0,0092; 2: p=0,0004; 3: p<0,0001; 4: p=0,0004) sowie gegenüber dem Effekt der jeweiligen Kombination in Abwesenheit von L-Arginin (1: p=0,0188; 2: p=0,0004; 3: p=0,0004; 4: p=0,0004).

Nach 48 Stunden Inkubation (*Abbildung 64B*) waren die erlangten Ergebnisse mit den Resultaten der 24stündigen Inkubation vergleichbar. Erneut steigerten L-Arginin (206% \pm 23%; p<0,0001) sowie die alleinige Gabe der verschiedenen Kombinationen die NO-Produktion signifikant (1: 227% \pm 15%; p<0,0001; 2: 202% \pm 9%; p<0,0001; 3: 220% \pm 17%; p=0,0002; 4: 189% \pm 14%; p<0,0001). Unterschiede konnten ebenfalls zwischen den Effekten der gleichzeitigen Gabe von L-Arginin und den verschiedenen Kombinationen (1: 309% \pm 19%; p<0,0001; 2: 300% \pm 24%; p<0,0001; 3: 282% \pm 17%; p<0,0001; 4: 263% \pm 11%; p<0,0001) gegenüber der Einfachgabe von L-Arginin (1: p=0,0030; 2: p=0,0141; 3: p=0,0030; 4: p=0,0062) sowie gegenüber dem Effekt der jeweiligen Kombination ohne L-Arginin (1: p=0,0082; 2: p=0,0107; 3: p=0,0286; 4: p=0,0007) nachgewiesen werden.

3.2.3.2.3 Zusammenfassung

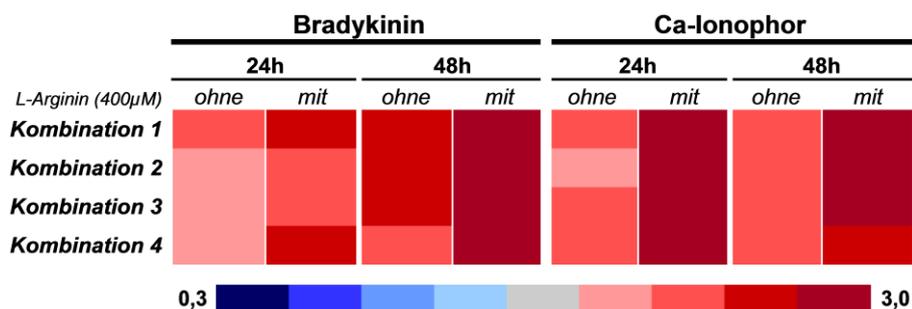


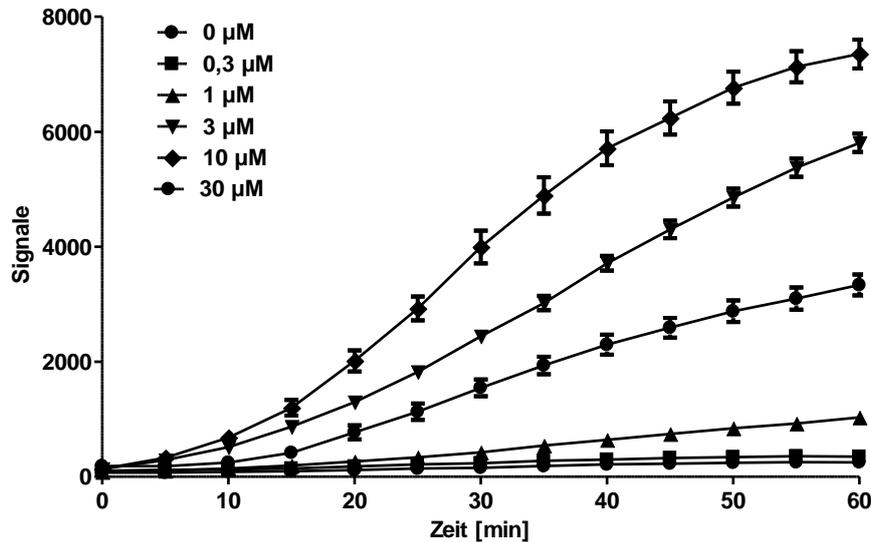
Abbildung 65: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die L-Arginin-abhängige NO-Produktion. Die Heatmap bietet einen Überblick der beobachteten Einflüsse der verschiedenen Kombinationen auf die L-Arginin-abhängigen NO-Produktion, die durch Bradykinin und Calcium-Ionophor forcierte wurde. Abgebildet sind die Effekte der einzelnen Kombinationen von den unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Ab- sowie Anwesenheit von L-Arginin, die Farben repräsentieren eine Erhöhung (rot) oder Verringerung (blau) der gemessenen Nitrit-Konzentrationen. Der Score ergibt sich aus der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Die Zusammenfassung (*Abbildung 65*) zeigt, dass alle Kombinationen die Arginin-abhängige NO-Produktion steigerten. Dabei nahm der Effekt im Verlauf der Zeit stets zu. Einzige Ausnahme war Kombination 4, deren Steigerung der NO-Produktion bei der Forcierung durch Calcium-Ionophor nach 48 Stunden etwas abnahm. Zusätzlich war zu beobachten, dass die Veränderungen nach 24 Stunden durch die Forcierung durch den Calcium-Ionophor im Vergleich zu Bradykinin höher waren. Schlussendlich waren die Unterschiede zwischen den Effekten der verschiedenen Kombinationen nur schwach ausgeprägt.

3.2.4 ROS-Abbau

3.2.4.1 Intrazelluläre ROS

A



B

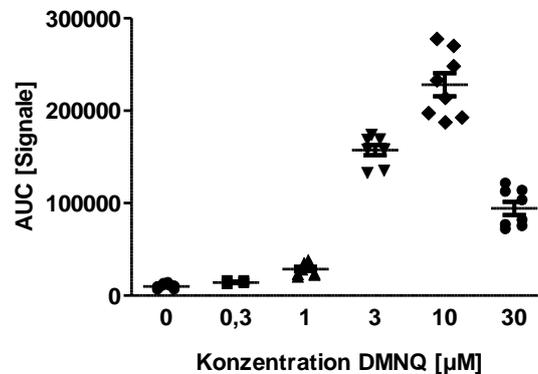


Abbildung 66: Intrazelluläre ROS-Produktion mittels DMNQ. Die EA.hy 926 Zellen wurden für 15 Minuten mit dem zellmembrangängigen Chemilumineszenz-Reagenz Luminol (500 μM) versetzt. Im Anschluss wurde durch die Zugabe von verschiedenen DMNQ-Konzentrationen die intrazelluläre ROS-Produktion gestartet sowie die entstehende Chemilumineszenz für 60 Minuten detektiert (A). Für die Auswertung wurden die AUCs der einzelnen Kurven gebildet (B). Die Daten sind abgebildet als Mittelwert ± SEM, n=8.

Dieser Versuch demonstrierte die Auswirkungen der verschiedenen Kombinationen auf die antioxidativen Abwehrmechanismen. DMNQ wurde für diesen Versuch gewählt, da diese Substanz zellmembrangängig war und intrazellulär ROS produzierte. Die produzierten ROS konnten mittels der vom ebenfalls zellmembrangängigen Luminol abgesonderten Chemilumineszenz detektiert werden. In einem Vorversuch wurden unbehandelte Zellen

verschiedenen DMNQ-Konzentrationen ausgesetzt und die Chemilumineszenz über die Zeit detektiert (Abbildung 66A). Durch die gebildeten AUCs waren die Konzentrationen am geeignetsten vergleichbar (Abbildung 66B). Die Konzentration von 3 μM hob sich dabei deutlich vom Grundrauschen ab, produzierte allerdings nur so viel ROS, dass es nicht zelltoxisch wirkte (30 μM). Deshalb wurden die nachfolgenden Experimente mit einer Konzentration von 3 μM DMNQ durchgeführt.

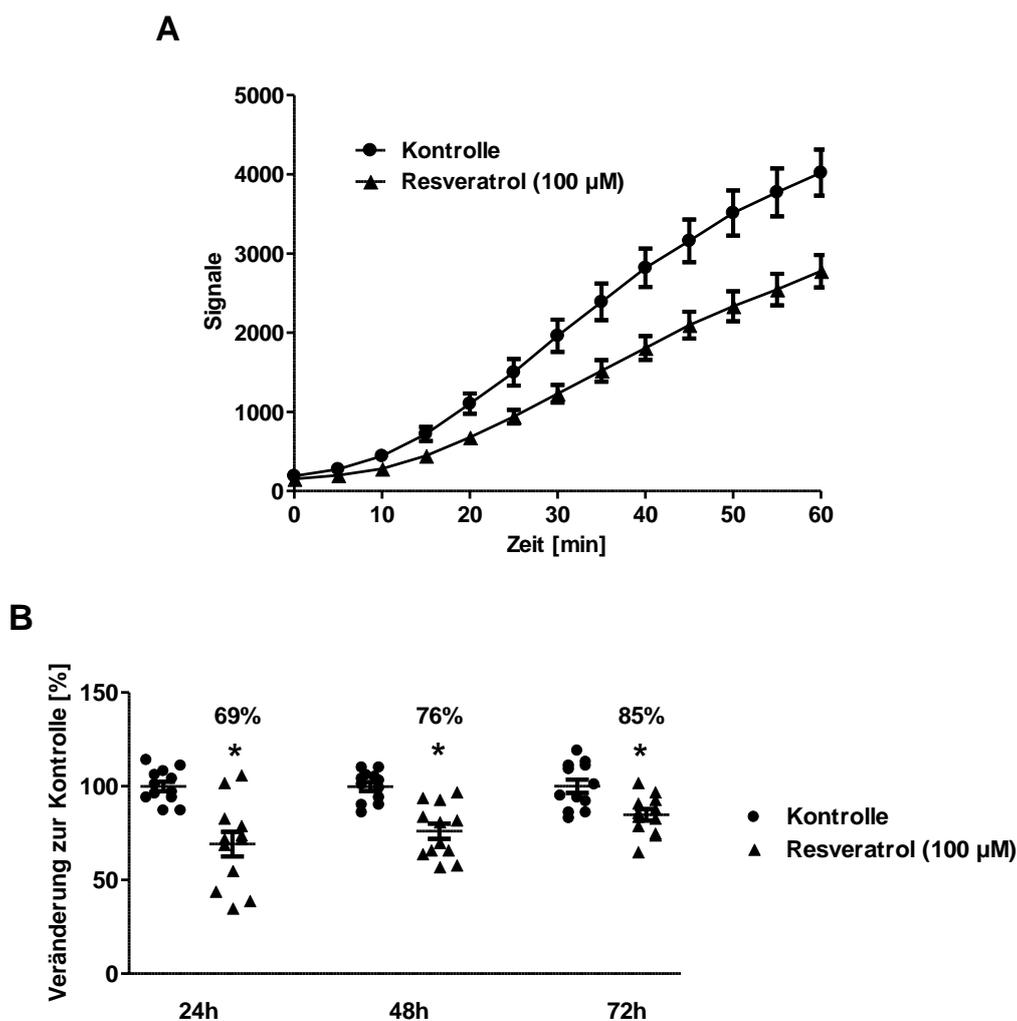


Abbildung 67: Effekt von Resveratrol auf die intrazelluläre ROS-Reduktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit Resveratrol (100 μM) oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für unterschiedliche Dauer inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit dem zellmembrangängigen Chemilumineszenz-Reagenz Luminol (500 μM) versetzt. Im Anschluss wurde durch die Zugabe von DMNQ (3 μM) die intrazelluläre ROS-Produktion gestartet sowie die entstehende Chemilumineszenz für 60 Minuten detektiert (A). Für die Auswertung wurden die AUCs der einzelnen Kurven gebildet und die Ergebnisse der Kontrollen gleich 100% gesetzt (B). Die Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM, n=12, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

In diesem Versuchsaufbau diente erneut Resveratrol (100 μM) als Positivkontrolle (Abbildung 67A), denn die Effekte von Resveratrol auf die antioxidativen

Abwehrmechanismen wurden ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben [101]. Resveratrol verringerte die AUCs (*Abbildung 67B*) und somit die nachweisbaren ROS nach 24 Stunden signifikant ($69\% \pm 7\%$; $p=0,0012$). Nach 48 ($76\% \pm 4\%$; $p=0,0004$) sowie 72 Stunden ($85\% \pm 3\%$; $p=0,0093$) war ebenfalls eine Reduktion zu detektieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Versuchsaufbau für die Fragestellung nach dem Einfluss von pflanzlichen Substanzen auf die antioxidativen Abwehrmechanismen verwendet werden kann.

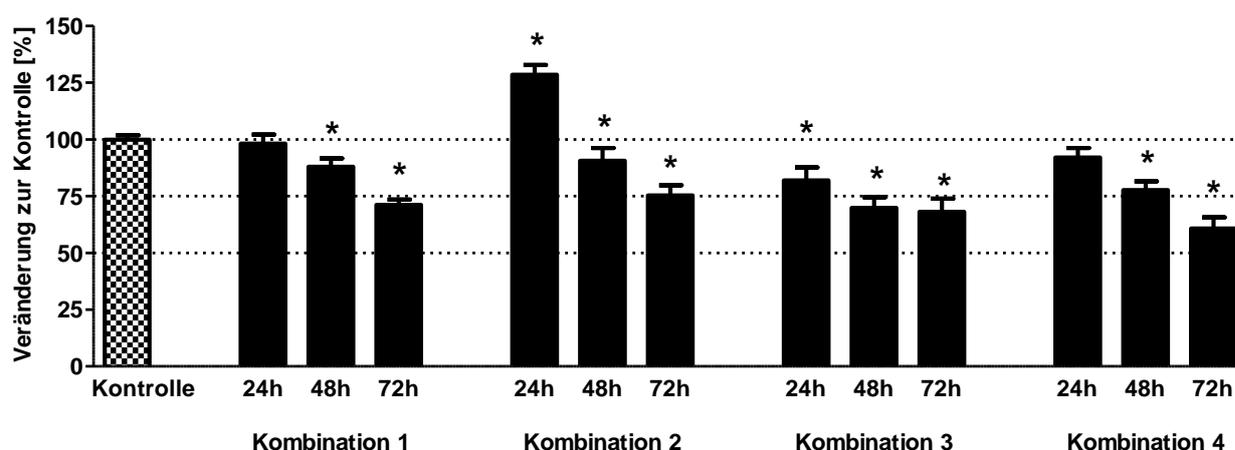


Abbildung 68: Effekt der Kombinationen auf die intrazelluläre ROS-Reduktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für unterschiedliche Dauer inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit dem zellmembrangängigen Chemilumineszenz-Reagenz Luminol (500 μ M) versetzt. Im Anschluss wurde durch die Zugabe von DMNQ (3 μ M) die intrazelluläre ROS-Produktion gestartet sowie die entstehende Chemilumineszenz für 60 Minuten detektiert. Für die Auswertung wurden die AUCs der einzelnen Kurven gebildet und die Ergebnisse der Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=12$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation (*Abbildung 68*) mit Kombination 1 war nach 24 Stunden kein Einfluss nachweisbar ($98\% \pm 4\%$; $p=0,8621$). Eine Reduktion konnte erst nach 48 ($88\% \pm 4\%$; $p=0,0162$) sowie nach 72 Stunden detektiert werden ($71\% \pm 2\%$; $p<0,0001$). Der Effekt nach 72 Stunden unterschied sich gegenüber den anderen beiden Zeitpunkten (24 h: $p=0,0002$; 48 h: $p=0,0021$). Bei Kombination 2 stieg die ROS-Produktion nach 24 Stunden signifikant an ($129\% \pm 4\%$; $p<0,0001$). Bei dieser Kombination konnte allerdings ebenfalls eine Verringerung nach 48 ($91\% \pm 6\%$; $p=0,0300$) und nach 72 Stunden ($75\% \pm 4\%$; $p=0,0002$) nachgewiesen werden. Zusätzlich waren diese beiden Effekte signifikant unterschiedlich zu dem Ergebnis nach 24 Stunden (48 h: $p=0,0005$;

72 h: $p < 0,0001$). Bereits nach 24 Stunden ($82\% \pm 6\%$; $p = 0,0261$) konnte ein Einfluss von Kombination 3 festgestellt werden. Diese Reduktion verstärkte sich über die Zeit nicht mehr, denn die Effekte nach 48 ($70\% \pm 5\%$; $p < 0,0001$) sowie 72 Stunden ($68\% \pm 6\%$; $p = 0,0002$) unterschieden sich weder zueinander ($p = 0,7949$) noch gegenüber der Veränderung nach 24 Stunden (48 h: $p = 0,1748$; 72 h: $p = 0,0885$). Eine eindeutige Zeitabhängigkeit konnte bei Kombination 4 demonstriert werden. Während nach 24 Stunden ($92\% \pm 4\%$; $p = 0,2243$) kein Effekt nachweisbar war, unterschied sich die Veränderung nach 48 Stunden ($78\% \pm 4\%$; $p = 0,0002$) gegenüber den Reduktionen von 72 ($61\% \pm 5\%$; $p < 0,0001$) und von 24 Stunden signifikant (24 h: $p = 0,0349$; 72 h: $p = 0,0162$).

3.2.4.2 Extrazelluläre ROS

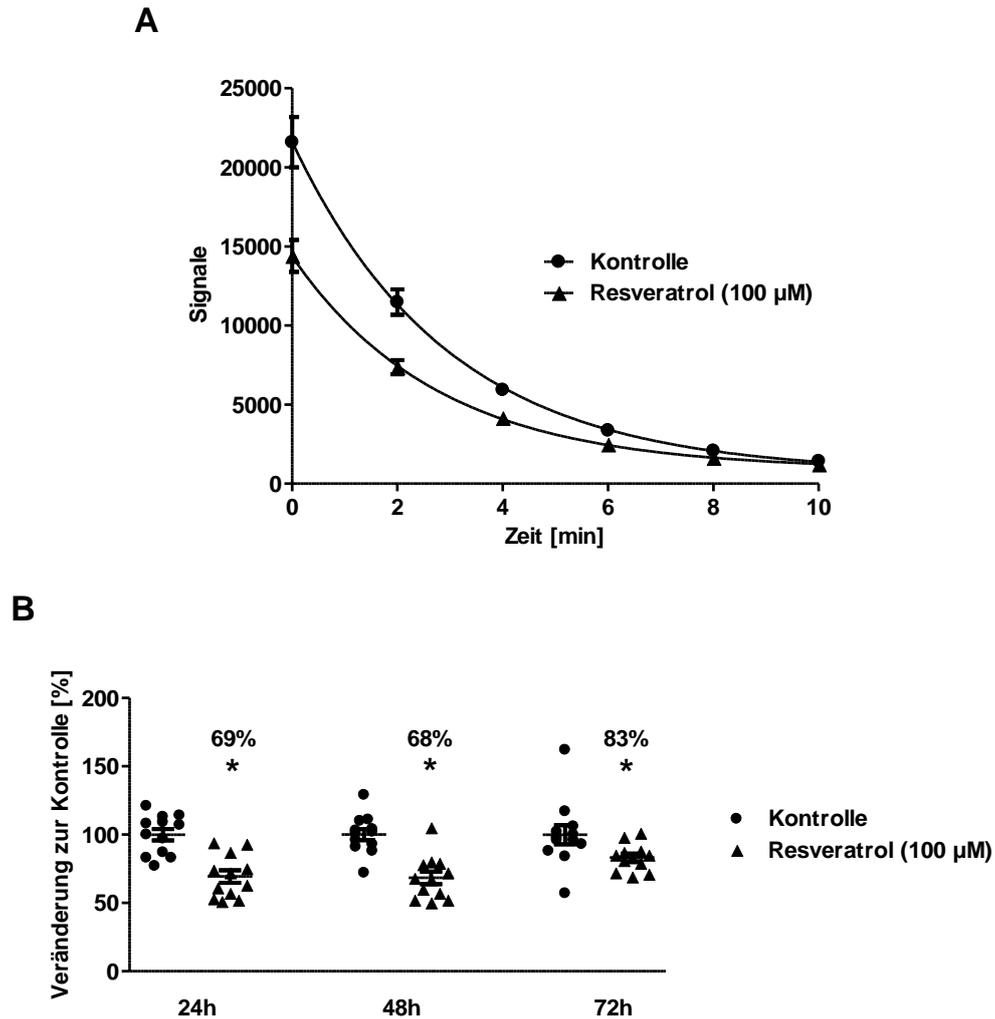


Abbildung 69: Effekt von Resveratrol auf die extrazelluläre ROS-Reduktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit Resveratrol (100 µM) oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für unterschiedliche Dauer inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit dem nicht-zellmembrangängigen Chemilumineszenz-Reagenz Lucigenin (500 µM) versetzt. Im Anschluss wurde durch die kombinierte Zugabe von Xanthin (50 µM) und Xanthin-Oxidase (50 U/µL) die extrazelluläre ROS-Produktion gestartet sowie die entstehende Chemilumineszenz für 10 Minuten detektiert (A). Für die Auswertung wurden die AUCs der einzelnen Kurven gebildet und die Ergebnisse der Kontrolle gleich 100% gesetzt (B). Die Daten sind abgebildet als Mittelwert ± SEM, n=12, * p<0,05 bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Mit diesem Versuchsaufbau wurde der Einfluss der Kombinationen auf die antioxidativen Abwehrmechanismen der Zellen gegen extrazelluläre ROS demonstriert. ROS wurden in der Lösung durch die Zugabe von Xanthin und Xanthin-Oxidase gebildet. Die produzierten ROS konnten mittels der vom nicht-zellmembrangängigen Lucigenin abgesonderten

Chemilumineszenz detektiert werden (Abbildung 69A). Durch die gebildeten AUCs (Abbildung 69B) konnten die Ergebnisse am geeignetsten untereinander verglichen werden.

