

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik B
- Komm. Direktorin: Prof. Dr. K. Hengst -

**Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), ein Catechin des
grünen Tees, als Therapeutikum im DSS-Kolitis-Modell
der Maus**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Brückner, Markus Georg
aus Bielefeld

2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. A. Lügering

2. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Kucharzik

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik B
- Komm. Direktorin: Prof. Dr. K. Hengst -
Referent: PD. Dr. A. Lügering
Koreferent: Prof. Dr. T. Kucharzik

ZUSAMMENFASSUNG

Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), ein Catechin des grünen Tees, als Therapeutikum im DSS-Kolitis-Modell der Maus

Brückner, Markus Georg

Gewebecharakteristika chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa sind eine vermehrte Leukozyteninfiltration, eine Hochregulation proinflammatorischer Zytokine und oxidativer Stress, der durch ein verstärktes Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies hervorgerufen wird. Ein Catechin aus der Spezies *Camellia*, (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoat), genannt Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), zeigt antientzündliche und antioxidative Eigenschaften; es führt zu einer Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies in entzündeten Geweben. Das Ziel dieser phytochemischen Studie war die Evaluation der potentiellen therapeutischen Effekte des EGCG in einem murinen Kolitismodell, das durch die Verabreichung von Dextran Sodium Sulfat induziert wurde. Die tägliche therapeutische Gabe umfasste 6.9 mg/kg Körpergewicht EGCG in Kombination mit einem Alkaloid der Spezies *Piper*, (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one, bezeichnet als Piperin, das in einer Konzentration von 2.9 mg/kg Körpergewicht verabreicht wurde, um die Bioverfügbarkeit des EGCG zu erhöhen. Die mit dieser Kombination behandelten Mäuse zeigten eine signifikante Gewichtsstabilisierung, einen besseren klinischen Verlauf und eine signifikante Verlängerung des Überlebens im Vergleich zu den nichtbehandelten Mäusen. Der mildere Verlauf der Kolitis war mit geringeren histologischen Schäden in der Kolonschleimhaut und einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 verbunden. Außerdem waren die Gewebekonzentrationen von Malondialdehyd, dem Endprodukt der Lipidperoxidation, und von Myeloperoxidase, einem Indikator der Neutrophilenakkumulation, signifikant reduziert, während antioxidativ wirkende Gewebeenzyme wie Superoxid Dismutase und Glutathion Peroxidase eine verstärkte Aktivität aufwiesen. Diese Daten unterstützen das Konzept der antientzündlichen Eigenschaften des EGCG im DSS-Kolitis-Modell, die vor allem durch dessen starkes antioxidatives Potential hervorgerufen werden.

Genehmigung des Tierversuchs ab dem 01.07.2008 unter Aktenzeichen 8.87-50.10.36.08.128 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen.

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	6
1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Genetik.....	6
1.1.1.1 Inzidenz der CED in Europa	6
1.1.1.2 Inzidenz der CED in Deutschland.....	6
1.1.1.3 Prävalenz der CED	7
1.1.1.4 Risikofaktoren	7
1.1.1.5 Genetik der CED.....	8
1.1.2 Klinik und Pathophysiologie der CED.....	9
1.1.2.1 Klinik und Therapie	9
1.1.2.2 Das intestinale Immunsystem	11
1.1.2.3 Immunologie der CED	13
1.1.2.4 Die intestinale Barriere	15
1.1.2.5 Intestinale Berrierestörung bei CED	15
1.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und CED	16
1.1.3.1 Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies	16
1.2 Grüner Tee	18
1.2.1 Botanik	18
1.2.1.1 Systematik	18
1.2.1.2 Verbreitungsgebiet.....	18
1.2.1.3 Kultureller Anbau	19
1.2.2 Die Teeproduktion.....	19
1.2.2.1 Der Verarbeitungsprozess	20
1.2.3 Teeformen und Inhaltsstoffe.....	21
1.2.3.1 Teeformen	21
1.2.3.2 Inhaltsstoffe	21
1.2.3.3 Molekularer Aufbau der Flavonoide	22
1.2.3.4 Flavonidkonzentrationen im Tee.....	24
1.2.4 Grüner Tee und CED	25
1.3 Frage- und Problemstellung.....	27

2 Materialien	29
2.1 Chemikalien	29
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
2.1.2 Antikörper	31
2.1.3 Enzyme	32
2.1.4 Puffer und Lösungen	32
2.2 Versuchstiere	36
2.3 Methoden	36
2.3.1 Induktion und Kontrolle der chronischen Kolitis bei Mäusen mit Dextransodiumsulfat (DSS)	36
2.3.2 Therapeutisches Vorgehen mit den Substanzen EGCG und Piperin	37
2.3.3 Histologie	38
2.3.3.1 <i>Beurteilung der Entzündungsaktivität nach Graduierungsschema</i>	40
2.3.4 Zellkultur	41
2.3.5 Quantitative Immunoassays: Enzyme-linked-Immunosorbent- Assay (ELISA)	42
2.3.6 Immunhistochemie	43
2.3.7 MDA Analyse	45
2.3.8 MPO Analyse	45
2.3.9 Quantitative Real-time PCR	46
2.4 Statistische Methoden	49
2.4.1 Ermittlung der statistischen Signifikanz über Mittelwertunterschiede: t-Test für zwei unabhängige Stichproben ...	49
2.4.2 Ermittlung der statistischen Signifikanz über Mittelwertunterschiede: einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)	50
2.4.3 Ereigniszeitanalyse	52
 3 Ergebnisse	 54
3.1 Die Gabe von EGCG und Piperin reduziert die Krankheitssymptome bei der murinen DSS-Kolitis	54

3.2 Reduktion der Letalität durch die Gabe von EGCG und Piperin	57
3.3 Reduktion der histomorphologischen Entzündungsaktivität durch EGCG und Piperin	58
3.4 Weniger entzündungsbedingte Kolonverkürzung durch EGCG und Piperin.....	61
3.5 Reduzierte MPO-Aktivität durch die Behandlung mit EGCG und Piperin.....	62
3.6 EGCG und Piperin als Schutz vor Lipidperoxidation.....	64
3.7 EGCG und Piperin beeinflussen die TNF- α - und IL-6- Sekretion von mit LPS stimulierten RAW 264.7 Makrophagen	66
3.8 EGCG und Piperin haben eine Wirkung auf die Expression von Genen des Sauerstoffmetabolismus	68
4 Diskussion	71
5 Originaldaten und Literaturverzeichnis	81
5.1 Originaldaten	81
5.2 Literaturverzeichnis.....	89
5.3 Tabellenverzeichnis	105
5.4 Abbildungsverzeichnis	105
6 Danksagung und Lebenslauf	107
6.1 Danksagung.....	107
6.2 Lebenslauf	108

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren und Genetik

1.1.1.1 Inzidenz der CED in Europa

Die Inzidenz für Morbus Crohn (MC) ist seit dem Ende des 2. Weltkriegs europaweit gestiegen. Bezüglich der Colitis Ulcerosa (CU) ist eine exakte Aussage zur Inzidenz schwierig zu treffen, da sich die teils milden Krankheitsverläufe einer Erhebung entziehen. Europäische Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die CU im Vergleich zu MC etwa doppelt so häufig auftritt. Weiterhin finden sich typischerweise leichte geographische Unterschiede. Eine europäische Studie zur Epidemiologie der CED (EC-IBD) (129) (138) zeigte ein milderer als von Forschern angenommenes Nord-Süd-Gefälle: beteiligte Zentren in Nordeuropa kamen für MC auf eine Inzidenz von $7/10^5$, in südlich gelegenen Zentren wurde eine Inzidenz von $3.9/10^5$ gefunden. Die Inzidenz der CU war deutlich höher: $11.8/10^5$ in nördlich gelegenen Zentren, $8.7/10^5$ in südlich gelegenen. Mögliche Gründe für diese geringen Unterschiede könnte ein später eingetretener Inzidenzanstieg im Süden sein. Desweiteren fand sich bei diesen Studien eine höhere Inzidenz in Ländern mit einem hohen sozioökonomischen Status (z.B. Frankreich).

1.1.1.2 Inzidenz der CED in Deutschland

In großen Studien (29) findet sich bezüglich des MC in Deutschland eine mittlere Inzidenz von $5/10^5$. CU dagegen fällt im internationalen Vergleich mit einer verhältnismäßig geringeren Inzidenz auf, was u.a. mit einer Untererfassung durch das stark individualisierte Gesundheitssystem in

Deutschland erklärbar ist. Auch aus anderen Zentren kommen ähnlich niedrige Angaben für die CU, vermutlich methodisch bedingt. Die Vermutung liegt nahe, dass in Deutschland das Verhältnis MC zu CU eher bei 1:1 als bei den üblicherweise angenommenen 1:2 liegt.

1.1.1.3 Prävalenz der CED

Würde man bei MC eine Inzidenz von $5/10^5$ zugrunde legen, müsste man rechnerisch eine Prävalenz von $180/10^5$ (= 0,2%) annehmen: man müsste also in Deutschland von bis zu 150 000 Crohn-Patienten ausgehen. Aktuelle deutsche Studiendaten sind im Vergleich dazu nicht plausibel, sie kommen auf eine etwa fünffach geringere Prävalenz, wobei auch hier von einer Untererfassung der prävalenten Fälle auszugehen ist.

Legt man die Daten der Essener Studie (138) zugrunde, würde man bei der CU von ca. 90 000 Patienten in Deutschland ausgehen.

1.1.1.4 Risikofaktoren

Es muss davon ausgegangen werden, dass CED multifaktoriell bedingte Erkrankungen sind, bei deren Manifestation also verschiedene begünstigende, prädisponierende, auslösende und krankheitsverstärkende Faktoren zusammenwirken. Mithilfe von Fall-Kontroll-Studien konnten folgende Risikofaktoren eruiert werden:

Ethnische Zugehörigkeit. CED treten bei Schwarzen in Südafrika im Vergleich zu Asiaten und Weißen erheblich seltener auf (146).

Stadt-Land-Gefälle. Der Verdacht, dass CED in städtischen Gebieten häufiger auftreten, konnte nicht verifiziert werden.

Diätfaktoren. Hier sind weiterhin keine sicheren Erkenntnisse zur Rolle bestimmter Faktoren zu verzeichnen. Beobachtungen von vermehrtem Zuckerkonsum als Risikofaktor (120) oder Früchten und Ballaststoffen als protektiver Faktor lassen sich nicht konsistent bestätigen (119).

Kindheitsfaktoren. Insbesondere bei MC, aber auch bei CU finden sich Hinweise, dass ein frühes Abstillen die spätere Entwicklung dieser Krankheiten

befördert (3) (22). Die Datenlage ist aber auch hier nicht einheitlich. Als ein weiterer Faktor werden frühkindliche Infektionen in Betracht gezogen. Immer wieder finden sich Hinweise, dass Patienten, die einen MC entwickeln, in ihrer Kindheit unter sehr guten sanitären Verhältnissen aufwuchsen (42), was in der „Sheltered-child-Hypothese“ Ausdruck findet. Die Datenlage ist auch hier inkonsistent (33). In einer weiteren großangelegten Studie (133) korrelierten Frühgeburtlichkeit, mütterliche Erkrankungen in der Schwangerschaft und kindliche Erkrankungen im ersten Lebensjahr mit der Entwicklung einer CED.

Rauchen. In mehreren prospektiven Kohortenstudien konnte nachgewiesen werden, dass Rauchen ein etwa doppeltes Erkrankungsrisiko für MC nach sich zieht (16) (22). Für die Entwicklung einer CU konnte allerdings ein deutlich vermindertes Erkrankungsrisiko gefunden werden. In der Metaanalyse von Calkins (s.o.) betrug die Odds Ratio (OR) für Raucher gegenüber Nichtrauchern 0.4.

Psychische Faktoren. Mehrere Studie zeigen, dass bestimmte Persönlichkeitsstrukturen die Ausprägung einer CED nicht begünstigen (34) (90).

1.1.1.5 Genetik der CED

Ein pathogenetisch zentraler Faktor bei CED ist die genetische Prädisposition, die vor allem Auswirkungen auf die Entstehung der Entzündungsreaktion bei MC hat. Sehr heterogene Therapieantworten lassen erhebliche Unterschiede in den primären Prozessen der Pathophysiologie – selbst bei klinisch kaum zu unterscheidenden Phänotypen – vermuten und sind der Grund für Annahme genetischer Ursachen (100) (85). Bei etwa 10% der Patienten findet sich eine familiäre Häufung der CED; Zwillingsstudien zeigen eine hohe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen von etwa 50-60%, bei dizygoten beträgt die Konkordanz nur etwa 4%. Epidemiologen gehen hier von einer polygenen Vererbung aus, wobei das genetische Risiko durch die additive Interaktion multipler Krankheitsgene zu entstehen scheint (105) (137). Diese Annahme wird durch molekulare Daten gestützt, beispielsweise den Nachweis multipler Kopplungsregionen. Kopplungsanalysen haben bei CED acht Regionen mit

hoher statistischer Wahrscheinlichkeit identifiziert, die am weitesten bestätigten Regionen wurden auf Chromosom 16 (16q12, IBD 1 oder CARD 15) (63) (25), Chromosom 12 (12p13.2-q24.1, IBD 2) (122), Chromosom 5 (5q31, IBD 5) (118) und Chromosom 6 (6q, IBD 3) (51) in verschiedenen Populationen gefunden.

1.1.2 Klinik und Pathophysiologie der CED

1.1.2.1 Klinik und Therapie

Die Tabelle 2 gibt einen kurzen Überblick über wesentliche Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild des MC und der CU, die im Folgenden bezüglich der Pathophysiologie und Immunologie genauer beschrieben werden.

DD	Colitis Ulcerosa	Morbus Crohn
Lokalisation	Kolon	gesamter GIT
Ileumbeteiligung	selten („backwash ileitis“)	bis 80%
Ausbreitung	kontinuierlich, konzentrisch proportioniert, Schleimhautniveau	diskontinuierlich, exzentrisch disproportioniert, transmural
Klinik	Rezidivierend blutig-schleimige Durchfälle	Rezidivierende Abdominalschmerzen, Durchfälle meist ohne Blut
Komplikationen	Tox. Megakolon, Blutungen	Fisteln, Abszesse, Stenosen
Endoskopie	Diffuse Rötung, Kontaktblutung, unscharf begrenzte Ulzerationen, Pseudopolypen	Aphtöse Läsionen, scharf begrenzte Ulzerationen, Stenosen, Fisteln, Pflastersteinrelief

Tab. 1 Klinik des MC und der CU

CED zeichnen sind durch rezidivierende Entzündungszustände des Darms aus, es sind jedoch auch chronisch aktive und therapierefraktäre Verläufe möglich. Bei der CU kommt es zu einem entzündlichen Befall des Mastdarms (Rektum) und des Dickdarms (Colon). Die Entzündung breitet sich kontinuierlich vom Rektum beginnend nach oralwärts aus, sie betrifft konzentrisch die gesamte Zirkumferenz des Darmlumens und sie ist proportioniert auf die

Darmschleimhaut (Mukosa) beschränkt. Klinisch treten hier die folgenden Symptome auf: Blutige Durchfälle (bis zu 40/d) sowie Eiter und Schleim im Stuhl. Der oft kontinuierliche Blutverlust hat in manchen Fällen eine Anämie zur Folge. Außerdem kann es zu dauerhaft schmerzhaftem Stuhldrang (Tenesmen) und zu kolikartigen Bauchschmerzen im linken Unterbauch kommen. Insgesamt führen diese Zustände zu einer Gewichtsabnahme, zu Müdigkeit und Leistungsverlust. Eine seltene Komplikation der CU ist das Toxische Megakolon. Selten kommt es bei CED im Sinne extraintestinaler Manifestationen zu einem Befall von Augen (Konjunktivitis, Iritis, Uveitis), Leber und Gallenwegen (Primär Sklerosierende Cholangitis), Bauchspeicheldrüse (Pankreatitis), von Knie- und Ileosakralgelenken (Arthralgien, Spondylarthropathien) sowie der Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum). Desweiteren ist das relative Risiko der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms vor allem bei langjähriger CU erhöht.

MC kann als chronische Entzündung im gesamten Magen-Darm-Trakt von der Mundhöhle bis zum After auftreten. Bevorzugt befallen sind der untere Dünndarm (terminales Ileum) und der Dickdarm (Colon), seltener die Speiseröhre (Ösophagus) und der Mund. Charakteristisch für MC ist der diskontinuierliche, d.h. der segmentale Befall der Darmschleimhaut, es können also gleichzeitig mehrere Darmabschnitte erkrankt sein, die durch gesunde Abschnitte voneinander getrennt sind. Weiterhin ist die Entzündungsausdehnung exzentrisch, sie umfasst also nicht die gesamte Zirkumferenz des Darmlumens, betrifft dafür aber disproportioniert alle Schichten des Darmrohrs. Leitsymptome beim MC sind wässrige Durchfälle und begleitende krampfartige Schmerzen, besonders im rechten Unterbauch. Blut- oder Schleimbeimengungen im Stuhl sind eher selten, infolge von Eiweißverlusten über den Darm kommt es aber auch zu Gewichtsverlusten. Weitere klinische Zeichen sind Fieber, Leukozytose und Anämie.

Komplikationen treten häufig in Form von Fisteln und Abszessen auf, es kann zu einem mechanischen Ileus oder auch zum Toxischen Megacolon kommen. Auch beim MC treten gelegentlich extraintestinale Manifestationen (s.o.) auf.

Aktuelle Daten legen nahe, dass eine Kolitis Crohn ein vergleichbares Risiko für die Ausbildung eines kolorektalen Karzinoms birgt wie die CU.

CED zeichnen sich klinisch typischerweise durch ihren schubartigen Verlauf aus (77). Danach folgt bei 18-22% der Patienten mit MC oder CU im Anschluss an die Erstmanifestation eine mehrjährige Remission.