In diesem Versuchsaufbau diente erneut Resveratrol (100 μ M) als Positivkontrolle. Denn die Effekte von Resveratrol auf die antioxidativen Abwehrmechanismen wurden ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben. Resveratrol verringerte die AUC und somit die nachweisbaren ROS nach 24 Stunden signifikant ($69\% \pm 5\%$; $p=0,0005$). Nach 48 ($68\% \pm 5\%$; $p=0,0007$) sowie 72 Stunden ($83\% \pm 3\%$; $p=0,0141$) war ebenfalls eine Reduktion zu detektieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass dieser Versuchsaufbau für die Fragestellung nach dem Einfluss von pflanzlichen Substanzen auf die antioxidativen Abwehrmechanismen verwendet werden kann.

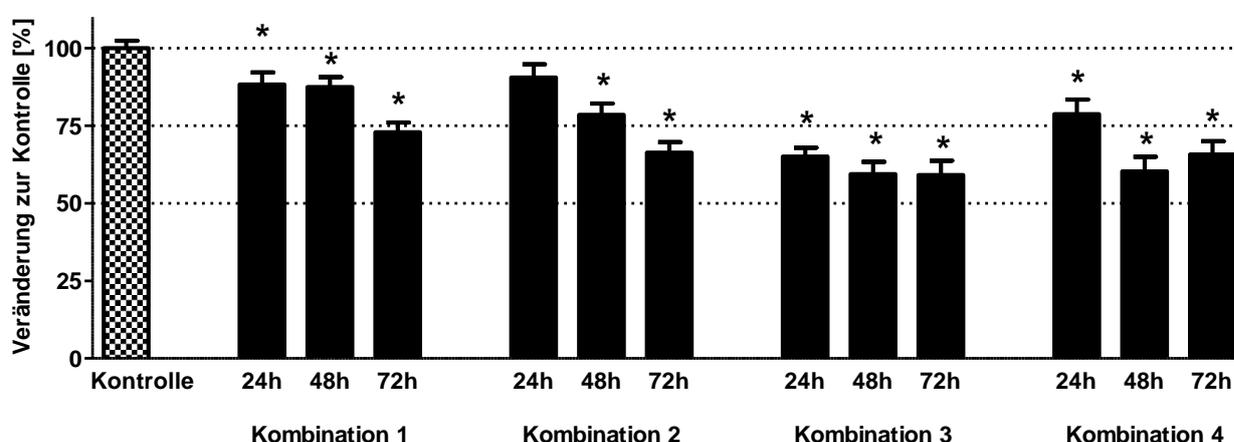


Abbildung 70: Effekt der Kombinationen auf die extrazelluläre ROS-Reduktion. Die EA.hy 926 Zellen wurden mit den verschiedenen Kombinationen oder der Lösungsmittelkontrolle (0,1% DMSO) für unterschiedliche Dauer inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit dem nicht-zellmembrangängigen Chemilumineszenz-Reagenz Lucigenin (500 μ M) versetzt. Im Anschluss wurde durch die kombinierte Zugabe von Xanthin (50 μ M) und Xanthin-Oxidase (50 U/ μ L) die extrazelluläre ROS-Produktion gestartet sowie die entstehende Chemilumineszenz für 10 Minuten detektiert. Für die Auswertung wurden die AUCs der einzelnen Kurven gebildet und die Ergebnisse der Kontrolle gleich 100% gesetzt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert \pm SEM, $n=12$, * $p<0,05$ bezüglich der Kontrolle, Mann-Whitney U-Test.

Bei der Inkubation (Abbildung 70) mit Kombination 1 war nach 24 ($88\% \pm 4\%$; $p=0,0421$) sowie nach 48 Stunden ($88\% \pm 3\%$; $p=0,0026$) eine signifikante Reduktion zu detektieren. Diese Effekte unterschieden sich nicht voneinander ($p=0,7725$). Die Veränderung nach 72 Stunden ($73\% \pm 3\%$; $p<0,0001$) unterschied sich gegenüber den Effekten nach 24 ($p=0,0130$) sowie nach 48 Stunden ($p=0,0054$). Eine eindeutige Zeitabhängigkeit zeigte sich bei Kombination 2. Während nach 24 Stunden ($91\% \pm 4\%$; $p=0,0724$) kein Einfluss

nachgewiesen werden konnte, unterschied sich der Effekt nach 48 Stunden ($79\% \pm 4\%$; $p=0,0005$) gegenüber den Veränderungen nach 72 Stunden ($66\% \pm 3\%$; $p<0,0001$) und nach 24 Stunden (24 h: $p=0,0375$; 72 h: $p=0,0429$). Bei Kombination 3 wurde erneut ein starker Effekt bereits nach 24 Stunden festgestellt ($65\% \pm 3\%$; $p<0,0001$). Diese Reduktion veränderte sich über die Zeit jedoch nicht mehr. Die Reduktionen nach 48 ($59\% \pm 4\%$; $p<0,0001$) sowie 72 Stunden ($59\% \pm 5\%$; $p<0,0001$) unterschieden sich nicht zueinander ($p=0,1000$) oder jeweils gegenüber denen nach 24 Stunden (48 h: $p=0,3118$; 72 h: $p=0,4022$). Bei Kombination 4 reduzierten sich die nachgewiesenen ROS nach 24 ($79\% \pm 5\%$; $p=0,0031$), 48 ($60\% \pm 5\%$; $p<0,0001$) und 72 Stunden ($66\% \pm 4\%$; $p<0,0001$). Der Effekt nach 48 Stunden unterschied sich gegenüber dem nach 24 Stunden ($p=0,0178$). Der Einfluss nach 72 Stunden veränderte sich gegenüber den beiden anderen (24 h: $p=0,2137$; 48 h: $p=0,5629$) nicht.

3.2.4.3 Zusammenfassung

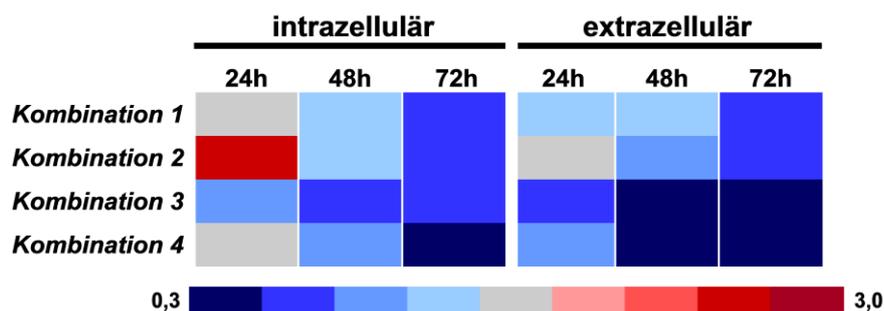


Abbildung 71: Heatmap der Effekte der verschiedenen Kombinationen auf die ROS-Reduktion. Die Heatmap bietet einen Überblick der beobachteten Einflüsse der verschiedenen Kombinationen auf den ROS-Abbau von intra- und extrazellulären ROS. Abgebildet sind die Effekte der einzelnen Kombinationen von den unterschiedlichen Inkubationszeiten, die Farben repräsentieren eine Erhöhung (rot) oder Verringerung (blau) der gemessenen ROS-Konzentrationen. Der Score ergibt sich aus der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle.

Die Zusammenfassung (*Abbildung 71*) zeigt, dass alle Kombinationen den ROS-Abbau steigerten. Dabei nahm der Effekt im Verlauf der Zeit stets zu. Lediglich bei Kombination 2 stieg die gemessene intrazelluläre ROS-Konzentration nach 24 Stunden an. Außerdem stellt die Übersicht den positiven Effekt von Knoblauch sehr deutlich dar. Die stärksten Reduktionen hinsichtlich der intra- sowie extrazellulären ROS sind bei Kombination 3 und 4 zu beobachten. Beide enthalten Knoblauch und zeigen ein besseres Wirkungsprofil als ihre jeweilige Vergleichskombination (1 respektive 2).

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen pflanzlichen Extrakten auf die im NO-Redox-Gleichgewicht involvierten Enzyme. Des Weiteren wurden deren Auswirkungen hinsichtlich der NO-Produktion sowie der verringerten Anfälligkeit der Zellen gegenüber oxidativen Stressoren analysiert.

Für die Versuche wurde mit den EA.hy 926 Zellen eine stabile Zelllinie gewählt, die auf Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen basiert. Zur Ermittlung der Effekte auf die Enzyme wurden die Zellen mit den entsprechenden Extrakten inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen für die verschiedenen pflanzlichen Extrakte folgten wenn möglich bisher vorliegenden Veröffentlichungen. Ansonsten wurde versucht, eine möglichst hohe Konzentration einzusetzen, um keine Effekte zu übersehen. Ein limitierender Faktor war dabei neben der Zelltoxizität der Extrakte ihre Löslichkeit in Wasser bzw. DMSO. Da DMSO selbst ein Zellgift darstellt, erfolgte die Verwendung mit einer maximalen Konzentration von 0,1%.

Bei den Experimenten, die einen Einfluss der pflanzlichen Extrakte auf die mRNA-Expression untersuchten, wurden sieben Enzyme analysiert. Auf der Seite des Stickstoffmonoxides waren es das NO-produzierende Enzym eNOS sowie das abbauende Enzym des Inhibitors ADMA, DDAH1. Da sich diese Arbeit auf die Endothelfunktion fokussiert und die verwendeten Zellen Endothelzellen waren, wurde von den NO-Synthase-Isoformen die endotheliale NOS untersucht. Die Isoform 1 der DDAH wurde gewählt, obwohl sie gegenüber der Isoform 2 verstärkt in der Niere anstatt im vaskulären Gewebe zu finden ist. Jedoch konnten Studien zeigen, dass eine Inaktivierung der beiden Isoformen deutlich unterschiedliche Auswirkungen hat. Während bei der DDAH1 ein Anstieg der ADMA-Plasmakonzentration um 25% gemessen werden konnte, reduzierte die Hemmung der DDAH2 lediglich die Acetylcholin-induzierte Relaxation von MRVs (*Mesenteric Resistance Vessels*) sowie die NO-Aktivität [102]. Da somit gezeigt wurde, dass nach aktuellem Stand die Isoform 1 hinsichtlich der Reduzierung der ADMA-Konzentration deutlich relevanter ist, fokussierte sich die vorliegende Arbeit auf diese Isoform.

Auf der Seite der ROS wurden die Enzyme NOX4, SOD1 sowie 2, CAT und GPX1 analysiert. Für die Produktion von ROS in den Zellen sind verschiedene Oxidasen und Dehydrogenasen verantwortlich. In einem Vorversuch wurden die Zellen daher auf die

Expression von Xanthin-Dehydrogenase (XDH) und die verschiedenen Isoformen der NADPH-Oxidase (NOX) getestet. Dabei konnten weder XDH noch die Isoformen 1 und 2 der NOX gemessen werden. Lediglich für die Isoform 4 der NOX waren Signale detektierbar. Diese Beobachtung deckte sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien, dass die NOX4 im Vergleich zu den anderen 4 im vaskulären Gewebe auftretenden Isoformen 100fach höher exprimiert wird [103]. Damit hat diese Isoform die größte Bedeutung hinsichtlich der Gesamtaktivität der NADPH-Oxidase sowie einen entscheidenden Anteil an der Funktionstätigkeit des Endothels [104-107]. Aus diesem Grund fokussiert sich diese Arbeit auf die Isoform 4. Bei der SOD wurden die Kupfer- und Zink-haltige Isoform 1 sowie die Mangan-enthaltende Isoform 2 untersucht. Die Isoform 3 wurde nicht weiter berücksichtigt, da sie hauptsächlich in Pflanzen vorkommt. Bei der Katalase (CAT) waren zum aktuellen Zeitpunkt keine Isoformen bekannt und bei der GPX wurde sich auf die bedeutendste Isoform 1 konzentriert.

Bei den Versuchsreihen, die einen Einfluss der pflanzlichen Extrakte auf die Protein-Expression untersuchten, konnten lediglich zwei Enzyme analysiert werden. Dabei handelte es sich um die bereits auf der mRNA-Ebene untersuchten eNOS und SOD1. Für die anderen fünf Enzyme, die ebenfalls auf der mRNA-Ebene analysiert wurden, konnte keine Untersuchung auf veränderte Protein-Expression durchgeführt werden. In den jeweiligen Vorversuchen war es nicht möglich sie zu detektieren. Trotz des Testens verschiedener Antikörper konnten keine sicher auswertbaren Signale erzeugt werden, was beispielsweise auf zu geringe Protein-Konzentrationen oder den Sensitivitätsmangel der Antikörper zurückzuführen war. Nichtsdestotrotz wurden mit eNOS und SOD1 die wichtigsten Vertreter der beiden Seiten des NO-Redox-Gleichgewichtes hinsichtlich einer veränderten Protein-Expression untersucht. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass gesteigerte mRNA-Expressionen sich nicht zwangsläufig in erhöhten Protein-Expressionen widerspiegeln. Dies kann unter anderem daraus resultieren, dass einzelne im Pflanzenextrakt enthaltene Stoffe eventuell mit nachfolgenden Schritten wie der Translation interagieren. Außerdem ist die Stabilität der mRNA ein entscheidender Faktor. Aus diesem Grund waren die Experimente, die den Einfluss der Extrakte auf der funktionellen Ebene untersuchten, umso bedeutsamer.

4.2 Extrakte

4.2.1 Artischocke

Artischocke ist eine der ältesten Heilpflanzen der Erde. Bereits den alten Ägyptern, Griechen und Römern war ihr verdauungsfördernder Effekt bekannt. Bisherige Studien zeigten, dass der Extrakt der Artischocke antidyspeptische Wirkungen hat und zu einer Lipidsenkung führt [108-111]. Sowohl bei Untersuchungen an Ratten als auch Menschen konnte außerdem eine erhöhte Gallentätigkeit nachgewiesen werden [112-113]. Zusätzlich wurde demonstriert, dass sowohl die Biosynthese von Cholesterin als auch die Oxidation von LDL inhibiert wird [114-116]. Hinsichtlich antioxidativer Effekte wurde belegt, dass der Extrakt zum einen isolierte Leberzellen von Ratten gegenüber Wasserstoffperoxid-induziertem Stress schützt und zum anderen die Produktion von intrazellulären ROS in kultivierten Endothelzellen und Monozyten senkt [117-118].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die mRNA-Expression von eNOS, SOD1 sowie SOD2 durch die Inkubation mit dem Artischocken-Extrakt gesteigert wurden (*Abbildung 14a*). Dabei konnte zumindest für die ersten beiden Enzyme offengelegt werden, dass der Effekt konzentrationsabhängig war, wobei eine signifikante Veränderung lediglich bei der höchsten Konzentration zu detektieren war. Dagegen verstärkten alle drei Konzentrationen die Expression von SOD2. Es ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen ihnen nachweisen (*Abbildung 15a*). Die Steigerung der mRNA-Expression von SOD1 spiegelte sich in einer erhöhten Protein-Expression wider (*Abbildung 14b*), wobei ebenso eine Konzentrationsabhängigkeit demonstriert werden konnte (*Abbildung 15b*). Das Ergebnis der Arbeit deckte sich mit den Resultaten von Li *et al.* [119]. Diese konnte ebenfalls eine Steigerung um etwa das gleiche Niveau der mRNA-Expression von eNOS zeigen. Allerdings demonstrierten sie auch eine gesteigerte Protein-Expression von eNOS, die in dieser Arbeit nicht nachweisbar war. Li *et al.* benutzten ebenfalls EA.hy 926 Zellen, unterschieden allerdings einen wässrigen und einen organischen Auszug der Artischocke. Die verwendete Konzentration (100 µg/mL) glich dieser Arbeit. Eventuell spielte die Inkubationszeit von 18 Stunden, anstatt der in dieser Arbeit verwendeten 72 Stunden, eine Rolle. Zusätzlich demonstrierten Li *et al.* eine Steigerung sowohl der eNOS-Promotoraktivität als auch der NO-Produktion.

Der Extrakt der Artischocke war auf den sekundären Pflanzenstoff Cynarin (2,5%) normalisiert. Die Ergebnisse offenbarten allerdings, dass Cynarin nicht bzw. zumindest nicht allein für die Effekte des Extraktes verantwortlich war. Zwar konnte die im Extrakt enthaltene

Konzentration von Cynarin (4,8 μM) die mRNA-Expression von eNOS tendenziell steigern, ein vergleichbarer Einfluss wie der gesamte Extrakt wurde jedoch erst durch eine etwa 20fach höhere Konzentration (100 μM) erreicht (*Abbildung 16*). Hinzu kommt, dass selbst für die hohe Konzentration von Cynarin kein Einfluss auf SOD1 oder SOD2 nachgewiesen werden konnte. Zu den bedeutsamen sekundären Pflanzenstoffen der Artischocke zählen neben dem Cynarin das Flavon Luteolin, dessen Glycosid Cynarosid sowie das Polyphenol Kaffeesäure und dessen Ester mit der Chinasäure Chlorogensäure. Li *et al.* hatten gezeigt, dass Luteolin und Cynarosid sowohl die mRNA-Expression von eNOS als auch die eNOS Promotoraktivität steigern. Diese Steigerung der eNOS-Promotoraktivität war durch Cynarin und Chlorogensäure nicht möglich [119]. Demgegenüber konnten Pérez García *et al.* demonstrieren, dass Cynarin, Luteolin, Kaffeesäure und Chlorogensäure die Produktion von ROS durch verschiedene Stimuli in humanen Leukozyten reduzieren [120].

4.2.2 Grüner Tee

Das meist konsumierte Getränk der Erde ist nach Wasser der Tee. Grüner Tee wird aus den Blättern der Pflanze *Camellia sinensis* gewonnen und enthält reichhaltig Flavonoide, wobei die Substanzen und deren Menge stark von der Art der Gewinnung und der Fermentierung abhängen. Epidemiologische Studien zeigten eine inverse Beziehung zwischen Teekonsum und kardiovaskulären Ereignissen [121]. Außerdem wird Teetrinken mit einer reduzierten kardiovaskulären Mortalität assoziiert sowie mit einer geringeren Progression von Atherosklerose [122-125].