Während eines beliebigen Jahres befinden sich etwa 50% der Patienten in stabiler Remission. Bei 20-30% ist die Erkrankung jeweils niedrig aktiv. Insgesamt ist der Verlauf bei MC etwas schwerer als bei CU. Für beide gilt jedoch, dass die Schubwahrscheinlichkeit mit andauernder Remission sinkt.

Eine kausale Behandlung dieser Erkrankungen ist bislang noch nicht möglich. Die Therapie besteht in der Verabreichung entzündungshemmender und / oder immunsuppressiver Medikamente. Mittel der Wahl stellen heute 5-Aminosalicylsäure-Präparate sowie bei schwereren Verlaufsformen Kortikosteroide, Azathioprin, Mercaptopurin und Cyclosporin dar. Bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit den genannten Wirkstoffen kommt es jedoch zu teilweise relevanten unerwünschten Nebenwirkungen. Auch die Anwendung der sogenannten Biologika wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) Antikörper (z.B. Remicade[®]) stellt nicht in allen Fällen ein wirksames Therapiekonzept dar, da es insbesondere nach längerer Behandlungsdauer zum Versagen der Therapie oder zu schweren allergischen Reaktionen kommen kann, so dass nicht selten der Abbruch der Therapie oder die chirurgische Entfernung erkrankter Darmregionen erforderlich ist.

1.1.2.2 Das intestinale Immunsystem

Natürliche Darmflora und Nahrung stellen schon unter physiologischen Bedingungen ein so großes Antigenreservoir dar, dass das intestinale Immunsystem zum Schutz des Organismus eine Hyporeaktivität aufweisen muss. Gleichzeitig muss es auf krankmachende Antigene im Darmlumen mit einer effektiven antikörper- und zellvermittelten lokalen Immunreaktion antworten. Diese Hyporeaktivität des Organismus ist dabei als eine aktive Hemmung zu verstehen, die durch komplexe Regulationsmechanismen des zellulären und humoralen Immunsystems zustande kommt.

Zentrale Aspekte der physiologischen Regulationsmechanismen des GALT.

Zu den im Darm auftretenden Entzündungszellpopulationen gehören unter anderen: CD4⁺-T-Helferzellpopulationen, zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, IgA-produzierende B-Zellen, Monozyten/Makrophagen und antigenpräsentierende Dendritische Zellen (DCs).

Strukturell und funktionell gliedert sich das intestinale Immunsystem in zwei Schenkel: einen afferenten Schenkel, der Antigene aufnimmt, prozessiert und präsentiert sowie einen efferenten Schenkel, über den die eigentliche reaktive Immunantwort abläuft.

Afferenter Schenkel. Mehr als die Hälfte aller lymphatischen Zellen und ca. 80% aller Immunglobulinproduzierenden Zellen des Körpers befinden sich im Darm. Die Peyer'schen Plaques enthalten spezialisierte epitheliale M-Zellen, die über den antigenpräsentierenden Zellen (APC) liegen. Ein germinales Zentrum aus T-Zellen befindet sich im Zentrum der Peyer'schen Plaques (139).

Antigene Makromoleküle und einige Viren, Bakterien und Protozoen werden zu den basal liegenden APCs (z.B. DCs) transportiert, die die Antigene prozessieren, auf ihrer Oberfläche präsentieren (113) und außerdem die Prägung der T-Helfer-Zellen kontrollieren. Sie steuern also die Induktion von Toleranz oder Immunität im intestinalen und im peripheren Immunsystem (12).

Efferenter Schenkel. Teile der über den afferenten Schenkel stimulierten B- und T-Zellen kehren in die Lamina propria zurück (homing). Intestinale B-Zellen sind in der Lage, sich zu Plasmazellen zu differenzieren und antigenspezifische Immunglobuline (v.a. IgA) zu produzieren. IgA bildet dann mit Antigenen im Darmlumen einen Komplex, der *keine* Aktivierung des Komplementsystems oder von Entzündungszellen nach sich zieht.

Th1/Th2-Polarisierung. Eine Schlüsselkomponente in der Immunantwort ist die Aktivierung von T-Lymphozyten, die sich gleichzeitig in funktionell unterschiedliche Subgruppen differenzieren. Anhand der sezernierten Zytokine unterscheidet man T-Helfer-1 (Th1)-Zellen (Produktion von Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , Interleukin-2 (IL-2) und anderen) von T-Helfer-2-(Th2)-Zellen (Produktion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 u.a.). Bei einer geringen luminalen Lipopolysaccharid- (LPS) oder Antigenkonzentration beispielsweise folgt eine

Anergie der T-Zellen im Sinne einer aktiven Hemmung (106). Die Zytokine wie IL-4 und IL-12 sind von entscheidender Wichtigkeit bei der Polarisierung der T-Helferzellen (91) (56). In der Summe ergibt dieses komplexe Wechselspiel eine physiologische Th2-Dominanz des Lokalmilieus.

1.1.2.3 Immunologie der CED

CED sind das Ergebnis eines Zusammenspiels von genetischen Suszeptibilitätsfaktoren, Umweltfaktoren wie bakteriellen Antigenen, Veränderungen der Darmflora und einer fehlerhaften Regulation des intestinalen Immunsystems (38). Bei MC kommt es zu einer stark Th1-Zytokin-vermittelten chronischen Entzündung, wobei man davon ausgeht, dass genetische Prädisposition und relevante bakterielle Antigene heterogen sind und die Aktivierung des mukosalen Immunsystems dabei wahrscheinlich eine gemeinsame Endstrecke der Pathogenese ist. Bei CU sind autoimmunologische Aspekte und Umweltfaktoren in den Vordergrund getreten.

Drei pathogenetische Phasen lassen sich bei CED erkennen: im ersten Schritt aktivieren unbekannte Auslöser lymphatische Zellen in der Darmwand, es kommt zweitens zur Bildung von Entzündungsmediatoren und in einem letzten Schritt folgt die lokale Gewebsschädigung mit Erosionen und Ulzerationen (8). Durch die Aktivierung des intestinalen Immunsystems kommt es zu einer massiven Infiltration von Monozyten und Makrophagen, die proinflammatorische Mediatoren wie Proteasen, Arachidonsäure-Metabolite und vor allem reaktive Sauerstoffspezies (ROS; wie beispielsweise Superoxid-Anionen, Hydrogen Peroxid und hypochlorige Säure) sezernieren (71).

Makrophagen sind außerdem antigenpräsentierende Zellen und stimulieren durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α die T-Zellaktivität. Bei Patienten mit CU konnten vermehrt IL-1, IL-6 und IL-8 in entzündeten Darmabschnitten im Vergleich zu gesunden Darmsegmenten gefunden werden. Wichtig für die Auslösung der Entzündung bei MC und CU ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B (124), der als Transkriptionsfaktor in nicht aktivierten Makrophagen und T-Zellen im Zellkern die Transkription verschiedener

proinflammatorischer Gene wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-12 initiiert. NF- κ B ist der Ansatzpunkt vieler etablierter Therapien mit Salicylaten, Kortikosteroiden (150) (10). Desweiteren hemmt NF- κ B höchstwahrscheinlich die T-Zell-Apoptose, es kommt zu einer Veränderung des T-Zell-Phänotyps. Statt einer aktiven Suppression und erhöhter Apoptoserate kommt es im Darm zu einer verstärkten T-Zell-Aktivität.

Deutliche Unterschiede im Zytokinmuster der einwandernden T-Zellen treten zwischen MC und CU zutage. Beim MC produzieren die T-Zellen v.a. die proinflammatorischen Th1-Zytokine TNF- α und IFN- γ (41) (108), weniger dagegen die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5. Bei der CU ist die Produktion von IFN- γ nicht erhöht, dagegen aber die von IL-5. Man geht daher davon aus, dass der MC eine Th1-vermittelte Erkrankung ist. Die Einordnung der CU als Th-2 vermittelt ist bis heute nicht gelungen, da das Th-2-Zytokin IL-4 bei CU vermindert ist.

1.1.2.3.1 Rolle der Zytokine

IL-6. Das Paradigma der Th-1/Th-2-Differenzierung wird durch Forschungsdaten zur Rolle des IL-6 eingeschränkt, das bisher als Th-2-Zytokin galt. T-Lymphozyten der Lamina propria von Patienten mit MC und CU sezernieren gleichermaßen sehr viel mehr IL-6 als die von Kontrollpatienten (9). Bei beiden Krankheitsbildern führt dies zur Aktivierung des Signaltransduktionsfaktors STAT-3, der eine Reihe antiapoptotischer Gene (*bcl2*, *bcl-xl*) aktiviert.

TNF- α . TNF- α liegt in einer membrangebundenen (m-TNF) und in einer löslichen (s-TNF) Form vor. Aus folgenden Gründen kommt TNF- α beim MC eine wichtige Rolle in der Pathogenese zu (62): per positivem Rückkoppelungsmechanismus regt die Sekretion von TNF- α durch Lamina propria T-Lymphozyten dessen eigene Produktion an, TNF- α aktiviert des weiteren endogene, das Darmepithel schädigende Matrix-Metalloproteinasen und führt zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, VCAM-1 und E-Selectin).

1.1.2.4 Die intestinale Barriere

Der Gastrointestinaltrakt ist von einer dünnen Epithelschicht überzogen, die Darmlumen von intestinaler Mukosa trennt. Diese sogenannte intestinale Barriere setzt sich also aus intestinalen Epithelzellen und den interzellulären Verbindungskomplexen [Tight Junctions (TJ) (23), Adherens Junctions (AJ) und Desmosomen] zusammen. Des weiteren übernehmen intestinale Epithelzellen wichtige, v.a. parazelluläre Transportfunktionen für Nährstoffe, Flüssigkeiten und Ionen. Die M-Zellen, epitheliale Zellen im Bereich des organisierten GALT, nehmen Makromoleküle und Mikroorganismen kontrolliert auf; das intestinale Epithel reguliert immunologische Prozesse der Mukosa, indem es immunologisch wirksame Mediatoren produziert.

Die Permeabilität zwischen den Zellen wird durch interzelluläre Verbindungsproteine gesteuert. Die lateral angeordneten Tight Junctions stellen eine Barriere für die freie Diffusion löslicher Substanzen dar, die die semipermeable epitheliale Barriere ansonsten parazellulär überwinden würden (43). An der intestinalen Barriere sind ebenfalls epitheliale Sekretionsprodukte beteiligt. Dies sind im Wesentlichen Muzine, antimikrobiell wirkende Defensine und sekretorische Antikörper vom Typ IgA (76).

Weiterhin informieren die intestinalen Epithelzellen das mukosale Immunsystem kontinuierlich über das externe Milieu. Die Epithelzellen nehmen Kontakt mit enteropathogenen Mikroorganismen auf und sezernieren daraufhin Immunmediatoren, was zu einer kontrollierten Stimulation des intestinalen Immunsystems im Sinne einer aktiven Hemmung über regulatorische Zytokine und Faktoren wie TGF- β führt. Dies kann als Versuch der antiinflammatorischen Gegenregulation verstanden werden (20).

1.1.2.5 Intestinale Berrierestörung bei CED

Bei Patienten mit CED kommt es durch die Schädigung der Epithelzellen - nicht zuletzt durch das verstärkte Anfluten reaktiver Sauerstoffspezies - zu einem Zusammenbruch der intestinalen Barriere. Intestinale diarrhoeische

Erkrankungen können die Barrierefunktion durch die Einwirkung entzündlicher oder chemischer Mediatoren auf die interzellulären Verbindungsproteine grundsätzlich schwächen. Durch die gesteigerte Durchlässigkeit für Antigene und Mikroorganismen kommt es zu einer vermehrten Transmigration und Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Epithelschicht: histologische Präparate von CED-Patienten werden in diesem Fall als aktiv entzündlich bezeichnet, ein sogenannter Kryptenabszess entsteht. Neutrophile Granulozyten durchwandern hier in großer Zahl das intestinale Epithel und migrieren in das intestinale Lumen, wobei es zwangsläufig zu einer Öffnung der TJ kommt. Üblicherweise korreliert der Grad der Neutrophileninfiltration in das intestinale Epithel gut mit der Krankheitsaktivität bei CED (60) (125). Des Weiteren konnten einige Zytokine identifiziert werden, die eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse bezüglich der Permeabilität der TJ regulieren. Zu den wichtigsten bisher untersuchten Zytokinen zählen IFN- γ und TNF- α , die zu einem Abfall des epithelialen Widerstands, einer Umverteilung von TJ-Proteinen und einer Induktion einer epithelialen Apoptose führen könnten (101).

1.1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und CED

1.1.3.1 Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies

Im Sauerstoffmetabolismus des Körpers entstehen physiologischerweise ständig Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die aufgrund ungepaarter Elektronen in ihrer Elektronenhülle hoch reaktionsfreudige Moleküle darstellen (115). Aufgrund der intestinalen Mikroflora, Diätfaktoren, der großen Kontaktfläche der Darmoberfläche zur Außenwelt und der ständigen Präsenz vieler Immunzellen ist der Darm einer der wichtigsten Körperstellen der Produktion und des Eintritts von ROS (67). Einige Studien konnten aufzeigen, dass periphere Blutmonozyten (69) sowie isolierte intestinale Makrophagen von Patienten mit CED größere Mengen an freien Radikalen bilden.

Da der Körper praktisch dauerhaft schädigenden ROS ausgesetzt ist, finden sich in der intestinalen Mukosa endogene Mechanismen, die einen antioxidativen Schutz bieten: Enzyme wie Superoxid Dismutasen (SOD), Katalasen (CAT), Glutathion Peroxidasen (GPO) oder Antioxidanzien wie Vitamin C oder Vitamin E (130) schützen vor freien Radikalen. Auf CED bezogen zeigt sich in diesem Zusammenhang beispielsweise, dass ein Defekt im GPO-Gen bei Mäusen zu Symptomen und dem pathologischen Bild einer CED führt (35).

Die körpereigene Schutzfunktion gegen freie Radikale ist jedoch nicht in jeder Situation ausreichend: Durch eine gesteigerte Produktion und verminderte Detoxifikation mit konsekutiver Erhöhung der Menge freier Radikale im Gewebe (46) (114) werden lokale Entzündungsreaktionen in Gang gesetzt, es kommt beispielsweise zu einem verstärkten Ablesen unterschiedlicher am Entzündungsprozess beteiligter Gene (13). Gleichzeitig potenzieren freie Radikale die Immunantwort, indem sie periphere neutrophile Granulozyten und Makrophagen ins intestinale Entzündungsgebiet locken (23). Dies führt zum Teufelskreis einer zusätzlichen Radikalproduktion und folgenden oxidativen Schäden wie Depolymerisierung von Hyaluronsäuren und Kollagenen, Lipidperoxidation etc. (27). Desweiteren schädigen große Mengen an ROS zelluläre Proteine (111), Lipide (49), das Zytoskelett (11), die DNA (147) und es kommt letztendlich zu einer Zerstörung der intestinalen Barriere mit einem Permeabilitätsverlust (112). So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit MC in Remission sowie 40% ihrer Verwandten ersten Grades eine erhöhte intestinale Permeabilität aufweisen – selbst wenn kein aktuelles Entzündungsgeschehen vorliegt (39) (15).

Die vermehrte Produktion von ROS und eine gleichzeitig verminderte antioxidative Kapazität des Körpers führt zu starkem oxidativen Stress (48), dies scheint einer der wichtigsten Pathomechanismen bei CED zu sein (110). Immunhistochemische Analysen von Gewebeproben der Kolonmukosa von Patienten mit CU (131) als auch von Gewebeproben aus CU-Tiermodellen (47) zeigen erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies in den betroffenen Darmabschnitten im aktiven Krankheitsstadium. Einen weiteren Hinweis für den

Zusammenhang zwischen ROS und CED ergibt der klinische Umstand, dass bis Anfang der 1980er Jahre Einläufe mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bei Patienten mit Verstopfung verschrieben wurden: Fallberichte über das konsekutive Auftreten von Kolitiden führte dazu, dass man diese Therapieform verließ (87) (14).

1.2 Grüner Tee

1.2.1 Botanik

1.2.1.1 Systematik

Die Teepflanze, *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (syn. *Thea sinensis* L.) gehört zur Familie der Teestrauchgewächse (Theaceae). Teestrauchgewächse gehören der Ordnung der Heidekrautartigen (Ericales) an, Unterklasse Asternähnliche (Asterales), Klasse der Dreifurchenpollen- Zweikeimblättrige (Rosopsida).

Als *Thea sinensis* wurde sie erstmals im Jahre 1753 von Carl von Linné (*23.5.1707, †10.1.1778; offizielles botanisches Autorenkürzel lautet „L.“) wissenschaftlich in „Species Plantarum, 1753“ benannt und von Carl Ernst Otto Kuntze (*23.6.1843, †1907; offizielles botanisches Autorenkürzel lautet „Kuntze“ oder „O.Kuntze“) 1887 in die Gattung *Camellia* eingeordnet („Trudy Imperatorskago S.-Peterburgskago Botaničeskago, 1887“).

1.2.1.2 Verbreitungsgebiet

Die Teepflanze wächst als bis zu sieben Meter hoher Baum, wird in Kultur aber als Strauch gezogen. Sie weist elliptische, gezähnte, bis zu 10 cm lange Blätter auf und blüht mit weißen Blüten, die bis zu 3 cm groß werden können.

Das Verbreitungsgebiet der Teepflanze umfasst die Hochlagen in den Tropen und Subtropen. Es erstreckt sich über den Süden Japans, die Südhälfte Chinas bis nach Nordostindien und südlich weiter über Thailand und Vietnam.

Kultiviert werden die Teepflanzen in den bekannten Anbaugeländern wie Japan, Darjeeling in Nordostindien, Assam in Nordindien und Ceylon auf Sri Lanka (123).

1.2.1.3 Kultureller Anbau

Zwei Varianten umfasst die traditionelle Kultivierung der Teepflanze:

- *Camellia sinensis* var. *sinensis* als strauchwüchsige, kleinblättrige, kälteresistente Hochlandform in China und Darjeeling
- *Camellia sinensis* var. *assamica* als eher schnellwüchsige, großblättrige, baumförmige Form im übrigen Indien und in Sri Lanka (5).