Diese Arbeit wies nach, dass die Inkubation mit dem Extrakt des Grünen Tees lediglich die mRNA-Expression von CAT steigert und die von GPX1 senkt (*Abbildung 17a*). Der Effekt auf CAT war nachweislich konzentrationsabhängig (*Abbildung 18a*). Die Verringerung von GPX1 wurde nicht weiter untersucht, da sie hinsichtlich der Gesamtsituation nicht in die relevante Richtung ging. Auf die Expression der Proteine konnte ein Einfluss für eNOS detektiert werden (*Abbildung 17b*). Dieser stellte sich aber nicht einwandfrei als konzentrationsabhängig dar (*Abbildung 18b*). Demgegenüber war es Persson *et al.* möglich zu zeigen, dass Grüner Tee die NO-Produktion steigert [126]. Dies deckte sich mit anderen Studien, dass über verschiedene Signalwege die Aktivität der eNOS erhöht wird [127-129]. Außerdem konnte in einer Studie mit dem Extrakt des Grünen Tees die endotheliale Dysfunktion bei gesunden Rauchern verbessert werden [130]. Jedoch sind zum aktuellen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen bekannt, die eine Steigerung der Expression von mRNA oder Proteinen der eNOS zeigen. Andere Studien hatten allerdings offengelegt, dass in BCAECs (*engl. Bovine Carotid Artery Endothelial Cells*) die Protein-Expression von CAT erhöht und die von NOX gesenkt wird [131-132].

Der für die Untersuchung dieser Arbeit verwendete Extrakt des Grünen Tees war auf 50% Gesamt-Polyphenole normalisiert. Darunter fielen 30% Catechin, 15% EGCG sowie 5% Coffein. Das Ergebnis der Inkubation mit den isolierten Substanzen war jedoch nicht eindeutig. Während die im Extrakt enthaltene Konzentration von Catechin (51,7 μM) keinen Einfluss zeigte, reichte bereits eine Verdopplung der Konzentration (100 μM) aus, um einen mit dem gesamten Extrakt vergleichbaren Effekt zu erzielen. Bei EGCG konnte bei der Konzentration, welche im Extrakt enthalten war (16,4 μM), lediglich eine Tendenz gezeigt werden. Diese blieb allerdings auch bei dem Einsatz der fast 6fach höheren Konzentration von EGCG (100 μM) unverändert (*Abbildung 19*). Somit machte diese Arbeit keine Einzelsubstanz für die Effekte des gesamten Extraktes ausfindig. Verschiedene Studien konnten allerdings bereits offenlegen, dass vor allem Catechin und EGCG die Substanzen mit dem größten Potential sind. So konnten Persson *et al.* die Steigerung der NO-Aktivität nicht nur für den gesamten Extrakt demonstrieren sondern auch für EGCG [126]. Außerdem wurde in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie mit KHK-Patienten gezeigt, dass EGCG die Fluss-vermittelte Dilatation akut verbessert [133]. Die Effekte korrelierten mit erhöhten Plasmakonzentrationen von EGCG. Demgegenüber steigerte die Einzelgabe von EGCG die NO-Produktion bei gesunden Probanden nicht [134]. Außerdem konnte für Catechin bei steigender Zufuhr ein verringertes Hypertonierisiko festgestellt werden [135].

4.2.3 Ingwer

Bereits seit der Antike ist Ingwer den Menschen als Mittel für medizinische Zwecke und als Gewürz bekannt [136]. Ingwer wird unter anderem mit antioxidativen und anti-inflammatorischen Effekten sowie schützenden Wirkungen gegenüber Krebs in Verbindung gebracht. Für verschiedene Inhaltsstoffe des Ingwers wurden sowohl positiv inotrope Effekte als auch die Hemmung der Plättchenaggregation nachgewiesen [137-140]. Zusätzlich konnten Studien lipidsenkende und anti-atherosklerotische Wirkungen nachweisen [141-142]. Deshalb war der Extrakt für diese Arbeit interessant und wurde entsprechend untersucht.

Die Experimente zeigten allerdings keinen Einfluss des Ingwer-Extraktes auf die mRNA-Expression (*Abbildung 20a*). Bei den Proteinen konnte eine Steigerung für eNOS und SOD1 festgestellt werden. Jedoch waren die Veränderungen sehr gering und es konnte keine Konzentrationsabhängigkeit gezeigt werden (*Abbildung 21*).

Da sich die Forschung und wahrscheinlich auch die Wirkung von Ingwer hauptsächlich auf den Einfluss auf Krebs fokussiert, ist die Datenlage hinsichtlich des NO-Redox-Gleichgewichtes nicht besonders ausgeprägt. Studien konnten lediglich

beschreiben, dass Ingwer in der Lage ist freie Radikale zu neutralisieren und, dass diese Fähigkeit mit der Konzentration von Gingerol zusammenhängt [143-145]. Außerdem konnte in Makrophagen gezeigt werden, dass durch die Inhibition von iNOS die Produktion von NO reduziert werden kann und somit schützende Effekte gegenüber nitrosativem Stress resultieren [146]. Demgegenüber stehen zusätzlich Studien, in denen Gingerol prooxidative Effekte zeigte, welche zu einer Unterdrückung des Krebszellenwachstums führte [147-148].

Aus der wissenschaftlichen Datenlage und aus den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitet, scheint Ingwer keinen relevanten Einfluss auf das NO-Redox-Gleichgewicht zu haben. Lediglich für den Inhaltsstoff Zerumbone konnte eine Aktivierung von Nrf2 (*engl. Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2*) nachgewiesen werden [149]. Vorherige Studien konnten bereits darlegen, dass die Expression von antioxidativen Enzymen unter anderem durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 reguliert wird. Daher führt eine Aktivierung von Nrf2 und dessen Bindung an das ARE (*engl. Antioxidative Responsive Element*) der DNA zu erhöhten Konzentrationen von SOD, GPX sowie CAT [150-151].

4.2.4 Japanischer Staudenknöterich

Sowohl in der traditionellen japanischen Medizin als auch in der indischen Ayurveda-Medizin ist der Japanische Staudenknöterich als Heilpflanze bekannt [152]. Der Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs war auf 95% Resveratrol normalisiert. Diese Substanz steht zurzeit sehr im Fokus der Forschung und über kaum einen anderen sekundären Pflanzenstoff wird aktuell soviel publiziert. Resveratrol kommt unter anderem in Trauben, Erdnüssen und Maulbeeren vor, jedoch ist im Japanischen Staudenknöterich der Gehalt am höchsten [153-154]. Daher wurde der Extrakt im Rahmen dieser Arbeit untersucht. In der Pflanze wirkt Resveratrol als Phytoalexin und ist damit ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems der Pflanze. Resveratrol schützt die Pflanze vor Virusinfektionen, Pilz- und Bakterienbefall sowie schädlichen Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung, Ozon und Toxinen [155]. Im Jahre 1992 wurden erstmals kardioprotektive Effekte von Rotwein dem darin enthaltenen Resveratrol zugeschrieben [156]. Seitdem wurden viele Studien zur Wirkung von Resveratrol durchgeführt und die Liste der Krankheiten, auf die es eine schützende Wirkung aufweist oder das Fortschreiten verlangsamt, verlängerte sich deutlich. Dazu zählt neben Gefäßkrankheiten, Ischämie, Krebs und Alzheimer auch die Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Stress [157-162].

Diese Arbeit konnte demonstrieren, dass sich durch die Inkubation mit dem Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs die mRNA-Expression von eNOS, DDAH1 und GPX1 steigert und sich gleichzeitig die von NOX4 verringert (*Abbildung 22a*). Nachfolgende

Experimente belegten, dass diese Veränderungen konzentrationsabhängig waren (*Abbildung 23a*). Bei den Proteinen erhöhte sich die Expression von eNOS (*Abbildung 22b*), wobei keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden konnte (*Abbildung 23b*). Weil der Extrakt des Japanischen Staudenknöterichs auf 95% Resveratrol normalisiert war und damit Resveratrol annähernd in Reinsubstanz vorlag, wurde auf den Nachweis der für die Wirkung verantwortlichen Einzelsubstanz verzichtet.

Da, wie bereits beschrieben, die Datenlage von Resveratrol sehr ausführlich ist, diente der Extrakt der vorliegenden Arbeit als Leitsubstanz. So konnten die Ergebnisse, die sich zum Teil mit den Arbeiten von Wallerath *et al.* und Spanier *et al.* überschneiden [100-101], dazu genutzt werden, um zu überprüfen, ob das Modell funktionierte und reproduzierbare Daten hervorbrachte. Hinsichtlich des Einflusses auf die eNOS waren die ermittelten Daten mit der Arbeit von Wallerath *et al.* vergleichbar [100]. In beiden Arbeiten zeigte sich eine ähnliche Steigerung der mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Konzentration. Zusätzlich konnten Wallerath *et al.* eine Abhängigkeit der Veränderung im Bezug auf die Inkubationszeit demonstrieren. Im Gegensatz zu dieser Arbeit war bei Wallerath *et al.* die Erhöhung der Protein-Expression deutlich stärker ausgeprägt. Außerdem konnte für die Veränderung eine Abhängigkeit hinsichtlich der Konzentration von Resveratrol offengelegt werden, was der vorliegenden Arbeit nicht gelang. Ergänzend stellten Wallerath *et al.* neben der ebenfalls konzentrationsabhängigen Steigerung der eNOS-Aktivität sowie der NO-Produktion auch eine zeit- und konzentrationsabhängige erhöhte eNOS-Promotor-Aktivität durch Resveratrol dar [100]. Die Arbeit von Spanier *et al.* widmete sich der Redox-Seite und analysierte die Effekte von Resveratrol auf die Enzyme NOX4, SOD1 und GPX1. Sie wiesen nach, dass sich die mRNA-Expression von NOX4 verringert und sich gleichzeitig die von SOD1 und GPX1 erhöht. Die beobachteten Effekte waren sowohl von der Konzentration als auch von der Inkubationszeit abhängig. Die Ergebnisse von Spanier *et al.* deckten sich mit den beobachteten Veränderungen dieser Arbeit. Zusätzlich war es Spanier *et al.* möglich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Protein-Expression von SOD1 und GPX1 nachzuweisen. SOD1 wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, zeigte jedoch keine Veränderungen. Für die Protein-Expression von NOX4 konnten Spanier *et al.* aufgrund des Mangels von geeigneten NOX4-Antikörpern ebenfalls keine Daten erheben. Abschließend zeigten Spanier *et al.*, dass Resveratrol die Widerstandsfähigkeit der Endothelzellen gegenüber induziertem Stress senkte [101].

Der Zugewinn dieser Arbeit besteht neben der Ausweitung des Modells für andere pflanzliche Extrakte vor allem in der Erfassung des konzentrationsabhängigen Einflusses von Resveratrol auf die Expression von DDAH1.

4.2.5 Kleines Fettblatt

Das Kleine Fettblatt wird in der indischen und pakistanischen Ayurveda-Medizin als Heilpflanze unter anderem zur Behandlung von Asthma, zur Stärkung der Nerven, zur Verbesserung der Gedächtnisleistung sowie als Kardiotonikum und Diuretikum eingesetzt [163]. Außerdem wird es bei Schmerzen, Fieber und Entzündungen angewendet [164]. Der hohe Gehalt des Extraktes des Kleinen Fettblattes an Saponinen, Flavonoiden, Alkaloiden und Phytosterolen macht es zu einem potentiellen Antioxidans. Studien konnten neben den antioxidativen Fähigkeiten unter anderem auch vasodilatorische, gefäßschützende, anti-inflammatorische sowie hepatoprotektive Wirkungen nachweisen [165-169].

Die Experimente dieser Arbeit mit dem Extrakt des Kleinen Fettblattes zeigten eine Steigerung der mRNA-Expression von eNOS, SOD1 sowie SOD2 (*Abbildung 24a*). In weiterführenden Untersuchungen konnte belegt werden, dass diese Veränderungen konzentrationsabhängig waren (*Abbildung 25*). Die erhöhte mRNA-Expression spiegelte sich jedoch nicht in der Protein-Expression wider (*Abbildung 24*). Diese Arbeit konnte nachweisen, dass das Stoffgemisch Bacosid A, auf das der Extrakt zu 10% normalisiert war, für die Effekte mitverantwortlich war. Während dies bei der Expression von eNOS und SOD2 recht deutlich war, legen die Daten nahe, dass bei SOD1 zumindest noch eine weitere Substanz von Bedeutung involviert ist (*Abbildung 26*).

Die wissenschaftliche Datenlage hinsichtlich eines Einflusses des Extraktes des Kleinen Fettblattes auf das NO-Redox-Gleichgewicht ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht sehr umfangreich. Almelkar *et al.* konnten antioxidative Effekte des Extraktes bei Stress-induzierten Endothelzellen zeigen [170]. Außerdem legten Kamesh *et al.* offen, dass in Stress-exponierten Ratten die mRNA-Expression von eNOS in der Niere gesteigert wird. Außerdem erhöhte sich die Aktivität von SOD, CAT und GPX [171]. Zusätzlich wiesen Sumathi *et al.* nach, dass das Stoffgemisch Bacosid A bei Morphin-induziertem Stress die Aktivität von SOD, CAT und GPX im Gehirn der Ratten steigerte [172].

4.2.6 Knoblauch

Seit über 1.000 Jahren wird Knoblauch als Heilpflanze angewendet. Dabei wird es neben der Verringerung des Blutdruckes, der Reduzierung von ischämischen Schäden sowie der Senkung der Cholesterin-Konzentrationen auch mit der Inhibition der Plättchenaggregation und erhöhter Thrombolysen in Verbindung gebracht [173-181]. Zusätzlich konnten Studien zeigen, dass Knoblauch die arterielle Sauerstoffaufnahme bei Patienten mit einer Lungendysfunktion durch ein hepatopulmonales Syndrom verbessert [182]. Die positiven

Effekte auf die Senkung der Blutkonzentration von Lipiden und Cholesterin könnten indirekt die Funktionserhaltung des Endothels unterstützen [183].

Diese Arbeit zeigte, dass der pulverisierte Extrakt des Knoblauchs lediglich die mRNA-Expression von NOX4 reduziert (*Abbildung 27a*). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Veränderung konzentrationsabhängig war (*Abbildung 28*). Außerdem wurde demonstriert, dass Alliin als Einzelsubstanz ebenfalls die mRNA-Expression von NOX4 senkt, jedoch nicht im gleichen Maße wie der gesamte Extrakt (*Abbildung 29*). Da für den pulverisierten Extrakt des Knoblauchs keine Konzentration für Alliin angegeben war, fällt die Einordnung des beobachteten Effektes schwer. Demgegenüber steigerte der ölige Extrakt lediglich die Protein-Expression von SOD1 (*Abbildung 30b*) ebenfalls konzentrationsabhängig (*Abbildung 31*). Obwohl für beide Extrakte die gleiche Knoblauchart verwendet wurde, zeigten sie völlig unterschiedliche Effekte. Eine Ursache könnte die Extraktionsart liefern. Beim pulverisierten Extrakt wurde Wasser als Auszugsmittel genutzt und die gewonnene Lösung anschließend sprühgetrocknet. Das Droge-Extrakt-Verhältnis entsprach bei diesem Extrakt 12:1. Demgegenüber wurde der ölige Extrakt durch die Mazeration mit Rapsöl gewonnen. In diesem Fall war das Droge-Extrakt-Verhältnis 1:1. Des Weiteren bietet die ölige Basis des Extraktes die Möglichkeit einer nachträglichen chemischen Veränderung der enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe.

In HUVECs wurde bereits gezeigt, dass durch Knoblauch und S-Allylcystein die cGMP-Produktion gesteigert wurde. Allerdings konnten Kim *et al.* keine Veränderung der Aktivität oder der Protein-Expression von eNOS detektieren [184]. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der Studie von Pedraza-Chaverri *et al.*, die bei Ratten nach einer 4wöchigen Verabreichung von Knoblauch-Extrakt eine erhöhte Konzentrationen von NO-Metaboliten im Urin nachweisen konnten [185]. Außerdem konnte in einem Diabetes-Tiermodell die endotheliale Dysfunktion verbessert werden [186]. Zusätzlich demonstrierten Studien an isolierten Lungenarterien von Ratten, dass Knoblauch zu einer akuten Vasodilatation führt, welche nicht eintritt, wenn das Endothel entfernt oder die NOS inhibiert wurde. Außerdem wiesen sie nach, dass dieser Effekt nicht auf Allicin zurückzuführen war [187-189]. Weitere Studien hingegen konnten eine Dosis-abhängige Vasodilatation in Lungengefäßen bei Ratten zeigen, die von NOS-Inhibitoren unabhängig war [190]. Außerdem wiesen Bat-Chen *et al.* eine Aktivierung von Nrf2 durch Allicin nach [191]. Somit konnten verschiedene Studien positive Auswirkungen von Knoblauch auf die NO-Produktion bzw. die NO-vermittelten Effekte darstellen. Jedoch war es bisher nicht möglich, die beobachteten Einflüsse einer Einzelsubstanz aus dem Extrakt zuzuschreiben.

4.2.7 Kurkuma

In den asiatischen Ländern wird Kurkuma bereits seit jeher als Gewürz, Arzneimittel und Farbstoff verwendet [192]. Der Extrakt zeigt analgetische, anti-inflammatorische, antioxidative, verdauungsfördernde sowie antibakterielle und antifungale Wirkungen [193-194]. Außerdem wird ein positiver Einfluss auf weitere Krankheiten wie Alzheimer, Arthritis, Diabetes, verschiedene Krebsarten sowie Leber- und Nierenschädigungen diskutiert [195-196]. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass Kurkuma als Insektizid gegen Insektenplagen sowie gegen Mosquitos eingesetzt werden kann [197-200].

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die Inkubation mit Kurkuma die mRNA-Expression von eNOS, SOD1 sowie CAT erhöht und gleichzeitig die von DDAH1 senkt (*Abbildung 32a*). Bei den Proteinen änderte sich lediglich die Expression von SOD1 (*Abbildung 32b*). In nachfolgenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass alle beobachteten Effekte konzentrationsabhängig waren (*Abbildung 33*). Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass das im Extrakt enthaltene Curcumin als Einzelsubstanz die gleichen Veränderungen bewirkt (*Abbildung 34*). Der Extrakt von Kurkuma war auf 90% Curcuminoide normalisiert. Dazu zählen neben Curcumin auch Cyclocurcumin, Demethoxycurcumin und Bisdemethoxycurcumin.

Boonla *et al.* war es möglich in hypertensiven Ratten eine Steigerung der Protein-Expression von eNOS sowie erhöhte Nitrit-Konzentrationen zu detektieren. Ergänzend dazu konnte Curcumin sowohl die NOX4-Expression als auch die ROS-Produktion verringern [201]. Die Arbeit von Nakmareong *et al.* lieferte vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der antioxidativen sowie gefäßschützenden Wirkungen von Curcumin. In diesem Fall wurden die durch L-NAME (*N-Nitro-L-Arginin-Methylester*) ausgelösten negativen Effekte wie erhöhter Blutdruck, reduzierte eNOS-Expression, verringerte NO-Konzentrationen sowie vermehrte ROS-Produktion abgeschwächt [202]. Außerdem konnten Sun *et al.* in einem Zellversuch mit HUVEC zeigen, dass Curcumin die Zelle vor Wasserstoffperoxid-induziertem Stress schützt. Dabei verringerte Curcumin die ROS-Produktion und erhöhte sowohl die Phosphorylierung von eNOS als auch die Konzentration von NO [203]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass in HUVECs, die mit TNF α behandelt wurden, ebenfalls die Phosphorylierung der eNOS sowie die NO-Konzentration stieg und die ROS-Produktion abnahm. Bei dieser Arbeit wurden die Effekte sowohl durch Curcumin als auch durch den gesamten Extrakt hervorgerufen [204]. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch Curcumin konnte ebenfalls nachgewiesen werden [205].

4.2.8 Mariendistel

Mariendistel wird seit über 2.000 Jahren zur Behandlung unterschiedlicher Beschwerden eingesetzt [206]. In der Neuzeit findet der Extrakt aufgrund seiner hepatoprotektiven Wirkung klinische Verwendung in der Therapie von verschiedenen Lebererkrankungen [207-208]. Außerdem konnten aktuelle Studien anti-inflammatorische Effekte nachweisen [209-210]. Zusätzlich wurde demonstriert, dass Mariendistel, vermittelt durch die Inhibition der LDL-Oxidation sowie der Biosynthese von Cholesterin, anti-atherosklerotische Wirkung aufweist [211-213]. Antioxidative Effekte der Mariendistel konnten ebenfalls dargestellt werden [214].

Die vorliegende Arbeit stellte dar, dass der Extrakt der Mariendistel die mRNA-Expression von eNOS erhöht und die von NOX4 verringert (*Abbildung 35*). Im Gegensatz zu der Veränderung von eNOS konnte bei der von NOX4 eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden (*Abbildung 36*). Die gesteigerte mRNA-Expression von eNOS spiegelte sich jedoch nicht in einer erhöhten Protein-Expression wider (*Abbildung 35*). Ergänzend wurde gezeigt, dass das Stoffgemisch Silymarin, auf das der Extrakt zu 80% normalisiert war, die Expression von eNOS und NOX4 im gleichen Maße beeinflusst (*Abbildung 37*).

Verschiedene Studien hatten bereits die antioxidative Wirkung von Mariendistel offengelegt. So konnten unter anderem Fehér *et al.* eine gesteigerte Aktivität von SOD in Erythrozyten und Leukozyten in Patienten mit Leberzirrhose zeigen [215]. Ergänzend dazu war es Zhao *et al.* möglich, die Aktivierung von Nrf2 im Lungengewebe von Ratten durch Mariendistel nachzuweisen. Damit einhergehend war die erhöhte Aktivität von SOD, CAT sowie GPX gezeigt worden [216]. Außerdem konnten in Studien an Endothelzellen, bei denen durch Wasserstoffperoxid oxidativer Stress induziert wurde, eine erhöhte NO-Produktion durch Mariendistel gemessen werden [217]. Des Weiteren zeigten Untersuchungen in einem Diabetes-Tiermodell mit Mäusen, dass Mariendistel die ADMA-Konzentration verringert sowie die Endothel-abhängige Vasodilatation verbessert [218].

4.2.9 Rosmarin

Rosmarin ist eines der meist genutzten pflanzlichen Produkte, welches als Aromastoff und Antioxidans in der Konservierung von Essen und Kosmetik eingesetzt wird [219-220]. Verwendung findet es in der traditionellen als auch in der modernen Medizin zur Behandlung von Bluthochdruck und der infolge von Diabetes auftretenden Komplikationen [221-223]. In

der Volksmedizin wird es außerdem beispielsweise als Mittel gegen Schmerzen, Krämpfe und Rheuma benutzt [224]. Bisherige Studien konnten weiterhin hepatoprotektive, hyperglykämische, antibakterielle sowie lipidsenkende, blutdrucksenkende, antioxidative und anti-inflammatorische Wirkungen belegen [225-230].

Die Daten dieser Arbeit legen dar, dass Rosmarin die mRNA-Expression von eNOS sowie von den antioxidativen Enzymen SOD1, SOD2 und CAT steigert (*Abbildung 38a*). Außer auf die Erhöhung von SOD1 konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte demonstriert werden (*Abbildung 39*). Obwohl die mRNA-Expressionen von eNOS und SOD1 deutlich erhöht waren, konnte keine Veränderung der Protein-Expression der beiden Enzyme detektiert werden (*Abbildung 38b*). Da der Extrakt auf 10% Carnosolsäure normalisiert war, wurde untersucht, ob die isolierte Einzelsubstanz vergleichbare Effekte aufweist. Jedoch hatte die im Extrakt enthaltene Konzentration von Carnosolsäure (15,0 µM) keinen nachweisbaren Effekt. Der Einsatz der fast 7fach höheren Konzentration (100 µM) senkte im Gegensatz zu dem gesamten Extrakt sogar die Expression von SOD1 sowie von CAT (*Abbildung 40*). Dementsprechend kann Carnosolsäure zumindest nicht allein für die Wirkungen des Extraktes verantwortlich sein.

Die Arbeit von Satoh *et al.* hingegen konnte darlegen, dass Carnosolsäure den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert, welcher die Expression der antioxidativen Enzyme reguliert. Dies wurde an Neuronen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert [231]. Zusätzlich konnten Poeckel *et al.* in Leukozyten zeigen, dass Carnosolsäure die Produktion von ROS verringert [232]. Weitere bedeutsame Inhaltsstoffe des Rosmarin-Extraktes neben der bereits beschriebenen Carnosolsäure sind die Glycoside von Apigenin und Luteolin sowie das Polyphenol Rosmarinsäure. Studien haben nachgewiesen, dass Luteolin in HAECs (*engl. Primary Human Aortic Endothelial Cells*) konzentrationsabhängig sowohl die Phosphorylierung von eNOS als auch die NO-Produktion steigert. Zusätzlich konnten Si *et al.* eine gesteigerte Phosphorylierung von eNOS in isolierten Ratten-Aorten nachweisen. Diese Aktivierung spiegelte sich in der unverzüglichen und konzentrationsabhängigen Vasodilatation der isolierten Aorten-Ringe durch Luteolin wider [233]. Außerdem haben Chen *et al.* in BCAECs dargelegt, dass Apigenin die NO-Produktion steigert. Im Detail wiesen sie nach, dass diese Veränderung aus der erhöhten Phosphorylierung von eNOS resultierte, denn Apigenin hatte keinen Einfluss auf die Protein-Konzentration oder die Transkription von eNOS [234]. Ergänzend dazu konnten Qin *et al.* zeigen, dass Apigenin in HUVECs sowohl die Stress-induzierte Steigerung der ROS-Produktion verringert als auch die verminderte NO-Produktion erhöht. Abschließend demonstrierten sie in isolierten Aorten, dass Apigenin ebenso wie Luteolin die

Phosphorylierung von eNOS, die NO-Produktion sowie die Endothel-vermittelte Relaxation verbessert [235].

4.2.10 Weißdorn

Weißdorn-Extrakt wird zur Behandlung von Herzinsuffizienz in den Anfangsstadien verwendet. Dabei steigert es die Kontraktionskraft des Herzens (positiv inotroper Effekt) und erweitert die Gefäße, insbesondere Herzkranzgefäße, wodurch die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels verbessert wird. Studien belegen neben der positiven Wirkung auf die Gefäßfunktion auch blutdrucksenkende, anti-inflammatorische, gastroprotektive, antibakterielle sowie antioxidative Effekte [236-238].

Bei dieser Arbeit waren die Ergebnisse der Inkubation mit den Extrakten der verschiedenen Pflanzenbestandteile des Weißdorns sehr unterschiedlich. Der Extrakt der Blätter erhöhte die mRNA-Expression von eNOS, CAT sowie GPX1 und verringerte gleichzeitig die von DDAH1 (*Abbildung 41a*). Die Veränderungen von eNOS und GPX1 waren konzentrationsabhängig (*Abbildung 42*). Ein Einfluss auf die Protein-Expression konnte hingegen nicht detektiert werden (*Abbildung 41b*). Im Gegensatz dazu zeigte der Extrakt der Blüten und Blätter keinen Effekt auf die mRNA-Expression (*Abbildung 43a*). Dafür wurde die Protein-Expression von SOD1 konzentrationsabhängig erhöht (*Abbildung 44*).

Die Einflüsse der beiden Extrakte des Weißdorns unterschieden sich sehr deutlich von einander, obwohl bei einem nur die Blätter und bei dem anderen neben den Blüten ebenfalls die Blätter zur Gewinnung des Extraktes benutzt worden sind. Da beide Extrakte mit der gleichen Konzentration eingesetzt wurden, weist diese Diskrepanz darauf hin, dass die Extrakte eine unterschiedliche Zusammensetzung von sekundären Pflanzenstoffen hatten. Diese kann zum einen daraus resultieren, dass unterschiedliche Arten des Weißdorns benutzt worden waren. Zum anderen spielt die Extraktion eine elementare Rolle. Der Extrakt der Blüten und Blätter wurde durch Perkolation mit Wasser nach den Vorschriften des Europäischen Arzneibuches gewonnen. Dabei entsprach das Droge-Extrakt-Verhältnis 4-5:1. Demgegenüber wurde beim Extrakt der Blätter ebenfalls Wasser als Auszugsmittel verwendet, jedoch wurden keine Aussagen über die Extraktionsart und das Droge-Extrakt-Verhältnis getätigt. Es wurde lediglich auf die Verwendung eines Niedrigtemperatur-Prozesses hingewiesen.

Auf die Experimente mit den Einzelsubstanzen wurde verzichtet, da die entscheidenden sekundären Pflanzenstoffe des Weißdorns bereits nachhaltig wissenschaftlich untersucht wurden. Der Extrakt der Blätter war auf 5% Flavonoide normalisiert. Darunter zählten unter anderem Rutin, Hyperosid und Vitexin. Andere wichtige Inhaltsstoffe sind das Triterpenoid

Ursolsäure sowie das Phytosterol Daucosterol. Der Extrakt der Blüten und Blätter hingegen wurde direkt auf 1,8% Vitexin und Hyperosid normalisiert.

Ugusman *et al.* wiesen sehr umfangreich die Wirkung von Rutin in HUVECs nach. Sie demonstrierten die Steigerung von eNOS hinsichtlich mRNA-Expression, Protein-Konzentration und dessen Aktivität. Zusätzlich konnte eine erhöhte NO-Konzentration gemessen werden. Allerdings war die eingesetzte Konzentration von Rutin (300 μM) vergleichsweise hoch [98]. Rutin und Hyperosid sind Glycoside von Quercetin. Für Quercetin selbst wurde bereits gezeigt, dass es unter anderem den Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert [239]. Zusätzlich verdeutlichten Studien eine gesteigerte Aktivität und Expression von eNOS sowie eine verminderte NOX4-Expression und ROS-Produktion [99]. Für das Flavonoid Vitexin konnten Zhu *et al.* vergleichbare Ergebnisse zur Arbeit von Ugusman *et al.* aufzeigen. In ihrer Studie erhöhte Vitexin ebenfalls die Expression und die Aktivität von eNOS sowie die Konzentration von NO in HUVECs [240]. Steinkamp-Fenske *et al.* konnten in EA.hy 926 Zellen zeigen, dass auch Ursolsäure die mRNA-Expression von eNOS steigert und die von NOX4 senkt. Außerdem wurde die ROS-Produktion verringert [241]. Da in den Extrakten für die einzelnen Substanzen keine Konzentrationen angegeben waren, konnten die in der Literatur gefundenen Ergebnisse nur schwer mit dieser Arbeit verglichen werden. Für den kompletten Extrakt der Blätter konnten Brixius *et al.* an isolierten Gefäßen von Ratten und Menschen belegen, dass er eine konzentrationsabhängige Vasodilatation induziert, welche durch den eNOS-Inhibitor L-NAME oder die Beschädigung des Endothels verhindert wurde. Zusätzlich demonstrierten sie in HCAECs (*engl. Human Coronary Artery Endothelial Cells*) eine gesteigerte eNOS-Aktivität infolge einer erhöhten Phosphorylierung von eNOS [242]. Eine verstärkte Aktivität von SOD und CAT konnten Wang *et al.* im Serum vom Stress-induzierten Ratten darlegen [243].

4.2.11 Coenzym Q1

Chemisch betrachtet handelt es sich bei Coenzym Q1 um Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH). Seine physiologischen Aktivitäten lassen sich in vier Gruppen unterteilen. Erstens ist es bei vielen Redox-Reaktionen als Coenzym beteiligt. Zweitens werden infolge der Oxidation von NADH zu NAD^+ durch NADPH-Oxidase ROS produziert, allerdings ist unter physiologischen Bedingungen die Konzentration von NAD^+ 700fach höher als die von NADH. Drittens wird NAD^+ durch viele NAD^+ -verbrauchende Enzyme wie PARPs (*engl. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase*) zu anderen Nicotinamid-haltigen Substanzen umgewandelt. Viertens kann NAD^+ durch die NAD-Kinase zu NADP^+ umgewandelt werden. Verschiedene Studien konnten positive Veränderungen durch Coenzym Q1 bei der Behandlung vom chronischen Fatigue-Syndrom, Parkinson sowie Alzheimer darlegen, welche die Autoren auf

eine gesteigerte ATP-Produktion zurückführten [244-247]. Außerdem konnten Bushehri *et al.* in hypertensiven Ratten eine blutdrucksenkende Wirkung sowie geringere Konzentrationen von Cholesterin und LDL nachweisen [248].

Diese Arbeit demonstrierte, dass Coenzym Q1 lediglich die Protein-Expression von SOD1 konzentrationsabhängig erhöht (*Abbildung 46*). Durak *et al.* konnten in einer Studie, in der Ratten NADH supplementiert bekamen, nur eine gesteigerte Aktivität von GPX in der Niere zeigen. Dabei untersuchten sie neben der Niere auch das Herz und die Leber. In allen drei Geweben hatte sich die Aktivität der antioxidativen Enzyme SOD und CAT nicht verändert [249]. Da das NADH in phosphorylierter Form ein Co-Faktor von eNOS darstellt, sind positive Effekte eventuell nur unter induziertem Stress nachzuweisen. Darauf weist zumindest die Studie von Liu *et al.* hin, denn in dieser konnten Leberzellen durch NADH bei induziertem Stress länger überleben und die ROS-Produktion wurde gesenkt [250]. Außerdem belegten Vrecko *et al.* in PCs (*engl. Rat Phaeochromocytoma Cells*), dass NADH die Aktivität der Quinonoid-Dihydropteridin-Reduktase steigert und somit mehr inaktives Dihydrobiopterin zu aktivem Tetrahydrobiopterin umgewandelt wird [251]. Da Tetrahydrobiopterin einen elementaren Co-Faktor für die eNOS darstellt und dessen verminderte Bioverfügbarkeit aktiv zur Entkopplung der eNOS und somit zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion beiträgt, könnte dieser Mechanismus auch für die Beeinflussung des NO-Redox-Gleichgewichtes durch die Verhinderung einer endothelialen Dyfunktion von Bedeutung sein.

4.2.12 Coenzym Q10

Coenzym Q10 (auch Ubichinon-10 genannt) spielt eine entscheidende Rolle als Antioxidans im kardiovaskulären System. Im Jahre 1940 konnte das Molekül erstmalig identifiziert werden. Crane *et al.* demonstrierten 1957, dass Coenzym Q10 ein essentieller Bestandteil der Atmungskette ist [252]. Zum ersten Mal zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen wurde es im Jahre 1965 durch Yamamura *et al.* eingesetzt [253]. Anschließend konnten Folkers *et al.* im Myokard von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen eine verringerte Konzentration von Coenzym Q10 nachweisen [254].

Die vorliegende Arbeit weist eine Steigerung der Protein-Expression von eNOS durch Coenzym Q10 nach (*Abbildung 47b*). Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht dargelegt werden (*Abbildung 48*). Eine Erhöhung der Protein-Expression von eNOS wurde auch durch die Studie von Tsai *et al.* in HUVECs demonstriert, bei der durch oxidiertes LDL Stress induziert wurde. Außerdem konnten sie darlegen, dass sich weitere Stress-induzierte Effekte durch Coenzym Q10 konzentrationsabhängig verbesserten. Dazu zählten die

Aktivität von SOD und CAT sowie die ROS-Produktion. Zusätzlich wiesen sie nach, dass bei der Inkubation mit nicht-oxidiertem, also normalem LDL, keine gesteigerte ROS-Produktion auftrat [255]. Die erhöhten Aktivitäten von SOD, CAT und GPX legten auch Li *et al.* in Stress-induzierten PCs dar. Sie benutzten Wasserstoffperoxid als oxidativen Stressor. Dabei konnten sie eine Aktivierung von Nrf2 durch dessen vermehrte Lokalisation im Nukleus aufzeigen. Weiterhin demonstrierten sie, dass diese Effekte von Coenzym Q10 lediglich bei Stress-induzierten Zellen auftraten [256]. Eine weitere Studie von Tsai *et al.* mit EPCs (*engl. Endothelial Progenitor Cell*) konnte ebenfalls die protektive Wirkung von Coenzym Q10 zeigen. In diesem Fall verbesserten sich die Glukose-induzierten Veränderungen hinsichtlich der NO-Konzentration sowie der ROS-Produktion. In dieser Studie demonstrierten sie, dass Coenzym Q10 in Folge einer gesteigerten Phosphorylierung von AMPK (*engl. AMP-Activated Protein Kinase*) die Phosphorylierung und somit die Aktivität von eNOS erhöht [257]. In einer dritten Studie induzierten Tsai *et al.* Stress in HUVECs durch oxidiertes LDL. Erneut verringerte sich die ROS-Produktion konzentrationsabhängig durch Coenzym Q10. Demgegenüber konnten sie darlegen, dass dieser Effekt nur bei gestressten Zellen auftrat. Außerdem war es ihnen in dieser Studie möglich zu zeigen, dass für die Stress-induzierte Produktionssteigerung von ROS hauptsächlich NOX4 verantwortlich war. Durch eine verstärkte Dephosphorylierung und somit Inaktivierung von AMPK α und der daraus resultierenden erhöhte Phosphorylierung von PKC (*Protein-Kinase C*) wurde die Aktivität von NOX4 durch die vermehrte Lokalisation in der Membran gesteigert. Dieser Mechanismus wurde durch Coenzym Q10 unterbrochen. Die Studie legte dar, dass durch Coenzym Q10 weniger AMPK α dephosphoryliert wurde und infolgedessen die Konzentration von phosphoryliertem PKC sank. Außerdem führte dies dazu, dass das Verhältnis der Lokalisation von NOX4 zwischen Membran und Cytosol wieder deutlich in Richtung der inaktivierten Form im Cytosol verschoben wurde. Abschließend konnten sie demonstrieren, dass durch den Einsatz von Coenzym Q10 und der damit einhergehenden reduzierten Dephosphorylierung von AMPK α die Konzentrationen von phosphoryliertem Akt und der daraus resultierenden phosphorylierter eNOS stiegen. Durch die erhöhte Phosphorylierung von eNOS verstärkte sich außerdem ihre Aktivität [258]. Neben den Studien hinsichtlich der Effekte auf eNOS und die antioxidativen Enzyme zeigten Hosseinzadeh-Attar *et al.*, dass sich bei Patienten mit Diabetes durch eine Supplementation mit Coenzym Q10 die Blutkonzentration von ADMA verringert. Außerdem stieg die Produktion von NO [259]. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Özdoğan *et al.* in ihrer Studie mit Ratten, die bei einem induzierten metabolischen Syndrom ebenfalls eine Supplementation mit Coenzym Q10 bekamen [260].

4.3 Kombinationen

4.3.1 Allgemein

Nachdem alle Extrakte einzeln hinsichtlich ihres Einflusses auf die Expression von mRNA und Proteinen der am NO-Redox-Gleichgewicht beteiligten Enzyme untersucht worden waren, wurde in dieser Arbeit Kombinationen der potentesten Extrakte zusammengestellt. Verschiedene Studien hatten bereits gezeigt, dass sich sekundäre Pflanzenstoffe gegenseitig positiv beeinflussen und es somit zu synergistischen Effekten kommt. Ein Beispiel dafür sind die Polyphenole Resveratrol und Quercetin. Trotz einer effektiven Resorption hat Resveratrol eine sehr geringe Bioverfügbarkeit. Bereits nach 30 Minuten ist freies Resveratrol nur noch in Spuren vorhanden, große Teile werden glukuronidiert oder konjugiert [261]. Die Frage, ob nur freies Resveratrol oder ebenso dessen Metabolite biologisch relevante Wirksamkeiten aufweisen, ist bisher noch nicht geklärt und wird kontrovers diskutiert. Neben dieser Diskussion konnten Mertens-Talcott *et al.* zeigen, dass unter anderem Quercetin die Metabolisierung von Resveratrol inhibiert [262]. Dieser Mechanismus könnte die Frage beantworten, warum bereits geringe Mengen von Resveratrol, die über die Nahrung (wie z.B. Wein) aufgenommen werden, positive gesundheitliche Wirkungen zeigen. Eine andere Studie konnte demonstrieren, dass die Bioverfügbarkeit von Curcumin bei gleichzeitiger Gabe des im Schwarzen Pfeffer enthaltenen sekundären Pflanzenstoffs Piperin um das 20fache erhöht wird [263].