Abb. 1 *Camellia sinensis* var. *japonica*

1.2.2 Die Teeproduktion

Laut den Leitsätzen der deutschen Lebensmittelbuchkommission werden zur Teeherstellung die Blätter, Blattknospen und zarten Stiele von *Camellia sinensis* (L.) Kuntze benutzt. Aus den Blättern derselben Pflanze kann sowohl Schwarzer, Grüner wie auch Weißer Tee hergestellt werden. Der grundlegende Unterschied zwischen Grünem und Schwarzem Tee besteht im so genannten

Fermentationsprozess, der eigentlich nur die Lagerung des Blattes an der Luft umschreibt und keine mikrobielle Komponente enthält.

1.2.2.1 Der Verarbeitungsprozess

Welken. Die frischgepflückten Teeblätter werden für etwa 24 Stunden auf Welktrögen ausgebreitet und verlieren so ca. 30% ihrer Feuchtigkeit. Der Grad der Welkung wirkt sich umgekehrt proportional auf den Grad der später erzielbaren Oxidation aus.

Rollen. Die Blätter werden mithilfe einer schweren Walze überrollt, sodass die Zellen in den Blättern aufbrechen und die Zellsäfte und ätherischen Öle freigesetzt werden. Diese treten mit dem Luftsauerstoff in Verbindung, der Prozess der Fermentation beginnt und die ätherischen Öle entwickeln sich. Durch das Oxidieren ändert sich die grüne Blattfarbe zu einem bräunlichen Kupferrot.

Fermentieren (Aeration). Bis zu fünf Stunden lang wird der Tee hier Temperaturen von 20-25°C bei hoher Luftfeuchtigkeit von über 90% ausgesetzt. Ein Oxidationsvorgang beginnt, der eine Farb- und Aromenänderung nach sich zieht. Dafür verantwortlich sind blatteigene Enzyme (Polyphenoloxidase, Peroxidase), die die in den Teeblättern enthaltenen Polyphenole oxidieren: der Tee verliert seinen hohen Gehalt an Gerbsäuren und damit den bitteren Geschmack.

In diesem Verarbeitungsschritt liegt der Hauptunterschied zwischen Grünem und Schwarzem Tee. Grüner Tee wird primär nicht gewelkt, sondern direkt gedämpft, wodurch die zur Oxidation benötigten Enzyme inaktiviert werden. Maßgeblich ist, dass Grüner Tee erst gar keinem Fermentationsprozess unterzogen wird und damit ein Großteil der Inhaltsstoffe in der chemisch ursprünglichen Form vorliegt.

Trocknen. Die Fermentation wird unterbrochen, indem die Blätter für etwa 20 Minuten mit 90-95 Grad heißer Luft getrocknet werden, was die Feuchtigkeit der Blätter auf 6% reduziert (149).

1.2.3 Teeformen und Inhaltsstoffe

1.2.3.1 Teeformen

In der heutigen Produktion finden sich vier traditionelle Formen, die sich vor allem im Grad der Fermentation unterscheiden:

Grüner Tee. Hier kommt es zu keiner gewollten Fermentation. Bei der traditionellen Herstellung wird der Tee nach der Ernte primär in Eisenpfannen über dem Feuer gedämpft oder getrocknet.

Oolong Tee. Hier kommt es zu einer teilweisen Fermentation. Nach der Ernte wird der Tee in Weidenkörben geschüttelt, der austretende Zellsaft reagiert mit dem Sauerstoff der Luft, dieser Prozess wird durch das Erhitzen in Eisenpfannen gestoppt.

Weißer Tee. Hat seinen Namen von den Epillarhärchen der Blattunterseite, die den getrockneten Teeblättern eine weiß-goldene Farbe geben. Auch hier kommt es zu keiner gewollten Fermentation. Junge Triebe werden geerntet und wie Heu getrocknet.

Schwarzer Tee. Dieser Tee zeichnet sich durch eine vollständige Fermentation aus (65).

1.2.3.2 Inhaltsstoffe

Die für diese Studie interessanten Inhaltsstoffe des Grünen Tees sind sekundäre Pflanzenstoffe, hauptsächlich Polyphenole. Zu den Polyphenolen im Tee zählen Gerbstoffe (Tannine), Catechine (Epicatechin (EC), Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechingallat (EGCG)), Flavonoglycoside (Rutin), Theaflavine und Thearubigine.

Flavonoide. Grüner Tee hat einen hohen Gehalt an Flavonoiden. Bei Grünem Tee kann man die Hauptkomponenten (Catechine, z. B. Epigallocatechingallat) bestimmen, die in der Summe 10–20 Prozent der Flavonoide ausmachen. Im Tee sind auch größere Mengen an Flavonolen enthalten, in der Summe etwa ein bis zwei Prozent (144). Flavonoide wurden in den 1930er Jahren durch den Nobelpreisträger Albert von Szent-Györgyi Nagrapolt (*16.9.1893,

†22.10.1986) entdeckt und gehören zu den Polyphenolen. Die laut Deutscher Gesellschaft für Ernährung über 6500 bekannten Flavonoide sind eine Gruppe von sekundären Pflanzenstoffen, d.h. Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels (53). Im pflanzlichen Stoffwechsel sorgen sie beispielsweise für die Abwehr von Pathogenen (Cannabinoide) oder den Schutz vor UV-Strahlung und Starklicht (Flavonoide) (52).

1.2.3.3 Molekularer Aufbau der Flavonoide

Flavonoide bestehen grundsätzlich aus 3 Kohlenstoffringen mit 2 oder mehr aromatischen Ringen (A und B), die jeweils ein aromatisches Hydroxyl aufweisen und über eine Kohlenstoffbindung verbunden sind. Bei Flavonoiden besteht diese Bindung aus drei C-Atomen, die mit einem Sauerstoffatom und zwei C-Atomen von einem der aromatischen Ringe (A Ring) verbunden sind und einen Ring mit 6 Atomen bilden. Bei Flavonoiden besteht diese Bindung aus drei C-Atomen und einem O-heterozyklischen Ring (1).

Anhand unterschiedlicher Bindungen zwischen dem aromatischen und dem O-heterozyklischen Ring, des Oxidationsstatus und der funktionellen Gruppen am heterozyklischen Ring können die Flavonoide in 6 Gruppen eingeteilt werden.

Tabelle 2 zeigt die Untergruppen der Flavonoide aufsteigend nach der Oxidationsstufe und anhand anderer wichtiger Unterscheidungsmerkmale (54). Innerhalb der Untergruppen können Flavonoide und Isoflavone über Hydroxylierungs- und Konjugationsmuster des B-Rings und über Konjugationsmuster der Hydroxylgruppen des A- und C-Rings unterschieden werden.

Flavonoid- Unterklasse	Position des B- Rings am C-Ring	C-Ring, ungesättigt	C-Ring, funktionelle Gruppen	Bekannte Nahrungsmittel- flavonoide	Nahrungs- mittel- quellen
Flavanole	2	Keine	3-Hydroxy 3-O-gallat	(+)-Catechin (C) (+)-Gallocatechin (GC) (-)-Epicatechin (EC) (-)-Epigallocatechin (EGC) (-)-Epicatechin-3- gallat (ECG) (-)- Epigallocatechin-3- gallat(EGCG)	Tee, Rotwein, Grapefruit
Flavanone	2	Keine	4-Oxo	Eriodictyol Hesperetin Naringenin	Zitrus- früchte
Flavone	2	2-3 Doppel- bindung	4-Oxo	Apigenin Luteolin	Grüne Kräuter, z.B. Petersilie
Isoflavone	3	2-3 Doppel- bindung	4-Oxo	Daidzein Genistein Glycitein Biochanin A	Soja- bohnen & Hülsen- früchte
Flavonole	2	2-3 Doppel- bindung	3-Hydroxy, 4-Oxo	Isorhamnetin Kaempferol Myricetin Quercetin	Ubiquitär in Nahrungs- mitteln
Anthocyanidine	2	1-2, 3-4 Doppel- bindungen	3-Hydroxy	Cyanidin Delphinidin Malvidin Pelargonidin Petunidin Peonidin	Rote und blaue Beeren

Tab. 2 Flavonoid-Unterklassen und deren Unterscheidungsmerkmale aus Haslam, E., 1998 (55).

Zur besseren Übersichtlichkeit sind in Abbildung 2a die Molekularstrukturen der Flavonoiduntergruppen dargestellt, Abbildung 2b zeigt die Molekularstruktur des Epigallocatechin-3-gallat (EGCG).

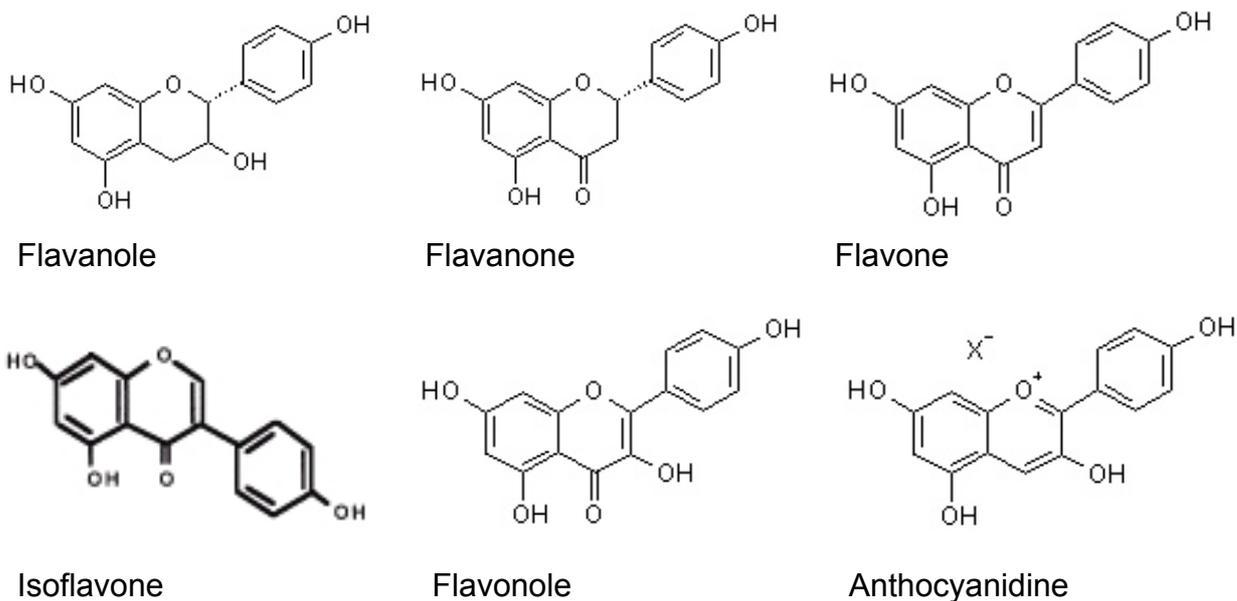


Abb. 2a Molekularstruktur der Untergruppen der Flavonoide. Bezüglich der strukturellen Unterschiede am Grundgerüst s. Tab. 2.

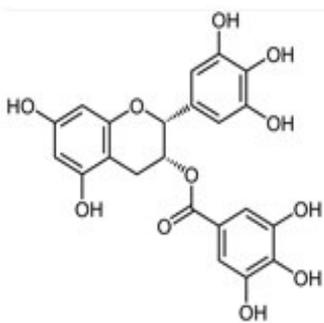


Abb. 2b Molekularstruktur des EGCG. Das Grundgerüst aller Flavonoide aus zwei aromatischen Ringen und einem O-heterozyklischen Ring wird hier durch einen dritten aromatischen Ring erweitert. Wichtig für die ausgeprägten antioxidativen Eigenschaften des EGCG sind die Hydroxygruppen am B- und am D-Ring.

1.2.3.4 Flavonidkonzentrationen im Tee

Die folgende Tabelle 3 listet auf, welche Konzentrationen an Flavonoiden bei unterschiedlichen Teesorten im Tee zu finden sind. Legt man diese Konzentrationsangaben zugrunde, nimmt man mit einer Tasse Grünem Tee also etwa 100-150 mg EGCG zu sich. Würde man die in vorliegenden Mäusversuchen (Gewicht ca. 20 g) verabreichten Mengen an EGCG (s.u.) auf

einen Menschen (Gewicht ca. 75 kg) übertragen, müsste dieser ca. 3 - 3.5 Tassen Grünen Tee pro Tag trinken, um eine vergleichbare Menge EGCG zu sich zu nehmen.

Teesorte	Inhalt in zubereitetem Tee mg/100 ml ¹		
	Flavonole ² insgesamt	Flavan-3-ole ³ insgesamt	Thearubigine ⁴
Grün, aufgegossen	5.2	132.1	1.1
Grün, aufgegossen, entkoffeiniert	4.8	55.8	8.8
Schwarz, aufgegossen	3.9	34.3	73.4
Schwarz, aufgegossen, entkoffeiniert	4.4	2.7	49.0
Schwarz, Fertiggetränk	2.3	2.1	25.5

¹Daten vom USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Daten wurden nur für illustrative Zwecke bereitgestellt, statistische Vergleiche sind nicht vorgesehen, da die Daten aus verschiedenen Experimententypen zusammengestellt wurden.

²Summation der Konzentrationen an Kaempferol, Myricetin und Quercetin.

³Summation der Konzentrationen an (–)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epicatechin-3-gallat, (–)-epigallocatechin, (–)-epigallocatechin-3-gallat und (–)-gallocatechin. In Teesorten mit maßgeblicher totaler Flavan-3-ol Konzentration (30 mg/ml) ist (–)-epigallocatechin-3-gallat das am häufigsten auftretende Flavanol.

⁴Thearubiginkonzentration auf der Basis von Gallussäure.

Tab. 3 Flavonoidkonzentrationen in verschiedenen Teesorten

1.2.4 Grüner Tee und CED

Die gesundheitsförderlichen Effekte von *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE werden ihren polyphenolischen Inhaltsstoffen zugeschrieben, insbesondere den Flavonoiden. Die Hauptquelle für Flavonoide, Catechine, haben einen Anteil von 30% am Trockengewicht der Teeblätter des Grünen Tees (44). Von den zahlreichen polyphenolischen Catechinen stellt das Epicatechin (2R,3R)-2-

(3,4,5- Trihydroxyphenyl)- 3,4-dihydro- 1(2H)-benzopyran- 3,5,7-triol- 3-(3,4,5-trihydroxybenzoat), genannt (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) den Hauptanteil mit ca. 50-80%. Viele Versuchsreihen der letzten Jahre zeigen die gesundheitsförderlichen Effekte des EGCG, Summenformel $C_{22}H_{18}O_{11}$, bei einer Vielzahl chronischer Erkrankungen und Krebserkrankungen.

Epidemiologische Studien zeigen bezüglich der antikanzinogenen Wirkung von Catechinen inkonsistente Ergebnisse. Einige Studien zeigen eine reduzierte Inzidenz und Rezidivrate (40), die mit dem Konsum von Grünem Tee assoziiert ist, andere Studien können keine Effekte nachweisen (148), was unter anderem in Unterschieden von Menschen und Tieren bezüglich der Pharmakokinetik von Catechinen begründet sein kann. Eindeutig antikanzerogene Wirkungen zeigen tierexperimentelle Studien, in denen die Verabreichung von Grünem Tee, Grüntee-Extrakt oder EGCG die Tumorbildung und das Tumorwachstum von Tumoren des Gastrointestinaltrakts, der Lunge, der Brust, der Prostata und der Haut signifikant reduzierte (24) (19). Desweiteren konnten Studien zeigen, dass EGCG die Angiogenese und die Mutagenese bei Krebserkrankungen vermindern kann (143) und molekulare Signalwege des Tumorzellzyklus, der Angiogenese, der Metastasierung und der wachsumsfaktorabhängigen Proliferation hindert (75) (4).

Catechine zeichnen sich außerdem durch ihre antioxidativen und ihre antiinflammatorischen Eigenschaften aus, die in *in vitro*- (7) und in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden konnten (142). Die antiinflammatorischen Eigenschaften werden vor allem damit erklärt, dass EGCG die Aktivität des NF- κ B unterdrückt (s.o.), was zu einer verringerten Expression proinflammatorischer Gene im Entzündungsgeschehen führt. Catechine weisen ein deutlich höheres antioxidatives Potential auf als beispielsweise andere bekannte Antioxidantien wie die Vitamine E oder C (116). Durch die Aktivierung von Enzymen des körpereigenen antioxidativen "Schutzsystems" vor ROS, das Enzyme wie Superoxiddismutasen oder Katalasen umfasst, können Catechine Körperzellen vor Schäden durch Oxidanzien schützen (132). Die antioxidative und ROS-reduzierende Aktivität des EGCG, die *in vitro* und *in vivo* (58) (126) gezeigt werden konnte, wird auf

die chemischen Eigenschaften der phenolischen Hydroxylgruppen an den B- und D- aromatischen Ringen des Catechinmoleküls zurückgeführt (97).

EGCG beeinträchtigt einzelne Schritte der Entzündungskaskade, beispielsweise unterbindet es die Sekretion des TNF- α , IL-6 und IL-8, indem es extrazelluläre signalregulierte Kinasen (ERK) und NF- κ B in humanen Mastzelllinien (HMC-1) abschwächt (128). Darüberhinaus beeinflusst EGCG einige wichtige Signalwege der Entzündungsentstehung, wie beispielsweise Aktivator Protein 1 (AP-1) oder die Synthese von Eicosanoiden. Es vermindert die Produktion von Chemokinen intestinaler Epithelzellen, wie dem von Makrophagen produzierten Inflammatory Protein-3 α (MIP-3 α) und Prostaglandin E2 (PGE2) (109).

Leider zeichnet sich EGCG durch eine recht geringe Bioverfügbarkeit und eine signifikante Biotransformation aus, weshalb die genannten Eigenschaften im ersten Moment nur eine geringe Ausprägung haben (37). Ein ausgeprägter Leber-, Dünndarm- und Dickdarmmetabolismus führt zu glukuronidierten, sulfatierten (141) (72) und methylierten (81) (104) Konjugaten. Die gesamte Bioverfügbarkeit des EGCG wird in Mausmodellen mit ungefähr 26.5% angegeben (74).