In dieser Arbeit wurden 4 Kombinationen zusammengestellt. Kombination 1 enthielt die Extrakte von Artischocke, Japanischem Staudenknöterich, Kleinem Fettblatt, Kurkuma, Mariendistel, Rosmarin, der Blätter des Weißdorns sowie Coenzym Q10. Bei Kombination 2 bzw. 3 wurde zusätzlich der Extrakt des Grünen Tees respektive der des Knoblauchs (Pulver) zur Kombination 1 hinzugefügt. Kombination 4 bildete die Zugabe von beiden Extrakten zur Kombination 1 (*Tabelle 21*).

4.3.2 mRNA-Expression

Bei der Expression der mRNA (*Abbildung 50 und Abbildung 51*) zeigte Kombination 1 die besten Ergebnisse. Bis auf DDAH1, SOD1 sowie GPX1 wurden alle Enzyme positiv beeinflusst. Interessanterweise hatte die Zugabe von Knoblauch (Kombination 3) keine weiteren Auswirkungen. Knoblauch wurde aufgrund seiner Verringerung der

mRNA-Expression von NOX4 gewählt. Eventuell konnten keine weiteren senkenden Effekte detektiert werden, weil die Expression bereits durch Kombination 1 stark vermindert wurde.

Kombination 1 und 2 sowie 3 und 4 unterschieden sich jeweils durch die Zugabe von Grünem Tee-Extrakt. Dabei war festzuhalten, dass bei den Grünen Tee-enthaltenden Kombinationen die mRNA-Expressionen grundsätzlich geringer ausfielen gegenüber ihren jeweiligen Vergleichskombinationen. Dies war bei der Expression von NOX4 bezüglich des NO-Redox-Gleichgewichtes positiv. Bei den anderen Enzymen jedoch konnten die vorher detektierten Veränderungen entweder nicht mehr nachgewiesen werden oder es kam sogar, wie bei Kombination 2 für DDAH1 sowie SOD1, zu einer signifikanten Verringerung der Expression im Vergleich zur Kontrolle. Dies war bei den Experimenten mit den einzelnen Extrakten noch nicht absehbar. Einer grundsätzlichen negativen Beeinflussung des Grünen Tee-Extraktes hinsichtlich der mRNA-Expression widerspricht, dass in den Einzelversuchen eine Steigerung von CAT um fast das 2,5fache detektiert werden konnte (*Abbildung 17a*). Da das Potential des Grünen Tee-Extraktes nicht sehr hoch bewertet wurde, diente er von vornherein nur als Ergänzung.

4.3.3 Protein-Expression

Hinsichtlich der Protein-Expression (*Abbildung 52*) konnten alle Kombinationen die eNOS steigern. Dabei waren alle Effekte auf einem vergleichbaren, sehr niedrigen Niveau. Die Expression von SOD1 hingegen erhöhte lediglich Kombination 1 signifikant. Die Veränderungen der Protein-Expressionen konnten die in den Vorversuchen aufgestellten Erwartungen nicht erfüllen, weshalb das Augenmerk umso mehr auf dem Einfluss der Kombinationen auf der funktionellen Ebene lag.

4.3.4 NO-Produktion

Die Steigerung der NO-Produktion zur Stabilisierung des NO-Redox-Gleichgewichtes war ein zentrales Ziel dieser Arbeit. Da NO sehr instabil und kurzlebig ist, wurde auf die Messung des wesentlich beständigeren Nitrits ausgewichen. Um etwaige Interaktionen von Bestandteilen der Kombinationen bzw. der Extrakte mit den zur Messung verwendeten Reagenzien zu vermeiden, wurden die Zellen nach dem Ende der Inkubationszeit gründlich mit HBSS gewaschen.

Um im Anschluss messbare Nitrit-Werte zu erhalten, wurde die Calcium-abhängige NO-Produktion von eNOS durch den herbeigeführten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration forciert. Dafür wurden Bradykinin und ein Calcium-Ionophor verwendet. Während Bradykinin die Erhöhung der Calcium-Konzentration durch eine Rezeptor-gebundene Öffnung der Calcium-Kanäle vermittelte, erzielt der Calcium-Ionophor dies durch seine Eigenschaft als mobiler Ionen-Carrier. In Vorversuchen erfolgte die Bestimmung der optimalen Konzentrationen von Bradykinin (*Abbildung 54*) und dem Calcium-Ionophor (*Abbildung 56*). Dazu wurde mit Resveratrol, einer bekannten NO-steigernden Substanz, überprüft, ob die NO-Produktion durch die beiden Stimuli nur so stark forciert wurde, dass Substanz-abhängige Effekte nicht verloren gingen.

Bei den Arginin-unabhängigen Experimenten konnte für beide Stimuli und alle Kombinationen jeweils bereits nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der NO-Produktion nachgewiesen werden. Im Verlauf der Zeit wurden die Effekte zudem bei allen Kombinationen größer. Dabei waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationen bei den jeweiligen Stimuli sehr gering. Bei Bradykinin war lediglich der Effekt von Kombination 1 nach 24 sowie nach 72 Stunden im Vergleich zu den anderen Kombinationen etwas verstärkt (*Abbildung 55*). Demgegenüber war beim Calcium-Ionophor der Einfluss von Kombination 4 nach 48 Stunden etwas höher, der nach 72 Stunden dafür etwas geringer als bei den anderen Kombinationen (*Abbildung 57*).

Da L-Arginin nicht nur Substrat sondern auch Induktor für eine erhöhte eNOS-Expression darstellt [264], wurde in einem weiterführenden Experiment untersucht, ob die zuvor beobachteten Effekte durch die Inkubation mit L-Arginin überlagert wurden. Dafür wurden die Zellen nicht mit Kulturmedium sondern mit HBSS und den darin gelösten Kombinationen inkubiert. Ein Vorversuch zeigte, dass die Zellen die Inkubation mit der Salzlösung keine 72 Stunden überlebten. Daher konnte diese Versuchsreihe lediglich Daten für die Inkubationszeiten von 24 sowie 48 Stunden produzieren. In einem weiteren Vorversuch wurde für L-Arginin die optimale Konzentration bestimmt. Dabei musste eine Steigerung der

NO-Produktion durch L-Arginin detektierbar sein, gleichzeitig aber noch Potential zur Erhöhung durch die Kombinationen bieten. Zur Etablierung diente auch in diesem Fall Resveratrol und die Forcierung wurde erneut sowohl mit Bradykinin als auch mit dem Calcium-Ionophor durchgeführt. Hierbei wurde für L-Arginin die Konzentration 400 μM als optimale Bedingung für beide Stimuli bestimmt. Dies entsprach der L-Arginin-Konzentration des in der vorherigen Versuchsreihe verwendeten Kulturmediums. Anschließend wurden die Effekte der Kombination auf die NO-Produktion bei Ab- und Anwesenheit von L-Arginin für die Inkubationszeiten 24 und 48 Stunden untersucht.

Dabei stellte sich für beide Stimuli und die jeweiligen Inkubationszeiten heraus, dass die NO-Produktion durch L-Arginin und die alleinige Inkubation mit den Kombinationen im Vergleich zur Kontrolle gesteigert werden konnte. Außerdem unterschieden sich die Effekte der Kombinationen bei Anwesenheit von L-Arginin jeweils gegenüber den Veränderungen der Einzelgabe von L-Arginin als auch gegenüber der Inkubation mit der entsprechenden Kombination bei Abwesenheit von L-Arginin. Dabei waren die Unterschiede der Einflüsse der verschiedenen Kombinationen erneut sehr gering. Lediglich bei der Forcierung durch Bradykinin war der Effekt von Kombination 1 bei 24 Stunden etwas höher als bei den anderen. Demgegenüber war die Steigerung durch Kombination 3 nach 48 Stunden etwas geringer. Klare Tendenzen für oder gegen eine Kombination konnten ebenso bei der Stimulierung durch Calcium-Ionophor nicht beobachtet werden. Während nach 24 Stunden der Effekt von Kombination 3 noch höher als bei den anderen ausfiel, war der nach 48 Stunden wiederum geringer. Auffällig dagegen war, dass bei der Stimulierung durch Bradykinin die Steigerung der NO-Produktion von allen Faktoren nach 48 Stunden höher war als der Effekt nach 24 Stunden. Demgegenüber veränderten sich die Einflüsse der unterschiedlichen Faktoren durch die Forcierung durch den Calcium-Ionophor von 24 zu 48 Stunden kaum. Bei Kombination 3 und 4 verringerte sich sogar der Effekt bei der Inkubation mit L-Arginin im Verlauf der Zeit. Dies kann allerdings zum einen aufgrund der dreifachen Stimulierung (Kombination, L-Arginin und Calcium-Ionophor) der Zellen und zum anderen den nicht mehr ganz optimalen Bedingungen (Absterben bei 72 Stunden) geschuldet sein.

Bei der NO-Produktion war unabhängig zum Einsatz von L-Arginin und den beiden Stimuli zu beobachten, dass sich die Effekte der Kombinationen auf die NO-Konzentration im Verlauf der Zeit verstärkten. Bei einigen Kombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten dargestellt werden, wodurch eine eindeutige Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden konnte. Dies kann ein Anzeichen dafür sein, dass trotz lediglich minimal gesteigerter Protein-Expression von eNOS eine relevante Erhöhung erzielt wurde.

4.3.5 ROS-Abbau

Neben der Produktion von NO war eine gesteigerte Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber oxidativen Stressoren ein wichtiges Ziel dieser Arbeit. Dafür wurden durch DMNQ intrazellulär bzw. durch eine Mischung von Xanthin und Xanthin-Oxidase extrazellulär Radikale produziert. Zur Detektion der vorhandenen ROS wurde das Chemilumineszenz-Reagenz Luminol (intrazellulär) respektive Lucigenin (extrazellulär) verwendet. In einem Vorversuch wurden durch entgegengesetzte Verwendung der Chemilumineszenz-Reagenzien keine nachweisbaren Signale aufgenommen, sodass Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden konnten. Des Weiteren wurden die Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen Extrakten gründlich mit HBSS gewaschen um etwaige direkte antioxidative Fähigkeiten einzelner Bestandteile auszuschließen.

Bei den intrazellulären ROS wurde in Vorversuchen die optimale DMNQ-Konzentration (3 μM) bestimmt (*Abbildung 66*) und mit Resveratrol überprüft, ob Veränderungen nachgewiesen werden konnten (*Abbildung 67*). Anschließend wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Kombinationen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert (*Abbildung 68*). Dabei zeigte sich für Kombination 1 eine signifikante Reduzierung ab 48 Stunden. Im Gegensatz dazu erbrachte das Hinzufügen des Grünen Tee-Extraktes ebenso eine Verringerung der nachgewiesenen ROS nach 48 Stunden, jedoch stieg bei 24 Stunden die ROS-Konzentration an. Die Ergänzung der Kombination 1 durch Knoblauch (Kombination 3) erbrachte bereits nach 24 Stunden eine signifikante Verminderung der ROS. Während der Effekt nach 48 Stunden etwas stärker als der von Kombination 1 war, wurden die ROS nach 72 Stunden bei beiden vergleichbar stark abgebaut. Interessanterweise glichen sich bei Kombination 4 die negativen Auswirkungen vom Zusatz des Grünen Tee-Extraktes mit den positiven Effekten von Knoblauch fast aus. Im Detail waren die Effekte von Kombination 4 jedoch grundsätzlich im Vergleich zur Kombination 1 etwas stärker, was darauf hinweist, dass der Einfluss von Knoblauch dem vom Grünen Tee überwiegt.

Bei der Produktion der extrazellulären ROS wurden ebenfalls in Vorversuchen für die Mischung aus Xanthin (50 μM) und Xanthin-Oxidase (50 U/ μL) die optimalen Konzentrationen bestimmt sowie erneut mit Resveratrol überprüft, ob Veränderungen nachgewiesen werden konnten (*Abbildung 69*). Auch in diesem Fall wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Kombinationen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert (*Abbildung 70*). Für den Abbau der extrazellulären ROS konnte für Kombination 1 bereits ab dem Zeitpunkt 24 Stunden eine Veränderung detektiert werden. Erneut zeigte der Zusatz des Grünen Tees eine negative Auswirkung, denn bei Kombination 2 war die Reduzierung im Vergleich zur Kombination 1 erst nach 48 Stunden signifikant. Einen deutlich optimierten Effekt ergab die

Zugabe von Knoblauch (Kombination 3). Bei dieser Kombination war die Verminderung der ROS bereits nach 24 Stunden im Vergleich zu den anderen Kombinationen am stärksten, änderte sich jedoch im weiteren Verlauf nicht mehr. Bei Kombination 4 überwogen wie bei dem Abbau der intrazellulären ROS die positiven Einflüsse des Knoblauchs gegenüber den negativen des Grünen Tees. Hier konnte ebenfalls bereits ab 24 Stunden eine stärkere Reduzierung detektiert werden.

Beim Abbau der intrazellulären und extrazellulären ROS war zu beobachten, dass sich dieser im Verlauf der Zeit verstärkt. Bei einigen Kombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Inkubationszeiten dargestellt werden, wodurch eine eindeutige Zeitabhängigkeit nachgewiesen wurde. Dies kann ein Anzeichen dafür sein, dass auch wenn die Protein-Expression für die antioxidativen Enzyme entweder keine Veränderung zeigte oder nicht untersucht werden konnte, die Extrakte doch eine relevante Erhöhung hinsichtlich des ROS-Abbaus aufwiesen. Außerdem könnten die katalytischen Aktivitäten der am ROS-Abbau beteiligten Enzyme durch die Kombinationen verstärkt worden sein.

4.3.6 Schlussfolgerung

Auf der Basis der erhobenen Daten der durchgeführten Experimente wird abschließend versucht, die Kombinationen hinsichtlich ihres Wirkungsprofils auf das NO-Redox-Gleichgewicht zu beurteilen:

Auf der Ebene der mRNA-Expression zeigte Kombination 1 die besten Ergebnisse. Deutlich zu erkennen war außerdem, dass der Zusatz von Grünem Tee die Effekte verringerte. Der Zusatz von Knoblauch hingegen hatte keine weiteren Veränderungen zur Folge.

Bei der Expression der Proteine waren aufgrund der sehr geringen Erhöhungen kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Kombinationen festzustellen. Lediglich Kombination 1 steigerte die Expression sowohl von eNOS als auch von SOD1.

Die NO-Produktion hingegen konnten alle Kombinationen deutlich verstärken. Diese Effekte waren unabhängig vom Einsatz von L-Arginin und den beiden Stimuli, Bradykinin und Calcium-Ionophor. Auch auf dieser Ebene waren die Kombinationen kaum zu unterscheiden.

Die größten Unterschiede wurden beim Abbau der ROS festgestellt. Dort zeigte sich, dass zumindest für diesen Versuchsaufbau der Einsatz vom Extrakt des Grünen Tees die Kombination 1 nicht verbesserte. Demgegenüber konnte deutlich demonstriert werden, dass die Zugabe des pulverisierten Extraktes vom Knoblauch das Wirkungsprofil der Kombination 1 nochmals nachweislich verbesserte.

Die Grundkombination (Kombination 1) bildeten die Extrakte der Artischocke, des Japanischen Staudenknöterichs, des Kleinen Fettblattes, von Kurkuma, der Mariendistel, dem Rosmarin, der Blätter des Weißdorns und Coenzym Q10.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat die Erkenntnis erbracht, dass es *in vitro* möglich ist, die im NO-Redox-Gleichgewicht beteiligten Enzyme durch Pflanzenextrakte positiv zu beeinflussen. Die Schwerpunkte lagen dabei auf der Untersuchung der Effekte auf der Ebene der Expression von mRNA und Proteinen. Hierauf aufbauend gibt es verschiedene Ansatzpunkte für eine weiterführende Forschung. Beispielsweise könnte die Fokussierung auf einen der Einzelextrakte zusätzliche Erkenntnisse über dessen Zusammensetzung, Wirkung und des verursachenden sekundären Pflanzenstoffes erbringen. Außerdem ist eine genauere Betrachtung der möglichen Wirkmechanismen, wie einer veränderten Promotoraktivität, sinnvoll. Zusätzlich würde die Analyse der Auswirkungen auf die Enzymaktivität von eNOS und SOD1 den Datensatz deutlich vervollständigen.

Die Zellversuche zeigten, dass eine Kombination der Extrakte ein besseres Wirkungsprofil liefert, als die einzelnen Extrakte. Allerdings wurden noch nicht alle Enzyme optimal angesprochen. Aufgrund dieses Optimierungspotentials der besten Kombination dieser Arbeit, sollten zusätzliche Pflanzenextrakte getestet werden. Durch weitere relevante Extrakte könnte die Kombination und somit das Wirkungsspektrum erweitert werden. Gegebenenfalls könnten zusätzliche Extrakte auch bestehende Extrakte aus der Kombination ersetzen bzw. zu einer anderen Zusammensetzung der jeweiligen Konzentrationen führen.

Es sollte angestrebt werden, die erworbenen Erkenntnisse mittels eines weiteren Zellstammes zu verfestigen. Die humanen, primären Zelllinien HUVEC (*engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) und HDMEC (*engl. Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*) kämen dafür beispielsweise infrage. So wäre es möglich mit gefestigten Daten einen Tierversuch durchzuführen. Dessen Ziel sollte es sein, zu zeigen, ob sich die gesteigerte NO-Produktion sowie die erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativen Stressoren auch *in vivo* nachweisen lässt. Ergänzend dazu wäre zu erforschen, ob sich der Einsatz der Kombination von pflanzlichen Extrakten auch bei bereits erkrankten Zuständen positiv auswirkt. Durch einen Tierversuch könnten zusätzliche Erkenntnisse hinsichtlich der Metabolisierung und Bioverfügbarkeit von den Pflanzenextrakten und den enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion ist eine entscheidende Vorstufe der Atherosklerose und resultiert aus der verringerten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). Neben der gefäßerweiternden Wirkung zählen die Hemmung der Thrombozytenaggregation und die Inhibition der Adhäsion von Monozyten und Leukozyten zu den physiologischen Eigenschaften von NO. Durch die Interaktion von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nimmt es eine wichtige Rolle im Schutzmechanismus des Körpers gegen oxidativen Stress ein. Dieser tritt ein, wenn die Balance zwischen oxidativen Substanzen gegenüber den antioxidativen Abwehrmechanismen zugunsten der Oxidantien verschoben ist. Verschiedene Pflanzenextrakte und sekundäre Pflanzenstoffe werden mit antioxidativen Wirkungen sowie verbessernden Effekten auf Herz-Kreislauferkrankungen in Verbindung gebracht.

Diese Arbeit konnte anhand von Experimenten an kultivierten Endothelzellen demonstrieren, dass die in dem NO-Redox-Gleichgewicht involvierten Enzyme mittels pflanzlicher Extrakte beeinflusst werden können. Viele der Extrakte zeigten Auswirkungen auf die Expression der mRNA und der Proteine mehrerer Enzyme. Allerdings waren nicht alle diese Veränderungen optimal hinsichtlich einer Verschiebung des NO-Redox-Gleichgewichtes zugunsten der antioxidativen Seite. Es konnte offengelegt werden, dass die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig sind, jedoch in den meisten Fällen nicht einem einzelnen im Extrakt enthaltenen sekundären Pflanzenstoff zuzuschreiben waren. Dies unterstützt die These, dass die gesundheitlichen Wirkungen der Extrakte auf den synergistischen Effekten mehrerer sekundärer Pflanzenstoffe beruhen.

Im Anschluss wurden Kombinationen aus den potentesten Extrakten zusammengestellt. Dabei wurde demonstriert, dass gebildete Kombinationen ein verbessertes Wirkungsprofil aufwiesen. Die optimierten Veränderungen der Expressionen von mRNA und Proteinen waren nun im Sinne einer positiven Beeinflussung des NO-Redox-Gleichgewichtes. Damit waren diese Kombinationen den Einzelnextrakten überlegen. Außerdem konnte der Zellversuch belegen, dass die Kombinationen zu einer erhöhten NO-Produktion führen. Es wurde demonstriert, dass dieser Effekt unabhängig von der L-Arginin-abhängigen Erhöhung war. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die verwendeten Zellen nach der Inkubation mit den Kombinationen widerstandsfähiger gegenüber intrazellulären sowie extrazellulären oxidativen Stressoren waren.

6 Summary

Endothelial dysfunction is an initial step in the development of atherosclerosis. It results from a decreased availability of biologically active nitric oxide (NO). Beside the vasodilatory effect, the physiological properties of NO include inhibition of platelet aggregation as well as reduced monocyte and leukocyte adhesion. Due to the interaction with reactive oxygen species (ROS), NO plays an important role in the protective mechanism of the organism against oxidative stress. This occurs if the balance between oxidative and pro-oxidative substances compared to the anti oxidative defence mechanism is shifted in favour of oxidants. Several herbal extracts and secondary plant products are associated with anti-oxidative effects as well as improvement of cardiovascular diseases.

Based on experiments with endothelial cells, this work demonstrates the ability of herbal extracts to influence enzymes involved in the NO-redox-equilibrium. Various extracts displayed effects on the expression of mRNA and protein of several enzymes. Nevertheless, not all of these changes were ideal regarding a shift of the NO-redox-equilibrium in favour of the anti-oxidative side. Although disclosing the concentration-dependency of the effects, in most cases it was not possible to attribute the effect to a single secondary plant compound. Accordingly, the results of this study strengthen the hypothesis that the health effects of herbal extracts are based on synergistic impacts of various secondary plant products.

Subsequently, combinations of the most potent extracts were tested. It was shown that the combinations improved the efficacy profile on both, the NO-enhancing and the anti-oxidant effect. The expression of mRNA and protein of the enzymes tested were now shifted towards an improved NO-redox-equilibrium. Taken together, combinations were far superior to single extracts. Additionally, an increase in NO production through the combinations was revealed, independently of the enhancement resulting from the addition of L-arginine. In conclusion, after incubation the cells appeared to be more resistant against intracellular as well as extracellular oxidative stressors.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, "Gesundheit in Deutschland". 2015.
2. WHO. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics>. Zuletzt besucht am 01.12.16.
3. Tegos, T.J., et al., *The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review*. *Angiology*, 2001. **52**(2): p. 89-98.
4. Assmann, G., H. Schulte, and P. Cullen, *New and classical risk factors--the Munster heart study (PROCAM)*. *Eur J Med Res*, 1997. **2**(6): p. 237-42.
5. Schulte, H., P. Cullen, and G. Assmann, *Obesity, mortality and cardiovascular disease in the Munster Heart Study (PROCAM)*. *Atherosclerosis*, 1999. **144**(1): p. 199-209.
6. Boger, R.H., et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia*. *Circulation*, 1998. **98**(18): p. 1842-7.
7. Cooke, J.P. and V.J. Dzau, *Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases*. *Circulation*, 1997. **96**(2): p. 379-82.
8. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. *Circulation*, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
9. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial function: cardiac events*. *Circulation*, 2005. **111**(3): p. 363-8.
10. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
11. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. *Nature*, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
12. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
13. Murad, F., et al., *Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP*. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979. **11**: p. 175-204.
14. Furchgott, R.F., *Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle*. *Circ Res*, 1983. **53**(5): p. 557-73.
15. Wolf, A., et al., *Dietary L-arginine supplementation normalizes platelet aggregation in hypercholesterolemic humans*. *J Am Coll Cardiol*, 1997. **29**(3): p. 479-85.

16. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
17. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
18. Hogg, N., et al., *Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis*. FEBS Lett, 1993. **334**(2): p. 170-4.
19. Böger, R.H., et al., *Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production*. Atherosclerosis, 1995. **117**(2): p. 273-84.
20. Böger, R.H., *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor*. Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p. 824-33.
21. Palmer, R.M., et al., *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 1251-6.
22. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication*. Biochem Pharmacol, 1989. **38**(11): p. 1709-15.
23. Stuehr, D.J., *Structure-function aspects in the nitric oxide synthases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 339-59.
24. Förstermann, U., et al., *Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(9): p. 1321-32.
25. Hibbs, J.B., Jr., et al., *Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 87-94.
26. Andrew, P.J. and B. Mayer, *Enzymatic function of nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res, 1999. **43**(3): p. 521-31.
27. Moncada, S. and E.A. Higgs, *The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S193-201.
28. Vallance, P., et al., *Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure*. Lancet, 1992. **339**(8793): p. 572-5.
29. Rees, D.D., et al., *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 1990. **101**(3): p. 746-52.
30. Closs, E.I., et al., *Plasma membrane transporters for arginine*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2752S-2759S; discussion 2765S-2767S.
31. Closs, E.I., et al., *Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y+ carrier hCAT-2B*. Nitric Oxide, 1997. **1**(1): p. 65-73.
32. Böger, R.H., et al., *Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community*. Circulation, 2009. **119**(12): p. 1592-600.

33. McDermott, J.R., *Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, Ng-dimethylarginine and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit.* Biochem J, 1976. **154**(1): p. 179-84.
34. Tsikas, D., et al., *Assessment of nitric oxide synthase activity in vitro and in vivo by gas chromatography-mass spectrometry.* J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000. **742**(1): p. 143-53.
35. Leiper, J.M., et al., *Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases.* Biochem J, 1999. **343 Pt 1**: p. 209-14.
36. Tran, C.T., J.M. Leiper, and P. Vallance, *The DDAH/ADMA/NOS pathway.* Atheroscler Suppl, 2003. **4**(4): p. 33-40.
37. Tran, C.T., et al., *Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins.* Genomics, 2000. **68**(1): p. 101-5.
38. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
39. Böger, R.H., et al., *Dietary L-arginine and alpha-tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms.* Atherosclerosis, 1998. **141**(1): p. 31-43.
40. Herlitz, H., et al., *The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy.* Scand J Urol Nephrol, 1997. **31**(5): p. 477-9.
41. Usui, M., et al., *Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure.* Life Sci, 1998. **62**(26): p. 2425-30.
42. Duckelmann, C., et al., *Asymmetric dimethylarginine enhances cardiovascular risk prediction in patients with chronic heart failure.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(9): p. 2037-42.
43. Surdacki, A., et al., *Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension.* J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **33**(4): p. 652-8.
44. Goonasekera, C.D., et al., *Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents.* J Hypertens, 1997. **15**(8): p. 901-9.
45. Wolf, C., et al., *Urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a predictor of mortality risk in patients with coronary artery disease.* Int J Cardiol, 2012. **156**(3): p. 289-94.
46. Kiechl, S., et al., *Asymmetric and symmetric dimethylarginines are of similar predictive value for cardiovascular risk in the general population.* Atherosclerosis, 2009. **205**(1): p. 261-5.
47. Abbasi, F., et al., *Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus.* Am J Cardiol, 2001. **88**(10): p. 1201-3.
48. Schulz, E., et al., *Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress, and endothelial dysfunction in hypertension.* Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(6): p. 1115-26.

49. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
50. Cooke, J.P., *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(9): p. 2032-7.
51. Tanaka, M., et al., *Effect of vasoconstrictor coupling factor 6 on gene expression profile in human vascular endothelial cells: enhanced release of asymmetric dimethylarginine*. J Hypertens, 2006. **24**(3): p. 489-97.
52. Gomberg, M., *AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL*. Journal of the American chemical Society, 1900. **22**(11): p. 757-771.
53. Commoner, B., J. Townsend, and G.E. Pake, *Free radicals in biological materials*. Nature, 1954. **174**(4432): p. 689-91.
54. Gerschman, R., et al., *Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common*. Science, 1954. **119**(3097): p. 623-6.
55. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
56. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
57. Babior, B.M., R.S. Kipnes, and J.T. Curnutte, *Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent*. J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 741-4.
58. Babior, B.M., J.T. Curnutte, and R.S. Kipnes, *Biological defense mechanisms. Evidence for the participation of superoxide in bacterial killing by xanthine oxidase*. J Lab Clin Med, 1975. **85**(2): p. 235-44.
59. Spagnoli, A., et al., *Effect of insulin on hydrogen peroxide production by human polymorphonuclear leukocytes. Studies with monoclonal anti-insulin receptor antibodies, and an agonist and an inhibitor of protein kinase C*. Horm Res, 1995. **43**(6): p. 286-93.
60. Shaikhali, J., et al., *The redox-sensitive transcription factor Rap2.4a controls nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin A and other chloroplast antioxidant enzymes*. BMC Plant Biol, 2008. **8**: p. 48.
61. Amstad, P.A., G. Krupitza, and P.A. Cerutti, *Mechanism of c-fos induction by active oxygen*. Cancer Res, 1992. **52**(14): p. 3952-60.
62. Babior, B.M., *Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts)*. N Engl J Med, 1978. **298**(12): p. 659-68.
63. Murrell, G.A., M.J. Francis, and L. Bromley, *Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals*. Biochem J, 1990. **265**(3): p. 659-65.
64. Chojkier, M., et al., *Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation?* J Biol Chem, 1989. **264**(28): p. 16957-62.

65. Verma, S., et al., *Activation of iodine into a free-radical intermediate by superoxide: a physiologically significant step in the iodination of tyrosine*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(3): p. 1026-34.
66. Skulachev, V.P., *Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases*. J Alzheimers Dis, 2012. **28**(2): p. 283-9.
67. Sinclair, A.J., A.H. Barnett, and J. Lunec, *Free radicals and antioxidant systems in health and disease*. Br J Hosp Med, 1990. **43**(5): p. 334-44.
68. Ohshima, H., et al., *Damage induced by hydroxyl radicals generated in the hydration layer of gamma-irradiated frozen aqueous solution of DNA*. J Radiat Res, 1996. **37**(3): p. 199-207.
69. Lesko, S.A., R.J. Lorentzen, and P.O. Ts'o, *Role of superoxide in deoxyribonucleic acid strand scission*. Biochemistry, 1980. **19**(13): p. 3023-8.
70. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
71. Steinberg, D., *Antioxidants in the prevention of human atherosclerosis. Summary of the proceedings of a National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop: September 5-6, 1991, Bethesda, Maryland*. Circulation, 1992. **85**(6): p. 2337-44.
72. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 159-63.
73. Manning, A.S., *Reperfusion-induced arrhythmias: do free radicals play a critical role?* Free Radic Biol Med, 1988. **4**(5): p. 305-16.
74. Oberley, L.W., *Free radicals and diabetes*. Free Radic Biol Med, 1988. **5**(2): p. 113-24.
75. Breimer, L.H., *Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage*. Mol Carcinog, 1990. **3**(4): p. 188-97.
76. Feig, D.I., T.M. Reid, and L.A. Loeb, *Reactive oxygen species in tumorigenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1890s-1894s.
77. Repine, J.E., *Scientific perspectives on adult respiratory distress syndrome*. Lancet, 1992. **339**(8791): p. 466-9.
78. Kay, A.B., *Asthma and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 1991. **87**(5): p. 893-910.
79. Blake, D.R., et al., *Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint*. Lancet, 1989. **1**(8633): p. 289-93.
80. Adams, J.D., Jr. and I.N. Odunze, *Oxygen free radicals and Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 1991. **10**(2): p. 161-9.
81. Toshniwal, P.K. and E.J. Zarling, *Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis*. Neurochem Res, 1992. **17**(2): p. 205-7.
82. Slater, T.F., *Free-radical mechanisms in tissue injury*. Biochem J, 1984. **222**(1): p. 1-15.

83. Sohal, R. and R. Allen, *Relationship between oxygen metabolism, aging and development*. Advances in Free Radical Biology & Medicine, 1986. **2**(1): p. 117-160.
84. Deisseroth, A. and A.L. Dounce, *Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role*. Physiol Rev, 1970. **50**(3): p. 319-75.
85. Flohe, L., W.A. Gunzler, and H.H. Schock, *Glutathione peroxidase: a selenoenzyme*. FEBS Lett, 1973. **32**(1): p. 132-4.
86. Kondo, T., et al., *Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia*. J Neurosci, 1997. **17**(11): p. 4180-9.
87. de Haan, J.B., et al., *Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22528-36.
88. Mena, M.A., et al., *Effects of wild-type and mutated copper/zinc superoxide dismutase on neuronal survival and L-DOPA-induced toxicity in postnatal midbrain culture*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 21-33.
89. White, C.W., et al., *Transgenic mice with expression of elevated levels of copper-zinc superoxide dismutase in the lungs are resistant to pulmonary oxygen toxicity*. J Clin Invest, 1991. **87**(6): p. 2162-8.
90. Halliwell, B., *How to characterize a biological antioxidant*. Free radical research communications, 1990. **9**(1): p. 1-32.
91. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
92. Watzl, B. and C. Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 2005: Georg Thieme Verlag.
93. Dauchet, L., et al., *Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies*. J Nutr, 2006. **136**(10): p. 2588-93.
94. He, F.J., et al., *Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies*. J Hum Hypertens, 2007. **21**(9): p. 717-28.
95. Stehle, P., *Deutsche Gesellschaft für Ernährung. 12. Ernährungsbericht 2012*. European Journal of Nutrition and Food Safety, 2012. **4**: p. 2347-2564.
96. Edgell, C.J., C.C. McDonald, and J.B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3734-7.
97. Colín-González, A.L., et al., *The antioxidant mechanisms underlying the aged garlic extract-and S-allylcysteine-induced protection*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2012. **2012**.
98. Ugusman, A., et al., *Role of rutin on nitric oxide synthesis in human umbilical vein endothelial cells*. ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 169370.

99. Sanchez, M., et al., *Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens, 2006. **24**(1): p. 75-84.
100. Wallerath, T., et al., *Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2002. **106**(13): p. 1652-8.
101. Spanier, G., et al., *Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4)*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60 Suppl 4**: p. 111-6.
102. Wang, D., et al., *Isoform-specific regulation by N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase of rat serum asymmetric dimethylarginine and vascular endothelium-derived relaxing factor/NO*. Circ Res, 2007. **101**(6): p. 627-35.
103. Xu, H., et al., *Differential roles of PKCalpha and PKCepsilon in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(8): p. 1656-67.
104. Guzik, T.J., et al., *Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(2): p. 333-9.
105. Lassegue, B. and R.E. Clempus, *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(2): p. R277-97.
106. Griending, K.K., *Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system*. Heart, 2004. **90**(5): p. 491-3.
107. Guzik, T.J., et al., *Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(9): p. 1614-20.
108. Fintelmann, V., *Antidyspeptic and lipid-lowering effect of artichoke leaf extract*. Zeitschrift fur Allgemeinmed, 1996. **72**(Suppl 2): p. 3-19.
109. Marakis, G., et al., *Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study*. Phytomedicine, 2002. **9**(8): p. 694-9.
110. Holtmann, G., et al., *Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(11-12): p. 1099-105.
111. Englisch, W., et al., *Efficacy of Artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia*. Arzneimittelforschung, 2000. **50**(3): p. 260-5.
112. Saenz Rodriguez, T., D. Garcia Gimenez, and R. de la Puerta Vazquez, *Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats*. Phytomedicine, 2002. **9**(8): p. 687-93.
113. Kirchhoff, R., et al., *Increase in choleresis by means of artichoke extract*. Phytomedicine, 1994. **1**(2): p. 107-15.

114. Gebhardt, R., *Inhibition of cholesterol biosynthesis in primary cultured rat hepatocytes by artichoke (Cynara scolymus L.) extracts*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **286**(3): p. 1122-8.
115. Gebhardt, R., *Prevention of tauro lithocholate-induced hepatic bile canalicular distortions by HPLC-characterized extracts of artichoke (Cynara scolymus) leaves*. Planta Med, 2002. **68**(9): p. 776-9.
116. Brown, J.E. and C.A. Rice-Evans, *Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro*. Free Radic Res, 1998. **29**(3): p. 247-55.
117. Gebhardt, R., *Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (Cynara scolymus L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 1997. **144**(2): p. 279-86.
118. Zapolska-Downar, D., et al., *Protective properties of artichoke (Cynara scolymus) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes*. Life Sci, 2002. **71**(24): p. 2897-08.
119. Li, H., et al., *Flavonoids from artichoke (Cynara scolymus L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(3): p. 926-32.
120. Perez-Garcia, F., T. Adzet, and S. Canigueral, *Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes*. Free Radic Res, 2000. **33**(5): p. 661-5.
121. Riemersma, R.A., et al., *Tea flavonoids and cardiovascular health*. QJM, 2001. **94**(5): p. 277-82.
122. Stensvold, I., et al., *Tea consumption. relationship to cholesterol, blood pressure, and coronary and total mortality*. Prev Med, 1992. **21**(4): p. 546-53.
123. Mukamal, K.J., et al., *Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction*. Circulation, 2002. **105**(21): p. 2476-81.
124. Sano, J., et al., *Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease*. Circ J, 2004. **68**(7): p. 665-70.
125. Geleijnse, J.M., et al., *Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study*. Arch Intern Med, 1999. **159**(18): p. 2170-4.
126. Persson, I.A., et al., *Tea flavanols inhibit angiotensin-converting enzyme activity and increase nitric oxide production in human endothelial cells*. J Pharm Pharmacol, 2006. **58**(8): p. 1139-44.
127. Nakagawa, T. and T. Yokozawa, *Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(12): p. 1745-50.
128. Anter, E., et al., *Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46637-43.
129. Lorenz, M., 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**(7): p. 6190-5.

130. Nagaya, N., et al., *Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers*. Heart, 2004. **90**(12): p. 1485-6.
131. Ying, C.J., et al., *ROS-related enzyme expressions in endothelial cells regulated by tea polyphenols*. Biomed Environ Sci, 2004. **17**(1): p. 33-9.
132. Ying, C.J., et al., *Tea polyphenols regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunit expression and ameliorate angiotensin II-induced hyperpermeability in endothelial cells*. Hypertens Res, 2003. **26**(10): p. 823-8.
133. Widlansky, M.E., et al., *Acute EGCG supplementation reverses endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Nutr, 2007. **26**(2): p. 95-102.
134. Loke, W.M., et al., *Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 1018-25.
135. Cassidy, A., et al., *Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(2): p. 338-47.
136. Bode, A. and Z. Dong, *Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health*. Packer L, Ong CN, Halliwell B, Eds. 2004, New York: Marcel Dekker.
137. Kobayashi, M., et al., *Cardiotonic action of [8]-gingerol, an activator of the Ca⁺⁺-pumping adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum, in guinea pig atrial muscle*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. **246**(2): p. 667-73.
138. Maier, L.S., et al., *Gingerol, isoproterenol and ouabain normalize impaired post-rest behavior but not force-frequency relation in failing human myocardium*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(4): p. 913-24.
139. Nurtjahja-Tjendraputra, E., et al., *Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger*. Thromb Res, 2003. **111**(4-5): p. 259-65.
140. Koo, K.L., et al., *Gingerols and related analogues inhibit arachidonic acid-induced human platelet serotonin release and aggregation*. Thromb Res, 2001. **103**(5): p. 387-97.
141. Alizadeh-Navaei, R., et al., *Investigation of the effect of ginger on the lipid levels. A double blind controlled clinical trial*. Saudi Med J, 2008. **29**(9): p. 1280-4.
142. Kamato, D., et al., *(S)-[6]-Gingerol inhibits TGF-beta-stimulated biglycan synthesis but not glycosaminoglycan hyperelongation in human vascular smooth muscle cells*. J Pharm Pharmacol, 2013. **65**(7): p. 1026-36.
143. Dugasani, S., et al., *Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol*. J Ethnopharmacol, 2010. **127**(2): p. 515-20.
144. Park, S.A., et al., *Effect of [6]-gingerol on myofibroblast differentiation in transforming growth factor beta 1-induced nasal polyp-derived fibroblasts*. Am J Rhinol Allergy, 2012. **26**(2): p. 97-103.
145. Huang, H.C., S.H. Chiu, and T.M. Chang, *Inhibitory effect of [6]-gingerol on melanogenesis in B16F10 melanoma cells and a possible mechanism of action*. Biosci Biotechnol Biochem, 2011. **75**(6): p. 1067-72.