Die gleichzeitige Verabreichung einer zweiten pflanzlichen Komponente, (2E, 4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one, genannt Piperin, bei der es sich um ein Alkaloid des Schwarzen Pfeffers, *Piper nigrum* (L.) (Gattung: Piper, Unterfamilie: Piperioideae, Familie: Piperaceae) handelt, führt zu einer Reduktion der Dünndarmglukuronidierung um etwa 40 bis 60 % und zu einer Verlangsamung der gastrointestinalen Transitzeit (73). Dies zieht im Vergleich zu Mäusen, die allein mit EGCG behandelt wurden, eine 1.7fach erhöhte Gewebekonzentration von EGCG im Gastrointestinaltrakt nach sich.

1.3 Frage- und Problemstellung

Zahlreiche Studien haben die antioxidativen und antientzündlichen Wirkeigenschaften des Grüntee-Catechins Epigallocatechin-3-Gallat gezeigt. Bezüglich der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen geht

man davon aus, dass reaktive Sauerstoffspezies einen prokolitogenen, wahrscheinlich sogar initialen Effekt haben. Ihr verstärktes Auftreten während einer Kolitis führt zu einer Verstärkung von Entzündungsprozessen, zu Zell- und DNA-Schäden. Bisher wurden die anti-entzündlichen und antioxidativen Effekte des EGCG nicht am DSS-Mausmodell getestet, das durchaus in der Lage ist, ein Teil der komplizierten Pathologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu imitieren. Von besonderem Interesse war bei dieser Arbeit, ob EGCG seine Wirkungen nach einer oralen Verabreichung entfalten kann. Eine weitere wichtige Frage nach der Bioverfügbarkeit des EGCG und die Frage, ob ein Alkaloid des schwarzen Pfeffers, Piperin, diese erhöhen kann, sollte im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden. Kriterien zur Wirksamkeitsprüfung dieser Kombination waren - im Vergleich zu Mäusen, die nur mit EGCG allein oder Wasser behandelt wurden - klinische Parameter wie Gewichtsverlauf und Überleben sowie histologische Darmschäden, die Zytokine TNF- α und IL-6, Malondialdehyd, Myeloperoxidase, die Aktivität antioxidativer Enzyme wie SOD und GPO und die Expression von Genen des Sauerstoffmetabolismus.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

<i>Chemikalien / Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cleland´s Reagenz (Dithiothreitol – DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DEPC – Wasser (Diethyl Pyrocarbonat)	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Desoxyribonuclease I Reaktionspuffer 10x	Invitrogen - Karlsruhe
4',6-Diamidine-2'-phenylindoldihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Dextransodiumsulfat (DSS)	MP Biomedicals, Illkirch, France
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	Qiagen, Hilden
Dulbecco´s PBS (phosphatgepufferte Cambrex Salzlsg.) mit bzw. ohne Calcium/ Magnesium	Bio Science, Verviers, Belgien
EGCG (99.7% rein)	AXXORA, Lörrach

Enzyme immunoassay kits: TNF- α , IL-6	BD Biosciences, Heidelberg
Eosin	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Merck, Darmstadt
Hämatoxylinlösung	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Hepes	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Isopentan (2- Methylbutan)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ketanest	Pfiser, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Invitrogen - Karlsruhe
n-Butanol	Roth, Karlsruhe
Na-Bicarbonat	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Na-Carbonat	Merck, Darmstadt
Na-dihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Na-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Na-Pyruvat	Merck, Darmstadt
O.C.T. Tissue Tek compound	Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
Oligo-dT Primer	Invitrogen, Karlsruhe
O – Phenylenediamine	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
PCR – Puffer 10x	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lonza, Belgien
Penicillin	Lonza, Belgien
Perhydrol 30% H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
Piperin (98% rein)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Pyridin	Sigma – Aldrich, Deisenhofen

RPMI 1640 Medium	Cambrex and Lonza, Verviers, Belgien
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Air Liquide, Düsseldorf
Streptavidin Alexa Flour 546	Molecular Probes, Luiden, NL
Streptomycin	Lonza, Belgien
SYBR Green I™ Mastermix	Molecular Probes, Eugene, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Trinitrobenzol (TNB)	PerkinElmer, Boston, USA
Thiobabitorsäure (TBA)	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
TNB Blocking Puffer	PerkinElmer, Zaventem, Belgium
Triton X-100	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
TRIzol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma - Aldrich, Deisenhofen
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vitro – Clud	R. Langenbrinck, Teningen
Wasserstoffperoxid	Sigma – Aldrich, Deisenhofen
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien wurden in p.a. Qualität eingesetzt (soweit nicht anders angegeben). Alle Chemikalien, die nicht aufgeführt wurden, wurden von der Firma Sigma in p.a. Qualität erworben.

2.1.2 Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
Anti-Glutathion Peroxidase 1-Ak (aus Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK
Anti- SOD1-Ak (aus Kaninchen)	Abcam, Cambridge, UK

Anti-Kaninchen-Ak (aus Ziege), biotinkonjugiert	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
Anti-Maus-IL6 (monoklonaler Antikörper), s. Elisa kit	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus-IL6 (monoklonaler Antikörper), biotinkonjugiert, s. Elisa kit	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus-TNF- α (monoklonaler Antikörper) s. Elisa kit	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus-TNF- α (monoklonaler Antikörper), biotinkonjugiert, s. Elisa kit	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-horseradish peroxidase, HRP, konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin Alexa Flour 546 conjugat	Molecular Probes, Luiden, NL

2.1.3 Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Hersteller</i>
Desoxyribonuklease I	Stratagene, La Jolla, USA
RNase	Promega, Mannheim
SuperScript™ II RNase H-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Lösungen

Methylenblau- Lösung

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Methylenblau	1 g
Borsäure	2 g
Aqua dest. ad	100 ml

Phosphate Buffered Saline (PBS)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Phosphate Buffered Saline (PBS)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
NaCl	80.0 g
Na ₂ HPO ₄	11.6 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
KCl	2.0 g
ad 10000 ml, pH 7.0 einstellen	

Coating Puffer für IL-6 für Elisa

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Karbonat	0.1 M pH 9.5
NaHCO ₃	8.4 g
Na ₂ CO ₃	3.56 g
ad 1000ml, pH 9.5	

Coating Puffer für TNF- α

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Na-Phosphat	0.2 M pH 6.5
Na ₂ HPO ₄	11.8 g
NaH ₂ PO ₄	16.1 g
ad 1000ml, pH 6.5	

Lagerung bei 2-8°C,
innerhalb von 7 Tagen aufbrauchen

Wasch Puffer für TNF- α & IL-6

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
D-PBS	
Tween 20	0.05 %

Lagerung bei 2-8°C,
innerhalb von 3 Tagen aufbrauchen

Block Puffer für TNF- α & IL-6

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
D-PBS	
FBS	10%
pH 7.0 einstellen	

Substratlösung für TNF- α & IL-6

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Tetramethyl- benzidine (TMB)	100 μ l
Na – Acetat	10 ml
H ₂ O ₂ 30%	1 μ l

Working Detector für TNF- α &
IL-6

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Detection- Ak	13 μ l
HRP	13 μ l
Blockpuffer	3250 μ l

MDA-Assay

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
SDS 8.1 %	50 μ l
Essigsäure 20 %	pH 3.5 200 μ l
TBA 1.3 %	900 μ l
N-Butanol: Pyridin	15:1 ml

Immunhistochemie (SOD/GPO)

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Aceton	200 ml
D-PBS	500 ml
TNB	75 µl/Schnitt
Primär-Ak (s.o.)	75 µl/Schnitt
Sekundär-Ak (s.o.)	75 µl/Schnitt
Streptavidin Alexa Flour 546	75 µl/Schnitt
X4',6-Diamidine-2'-phenylindoldihydrochloride (DAPI)	75 µl/Schnitt
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	50 µl/Schnitt
H ₂ O ₂	200 ml

Zellkulturmedium RAW.264.7

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
RPMI 1640 Medium	500 ml
Hepes 10 mM	1.3 g
Na-Pyruvat 1mM	5 ml
Glukose 4.5 g/l	2.25 g
Na-Bicarbonat 1.5 g/l	0.75 g
FCS 10%	50 ml
Penicillin/ Streptomycin 1%	5 ml

Tris- Acetat- EDTA- Puffer

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
Tris- Base	242 g
Essigsäure	57.1 ml
0.5 M EDTA, pH 8,0	100 ml
Aqua dest. ad	1000 ml

MPO-Assay

<i>Chemikalie</i>	<i>Menge</i>
NaCl 100 mM	
Tris 20 mM, pH 7.5	
Triton X-100 0.1%	
ad 500µl	

2.2 Versuchstiere

Die *in vivo* Studien wurden an Mäusen durchgeführt (Zulassung: 8.87-50.10.36.08.128). Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) und im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster gehalten. Es handelte sich um den Mausstamm C57BL/6J, bezogen von der Firma Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland. Die Mäuse waren ausschließlich weiblichen Geschlechts, 8-10 Wochen alt und wogen im Durchschnitt 18 - 20g. Es wurde eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche eingehalten. Die Mäuse wurden zu fünf Tieren pro Käfig unter sterilen Standardbedingungen (Temperatur $20 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $50 \pm 10\%$, 12- stündiger Tag-/ Nachtrhythmus) gehalten und erhielten uneingeschränkten Zugang zu Wasser (DSS-Wasser) und Standardlaborfutter.

2.3 Methoden

2.3.1 Induktion und Kontrolle der chronischen Kolitis bei Mäusen mit Dextransodiumsulfat (DSS)

Prinzip. Viele Tiermodelle sind für CED beschrieben worden, insbesondere für den MC (145). Auch wenn keines dieser Modelle der genauen Imitation eines MC oder einer CU gerecht wird, lassen sie wenigstens eine Analyse bestimmter klinischer, histopathologischer oder immunologischer Details und Aspekte zu. Eine transmurale Entzündung und ein Th1-Profil ihrer LPMC sind die Charakteristika von MC-Tiermodellen. In guten Untersuchungen des DSS-Modells führte die Gabe von DSS im Trinkwasser über 7 Tage zur Induktion einer akuten Kolitis (21). Histologisch kommt es zum fokalen Untergang von mukosalen Krypten und zur Infiltration von Entzündungszellen. Pathogenetisch spielen aktivierte Immunzellen und Entzündungsmediatoren eine Rolle. In dieser Arbeit wurde das Modell einer chronischen Kolitis gewählt. Das Protokoll

sah mehrfache Behandlungszyklen mit behandlungsfreien Phasen von 7 Tagen vor. Für eine reine CU stehen bislang nur wenige Tiermodelle zur Verfügung, die zudem nur einzelne Characteristica der CU imitieren, wie eine Th2-Vermittlung oder die Organspezifität der Kolitis. Hierzu zählen das Oxazolone-Kolitis-Modell, die T-Zell-Rezeptor-Knockout-Maus, sowie die IL-7 transgene Maus.

Benötigte Materialien. Mäuse C57BL/6J, Dextransodiumsulfat (DSS).

Protokoll. Zur Untersuchung der Eigenschaften des EGCG bei chronischer Kolitis wurde ein Tiermodell (Mausmodell) verwendet. Die Induktion der Kolitis erfolgte oral über das Trinkwasser. Um bei den Mäusen eine chronische Kolitis auszulösen, wurde DSS in das Trinkwasser der Tiere gemischt, das *ad libitum* zur Verfügung stand. Das Protokoll sah folgendes Schema vor: für jeweils eine Woche betrug die Menge an DSS 2% (v/v) im Trinkwasser (Tag 7-14, 21-28 und 35-42). Nach dieser jeweils einwöchigen DSS-Gabe folgte eine Woche mit normalem Trinkwasser. Dieses Schema wurde dreimal wiederholt. Um die Kolitis der Tiere im Folgenden zu intensivieren, wurde im vierten Durchgang 3% DSS (v/v) verabreicht (Tag 49-56). Ein solches Vorgehen führt verlässlich zu einer chronischen Kolitis. Um die Krankheitsaktivität bei den Tieren zu überwachen, wurden täglich der klinische Zustand und das Gewicht erhoben.

2.3.2 Therapeutisches Vorgehen mit den Substanzen EGCG und Piperin

Prinzip. Um das therapeutische Potential der Substanz EGCG zu untersuchen, wurden die Mäuse täglich oral damit gavagiert. Zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit wurde EGCG auch in Kombination mit Piperin verabreicht. Verschiedene Kontrollgruppen wurden ebenfalls behandelt.

Benötigte Materialien. Epigallocatechingallat (EGCG), Piperin, PBS, Dimethylsulfoxid (DMSO).

Protokoll. Sowohl EGCG (Molekulargewicht 458) als auch Piperin (Molekulargewicht 285) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. EGCG wurde als eine 1,5 mM Lösung hergestellt, Piperin als eine 1 mM Lösung. Da

den Mäusen 200 µl pro Tag per oraler Gavage appliziert wurden (EGCG u/o Piperin in PBS), ergab sich für EGCG eine Menge von 6.9 mg/kg Körpergewicht, für Piperin eine Menge von 2.9 mg/kg Körpergewicht. Es ergaben sich folgende Gruppen (n=5): Gruppe 1 wurde nur mit PBS gavagiert, es wurde hier zu Kontrollzwecken kein Wirkstoff verabreicht. Gruppe 2 wurde nur mit Piperin (2.9 mg/kg Körpergewicht) gavagiert. Gruppe 3 wurde mit einer Kombination aus EGCG (6.9 mg/ kg Körpergewicht) und Piperin (2.9 mg/ kg Körpergewicht) gavagiert. Eine vierte Gruppe wurde mit EGCG allein gavagiert. Die Gavage wurde täglich über den gesamten Versuchsverlauf bei den Tieren durchgeführt. Der Startpunkt lag eine Woche vor der ersten DSS-Gabe, man kann hier also von einem präventiven Ansatz sprechen.

2.3.3 Histologie

Prinzip. Um kolitisbedingte Schäden und Verletzungen am Kolon der Mäuse zu untersuchen bzw. um den schützenden Effekt von EGCG vor selbigen darzustellen, wurden histologische Präparate hergestellt und diese mikroskopisch untersucht. Die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin diente als Übersicht zur Einschätzung der intestinalen Entzündung. Dabei färbt Hämatoxylin Zellkerne, Kalk und Bakterien blau-violett. Eosin färbt Cytoplasma, Bindegewebe und Interzellulärräume rot.

Benötigte Materialien. Ketanest, D-PBS, Cryomolds, OCT Tissue Tek, flüssiger Stickstoff, Isopentan, Methyleneblau, Eosinlösung (Stammlösung: 1% Eosin in 70% EtOH; Gebrauchslösung: Stammlösung 1: 10 in 70% EtOH verdünnt mit 1-2 Tropfen Eisessig), Hämatoxylinlösung nach Meyer, Superfrost-Objektträger, Xylol-Lösung, Vitro-Clud.

Protokoll. Die Tötung der Mäuse erfolgte nach Narkose mit Ketanest mittels Genickbruch. Der Bauchraum wurde über eine Längslaparotomie, die vom Processus xiphoideus bis zur Symphyse reichte, eröffnet. Nach Auffinden des Coecums wurde das Colon ascendens vom terminalen Ileum bzw. Coecum abgesetzt. Am Übergang vom Rectum in den Analkanal erfolgte ebenfalls möglichst distal ein Absetzen. Das Präparat wurde entnommen und in einer

Petrischale mit eisgekühltem D-PBS gereinigt und gelagert. Danach erfolgte die Längseröffnung des Kolons. Nach der Eröffnung wurde das Kolon nochmals ausgiebig in D-PBS gespült.

Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur histologischen Aufarbeitung. Mit Hilfe der Gefrierschnittmethode wurde das isolierte Material histologisch aufgearbeitet und ausgewertet. Die isolierten Gewebstücke wurden mit der Swiss-Roll-Methode (längseröffnetes Kolon der Länge nach über einen Holzstab aufrollen) in Cryomolds eingebettet. Die Cryomolds waren mit O.C.T. Tissue-Tek gefüllt. Die Aushärtung erfolgte in flüssigem Stickstoff und in gekühltem Isopentan. Die Proben ließen sich durch diese Art der Konservierung bei -80°C für mehrere Wochen lagern. Die Aufarbeitung der Gewebelöcke erfolgte an einem Gefriermikrotom (Kryostat Microm HM 550) bei -25°C . Die Gewebeschnitte hatten eine Dicke von $5\ \mu\text{m}$ und wurden auf Superfrost Objektträger aufgetragen. Die Schnittlage und -qualität wurde durch eine Übersichtsfärbung mit Methylenblau regelmäßig mikroskopisch kontrolliert.

Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin- Eosin. Nach dem Schneiden und Fixieren der Gewebsschnitte auf Superfrost Objektträger erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Hierfür wurden die Schnitte für 2 Minuten in 70% EtOH gestellt. Danach erfolgte eine Zwischenwässerung in Aqua dest. Daraufhin wurden die Schnitte für 5-10 Minuten in Hämatoxylinlösung gestellt. Anschließend wurden sie 5-10 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült und wiederum in ein Gefäß mit Aqua dest. gegeben. Die Schnitte wurden in einem zweiten Schritt in Eosinlösung gestellt (2 Minuten) und wiederum in Aqua dest. zwischengewässert. Im Folgenden wurden die Schnitte nacheinander in 70% EtOH, zweimal in 96% EtOH und letztendlich in 99% EtOH gegeben. Zuletzt erfolgte die Waschung in Xylol. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden sie mit Vitro- Clud eingedeckelt.

2.3.3.1 Beurteilung der Entzündungsaktivität nach Graduierungsschema

Prinzip. Um einen höheren Grad der Standardisierung bei der Befundung der histologischen Schnitte zu erreichen, wurde hierfür das Schema von Dielemann (28) verwendet.