146. Ippoushi, K., et al., *[6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions*. Life Sci, 2003. **73**(26): p. 3427-37.
147. Lin, C.B., C.C. Lin, and G.J. Tsay, *6-Gingerol Inhibits Growth of Colon Cancer Cell LoVo via Induction of G2/M Arrest*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 326096.
148. Yang, G., et al., *Genotoxic effect of 6-gingerol on human hepatoma G2 cells*. Chem Biol Interact, 2010. **185**(1): p. 12-7.
149. Nakamura, Y., et al., *Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 245-50.
150. Banning, A., et al., *The Gl-GPx gene is a target for Nrf2*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(12): p. 4914-23.
151. Reisman, S.A., et al., *Increased Nrf2 activation in livers from Keap1-knockdown mice increases expression of cytoprotective genes that detoxify electrophiles more than those that detoxify reactive oxygen species*. Toxicol Sci, 2009. **108**(1): p. 35-47.
152. Paul, B., et al., *Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India*. J Ethnopharmacol, 1999. **68**(1-3): p. 71-6.
153. Baur, J.A. and D.A. Sinclair, *Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(6): p. 493-506.
154. Opie, L.H. and S. Lecour, *The red wine hypothesis: from concepts to protective signalling molecules*. Eur Heart J, 2007. **28**(14): p. 1683-93.
155. Ignatowicz, E. and W. Baer-Dubowska, *Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases*. Pol J Pharmacol, 2001. **53**(6): p. 557-69.
156. Siemann, E. and L. Creasy, *Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 1992. **43**(1): p. 49-52.
157. Bradamante, S., L. Barenghi, and A. Villa, *Cardiovascular protective effects of resveratrol*. Cardiovasc Drug Rev, 2004. **22**(3): p. 169-88.
158. Wang, Q., et al., *Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils*. Brain Res, 2002. **958**(2): p. 439-47.
159. Sinha, K., G. Chaudhary, and Y.K. Gupta, *Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats*. Life Sci, 2002. **71**(6): p. 655-65.
160. Kundu, J.K. and Y.J. Surh, *Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives*. Cancer Lett, 2008. **269**(2): p. 243-61.
161. Vingtdoux, V., et al., *Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease*. BMC Neurosci, 2008. **9 Suppl 2**: p. S6.
162. Ungvari, Z., et al., *Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(5): p. H2417-24.
163. Chopra, R.N., S.L. Nayar, and I.C. Chopra, *Glossary of Indian medicinal plants*. New Delhi.: C SIR, 1956.

164. Russo, A. and F. Borrelli, *Bacopa monniera*, a reputed nootropic plant: an overview. *Phytomedicine*, 2005. **12**(4): p. 305-17.
165. Tripathi, Y.B., et al., *Bacopa monniera* Linn. as an antioxidant: mechanism of action. *Indian J Exp Biol*, 1996. **34**(6): p. 523-6.
166. Channa, S., et al., *Broncho-vasodilatory activity of fractions and pure constituents isolated from Bacopa monniera*. *J Ethnopharmacol*, 2003. **86**(1): p. 27-35.
167. Mohanty, I.R., et al., *Bacopa monniera* protects rat heart against ischaemia-reperfusion injury: role of key apoptotic regulatory proteins and enzymes. *J Pharm Pharmacol*, 2010. **62**(9): p. 1175-84.
168. Channa, S., et al., *Anti-inflammatory activity of Bacopa monniera in rodents*. *J Ethnopharmacol*, 2006. **104**(1-2): p. 286-9.
169. Sumathi, T. and A. Nongbri, *Hepatoprotective effect of Bacoside-A, a major constituent of Bacopa monniera* Linn. *Phytomedicine*, 2008. **15**(10): p. 901-5.
170. Almelkar, S., S. Divate, and A. Patwardhan, *BACOPA MONNIERA HERB AS AN ANTIOXIDANT IN REDUCING LIPID PEROXIDATION LEVELS IN CULTURED HUMAN ENDOTHELIAL CELLS*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 2013. **13**(1): p. 3549.
171. Kamesh, V. and T. Sumathi, *Nephroprotective potential of Bacopa monniera on hypercholesterolemia induced nephropathy via the NO signaling pathway*. *Pharm Biol*, 2014. **52**(10): p. 1327-34.
172. Sumathi, T., V.C. Nathiya, and M. Sakthikumar, *Protective Effect of Bacoside-A against Morphine-Induced Oxidative Stress in Rats*. *Indian J Pharm Sci*, 2011. **73**(4): p. 409-15.
173. Gebhardt, R., *Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes*. *Lipids*, 1993. **28**(7): p. 613-9.
174. Kieseewetter, H., et al., *Effects of garlic coated tablets in peripheral arterial occlusive disease*. *Clin Investig*, 1993. **71**(5): p. 383-6.
175. Apitz-Castro, R., J.J. Badimon, and L. Badimon, *A garlic derivative, ajoene, inhibits platelet deposition on severely damaged vessel wall in an in vivo porcine experimental model*. *Thromb Res*, 1994. **75**(3): p. 243-9.
176. Bordia, T., et al., *An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1996. **54**(3): p. 183-6.
177. el-Sabban, F., et al., *Garlic preserves patency and delays hyperthermia-induced thrombosis in pial microcirculation*. *Int J Hyperthermia*, 1996. **12**(4): p. 513-25.
178. Gebhardt, R. and H. Beck, *Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures*. *Lipids*, 1996. **31**(12): p. 1269-1276.
179. Steiner, M., et al., *A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **64**(6): p. 866-70.

180. Brandle, M., et al., *Prolongation of life span in hypertensive rats by dietary interventions. Effects of garlic and linseed oil.* Basic Res Cardiol, 1997. **92**(4): p. 223-32.
181. Bordia, A., S.K. Verma, and K.C. Srivastava, *Effect of garlic (Allium sativum) on blood lipids, blood sugar, fibrinogen and fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1998. **58**(4): p. 257-63.
182. Abrams, G.A. and M.B. Fallon, *Treatment of hepatopulmonary syndrome with Allium sativum L. (garlic): a pilot trial.* J Clin Gastroenterol, 1998. **27**(3): p. 232-5.
183. Rahman, K. and G.M. Lowe, *Garlic and cardiovascular disease: a critical review.* J Nutr, 2006. **136**(3 Suppl): p. 736S-740S.
184. Kim, K.M., et al., *Differential regulation of NO availability from macrophages and endothelial cells by the garlic component S-allyl cysteine.* Free Radic Biol Med, 2001. **30**(7): p. 747-56.
185. Pedraza-Chaverri, J., et al., *Garlic prevents hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis.* Life Sci, 1998. **62**(6): p. PL 71-7.
186. Baluchnejadmojarad, T., et al., *Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rats.* J Ethnopharmacol, 2003. **85**(1): p. 139-44.
187. Ku, D.D., et al., *Garlic and its active metabolite allicin produce endothelium- and nitric oxide-dependent relaxation in rat pulmonary arteries.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002. **29**(1-2): p. 84-91.
188. Fallon, M.B., et al., *Garlic prevents hypoxic pulmonary hypertension in rats.* Am J Physiol, 1998. **275**(2 Pt 1): p. L283-7.
189. Kim-Park, S. and D.D. Ku, *Garlic elicits a nitric oxide-dependent relaxation and inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(10): p. 780-6.
190. Kaye, A.D., et al., *Analysis of responses of garlic derivatives in the pulmonary vascular bed of the rat.* J Appl Physiol (1985), 2000. **89**(1): p. 353-8.
191. Bat-Chen, W., et al., *Allicin purified from fresh garlic cloves induces apoptosis in colon cancer cells via Nrf2.* Nutr Cancer, 2010. **62**(7): p. 947-57.
192. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin: the Indian solid gold.* Adv Exp Med Biol, 2007. **595**: p. 1-75.
193. Chattopadhyay, I., et al., *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications.* Curr Sci, 2004. **87**(1): p. 44-53.
194. Alia, B.H., et al., *Biological properties of curcumin: A review.* NPC Natural Product Communications, 2006. **1**: p. 509-521.
195. Gregory, P.J., M. Sperry, and A.F. Wilson, *Dietary supplements for osteoarthritis.* Am Fam Physician, 2008. **77**(2): p. 177-84.
196. Mishra, S. and K. Palanivelu, *The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview.* Ann Indian Acad Neurol, 2008. **11**(1): p. 13-9.

197. de Souza Tavares, W., et al., *Ar-turmerone from Curcuma longa (Zingiberaceae) rhizomes and effects on Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) and Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)*. Industrial Crops and Products, 2013. **46**: p. 158-164.
198. Iqbal, J., G. Jilani, and M. Aslam, *Growth inhibiting effects of plant extracts against the grain moth, Sitotroga cerealella (Oliv.)(Gelechiidae: Lepidoptera)*. Pak J Zool, 2010. **42**(5): p. 597-601.
199. Sukari, M., et al., *Larvicidal activity of some Curcuma and Kaempferia rhizome extracts against dengue fever mosquito Aedes aegypti Linnaeus (Diptera: Culicidae)*. Asian Journal of Chemistry, 2010. **22**(10): p. 7915.
200. Damalas, C.A., *Potential uses of turmeric (Curcuma longa) products as alternative means of pest management in crop production*. Plant Omics, 2011. **4**(3): p. 136.
201. Boonla, O., et al., *Curcumin improves endothelial dysfunction and vascular remodeling in 2K-1C hypertensive rats by raising nitric oxide availability and reducing oxidative stress*. Nitric Oxide, 2014. **42**: p. 44-53.
202. Nakmareong, S., et al., *Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2011. **383**(5): p. 519-29.
203. Sun, Y., et al., *Curcumin Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Premature Senescence via the Activation of SIRT1 in Human Umbilical Vein Endothelial Cells*. Biol Pharm Bull, 2015. **38**(8): p. 1134-41.
204. Lee, H.S., et al., *Curcumin inhibits TNFalpha-induced lectin-like oxidised LDL receptor-1 (LOX-1) expression and suppresses the inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by an antioxidant mechanism*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2010. **25**(5): p. 720-9.
205. Yang, C., et al., *Curcumin upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia*. Brain Res, 2009. **1282**: p. 133-41.
206. Pradhan, S.C. and C. Girish, *Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine*. Indian J Med Res, 2006. **124**(5): p. 491-504.
207. Mereish, K.A., et al., *Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by Silymarin: biochemistry, histopathology, and lethality*. Pharm Res, 1991. **8**(2): p. 273-7.
208. Carini, R., et al., *Lipid peroxidation and irreversible damage in the rat hepatocyte model. Protection by the silybin-phospholipid complex IdB 1016*. Biochem Pharmacol, 1992. **43**(10): p. 2111-5.
209. Manna, S.K., et al., *Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis*. J Immunol, 1999. **163**(12): p. 6800-9.
210. Kang, J.S., et al., *Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(1): p. 138-44.
211. Bialecka, M., *[The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits]*. Ann Acad Med Stetin, 1997. **43**: p. 41-56.

212. Locher, R., et al., *Inhibitory action of silibinin on low density lipoprotein oxidation*. *Arzneimittelforschung*, 1998. **48**(3): p. 236-9.
213. Skottova, N. and V. Krecman, *Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug*. *Physiol Res*, 1998. **47**(1): p. 1-7.
214. Dehmlow, C., N. Murawski, and H. de Groot, *Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells*. *Life Sci*, 1996. **58**(18): p. 1591-600.
215. Feher, J., et al., *In vivo effect of free radical scavenger hepatoprotective agents on superoxide dismutase (SOD) activity in patients*. *Tokai J Exp Clin Med*, 1990. **15**(2-3): p. 129-34.
216. Zhao, F., et al., *Silymarin attenuates paraquat-induced lung injury via Nrf2-mediated pathway in vivo and in vitro*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015.
217. Wang, Y.K., Y.J. Hong, and Z.Q. Huang, *Protective effects of silybin on human umbilical vein endothelial cell injury induced by H₂O₂ in vitro*. *Vascul Pharmacol*, 2005. **43**(4): p. 198-206.
218. Li Volti, G., et al., *Effect of silibinin on endothelial dysfunction and ADMA levels in obese diabetic mice*. *Cardiovasc Diabetol*, 2011. **10**: p. 62.
219. Perez-Fons, L., M.T. Garzon, and V. Micol, *Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(1): p. 161-71.
220. Cui, L., et al., *Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity*. *Food Chemistry*, 2012. **132**(4): p. 1775-1780.
221. Javanmardi, J., et al., *Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions*. *Food Chemistry*, 2003. **83**(4): p. 547-550.
222. Martynyuk, L., O. Ruzhitska, and O. Martynyuk, *Effect of the herbal combination *Canephron N* on diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: results of a comparative cohort study*. *J Altern Complement Med*, 2014. **20**(6): p. 472-8.
223. Amel, B., *Traditional treatment of high blood pressure and diabetes in Souk Ahras District*. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 2013. **5**(1): p. 12-20.
224. al-Sereiti, M.R., K.M. Abu-Amer, and P. Sen, *Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials*. *Indian J Exp Biol*, 1999. **37**(2): p. 124-30.
225. Fahim, F.A., et al., *Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis*. *Int J Food Sci Nutr*, 1999. **50**(6): p. 413-27.
226. Ramadan, K.S., et al., *Hypoglycemic and hepatoprotective activity of *Rosmarinus officinalis* extract in diabetic rats*. *J Physiol Biochem*, 2013. **69**(4): p. 779-83.
227. Wang, W., et al., *Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components*. *Molecules*, 2012. **17**(3): p. 2704-13.

228. Afonso, M.S., et al., *Phenolic compounds from Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) attenuate oxidative stress and reduce blood cholesterol concentrations in diet-induced hypercholesterolemic rats*. Nutr Metab (Lond), 2013. **10**(1): p. 19.
229. Kwon, Y.I., D.A. Vatter, and K. Shetty, *Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension*. Asia Pac J Clin Nutr, 2006. **15**(1): p. 107-18.
230. Rocha, J., et al., *Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of Rosmarinus officinalis in rat models of local and systemic inflammation*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015. **116**(5): p. 398-413.
231. Satoh, T., et al., *Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1*. J Neurochem, 2008. **104**(4): p. 1116-31.
232. Poeckel, D., et al., *Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes*. Biochem Pharmacol, 2008. **76**(1): p. 91-7.
233. Si, H., R.P. Wyeth, and D. Liu, *The flavonoid luteolin induces nitric oxide production and arterial relaxation*. Eur J Nutr, 2014. **53**(1): p. 269-75.
234. Chen, C.C., et al., *Calcium- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase by apigenin*. Life Sci, 2010. **87**(23-26): p. 743-9.
235. Qin, W., et al., *Apigenin and naringenin ameliorate PKC β 1-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose*. Vascul Pharmacol, 2016. **85**: p. 39-49.
236. Veveris, M., E. Koch, and S.S. Chatterjee, *Crataegus special extract WS 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion*. Life Sci, 2004. **74**(15): p. 1945-55.
237. Asgary, S., et al., *Antihypertensive effect of Iranian Crataegus curvisepala Lind.: a randomized, double-blind study*. Drugs Exp Clin Res, 2004. **30**(5-6): p. 221-5.
238. Tadic, V.M., et al., *Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(17): p. 7700-9.
239. Tanigawa, S., M. Fujii, and D.X. Hou, *Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(11): p. 1690-703.
240. Zhu, X.X., et al., *[Effect of vitexia-rhamnoside (V-R) on vasomotor factors expression of endothelial cell]*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2006. **31**(7): p. 566-9.
241. Steinkamp-Fenske, K., et al., *Ursolic acid from the Chinese herb danshen (Salvia miltiorrhiza L.) upregulates eNOS and downregulates Nox4 expression in human endothelial cells*. Atherosclerosis, 2007. **195**(1): p. e104-11.
242. Brixius, K., et al., *Crataegus special extract WS 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(3): p. 177-84.

243. Wang, T., et al., *Prevention effect in selenite-induced cataract in vivo and antioxidative effects in vitro of Crataegus pinnatifida leaves*. Biol Trace Elem Res, 2011. **142**(1): p. 106-16.
244. Forsyth, L.M., et al., *Therapeutic effects of oral NADH on the symptoms of patients with chronic fatigue syndrome*. Ann Allergy Asthma Immunol, 1999. **82**(2): p. 185-91.
245. Santaella, M.L., I. Font, and O.M. Disdier, *Comparison of oral nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) versus conventional therapy for chronic fatigue syndrome*. P R Health Sci J, 2004. **23**(2): p. 89-93.
246. Birkmayer, J.G., et al., *Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)--a new therapeutic approach to Parkinson's disease. Comparison of oral and parenteral application*. Acta Neurol Scand Suppl, 1993. **146**: p. 32-5.
247. Birkmayer, J.G., *Coenzyme nicotinamide adenine dinucleotide: new therapeutic approach for improving dementia of the Alzheimer type*. Ann Clin Lab Sci, 1996. **26**(1): p. 1-9.
248. Bushehri, N., et al., *Oral reduced B-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) affects blood pressure, lipid peroxidation, and lipid profile in hypertensive rats (SHR)*. Geriatr Nephrol Urol, 1998. **8**(2): p. 95-100.
249. Iker Durak, H.O., Erdinc Devrim and Asl han Avc, *Effects of NADH Supplementation on Hematological and Blood Biochemical Parameters and Tissue Oxidant/Antioxidant Status in Rats*. International Journal of Pharmacology, 2005. **1**: p. 71-73.
250. Liu, F.Q. and J.R. Zhang, *X-ray induced L02 cells damage rescued by new antioxidant NADH*. World J Gastroenterol, 2003. **9**(8): p. 1781-5.
251. Vrecko, K., et al., *NADH stimulates endogenous dopamine biosynthesis by enhancing the recycling of tetrahydrobiopterin in rat phaeochromocytoma cells*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1361**(1): p. 59-65.
252. Crane, F.L., et al., *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 1957. **25**(1): p. 220-1.
253. YAMAMURA, Y., et al., *Clinical use of coenzyme-Q for treatment of cardiovascular diseases*. Japanese circulation journal, 1967. **31**(1): p. 168.
254. Folkers, K., et al., *Evidence for a deficiency of coenzyme Q10 in human heart disease*. Int Z Vitaminforsch, 1970. **40**(3): p. 380-90.
255. Tsai, K.L., et al., *A novel mechanism of coenzyme Q10 protects against human endothelial cells from oxidative stress-induced injury by modulating NO-related pathways*. J Nutr Biochem, 2012. **23**(5): p. 458-68.
256. Li, L., et al., *Protective Effects of Coenzyme Q10 Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC12 Cell: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(1): p. 103-11.
257. Tsai, H.Y., et al., *Coenzyme Q10 Attenuates High Glucose-Induced Endothelial Progenitor Cell Dysfunction through AMP-Activated Protein Kinase Pathways*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 6384759.
258. Tsai, K.L., et al., *Coenzyme Q10 suppresses oxLDL-induced endothelial oxidative injuries by the modulation of LOX-1-mediated ROS generation via the*