Protokoll. Jeweils 3 Untersucher erhoben schematisch die Entzündungszeichen für die verblindeten Histologieschnitte. Das Dielemann-Schema sah folgendes Vorgehen vor: jedes Viertel des Kolons wurde für die Kriterien „Entzündungsschwere“ (akut oder chronisch) und „Entzündungstiefe“ (keine Entzündung bis transmurale Entzündung) mit einem Wert von 0 – 3 beurteilt. Für die Kriterien „Kryptenschaden“ (kein Schaden bis Kriptenstruktur zerstört) und „Regeneration“ (keine Regeneration bis komplette Ausheilung) wurde ein Wert zwischen 0 und 4 vergeben. Ein fünftes Kriterium war die „prozentuale Ausbreitung der Entzündung“: waren 1-25% der Fläche betroffen, wurde ein Wert von 1 vergeben, für 26-50% ein Wert von 2, für 51-75% ein Wert von 3 und für 76-100% ein Wert von 4. Für jedes Viertel des Kolons wurden die vier ersten Kriterien einzeln erhoben und dann jeweils mit dem Wert für die prozentuale Ausdehnung multipliziert, so dass für die ersten beiden Kriterien „Entzündungsschwere“ und „Entzündungstiefe“ jeweils ein Wert zwischen 0 und 12 erhoben wurde, für das dritte und vierte Kriterium „Kryptenschaden“ und „Regeneration“ ein Wert zwischen 0 und 16. Die Werte für die Kriterien wurden pro Kolonviertel addiert (0-40 Punkte), der Durchschnittswert aller vier Anteile wurde als repräsentativ für das gesamte Kolon angesehen.

<i>Kriterium</i>	<i>Wert</i>	<i>Beschreibung</i>
Entzündungsschwere	0	Keine
	1	Leicht
	2	moderat
	3	schwer
Entzündungstiefe	0	keine
	1	Mukosa
	2	Mukosa und Submukosa
	3	Transmural
Regeneration	4	keine

	3	Oberflächenepithel nicht intakt
	2	Regeneration, aber Kryptenschaden
	1	nahezu komplette Regeneration
	0	komplette Regeneration oder normales Gewebe
Kryptenschaden	0	keiner
	1	basales 1/3 geschädigt
	2	basale 2/3 geschädigt
	3	nur Oberflächenepithel intakt
	4	ganze Krypte und Oberflächenepithel zerstört
Prozentuale Ausbreitung	1	1-25 %
	2	26-50 %
	3	51-75 %
	4	76-100%

Tab. 4 Kriterien des histologischen Graduierungsschemas nach Dielemann

2.3.4 Zellkultur

Prinzip. Nach der Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) produzieren RAW 264.7-Zellen proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNF- α und IL-6. Diese Zellen wurden mit einer Kombination aus EGCG und Piperin behandelt, um dessen antientzündliches Potential zu eruieren.

Benötigte Materialien. LPS, RPMI-Zellkulturmedium, Epigallocatechingallat, Piperin, Dimethylsulfoxid (DMSO), Kulturplatten.

Protokoll. Raw 264.7-Zellen sind eine Zellpopulation immortalisierter Makrophagen. Diese Zellen wurden in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und in einem Brutschrank bei einem Stickstoffgehalt von 95% und einem Kohlendioxidgehalt von 5% bei 37°C gehalten. Nach vier bis fünf Tagen hatten sich die Zellen so weit vermehrt, dass sie für die Zellkulturversuche eingesetzt werden konnten. Dazu wurden EGCG und Piperin wie unter 2.3.2 beschrieben gelöst und 6 Stunden vor der Stimulation mit LPS (100 ng/ml) in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen auf die RAW-Zellen gegeben. Auch hier kann man also von einem präventiven Ansatz sprechen. Die Gruppen 1 und 2 wurden nicht behandelt, Gruppe 3 wurde mit 150 μ M EGCG behandelt, Gruppe

4 wurde mit einer Kombination aus 150 μM EGCG und 100 μM Piperin behandelt und Gruppe 5 wurde mit 100 μM Piperin behandelt. Nach einer Stimulationszeit von 18 Stunden wurden die Überstände der Zellen abgenommen und ausgewertet, d.h. die Konzentration von TNF- α und IL-6 per ELISA gemessen.

2.3.5 Quantitative Immunoassays: Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Prinzip. Entwickelt wurde die Methode parallel von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (Avrameas und Guilbert, 1971) und Schweden (Engvall und Perlman, 1971). Mithilfe des ELISA können Proteine, niedermolekulare Verbindungen oder Viren in Proben nachgewiesen werden. Ein spezifischer Antikörper bindet an den nachzuweisenden Stoff (Antigen). Antigen oder Antikörper werden mit einem Enzym markiert, welches eine Farbreaktion katalysiert und somit das Vorhandensein des fraglichen Antigens nachweist. Die Antigenkonzentration kann anhand des Substratumsatzes bestimmt werden.

Benötigtes Material. 96-Well Mikrotiterplatte, Coating Puffer, Capture Antikörper, Wasch Puffer, Block Puffer, Standard, Detection Antikörper, Avidin-horseradish- Peroxidase konjugiert, Substrat Lösung, Stop Lösung (1 M H_2SO_4), Mikrotiterplatten- Photometer.

Protokoll. ELISAs wurden mit unterschiedlichen ELISA-Kits durchgeführt (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). In einem ersten Schritt, dem Coating, erfolgte die Bindung des Antikörpers an die feste Phase. Dazu wurde in eine 96-Well Mikrotiterplatte pro Well 100 μl eines Capture Antikörpers gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. (Der Antikörper wird mit Coating Puffer 1:250 verdünnt). Nach der Inkubationszeit wurde der Coating Puffer abgenommen und die Wells 3x mit einem Wasch Puffer (> 300 μl / Well) gewaschen. Im nächsten Schritt folgte das Blocken (Block-Puffer, > 200 μl / Well für 1 Stunde bei Raumtemperatur), ein entscheidender Schritt, bei dem freie Proteinbindungsstellen besetzt werden, um die Hintergrundaktivität des ELISA

zu reduzieren, die durch unspezifisch absorbierte enzymmarkierte Antikörper- bzw. Antigenmoleküle verursacht wird. Es folgte ein weiterer Waschschriff (s.o.). Danach wurden 100µl/ Well Standard und die jeweiligen zu untersuchenden Zellkulturüberstände (100µl/ Well) hinzugegeben und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Der Standard wurde mit Blockpuffer im Sinne einer Verdünnungsreihe hergestellt (10 µl Standard + 990 µl Blockpuffer). Nach der Inkubationszeit wurden die Wells wiederum gewaschen. Anschließend wurden 100µl/ Well Working Detector zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff, danach die Zugabe von 100µl/ Well Substratlösung für 1 Stunde, um die Farbreaktion zu starten. Die Inkubation wurde in einer Dunkelkammer für 30 Minuten durchgeführt. Beim ELISA erfolgte eine so genannte Endpunktbestimmung, so dass die Enzymreaktion durch Zugabe einer entsprechenden Stopplösung beendet werden musste (50 µl/ Well). Die Messung erfolgte im Photometer (Dynatech MR4000) bei entsprechender Wellenlänge (450 nm und als Referenzwellenlänge bei 570 nm) innerhalb der nächsten 30 Minuten.

2.3.6 Immunhistochemie

Prinzip. Bei der Immunhistochemie (IHC) (auch Antikörperfärbung) werden Proteine (Antigene) mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht, in dieser Arbeit SOD und Glutathion. Eine Lokalisierung von Proteinen in Geweben oder Zellkompartimenten ist dadurch möglich. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebe- bzw. Oberflächeneigenschaft des gesuchten Proteins als Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Antikörper wiederum ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat bei schon geringen Mengen sichtbar macht. In dieser Arbeit wurde eine indirekte Färbemethode gewählt: Im ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper (Sekundärantikörper) aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Dieser zweite Antikörper wird über

die Zugabe von Fluorophor sichtbar gemacht, die Detektion erfolgt direkt im Fluoreszenzmikroskop.

Benötigte Materialien. Aceton, PBS, Wasserstoffperoxid, TNB, Primärantikörper, Sekundärantikörper, Alexa Fluor 546, DAPI, Vectashield, Fluoreszenzmikroskop.

Protokoll. Wie bei der histologischen Aufarbeitung wurden zuerst Gefrierschnitte hergestellt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte haltbar gemacht, es erfolgt die Fixierung des Gewebeschnitts mit Aceton. Nach Lufttrocknung der Gewebsschnitte wurden diese bei -20°C für 10 Minuten in Aceton gelegt. Nach vollständiger Verdunstung des Acetons wurden die Präparate bei -80°C gelagert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte für 1 Stunde mit TNB blocking Puffer bei Raumtemperatur geblockt. (Für die SOD-Färbung wurden die Schnitte in einem ersten Schritt für 20 Minuten in 0.3%ige Wasserstoffperoxidlösung gelegt und dann 1 Stunde mit TNB geblockt). Anschließend wurde eine dreischrittige Färbung durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde entweder ein Kaninchen-Anti-Glutathion Peroxidase 1-Ak (Verdünnung 1:200) oder ein Kaninchen-Anti-SOD1-Ak (Verdünnung 1:1000) aufgetragen. Danach folgte die Inkubation bei 4°C über Nacht. Nach diesem und nach allen anderen Inkubationsschritten wurden die Schnitte drei Mal für zwei Minuten mit PBS gewaschen. In einem zweiten Schritt wurde biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Ak (1:100) aufgetragen und für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde auf die Schnitte Streptavidin Alexa Fluor 546 (1:100) aufgetragen und 60 Minuten inkubiert. (Bei der SOD-Färbung folgte anschließend eine 3-5 minütige Amplifikation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Zur besseren Darstellbarkeit und Überprüfbarkeit der Schnitte wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidine-2'-phenylindoldihydrochloride (DAPI) (1:1000) für 5 Minuten gegengefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Mikroskop Leica DM LB). Histologische Schnitte mit positivem Färbeergebnis wurden semiquantitativ ausgezählt und ausgewertet.

2.3.7 MDA Analyse

Prinzip. Reaktive Sauerstoffspezies führen im Darm zu einer Oxidation von Lipiden, beispielsweise Membranlipiden. Ein Endprodukt dieser Reaktion ist Malondialdehyd, MDA, das mithilfe einer kolorimetrischen Reaktion mit Thiobarbitursäure, TBA, sichtbar gemacht werden kann. Damit sind Rückschlüsse auf die Menge reaktiver Sauerstoffspezies möglich.

Benötigte Materialien. Na-Dodecyl-Sulfat (SDS), Essigsäure, Thiobarbitursäure (TBA), n-Butanol, Pyridin, Photometer.

Protokoll. Um den Schaden zu bestimmen, der durch die Lipidperoxidation im Darm der Mäuse entstand, wurde die von Ohkawa (102) beschriebene Reaktion von Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure gewählt. Dazu wurde eine Reaktionslösung mit 50 µl 8.1% SDS, 200 µl 20% Essigsäure (pH 3.5) und 900 µl 1.3% Thiobarbitursäure hergestellt, in die ca. 0,5 g frisches Darmgewebe gegeben wurde. Diese Mischung wurde für 60 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend langsam bis auf Raumtemperatur abgekühlt. 1 ml einer Mischung aus n-Butanol and Pyridin (15:1, v/v) wurde untergemischt und alles anschließend für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde eine geringe Menge der oberen, organischen Phase abgenommen und deren Absorption bei 532 nm photometrisch (Genesys 10 Bio) ausgemessen. Dieser Wert wurde in Beziehung zu dem genauen Gewicht des am Beginn benutzten Darmgewebes gesetzt.

2.3.8 MPO Analyse

Prinzip. Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Gewebsmakrophagen exprimiert wird. Es spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation und Terminierung von Entzündungsprozessen, beispielsweise hilft es bei der Erkennung und Aufnahme apoptotischen Materials durch Phagozyten. Über die Aktivitätsanalyse des MPO kann also eine Aussage über den Umfang der eingewanderten Entzündungszellen getroffen werden (93).

Benötigte Materialien. NaCl, Tris Puffer, Triton X-100, Phosphat-Puffer, H₂O₂, Photometer.

Protokoll. Für die Analyse der MPO-Aktivität wurde Darmgewebe homogenisiert. Dieses Gewebe wurde in einer Mischung aus 500 µl 100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.5) und 0.1% Triton X-100 resuspendiert. Nach der Zentrifugation bei 12.000 rpm für 20 Minuten wurde der Überstand abgenommen und für die Aktivitätsbestimmung benutzt. Zehn Mikroliter des Überstandes wurden zu 200 µl eines 50 mM Phosphatpuffer (pH 6.0) gegeben (beinhaltet 0.4 mg/ml o-Phenylendiamin und 10 µl H₂O₂). Nach einer 20 minütigen Inkubation wurde die Reaktion mit 50 µl 0.4 mM H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption dieses Endprodukts wurde bei 490 nm (Genesys 10 Bio) photometrisch ausgemessen.

2.3.9 Quantitative Real-time PCR

Prinzip. Bei dieser Methode, die auf einer Vervielfältigung von Nucleinsäuren nach herkömmlicher Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, ist eine Quantifizierung der produzierten c-DNA möglich. Die relative Quantifizierung wird mithilfe von interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt, deren Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus proportional zur Zunahme der Target-DNA zunimmt. Anhand der während eines Laufs gemessenen Fluoreszenzsignale ist die Quantifizierung der Nucleinsäuren möglich. Damit erlaubt diese Methode eine Aussage über die Expression fraglicher Gene in bestimmten Zellpopulationen.

Benötigte Materialien. Stickstoff, Trizol, Aqua ad injectabilia, Chloroform, Isopropanol, EtOH 70%, 2 µg Gesamt – RNA, 25 mM EDTA, 10x DNase I Reaktions-Puffer, Desoxyribonuclease I, Oligo dT – Primer, 10x PCR Puffer, 25 mM MgCl₂ – Lsg., 10 mM dNTPs, 0,1 mM DTT – Lsg., RNase, SuperScript™II RNase H-Reverse Transkriptase, 1 µg Gesamt cDNA, SYBR Green I™, Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense PCR-Array, Thermocycler TRIO Thermoblock.

Protokoll. Zunächst erfolgte die Isolation von RNA mithilfe der Trizol-Methode. Das Kolongewebe wurde isoliert, in Reagiergefäße transferiert und in Stickstoff gefroren. 1 ml Trizol wurde je Gefäß hinzugegeben und bei 4°C für 30 – 60 Minuten gerüttelt. Je 0,22 ml Chloroform wurden pro 1 ml Trizol hinzugegeben, 2 - 3 Minuten inkubiert und anschließend bei 14000 x g über 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die obere, anorganische Phase, die die RNA enthält, wurde mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben. 0,6 ml Isopropanol wurden hinzugegeben, erneut 10 Minuten inkubiert und bei 14000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 0,7 ml 70 % EtOH hinzugegeben und nochmals bei 14000 x g für 20 - 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zuletzt wurde das EtOH abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in je 30 µl Aqua ad inj. gelöst. Die nachfolgende photometrische Messung zur RNA-Mengenbestimmung erfolgte bei 260 nm.

Vor der cDNA Erststrangsynthese folgte eine Hydrolyse eventuell vorhandener DNA- Reste. 2 µg der Gesamt- RNA wurden mit Aqua ad inj. in einem sterilen Gefäß auf 8 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl DNase I Reaktions Puffer (10x) und 1 µl DNase I wurde das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 25 mM EDTA wurden zu der Lösung hinzugegeben und diese dann für 10 Minuten bei 65°C erhitzt. Durch kurze Zentrifugation wurde die RNA separiert und gesammelt.

Die gewonnene RNA wurde zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Zunächst wurden 2 µg der Gesamt RNA mit 1 µl Oligo(dT) Primer (500 µg/ ml) gemischt und mit sterilem Aqua ad inj. auf 12 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde bei 65°C für 5 Minuten denaturiert und unmittelbar für mindestens 1 Minute auf Eis gebracht. Hiernach wurde 2µl Erststrang Puffer (10 X), 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl eines dNTPs Gemisches (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 µl 0,1 mM DTT hinzugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurde 1 µl des Enzyms SUPERScript II pro Gefäß hinzugegeben und bei 42°C für 50 Minuten

inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 15 Minuten. Zuletzt wurde 1 µl RNase und 20 µl Aqua ad inj. je Probe hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

In einem letzten Schritt konnten per Polymerase Kettenreaktion bestimmte Zielsequenzen der cDNA exponentiell amplifiziert werden. Dies geschieht mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotidprimer, die in unseren Untersuchungen aus Primern für 84 Gene bestand, die zum Sauerstoffmetabolismus gehören und auf oxidativen Stress reagieren. 1 µl cDNA eines Versuchstiers wurde dazu mit 30 µl des Farbstoffs SYBR Green ITM und 29 µl Aqua ad inj. vermischt und in ein vorgefertigtes „Mouse Oxidative Stress and Antioxidant Defense PCR-Array“ aliquotiert. Die PCR- Reaktion erfolgte temperaturabhängig in einem Thermocycler TRIO Thermoblock nach folgendem Protokoll: 2 Minuten 50°C (initialer Denaturierungsschritt), 10 Minuten 95°C (entspricht der Denaturierungsphase), 1 Minute 95°C (40 Zyklen), 2.5 Minuten 60°C (40 Zyklen), 10 Minuten 72°C (einmaliger verlängerter Denaturierungsschritt, um eine komplett verlaufende Elongation sicherzustellen). Anhand der Fluoreszenz kann die Menge der gesuchten DNA-Abschnitte ermittelt werden. Die Amplifikation der Ziel-DNA verläuft während der ersten Reaktionszyklen exponentiell. Daher erfolgt die Bestimmung des C_T-Wertes einer Reaktion durch Auftragung der Fluoreszenzkurve mit logarithmischem Maßstab während der ersten Reaktionszyklen. Der C_T-Wert liegt somit im Bereich der exponentiellen Amplifikation. Der Logarithmus der anfänglich eingesetzten DNA-Menge wird errechnet und gegen den C_T-Wert aufgetragen. Hieraus errechnet sich eine Standardkurve, die es ermöglicht, aus den C_T-Werten der Versuchsansätze die ursprünglich vorhandene amplifizierte DNA-Menge zu bestimmen.

2.4 Statistische Methoden

Grundsätzlich wurden alle Experimente dieser Arbeit dreifach oder öfter durchgeführt und alle Einzelerperimente wurden unabhängig voneinander begangen.

Untersucht wird die Frage, ob die Gruppenunterschiede im vorliegenden Experiment auf die Gesamtpopulation übertragen werden können (Hypothese 1, H1) oder ob sie sich zufällig ergeben (H0). In den nachfolgenden Berechnungen werden immer mindestens zwei Stichproben miteinander verglichen.

2.4.1 Ermittlung der statistischen Signifikanz über Mittelwertunterschiede: t-Test für zwei unabhängige Stichproben

Der t-Test ist ein parametrischer Test, bei dem die Hypothesen über den Erwartungswert einer Normalverteilung geprüft werden. Es wird eine Nullhypothese (H0) und eine Alternativhypothese (H1) formuliert.

Die Nullhypothese dieser Arbeit lautete, dass der Erwartungswert der mit EGCG und Piperin behandelten Mäuse gleich dem Erwartungswert der jeweiligen Kontrollgruppe (H₂O; EGCG; Piperin) ist.

$$H_0 : \mu_{\text{EGCG+Piperin}} = \mu_{\text{Kontrolle}}$$

Als alternative Hypothese galt die Aussage, dass die beiden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha < 0.05$ nicht übereinstimmen.

$$H_1: \mu_{\text{EGCG+Piperin}} \neq \mu_{\text{Kontrolle}}$$

Die Verteilung der Differenz zweier Stichprobenmittelwerte, geteilt durch die geschätzte Streuung, ist unter bestimmten Voraussetzungen t-verteilt. Die Prüfgröße beim t-Test für unabhängige Stichproben lautet

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{(s_x^2 + s_y^2)/n}}$$

ist t-verteilt mit $df = n_{\text{EGCG+Piperin}} + n_{\text{Kontrolle}} - 2 = 8$ Freiheitsgraden.

Hierbei steht t für die Prüfgröße, $(\bar{X} - \bar{X}_{\text{Kontrolle}})$ für den Mittelwert der mit EGCG und Piperin behandelten Mäuse zum Untersuchungszeitpunkt, $(\bar{X} - \bar{X}_{\text{Kontrolle}})$ für den Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe zum Untersuchungszeitpunkt, s für die Standardabweichung der mit EGCG und Piperin behandelten Mäuse und n für den Umfang der einzelnen Versuchsgruppen ($n=5$).

Nun kann verglichen werden, ob die Differenz der Mittelwerte so groß ist, dass ihr Zustandekommen unter H_0 weniger als 5% Wahrscheinlichkeit hat. Die Prüfgröße wird mit dem Quantil der t – Verteilung mit df Freiheitsgraden verglichen. Die Testentscheidung lautet Nullhypothese und wird verworfen, wenn die Prüfgröße größer als das Quantil ist. Die Testentscheidung fällt auf die Nullhypothese und wird beibehalten, wenn die Prüfgröße kleiner als das Quantil ist.

2.4.2 Ermittlung der statistischen Signifikanz über Mittelwertunterschiede: einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)

Das Ziel der Varianzanalyse ist es, Unterschiede der Mittelwerte von mehr als zwei Stichproben zu testen. Es wird eine Nullhypothese (H_0) und eine Alternativhypothese (H_1) formuliert.

Die Nullhypothese dieser Arbeit war, dass sich die Mittelwerte zwischen den verschiedenen Gruppen nur zufällig unterscheiden. Genauer: in der Population gibt es keine Unterschiede durch verschiedene Therapieansätze (unabhängige Variable: EGCG+ Piperin; H_2O ; EGCG; Piperin) hinsichtlich eines Kriteriums (abhängige Variable: Gewicht, Menge an MDA etc).

$H_0: \mu_{\text{EGCG+Piperin}} = \mu_{H_2O} = \mu_{\text{EGCG}} = \mu_{\text{Piperin}}$

Als Alternativhypothese galt die Aussage, dass es in der Population Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen (UV) hinsichtlich eines Kriteriums (AV) gibt.

H1: $\mu_{\text{EGCG+Piperin}} \neq \mu_{\text{H}_2\text{O}} \neq \mu_{\text{EGCG}} \neq \mu_{\text{Piperin}}$

Obwohl also die Varianz der Daten analysiert wird, dient die Varianzanalyse der Überprüfung von Mittelwertsunterschieden. Ziel ist es, die Populationsvarianz auf zwei Arten zu schätzen:

- aufgrund der Varianz der Mittelwerte *innerhalb* der verschiedenen Stichproben (Gruppen) (=Fehlervarianz)
- aufgrund der Varianz der Mittelwerte, also aufgrund der Unterschiede *zwischen* den Stichproben (Gruppen) (=erklärte Varianz).

Gilt die Nullhypothese, unterscheiden sich diese nur zufällig. Unterscheiden sich die verschiedenen Gruppenmittelwerte aber mehr als zufällig, so wird die daraus geschätzte Varianz (zwischen) größer sein als die innerhalb einzelner Gruppen geschätzte Varianz (innerhalb).

Prüfgröße: Die Prüfgröße ist wie beim F-Test der Quotient beider Varianzschätzer. Unter der Nullhypothese ist

$$F_{\text{Stichprobe}} = \frac{\hat{\sigma}_1^2}{\hat{\sigma}_2^2}$$

F-verteilt mit $df = k(\text{Stichprobenanzahl}) - 1$ (Zähler) und $df = k(n - 1)$ (Nenner) Freiheitsgraden.

Die Testentscheidung lautet Nullhypothese und wird verworfen, wenn die Prüfgröße größer als der kritische F-Wert ist. Die Testentscheidung lautet Nullhypothese und wird beibehalten, wenn die Prüfgröße kleiner als der kritische F-Wert ist.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurden teilweise wichtige Voraussetzungen der Varianzanalyse verletzt, beispielsweise wurde durch

Todesfälle die Voraussetzung der gleichgroßen Stichproben unter der Gefahr der überproportionalen Gewichtung der größeren Gruppe (höherer α -Fehler) nicht eingehalten. Diesem Problem wurde mit einer alternativen Verfahrenswahl begegnet (Welch-Test, Brown-Forsythe-Test).

Um die Mittelwertsunterschiede genauer zu beleuchten und zu analysieren, wo genau die Unterschiede lagen, wurden im Nachhinein (post hoc) multiple Mittelwertsvergleiche durchgeführt. Hier wurde das Verfahren von Turkey (Turkey's honestly significant difference) gewählt, bei dem alle Paare von Mittelwerten gleichzeitig ohne kumulierte α -Fehler untersucht werden können. Das Ergebnis einer post hoc Analyse als hypothesengenerierendes Verfahren liefert lediglich Hypothesen darüber, welche Unterschiede genau bestehen. Nur wenn bereits vorher Hypothesen über bestimmte Mittelwertsunterschiede aufgestellt wurden, können diese mit dem Turkey Test getestet werden. Um der Problematik der ungleichen Stichprobenumfänge durch die in den Gruppen aufgetretenen Todesfälle zu begegnen, wurde auch der Turkey-Kramer-Test (bei ungleichem n) eingesetzt.

2.4.3 Ereigniszeitanalyse

Von Interesse war weiterhin eine Überlebenszeitanalyse, bei der die Zeit bis zum kolitisbedingten Tod der Mäuse abhängig vom prognostischen Faktor Therapie untersucht wurde.

Dies wurde mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers und des Log-Rang-Tests erhoben. Der Kaplan-Meier-Schätzer ist ein univariates Verfahren und gibt als Überlebensfunktion die Wahrscheinlichkeit an, dass die Tiere der verschiedenen Gruppen länger als bis zum Zeitpunkt x (hier z.B. Tag 61 des Experiments) überleben (das Ereignis „Tod“ tritt nicht ein). Wichtig zu beachten ist in diesem Zusammenhang, dass durch den Kaplan-Meier-Schätzer nicht die Wahrscheinlichkeit des Todes angegeben wird, sondern die kürzere oder längere Zeit bis zum Ereignis im Vordergrund steht. Charakteristischerweise kann die Zielvariable „Tod“ nicht zu einem festen Zeitpunkt erhoben werden, da

der Eintritt des Ereignisses zu Studienbeginn unbekannt ist. Außerdem muss das Ereignis „Tod“ am Ende der Studie nicht bei allen Tieren eingetreten sein, d.h. es fließen auch Daten von Tieren mit in die Berechnungen ein, deren Tod aus irgendeinem Grund noch nicht eingetreten ist. Deshalb spricht man hier von „zensierten“ Daten. Trotz dieser Problematik ist es das Ziel, für jedes Zeitintervall eine Wahrscheinlichkeit für das Überleben der Tiere zu berechnen, was mithilfe des Kaplan-Meier-Schätzers (auch Produkt-Limit-Schätzer) gelingt. Für jedes Zeitintervall wird die bedingte Wahrscheinlichkeit berechnet, dass eines der Tiere das Intervall überlebt, der Tod also nicht eintritt, unter der Voraussetzung, dass es schon zu Beginn des neuen Zeitintervalls überlebt hat. Die Gesamtwahrscheinlichkeit dafür, einen bestimmten Zeitpunkt zu überleben, lässt sich dann darstellen als Produkt der entsprechenden bedingten Wahrscheinlichkeiten (66)

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} = \prod_{t_{(i)} \leq t} \left(1 - \frac{d_i}{n_i} \right)$$

mit

$$\hat{S}(0) = 1$$

und

d_i = Versuchsobjekte, bei denen das Ereignis zum Zeitpunkt $t(i)$ eingetreten ist
und n_i = Versuchsobjekte zum Zeitpunkt $t(i)$ unter Risiko.

Um die 3 Behandlungsgruppen (H₂O, Piperin, EGCG+Piperin) miteinander zu vergleichen, wurde bei der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse ein Gruppenvergleich von jeweils zwei Behandlungsgruppen mithilfe des Log-Rang-Tests durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Gabe von EGCG und Piperin reduziert die Krankheitssymptome bei der murinen DSS-Kolitis

Die hier vorgestellten Daten sind für fünf Versuchsdurchgänge repräsentativ, die alle zu vergleichbaren Ergebnissen führten.

Mithilfe von DSS wurde bei C57BL/6-Mäusen eine chronische Kolitis ausgelöst. Der Versuchsplan sah die Gabe von 2% DSS im Trinkwasser im wöchentlichen Wechsel mit reinem Trinkwasser vor. Nach dem dritten Durchgang (Versuchstag 49) mit 2%igem DSS wurde die chronische Kolitis durch die Gabe von 3% DSS im Trinkwasser intensiviert. Ziel war es, die bereits vorhandenen Unterschiede im Gesundheits- und Gewichtszustand zwischen den einzelnen Versuchsgruppen genauer herauszustellen.

Eine Woche vor Induktion der Kolitis begann die therapeutische Behandlung der Mausgruppen mit je 200 µl reinem Trinkwasser (Gruppe 1, „Ctrl.“), reinem Piperin (2.9 mg/kg KG) (Gruppe 2, „Piperine“), der Kombination aus Piperin (2.9 mg/kg KG) und EGCG (6.9 mg/kg KG) (Gruppe 3, „EGCG + Piperine“). Eine vierte Gruppe wurde mit reinem EGCG (6.9 mg/kg KG) behandelt, was nicht zu signifikanten Unterschieden in den Ergebnissen im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 führte (Daten sind nicht gezeigt). Die Behandlung der einzelnen Gruppen wurde täglich über den gesamten Versuchszeitraum per oraler Gavage durchgeführt. Als entscheidender Parameter für die Krankheitsaktivität wurde das Gewicht der Mäuse gewählt. Durchschnittlich wogen die Mäuse bei Versuchsbeginn 18.7 g (\pm 0.7). Ab dem Zeitpunkt der Kolitisinduktion zeigte sich in der dritten Gruppe schnell eine Überlegenheit im Gewichtsverlauf, sie wies über den gesamten Versuchszeitraum als einzige Gruppe eine stetige Gewichtszunahme auf – genau so, wie es von gesunden Mäusen dieses Alters zu erwarten ist. Am Ende der Versuche (Tag 60) wies diese mit EGCG und Piperin behandelte Gruppe ein relatives Gewicht von 1.2 (\pm 0.05) auf, die

Mäuse hatten also trotz stetiger prokolitogener DSS-Gabe 20% Gewicht zugenommen. Ein anderes Bild zeigte sich bei den Kontrollgruppen, die nur mit Wasser (Gruppe 1) oder nur mit Piperin (Gruppe 2) behandelt worden waren. Gerade die Intensivierung der Kolitis führte bei diesen Gruppen dazu, dass sie ihr Eingangsgewicht nicht halten konnten. Gruppe 1 verlor 3% Körpergewicht (rel. Gewicht $0.97, \pm 0.21$), Gruppe 2 sogar 5% im Vergleich zum Versuchsbeginn (rel. Gewicht $0.95, \pm 0.07$) (Abb. 3b).

Der klinische Zustand der Mäuse in den Gruppen 1 und 2 war am Versuchsende deutlich schlechter als in Gruppe 3. Die Mäuse, die mit der Kombination aus EGCG und Piperin behandelt wurden, waren klinisch gesund und zeigten das für diese Mäuse hohe Aktivitätsniveau. Bei den Kontrollgruppen lagen klinisch deutliche Krankheitszeichen vor: die Tiere waren apathisch und wenig aktiv, zeigten aufgrund der Kolitisschmerzen eine Schonhaltung und vernachlässigten die Fellpflege (Abb. 3a).



Abb. 3a Maus der Gruppe 1, auffällig sind das geringe Gewicht und die kolitisbedingte Schonhaltung des Tieres

Die statistische Aufarbeitung der Gewichtsdaten zeigt, dass sich das Körpergewicht der verschiedenen Gruppen ab dem 45. Versuchstag signifikant unterschied (Student's t-Test, $p < 0.05$). Inferenzstatistisch führten die verschiedenen Therapieansätze zu signifikanten Mittelwertsunterschieden bezüglich des Gewichts in den einzelnen Gruppen (ANOVA, $p = 0.001$). Multiple Mittelwertsvergleiche (Turkey-Test, gleichzeitiger Vergleich aller Paare von Mittelwerten ohne kumulierten α -Fehler) zeigten, dass sich die Gruppe 3 (EGCG plus Piperin) von den anderen Therapiegruppen signifikant unterschied, diese untereinander jedoch nicht signifikant. Statistisch gesehen unterscheidet

sich also bezüglich der Gewichtsentwicklung die Behandlung mit Wasser (Gruppe 1) nicht von der mit Piperin (Gruppe 2); Piperin selbst weist hier also kein eigenes therapeutisches Potential auf.

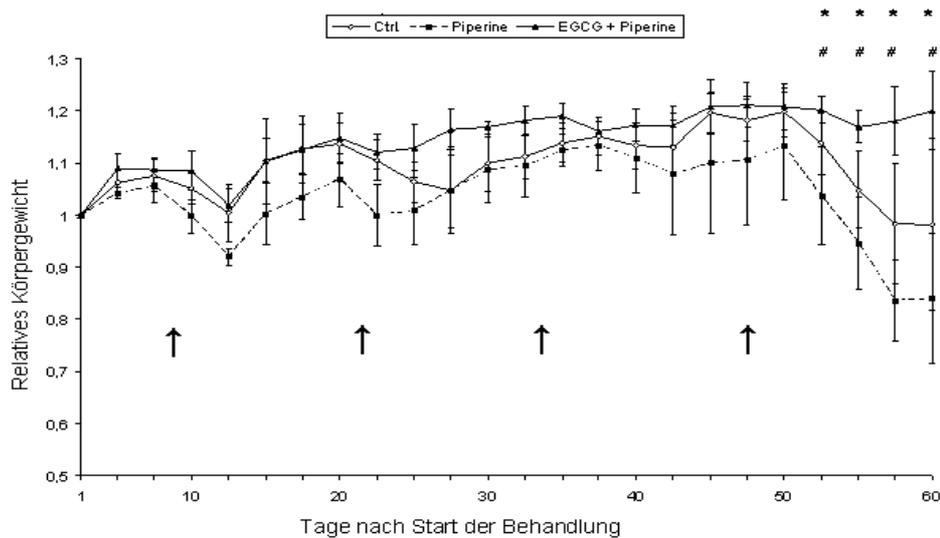


Abb. 3b Relatives Gewicht in einem Zeitraum von 60 Tagen. Verabreichung von 2% (v/v) DSS für jeweils eine Woche (Pfeile) in Abwechslung mit reinem Trinkwasser. Die tägliche Behandlung mit H₂O („Ctrl.“), Piperin („Piperine“) oder der Kombination aus EGCG & Piperin begann 1 Woche vor der ersten DSS-Verabreichung. Sternchen/ Rauten zeigen signifikante Unterschiede im Körpergewicht zwischen „EGCG + Piperine“ und den Kontrollgruppen an ($p < 0.05$). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm SD; $n = 5$ pro Gruppe am Beginn des Experiments. Das Experiment wurde fünfmal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Die unterschiedlichen Behandlungsarten führten zu einem signifikant unterschiedlichen Gewichtsverlust ($p = 0.001$, ANOVA).

3.2 Reduktion der Letalität durch die Gabe von EGCG und Piperin

Aufgrund der erhöhten Zahl an Todesfällen in den Kontrollgruppen (Behandlung nur mit Wasser oder nur mit Piperin) wurden die Versuche stets um den 60. Versuchstag abgebrochen. Zur Beurteilung der Wirksamkeit der Kombination von EGCG und Piperin wurde daher ergänzend eine Ereigniszeitanalyse durchgeführt.