- AMPK/PKC/NADPH oxidase signaling pathway*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55 Suppl 2**: p. S227-40.
259. Hosseinzadeh-Attar, M., et al., *Reduction in asymmetric dimethylarginine plasma levels by coenzyme Q10 supplementation in patients with type 2 diabetes mellitus*. Minerva Endocrinol, 2015. **40**(4): p. 259-66.
260. Ozdogan, S., D. Kaman, and B.C. Simsek, *Effects of coenzyme Q10 and alpha-lipoic acid supplementation in fructose fed rats*. J Clin Biochem Nutr, 2012. **50**(2): p. 145-51.
261. Walle, T., et al., *High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(12): p. 1377-82.
262. Mertens-Talcott, S.U. and S.S. Percival, *Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells*. Cancer Lett, 2005. **218**(2): p. 141-51.
263. Shoba, G., et al., *Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers*. Planta Med, 1998. **64**(4): p. 353-6.
264. Javanmard, S.H., et al., *L-Arginine supplementation enhances eNOS expression in experimental model of hypercholesterolemic rabbits aorta*. Pathophysiology, 2009. **16**(1): p. 9-13.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

<i>ACh</i>	<i>Acetylcholin</i>
<i>ADMA</i>	<i>Asymmetrisches Dimethylarginin</i>
<i>AIDS</i>	<i>Erworbenes Immundefektsyndrom (engl. Acquired Immune Deficiency Syndrome)</i>
<i>Akt</i>	<i>Proteinkinase B (PKB)</i>
<i>AMPK</i>	<i>Engl. AMP-Activated Protein Kinase</i>
<i>APS</i>	<i>Ammoniumpersulfat</i>
<i>ARE</i>	<i>Engl. Antioxidative Responsive Element</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosintriphosphat</i>
<i>AUC</i>	<i>Fläche unterhalb der Kurve (engl. Area under the Curve)</i>
<i>BCAEC</i>	<i>Engl. Bovine Carotid Artery Endothelial Cells</i>
<i>BFGF</i>	<i>Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. Basic Fibroblast Growth Factor)</i>
<i>BH₄</i>	<i>Tetrahydrobiopterin</i>
<i>CAT</i>	<i>Katalase</i>
<i>CCD</i>	<i>Engl. Charge-Coupled Device</i>
<i>cDNA</i>	<i>Engl. Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>cGMP</i>	<i>Cyclisches Guanosinmonophosphat</i>
<i>ct</i>	<i>Engl. Cycle Threshold</i>
<i>DAN</i>	<i>Diaminonaphthalin</i>
<i>DDAH</i>	<i>Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase</i>
<i>DEPC</i>	<i>Diethylpyrocarbonat</i>
<i>DMEM</i>	<i>Engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<i>DMNQ</i>	<i>2,3-Dimethoxy-1,4-naphthoquinon</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimethylsulfoxid</i>
<i>dNTP</i>	<i>Desoxynukleosidtriphosphat</i>
<i>ECL</i>	<i>Engl. Enhanced Chemiluminescence</i>

- EDHF* Endothelabhängigen Hyperpolarisationsfaktor
(engl. Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor)
- EDRF* Endothelabhängigen Relaxationsfaktor
(engl. Endothelium Derived Relaxing Factor)
- EDTA* Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
- EGCG* Epigallocatechingallat
- ELAM* Endotheliale Leukozytenadhäsionsmolekül
(engl. Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule)
- eNOS* Endotheliale NOS
- EPC* Engl. Endothelial Progenitor Cells
- FAD* Flavin-Adenin-Dinukleotid
- FAM* Flavinmononukleotid
- FCS* Fetales Kälberserum
- FGF* Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. Fibroblast Growth Factor)
- FRET* Förster-Resonanzenergietransfers
- g* Erdbeschleunigung
- GAG* Glykosaminoglykane
- GAPDH* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
- GM-CSF* Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
(engl. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)
- GPX* Glutathion-Peroxidase
- GSH* Gluathion
- HAEC* Engl. Primary Human Aortic Endothelial Cells
- HBSS* Engl. Hank's Balanced Salt Solution
- HCAEC* Engl. Human Coronary Artery Endothelial Cells
- HDMEC* Engl. Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
- HRP* Meerrettich-Peroxidase (engl. Horse Radish Peroxidase)
- HUVEC* Engl. Human Umbilical Vein Endothelial Cells
- ICAM-1* Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (engl. Intercellular Adhesion Molecule 1)
- IFN γ* Interferon γ

<i>IGF</i>	<i>Insulinähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-Like Growth Factor)</i>
<i>IL</i>	<i>Interleukin</i>
<i>iNOS</i>	<i>Induzierbare NOS</i>
<i>Jap.</i>	<i>Japanischer</i>
<i>KHK</i>	<i>koronare Herzkrankheit</i>
<i>LDL</i>	<i>Lipoproteine niederer Dichte (engl. Low Density Lipoprotein)</i>
<i>L-NAME</i>	<i>N-Nitro-L-Arginin-Methylester</i>
<i>L-NMMA</i>	<i>Monomethyl-L-Arginin</i>
<i>MCP-1</i>	<i>Engl. Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
<i>M-CSF</i>	<i>Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl. Macrophage Colony-Stimulating Factor)</i>
<i>mRNA</i>	<i>Engl. Messenger Ribonucleic Acid</i>
<i>NADH</i>	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid</i>
<i>NADPH</i>	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
<i>nNOS</i>	<i>Neuronale NOS</i>
<i>NO</i>	<i>Stickstoffmonoxid</i>
<i>NOS</i>	<i>Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
<i>NOX</i>	<i>NAPDH-Oxidase</i>
<i>Nrf2</i>	<i>Engl. Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2)-Related Factor 2</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
<i>PARP</i>	<i>Poly(ADP-Ribose)-Polymerase</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphat-gepuffertes Salzlösung (engl. Phosphate Buffered Saline)</i>
<i>PC</i>	<i>Engl. Rat Phaeochromocytoma Cells</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerasen-Ketten-Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)</i>
<i>PDGF</i>	<i>Plättchenabhängiger Wachstumsfaktor (engl. Platelet-Derived Growth Factor)</i>
<i>PKC</i>	<i>Protein-Kinase C</i>
<i>ppm</i>	<i>Teile von einer Million (engl. parts per million)</i>
<i>PRMT</i>	<i>Protein-Arginin-Methyltransferasen</i>

- PROCAM* Engl. *Prospective Cardiovascular Münster Study*
- ROS* *Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)*
- SDMA* *Symmetrische Dimethylarginin*
- SDS* *Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)*
- SEM* *Standardfehler des Mittelwerts (engl. Standard Error of the Mean)*
- SOD* *Superoxid-Dismutase*
- Staudenknöt.* *Staudenknöterich*
- TBS* *Tris-gepufferter Salzlösung (engl. Tris Buffered Saline)*
- TBST* *Tris-gepufferter Salzlösung inklusive Tween 20
(engl. Tris Buffered Saline with Tween 20)*
- TEMED* *N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin*
- TGFβ* *Engl. Transforming growth factor*
- TNFα* *Tumor Nekrose Faktor α*
- UV* *Ultraviolett*
- VCAM-1* *Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (engl. Vascular Cell Adhesion Molecule 1)*
- VEGF* *Endothelwachstumsfaktor (engl. Vascular Endothelial Growth Factor)*
- WHO* *Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)*
- XDH* *Xanthin-Dehydrogenase*

7.3 H- und P-Sätze des GHS

H200-Reihe: Gefahrenhinweise für physikalische Gefahren

- H200 *Instabil, explosiv.*
- H201 *Explosiv; Gefahr der Massenexplosion.*
- H202 *Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.*
- H203 *Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.*
- H204 *Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.*
- H205 *Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.*
- H220 *Extrem entzündbares Gas.*
- H221 *Entzündbares Gas.*
- H222 *Extrem entzündbares Aerosol.*
- H223 *Entzündbares Aerosol.*
- H224 *Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.*
- H225 *Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.*
- H226 *Flüssigkeit und Dampf entzündbar.*
- H228 *Entzündbarer Feststoff.*
- H229 *Behälter steht unter Druck: kann bei Erwärmung bersten.*
- H230 *Kann auch in Abwesenheit von Luft explosionsartig reagieren.*
- H231 *Kann auch in Abwesenheit von Luft bei erhöhtem Druck und/oder erhöhter Temperatur explosionsartig reagieren.*
- H240 *Erwärmung kann Explosion verursachen.*
- H241 *Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.*
- H242 *Erwärmung kann Brand verursachen.*
- H250 *Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.*
- H251 *Selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.*
- H252 *In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.*
- H260 *In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.*

- H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.*
- H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.*
- H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.*
- H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.*
- H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.*
- H281 Enthält tiefgekühltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -verletzungen verursachen.*
- H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.*

H300-Reihe: Gefahrenhinweise für Gesundheitsgefahren

- H300 Lebensgefahr bei Verschlucken.*
- H301 Giftig bei Verschlucken.*
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.*
- H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.*
- H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.*
- H311 Giftig bei Hautkontakt.*
- H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.*
- H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.*
- H315 Verursacht Hautreizungen.*
- H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.*
- H318 Verursacht schwere Augenschäden.*
- H319 Verursacht schwere Augenreizung.*
- H330 Lebensgefahr bei Einatmen.*
- H331 Giftig bei Einatmen.*
- H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.*
- H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.*
- H335 Kann die Atemwege reizen.*

- H336 *Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.*
- H340 *Kann genetische Defekte verursachen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H341 *Kann vermutlich genetische Defekte verursachen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H350 *Kann Krebs erzeugen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H350i *Kann bei Einatmen Krebs erzeugen.*
- H351 *Kann vermutlich Krebs erzeugen <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H360 *Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen <konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H360F *Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.*
- H360D *Kann das Kind im Mutterleib schädigen.*
- H360FD *Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.*
- H360Fd *Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.*
- H360Df *Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.*
- H361 *Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen <konkrete Wirkung angeben, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*
- H361f *Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.*
- H361d *Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.*
- H361fd *Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.*
- H362 *Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.*
- H370 *Schädigt die Organe <oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*

H371 *Kann die Organe schädigen <oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*

H372 *Schädigt die Organe <alle betroffenen Organe nennen> bei längerer oder wiederholter Exposition <Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>*

H373 *Kann die Organe schädigen <alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt> bei längerer oder wiederholter Exposition <Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht>.*

H300 + H310 *Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.*

H300 + H330 *Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.*

H310 + H330 *Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.*

H300 + H310 + H330 *Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.*

H301 + H311 *Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.*

H301 + H331 *Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.*

H311 + H331 *Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.*

H301 + H311 + H331 *Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.*

H302 + H312 *Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.*

H302 + H332 *Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.*

H312 + H332 *Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.*

H302 + H312 + H332 *Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.*

H400-Reihe: Gefahrenhinweise für Umweltgefahren

H400 *Sehr giftig für Wasserorganismen.*

H410 *Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.*

H411 *Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.*

H412 *Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.*

H413 *Kann für Wasserorganismen langfristig schädlich sein.*

H420 *Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.*

P100-Reihe: Allgemeines

- P101 *Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Kennzeichnungsetikett bereithalten.*
- P102 *Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.*
- P103 *Vor Gebrauch Kennzeichnungsetikett lesen.*

P200-Reihe: Prävention

- P201 *Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.*
- P202 *Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.*
- P210 *Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen und anderen Zündquellen fernhalten. Nicht rauchen.*
- P211 *Nicht gegen offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.*
- P220 *Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.*
- P221 *Mischen mit brennbaren Stoffen/... unbedingt verhindern.*
- P222 *Keinen Kontakt mit Luft zulassen.*
- P223 *Keinen Kontakt mit Wasser zulassen.*
- P230 *Feucht halten mit ...*
- P231 *Unter inertem Gas handhaben.*
- P232 *Vor Feuchtigkeit schützen.*
- P233 *Behälter dicht verschlossen halten.*
- P234 *Nur im Originalbehälter aufbewahren.*
- P235 *Kühl halten.*
- P240 *Behälter und zu befüllende Anlage erden.*
- P241 *Explosionssgeschützte elektrische Geräte/Lüftungsanlagen/ Beleuchtungsanlagen/... verwenden.*
- P242 *Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.*
- P243 *Maßnahmen gegen elektrostatische Entladungen treffen.*
- P244 *Ventile und Ausrüstungsteile öl- und fettfrei halten.*
- P250 *Nicht schleifen/stoßen/...reiben.*

- P251 Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach Gebrauch.*
- P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/ Aerosol nicht einatmen.*
- P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/ Aerosol vermeiden.*
- P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.*
- P263 Kontakt während der Schwangerschaft/und der Stillzeit vermeiden.*
- P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen.*
- P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.*
- P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.*
- P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.*
- P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.*
- P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.*
- P282 Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.*
- P283 Schwer entflammbare/flammhemmende Kleidung tragen.*
- P284 [Bei unzureichender Belüftung] Atemschutz tragen.*
- P231 + P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.*
- P235 + P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.*

P300-Reihe: Reaktion

- P301 Bei Verschlucken:*
- P302 Bei Berührung mit der Haut:*
- P303 Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar):*
- P304 Bei Einatmen:*
- P305 Bei Kontakt mit den Augen:*
- P306 Bei Kontakt mit der Kleidung:*
- P308 Bei Exposition oder falls betroffen:*
- P310 Sofort Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.*

- P311 *Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.*
- P312 *Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.*
- P313 *Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P314 *Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P315 *Sofort ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P320 *Besondere Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).*
- P321 *Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).*
- P330 *Mund ausspülen.*
- P331 *KEIN Erbrechen herbeiführen.*
- P332 *Bei Hautreizung:*
- P333 *Bei Hautreizung oder -ausschlag:*
- P334 *In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.*
- P335 *Lose Partikel von der Haut abbürsten.*
- P336 *Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.*
- P337 *Bei anhaltender Augenreizung:*
- P338 *Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.*
- P340 *Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.*
- P342 *Bei Symptomen der Atemwege:*
- P351 *Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.*
- P352 *Mit viel Wasser/... waschen.*
- P353 *Haut mit Wasser abwaschen/duschen.*
- P360 *Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.*
- P361 *Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.*
- P362 *Kontaminierte Kleidung ausziehen.*
- P363 *Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.*

- P364 *Und vor erneutem Tragen waschen.*
- P370 *Bei Brand:*
- P371 *Bei Großbrand und großen Mengen:*
- P372 *Explosionsgefahr bei Brand.*
- P373 *Keine Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische/Erzeugnisse erreicht.*
- P374 *Brandbekämpfung mit üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.*
- P375 *Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.*
- P376 *Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.*
- P377 *Brand von ausströmendem Gas: Nicht löschen, bis Undichtigkeit gefahrlos beseitigt werden kann.*
- P378 *... zum Löschen verwenden.*
- P380 *Umgebung räumen.*
- P381 *Alle Zündquellen entfernen, wenn gefahrlos möglich.*
- P390 *Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.*
- P391 *Verschüttete Mengen aufnehmen.*
- P301 + P310 *Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.*
- P301 + P312 *Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum/Arzt/... anrufen.*
- P301 + P330 + P331 *Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.*
- P302 + P334 *Bei Berührung mit der Haut: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.*
- P302 + P352 *Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser/... waschen.*
- P303 + P361 + P353 *Bei Berührung mit der Haut (oder dem Haar): Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.*
- P304 + P340 *Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und für ungehinderte Atmung sorgen.*
- P305 + P351 + P338 *Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.*

- P306 + P360 Bei Kontakt mit der Kleidung: Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen und danach Kleidung ausziehen.*
- P308 + P311 Bei Exposition oder falls betroffen: Giftinformationszentrum/ Arzt/... anrufen.*
- P308 + P313 Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P335 + P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/ nassen Verband anlegen.*
- P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.*
- P342 + P311 Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum/ Arzt/... anrufen.*
- P361 + P364 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.*
- P362 + P364 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.*
- P370 + P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, wenn gefahrlos möglich.*
- P370 + P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.*
- P370 + P380 Bei Brand: Umgebung räumen.*
- P370 + P380 + P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.*
- P371 + P380 + P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.*

P400-Reihe: Aufbewahrung

- P401 ... aufbewahren.*
- P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.*
- P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.*
- P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.*
- P405 Unter Verschluss aufbewahren.*

- P406 In korrosionsbeständigem/... Behälter mit widerstandsfähiger Innenauskleidung aufbewahren.*
- P407 Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.*
- P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.*
- P411 Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren.*
- P412 Nicht Temperaturen über als 50 °C/122 °F aussetzen.*
- P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/... lbs bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren.*
- P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.*
- P422 Inhalt in/unter ... aufbewahren.*
- P402 + P404 An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.*
- P403 + P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.*
- P403 + P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.*
- P410 + P403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.*
- P410 + P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen. Nicht Temperaturen über 50 °C/122 °F aussetzen.*
- P411 + P235 Bei Temperaturen nicht über ... °C/...°F aufbewahren. Kühl halten.*

P500-Reihe: Entsorgung

- P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.*
- P502 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.*

7.4 Lebenslauf

Name	<i>Felix Schönfeldt</i>
Geburtsdatum	<i>15. Februar 1987</i>
Geburtsort	<i>Magdeburg</i>

Bildungsweg

<i>seit Februar 2012</i>	<i>Promotion im Institut für Klinische Pharmakologie & Toxikologie Universitätsklinikum Hamburg/Eppendorf</i>
<i>10/2013 – 09/2015</i>	<i>Aufbaustudiengang Molekularbiologie, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg</i>
<i>02/2012</i>	<i>Approbation als Apotheker</i>
<i>10/2006 – 10/2011</i>	<i>Studium der Pharmazie Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn</i>
<i>06/2006</i>	<i>Allgemeine Hochschulreife Goethe-Gymnasium Stralsund</i>

Praktische Erfahrung

<i>seit 06/2014</i>	<i>Angestellter Apotheker in Teilzeit Aquarius-Apotheke, Hamburg-Eppendorf</i>
<i>04/2012 – 03/2014</i>	<i>Angestellter Apotheker in Teilzeit Brunnen-Apotheke, Hamburg-Eppendorf</i>
<i>05/2011 – 10/2011</i>	<i>Praktisches Jahr, 2. Halbjahr 4SC AG, Abteilung Development & Drug Supply, München</i>
<i>11/2010 – 04/2011</i>	<i>Praktisches Jahr, 1. Halbjahr Park-Apotheke, Berlin / Margareten Apotheke, Friedersdorf</i>

7.5 Veröffentlichungen

F. Schönfeldt, E. Schwedhelm, W. Krüger, R. H. Böger. Hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetat inhibit platelet aggregation. Center for Experimental Medicins introduces its research. Hamburg, 5. April 2013 (Poster)

7.6 Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Optimierung des NO-Redox-Gleichgewichtes mittels pflanzlicher Extrakte“

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R.H. Böger ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Felix Schönfeldt

7.7 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Überlassung des Promotionsthemas sowie die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Elke Oetjen für die Begutachtung dieser Arbeit und die Vertretung meiner Dissertation gegenüber dem Fachbereich Chemie.

Herrn Prof. Dr. Tidow und Frau Dr. Hoffmeister-Ullerich danke ich für die freundliche Zusage als Prüfer in meiner Disputation teilzunehmen.

Bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes für Klinische Pharmakologie und Toxikologie bedanke ich mich für ihre Unterstützung und die produktive Zusammenarbeit.

Mein herzlichster Dank geht an meine Eltern Christine und Manfred für die Ermöglichung meines Lebensweges, insbesondere für Ihre finanzielle und moralische Unterstützung während meiner gesamten beruflichen Ausbildung. Das Korrekturlesen meiner Arbeit sowie die gegebenen Denkanstöße waren mir eine große Unterstützung. Während gemeinsamer Stunden konnte ich stets Kraft für die kommenden Aufgaben tanken.

Meinen Brüdern Stephan und Marcus danke ich ebenfalls für die Begleitung meines bisherigen Werdegangs, vor allen Dingen für die Möglichkeit des Kopf-Ausschaltens bei Spielabenden und Sportevents.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Frau Julia dafür, dass sie mit mir gemeinsam den Weg nach Hamburg gegangen ist, mir vor allem in den schwierigsten Arbeitsphasen den Rücken frei gehalten und mich mit großer Geduld unterstützt hat.

Ein ganz spezieller Dank für den letzten Motivationsschub geht an meine Tochter Klara.