Dabei zeigte sich folgendes Bild: bei einer Gruppenstärke von $n = 5$ pro Gruppe starben in einem der Versuchsdurchgänge beispielsweise in Gruppe 1 (Gavage mit Wasser) 2 Tiere, eines an Versuchstag 54, das zweite an Versuchstag 57. In Gruppe 2 (Gavage mit Piperin) starb ein Tier an Tag 55 (Abb.4). Auch in diesem Fall schien die Intensivierung der Kolitis einen Einfluss auf die abhängige Variable zu haben. Das Überleben der Tiere aus Gruppe 3 (Gavage mit EGCG und Piperin) war in keinem der fünf Versuchsdurchgänge eingeschränkt, ein Befund, der in hoher Korrelation zum klinischen Erscheinungsbild der Tiere der Gruppe 3 stand. Bleibt man bei der Betrachtung nur eines Versuchsdurchgangs ($n=15$), zeigt die statistische Überlebensanalyse, bei der mithilfe des Log Rank-Tests jeweils zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen werden, kein erhöhtes Risiko eines vorzeitigen Todes in Gruppe 1 ($p = 0.134$). Betrachtet man allerdings zwei und mehr Versuchsdurchgänge mit denselben Versuchsbedingungen ($n = 30$), weist Gruppe 1 ein signifikant höheres Risiko eines vorzeitigen Todes auf ($p = 0.032$). Diese Statistiken zeigen also, dass die kombinierte Gabe von EGCG und Piperin bezüglich der abhängigen Variablen „Überleben“ einen protektiven Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe 1 hat, sprich die Zeit bis zum Zeitpunkt des Todes signifikant verlängert ist.

Im Vergleich zur Gruppe 2 hat die Gabe von EGCG und Piperin über alle Versuchsdurchgänge hinweg betrachtet keinen protektiven Effekt in Bezug auf die AV „Überleben“, sprich die Zeit bis zum Zeitpunkt des Todes ist nicht signifikant verlängert ($p = 0.146$, $n = 30$).

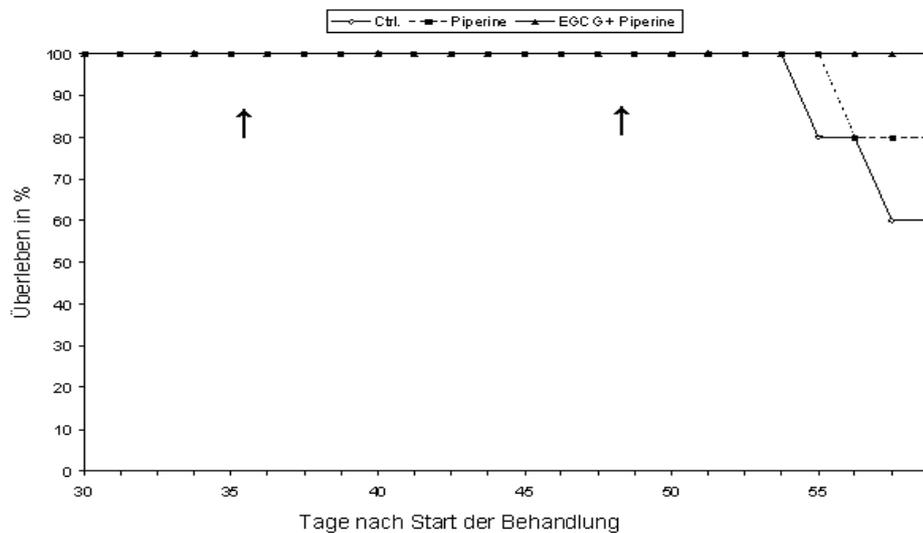


Abb. 4 Kaplan-Meier-Schätzer für das Überleben der mit Wasser („Ctrl.“), Piperin („Piperine“) und EGCG + Piperin („EGCG + Piperine“) behandelten Tiere nach Verabreichung 2% (v/v) DSS (Pfeile). Über drei vergleichbare Versuchsdurchgänge gemittelt (n =15) zeigt die Log Rang-Analyse ein signifikant erhöhtes Risiko eines früheren Todes in der Kontrollgruppe („Ctrl.“) ($p < 0.05$).

3.3 Reduktion der histomorphologischen Entzündungsaktivität durch EGCG und Piperin

Die histologischen Untersuchungen des Kolongewebes der Mäuse aus den verschiedenen Versuchsgruppen zeigten signifikante Unterschiede. In den Gruppen 1 und 2 fanden sich mukosal akzentuierte, teilweise sogar transmurale Entzündungszeichen. Es zeigte sich ein diffuses, entzündliches Schleimhautinfiltrat in Form großer Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten, was für eine hohe Entzündungsaktivität spricht. Aggregate von neutrophilen Granulozyten infiltrierten das Oberflächen- und Kryptenepithel und führten zu den charakteristischen Störungen der Kryptenarchitektur mit teilweise irregulär verzweigten Krypten und Kryptenabszessen. Weite Teile der

Epithelschicht waren teilweise flächenhaft destruiert und führten zu Erosionen und zahlreichen, teilweise fissuralen Ulzerationen oder Freilegung der Lamina muscularis propria. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei Mäusen, die mit EGCG und Piperin behandelt worden waren, milde Entzündungszeichen mit einem nur leichten Infiltrat neutrophiler Granulozyten. Die Kriptenarchitektur war größtenteils erhalten. Die Desintegration der Epithelschicht war nur mild ausgeprägt, es zeigten sich einige, jedoch sehr oberflächliche Erosionen und Ulzerationen. (Abb. 5)

Um diesen groben histologischen Überblick weiter zu präzisieren, wurde das Graduierungsschema für Entzündungsaktivität in der Kolonmukosa nach Dielemann erhoben. Diese umfasst die Kategorien „Schwere der Entzündung“, „Entzündungstiefe“, „Kryptenschaden“ und „prozentuales Ausmaß der entzündlichen Prozesse“. Die Gruppen 1 und 2 zeigten schwere Entzündungszeichen mit einem starken, submuköse Schichten erreichenden Leukozyteninfiltrat, destruierende Epithelläsionen und Kryptenschäden in prozentual weiten Arealen des Gewebes. Dieser Zustand führte zu einem Punktwert in der Dielemann-Skala von 10.8 (\pm 3.2) für die Gruppe 1 und einem Wert von 9 (\pm 2.0) für die Gruppe 2 (Abb. 6). Im Vergleich dazu zeigten die Analysen der Gruppe 3 mikroskopisch eine fast normale Darmwandarchitektur, in der prozentual wenige Areale ein mildes entzündliches Infiltrat aufwiesen. Epithelläsionen waren zu vernachlässigen. Dieses mikroskopische Bild führte zu einem Punktwert von 5.3 (\pm 1.36). Damit unterscheidet sich die Gruppe 3, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, bezüglich der Schwere der Entzündung in der Kolonschleimhaut hochsignifikant von den beiden Kontrollgruppen, die nur mit Wasser oder nur mit Piperin behandelt wurden ($p < 0.05$).

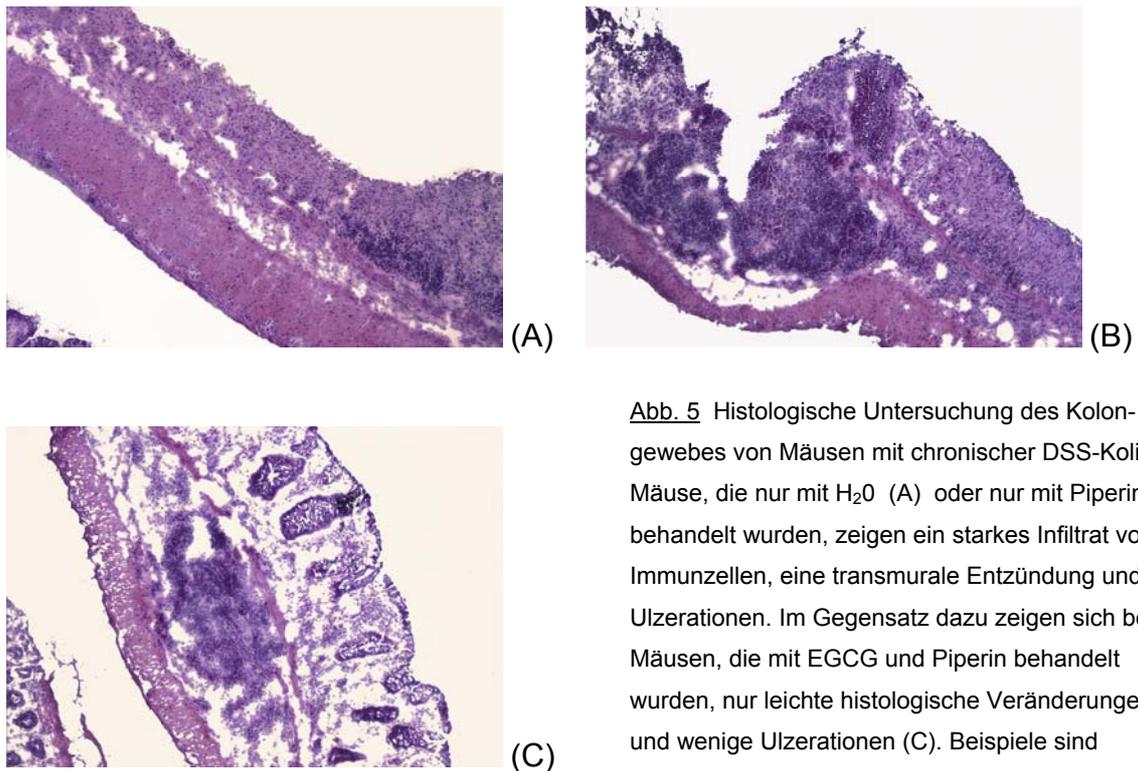


Abb. 5 Histologische Untersuchung des Kolon-
gewebes von Mäusen mit chronischer DSS-Kolitis.
Mäuse, die nur mit H₂O (A) oder nur mit Piperin (B)
behandelt wurden, zeigen ein starkes Infiltrat von
Immunzellen, eine transmurale Entzündung und
Ulzerationen. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei
Mäusen, die mit EGCG und Piperin behandelt
wurden, nur leichte histologische Veränderungen
und wenige Ulzerationen (C). Beispiele sind
repräsentativ.

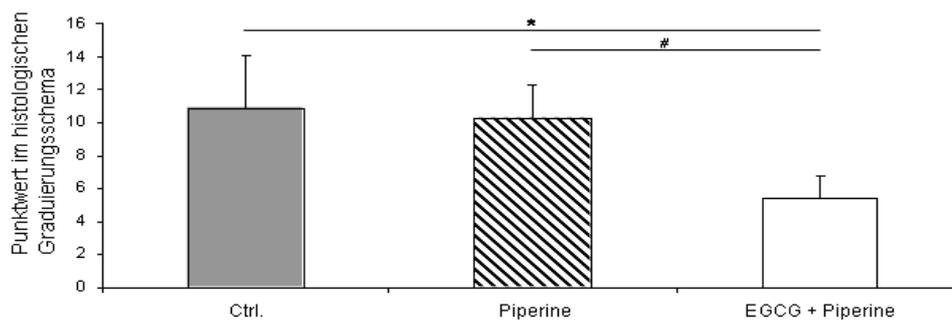


Abb. 6 Verblindet erhobene histologische Auswertung der Kolonmukosa von Mäusen mit DSS-Kolitis. Die Gruppen waren mit H₂O („Ctrl.“), mit Piperin („Piperine“) oder mit EGCG und Piperin („EGCG + Piperine“) behandelt worden (* $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit H₂O, # $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit Piperin). Im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigten sich in den Gewebeproben von

Mäusen, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden, signifikant weniger Entzündungszeichen und Kryptenschäden.

3.4 Weniger entzündungsbedingte Kolonverkürzung durch EGCG und Piperin

Ein weiteres gebräuchliches Maß zur Evaluation der Schwere der Entzündung ist die makroskopische Verkürzung des Kolons. Kommt es kolitisbedingt zu schweren Entzündungsprozessen im Kolon, führen diese zu einer Verkürzung, die makroskopisch erfasst werden kann. Dazu zeigte sich folgendes Bild: Gruppe 1, die nur mit Wasser behandelt worden war, zeigte eine durchschnittliche Kolonlänge von 5.4 cm (\pm 0.5). Gruppe 2, die nur mit Piperin behandelt worden war, zeigte eine durchschnittliche Kolonlänge von 5.9 cm (\pm 0.4). Gruppe 3, die mit der Kombination aus EGCG und Piperin behandelt worden war, zeigte eine Kolonlänge von 6.3 cm (\pm 0.2). Die statistische Auswertung mit dem Student's t-Test führt zu dem Ergebnis, dass sich die Gruppen 3 und 1 signifikant voneinander unterscheiden ($p < 0.05$); die Gruppen 3 und 2 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die inferenzstatistische Analyse zeigte signifikante Mittelwertsunterschiede in der Kolonlänge durch die verschiedenen Therapieansätze ($p < 0.05$, ANOVA) (Abb. 7).

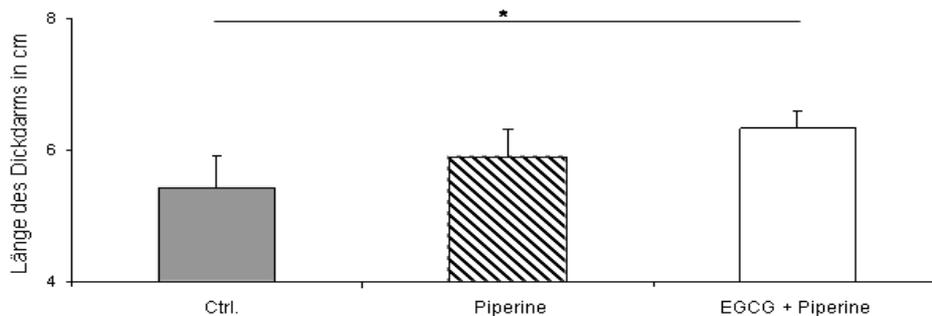


Abb. 7 Auswirkungen der Behandlung mit H₂O („Ctrl.“), Piperin („Piperine“) oder EGCG und Piperin („EGCG + Piperine“) auf die entzündungsbedingte Verkürzung der Kolonlänge durch DSS. In den Kontrollgruppen kam es zu einer stärkeren Verkürzung der Kolonlänge im Vergleich zu der Gruppe, die mit der Kombination aus EGCG und Piperin behandelt wurde (* $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit H₂O, n.s. im Vergleich zur Behandlung mit Piperin).

3.5 Reduzierte MPO-Aktivität durch die Behandlung mit EGCG und Piperin

Einen weiteren Hinweis auf die Reduktion des Entzündungsgeschehens durch EGCG und Piperin liefert die Messung von MPO im Kolongewebe. MPO ist ein lysosomales Enzym, das vorwiegend in neutrophilen Granulozyten vorkommt und eine wichtige Rolle in der Prozessierung von apoptotischem Material im Entzündungsgebiet spielt. Die MPO-Aktivität korreliert dabei mit der Menge der im Rahmen des Entzündungsgeschehens ins Gewebe eingewanderten neutrophilen Granulozyten.

Die Gruppe 3, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, wies im MPO-Assay durchschnittlich eine Aktivität von 441.2 mU MPO/ mg Kolongewebe (± 205.2)

auf - deutlich weniger als die Kontrollgruppen. Gruppe 1, die nur mit Wasser behandelt worden war, wies eine MPO-Aktivität von 1027.4 mU MPO/mg Kolongewebe (± 464.4) auf. Gruppe 2, die nur mit Piperin behandelt worden war, zeigte eine Aktivität von 1238.5 mU MPO/mg Kolongewebe ($\pm 259,5$). Die Gruppen, die mit EGCG und Piperin behandelt worden waren, zeigten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen eine signifikant geringere MPO-Aktivität ($p < 0.05$), was eine deutlich geringere Gewebeeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten und damit eine verringerte Entzündungsaktivität anzeigt (Abb. 8).

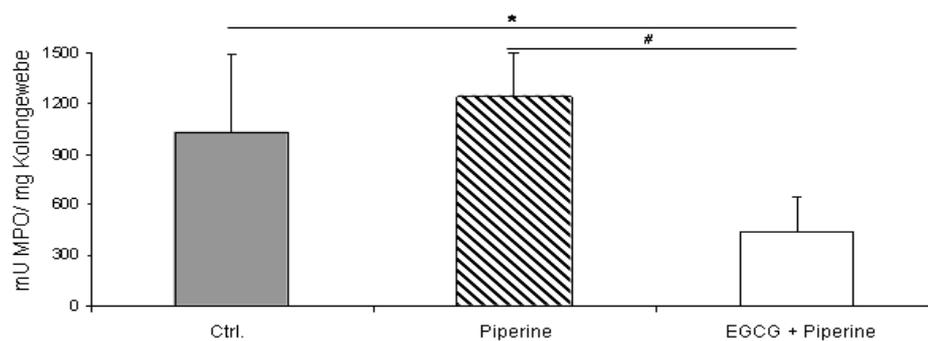


Abb. 8 MPO-Aktivität im Kolongewebe. Zerteiltes Kolongewebe wurde der Proteinisolierung zugeführt. Die in diesen Proben bestimmte MPO-Aktivität zeigte eine signifikant höhere MPO-Aktivität bei Mäusen, die nur mit H₂O („Ctrl.“) oder nur mit Piperin („Piperine“) behandelt wurden (* $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit H₂O, # $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit Piperin). Die MPO-Aktivität zwischen den verschiedenen Behandlungsstrategien zeigte signifikante Unterschiede ($p < 0.05$, ANOVA).

3.6 EGCG und Piperin als Schutz vor Lipidperoxidation

Um die schädigende Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies im Entzündungsprozess der chronischen Kolitis weiter zu untersuchen, wurden die MDA-Konzentrationen im Kolongewebe bestimmt. MDA entsteht als Endprodukt der Lipidperoxidation, d.h. bei Reaktionen reaktiver Sauerstoffmetabolite beispielsweise mit Fettsäuren der Lipiddoppelschicht von Zellmembranen im Rahmen des Entzündungsgeschehens. Dies führt zu einer Reaktionskette, bei der immer mehr Fettsäuren der Zellwand oxidiert werden; ein Prozess, der andere Strukturen der Zellmembran wie z.B. Transportproteine, andere Fette oder sogar die Zell-DNA im Zellkern schädigen kann. In den Kontrollgruppen fanden sich deutlich erhöhte MDA-Konzentrationen: Gruppe 1 zeigte durchschnittlich eine Konzentration von 9.4 mmol/g Kolongewebe (± 0.51), Gruppe 2 eine durchschnittliche Konzentration von 9.2 mmol/g Kolongewebe (± 0.43), Gruppe 3 hingegen zeigte lediglich eine Konzentration von 4.8 mmol/g Kolongewebe (± 1.02). In der Gruppe, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, kam es also zu einem signifikant verringerten Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies im kolitogenen Entzündungsprozess ($p < 0.05$) und damit zu weniger Folgeschäden durch radikalen Sauerstoff (Abb. 9).

Um diese Befunde weiter zu validieren, wurden immunhistochemische Analysen des Kolongewebes durchgeführt. Untersucht wurden dabei die antioxidativ wirkenden Enzyme GPO und SOD, die normalerweise im Kolongewebe das Auftreten radikaler Sauerstoffspezies stark reduzieren. Von diesen antioxidativ wirkenden Enzymen ist bekannt, dass sie bei chronischem und starkem oxidativen Stress einer Funktionseinschränkung unterliegen und ihre antioxidative Wirkung einbüßen. Bei durchschnittlichem oder leicht erhöhtem oxidativen Stress ist die Funktion aber uneingeschränkt. In der immunhistochemischen Färbung fand sich in den Gruppen 1 und 2 ein deutlich verringertes Signal der Enzyme GPO und SOD. In der Gruppe, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, fand sich ein normales Signal dieser Enzyme. Zwei Rückschlüsse können aus diesem Ergebnis gezogen werden: einerseits scheint es im DSS-Kolitismodell im Entzündungsprozess zu einem verstärkten

Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies zu kommen - beide Enzymgruppen schienen in den Gruppen 1 und 2 mit dem verstärkten Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies überfordert zu sein. Andererseits ist in der Gruppe 3, die mit EGCG und Piperin behandelt worden war, ein deutliches Signal in der Immunhistochemie sichtbar – die Enzyme scheinen also regelrecht zu arbeiten. Die Abbildung 10 zeigt repräsentative Aufnahmen der Gruppen 1 (H₂O) und 3 (EGCG und Piperin).

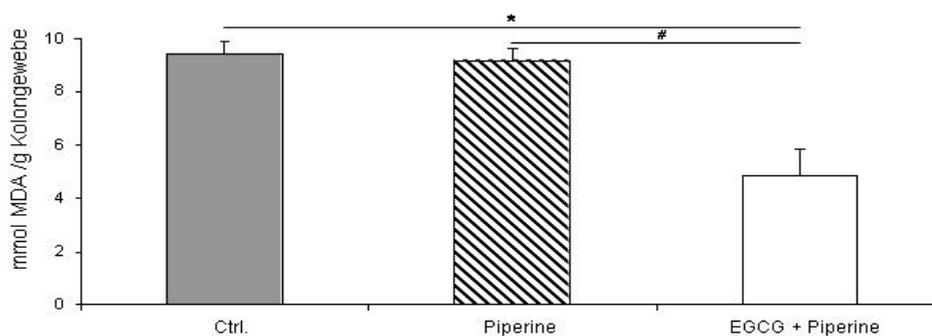


Abb. 9 Effekte der Behandlung mit EGCG und Piperin auf die Konzentration von MDA im Kolongewebe. MDA ist ein Sekundärprodukt der Lipidperoxidation. In den Kontrollgruppen, die nur mit H₂O oder nur mit Piperin behandelt wurden, waren die Konzentrationen an MDA im Kolongewebe signifikant höher als in der Gruppe, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde (* $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit H₂O, # $p < 0.05$ im Vergleich zur Behandlung mit Piperin). Die MDA-Konzentration zwischen den verschiedenen Behandlungsstrategien zeigte signifikante Unterschiede ($p = 0.001$, ANOVA).

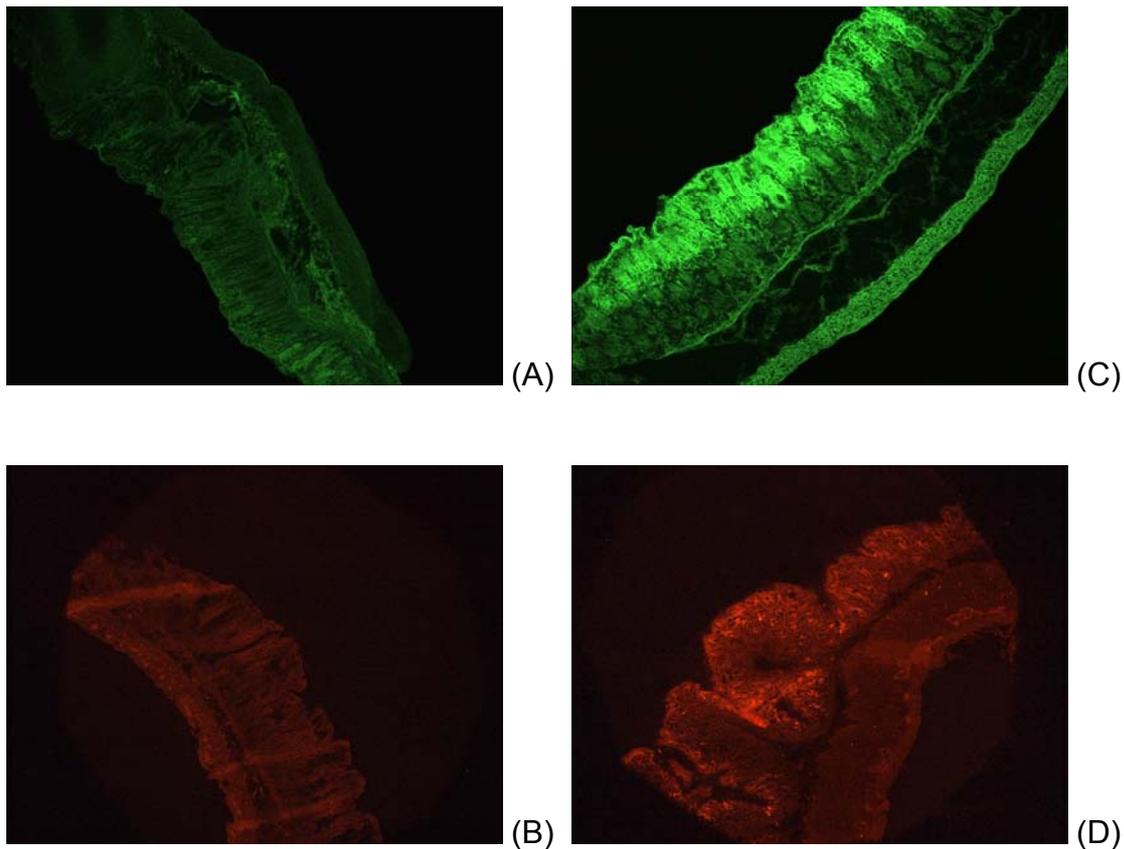


Abb. 10 Immunhistochemische Färbung des Kolongewebes nach der Induktion einer chronischen DSS-Kolitis. (A) zeigt die Färbung des Enzyms SOD, (B) die Färbung des Enzyms GPO im Kolongewebe von Tieren, die nur mit H₂O behandelt wurden. Beide Färbungen zeigen nur leichte Farbsignale, die Menge an antioxidativ wirkenden Enzymen ist gering. Im Gegensatz dazu zeigen die Proben der Tiere, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden, eine signifikante Expression der Enzyme SOD (C) und GPO (D). Repräsentative Beispiele beider Gruppen sind gezeigt.

3.7 EGCG und Piperin beeinflussen die TNF- α - und IL-6-Sekretion von mit LPS stimulierten RAW 264.7 Makrophagen

Eine entscheidende Frage ist, über welche Mechanismen EGCG und Piperin ihre antiinflammatorische Wirkung entfalten. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von EGCG und Piperin auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 bei RAW 264.7-Zellen untersucht (Abb. 11). Die Zellen wurden unterschiedlich vorbehandelt: Die Gruppen 1 und 2 wurden nicht vorbehandelt, Gruppe 3 wurde mit 150 μ M EGCG, Gruppe 4 mit einer

Kombination aus 150 μ M EGCG und 100 μ M Piperin und Gruppe 5 wurde ausschließlich mit 100 μ M Piperin behandelt. Nach sechs Stunden Inkubationszeit wurden die Gruppen 2-6 mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Bezüglich der Produktion proinflammatorischer Zytokine zeigte sich 16 Stunden später folgendes Bild: in der nicht mit LPS stimulierten Gruppe 1 wurden lediglich kleine Mengen an TNF- α and IL-6 im Medium gefunden. In der Kontrollgruppe 2, die nur mit LPS stimuliert wurde, zeigten sich im Medium stark erhöhte Konzentrationen von TNF- α (3187 pg/ml; \pm 184) und IL-6 (1664 pg/ml; \pm 41). Die Vorbehandlung mit EGCG allein (Gruppe 3) führte zu einer leichten, signifikanten Reduktion der Konzentrationen von TNF- α (2571pg/ml; \pm 334) (p = 0.049) und IL-6 (653pg/ml; \pm 245) (p = 0.002). Hingegen führte die Vorbehandlung mit Piperin allein nicht zu einer Reduktion der Konzentrationen von TNF- α (2120pg/ml; \pm 788) oder IL-6 (1300pg/ml; \pm 278) im Medium. Allein die kombinierte Gabe von EGCG und Piperin (Gruppe 4) führte zu einer signifikanten und exponentiellen Reduktion der Konzentrationen von TNF- α (61pg/ml; \pm 20) und IL-6 (26pg/ml; \pm 16) im Medium der RAW-Zellen (p < 0.001).

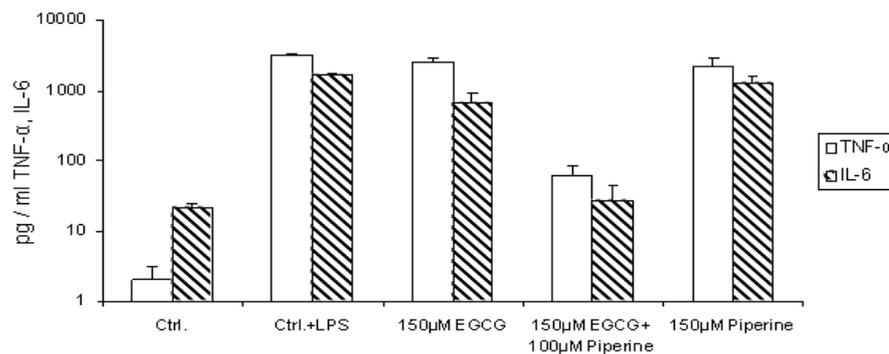


Abb. 11 Produktion von TNF- α und IL-6 nach der Stimulation mit LPS (100 ng/ml) in RAW 264.7 Zellen. Die Zellen waren mit EGCG oder Piperin allein oder mit der Kombination aus EGCG und Piperin vorbehandelt worden. Kombiniert behandelte Zellen zeigen eine exponentiell verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α ($p = 0.001$), wohingegen die Zellen, die mit EGCG oder Piperin allein behandelt wurden, nur eine geringe Reduktion der Sekretion aufweisen.

3.8 EGCG und Piperin haben eine Wirkung auf die Expression von Genen des Sauerstoffmetabolismus

Ein wichtiger Teil der Fragestellung dieser Arbeit war, ob EGCG in der Lage ist, die schädigenden Effekte der bei CED in großen Mengen auftretenden ROS abzumildern. Um dem auf Genebene weiter nachzugehen, wurde das Expressionsmuster von 84 Genen, deren Translation sich bei oxidativem Stress reaktiv verändert, in primär isolierten Kolonepithelzellen per Real-time PCR Array untersucht. Verglichen wurden dabei die Gruppe, die mit EGCG und Piperin ($n = 3$) behandelt wurde und die Kontrollgruppe, die mit H_2O ($n = 4$) behandelt wurde. Leider konnte aufgrund der kleinen Stichprobe das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Es zeigten sich aber insbesondere bei den Genen ERCC6 und GSR starke Veränderungen in der Genexpression.

ERCC6 (excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6), auch CSB (Cockayne Syndrome group B gene) genannt, codiert für ein DNA-Bindungsprotein mit ATPase-Funktion, das eine entscheidende Funktion in der Rekrutierung von Reparaturproteinen bei der transkriptionsgebundenen Basen- und Nucleotid-Exzisionsreparatur von DNA-Schäden hat. Das Protein, das mit der Polymerase II und bestimmten Transkriptionsfaktoren interagiert, ist insbesondere an der Reparatur von 8-Hydroxyguanin und 8-Hydroxyadenin beteiligt, die als DNA-Schäden durch oxidativen Stress entstehen können. In den Epithelzellen der Gruppe, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, zeigte sich in der Real-time PCR eine 4.82-fache ($p = 0.2862$, n.s.) Herunterregulation der Expression dieses Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 12). Dies lässt vermuten, dass es durch die antioxidativen Eigenschaften des EGCG zu einem verminderten Auftreten von ROS im Milieu der Kolonepithelzellen kommt, was zu weniger oxidationsbedingten DNA-Schäden führt und somit eine verminderte Expression dieses Gens nach sich zieht. Eine weitere auffällige Expressionsveränderung ergibt sich bei dem Gen GSR (glutathione reductase), das für das Flavoenzym Glutathion-Reduktase codiert. Diese spielt unter anderem im Sauerstoffmetabolismus der Zellen eine wichtige Rolle, da sie durch freie Radikale oxidiertes Glutathion reduzieren und damit wieder funktionsfähig machen kann. Die Epithelzellen der Gruppe, die mit EGCG und Piperin behandelt wurde, zeigte im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe in der Real-time PCR eine 4.32-fache Heraufregulation ($p = 0.2699$, n.s.) der Expression dieses Gens.

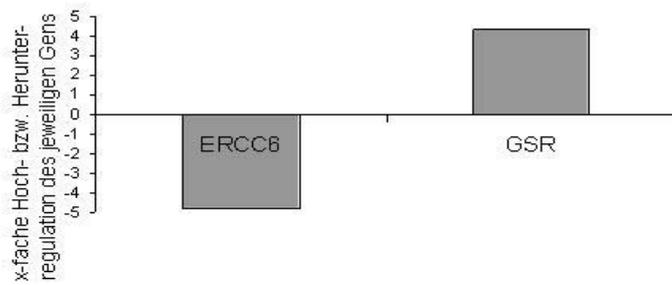


Abb. 12 Expression der Gene ERCC6 und GSR in Kolonepithelzellen von Mäusen, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit H₂O behandelt wurde. Die Transkription von ERCC6 (Reparatur von DNA-Schäden; $p = 0.2862$, n.s.) ist stark herunterregelt, die von GSR (Glutathion-Reduktase; $p = 0.2699$, n.s.) ist heraufregelt.

4 Diskussion

Catechine haben sich bei verschiedenen chronischen Erkrankungen als gesundheitsförderlich herausgestellt. Ziel dieser Studie war, die Effekte von EGCG in Bezug auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu untersuchen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf den Einfluss von EGCG auf ROS gelegt. Der Grund für diese Fokussierung liegt darin, dass die genaue Ätiologie und Pathogenese von CED trotz intensiver Forschung nach wie vor nicht vollständig geklärt sind und eine wichtige Ursache bzw. ein Effektormechanismus in ROS gesehen wird. So wurden in der Tunica mucosa des Darms von Patienten mit CU (68) erhöhte Mengen an ROS gefunden, die einen initiierenden (89) und einen aufrechterhaltenden Effekt im Entzündungsprozess haben (70) (17). Letztendlich lösen ROS im Körper und im Intestinaltrakt ernsthaften oxidativen Stress aus, was in der Folge zu Gewebeerstörungen und Ulzerationen führt (117) und deshalb ein Ziel therapeutischer Forschung sein muss. Interessanterweise weisen auch häufig eingesetzte CED-Medikamente wie 5-Aminosalicylsäure antioxidative Eigenschaften auf (88). Da etwa 30-58% der CED-Patienten jemals während ihrer Erkrankung Kortikosteroide und 6-12% weitere Immunsuppressiva benötigen und es bei diesen Therapien immer wieder zu Problemen wie Steroidresistenzen oder -abhängigkeiten kommt (36) (94), ist der Ruf nach schonenderen und natürlichen Medikationen gerade auf Patientenseite enorm.

Dies ist ein Grund, warum das Epicatechin (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoat), genannt (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), ein Catechin des Grünen Tees *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, in den letzten Jahren in den Fokus intensiver medizinischer Forschung verschiedener Fachrichtungen gerückt ist. Das starke antioxidative Potential (116) dieses Stoffes könnte die große Menge von ROS im Entzündungsprozess bei CED dezimieren und somit von therapeutischem Nutzen sein. Diese Hoffnung wurde durch *in vitro* (80) and *in vivo* (142)

Studiendaten genährt, die zeigen, dass EGCG das Entzündungsgeschehen auf mehreren Ebenen abschwächt. Dazu passen epidemiologische Daten, die moderate Verbesserungen antioxidativer Kapazitäten im Plasma bei Menschen fanden, die regelmäßig Grünen Tee tranken (58).

Das in diesem Experiment eingesetzte murine DSS-Modell stellt nur den Versuch dar, die chronische Darmentzündung im klassischen Sinne zu imitieren. Sicherlich ist keines der zur Zeit eingesetzten CED-Mausmodelle ideal; der Versuch, ein experimentelles Modell menschlicher CED durch den Einsatz toxischer Chemikalien wie DSS zu reproduzieren, ist aufgrund der komplizierten genetischen, immunologischen und umweltbedingten Einflussfaktoren auf menschliche CED bis heute nicht machbar (59). Es gibt jedoch einige Studien, die den Stellenwert von ROS in Mausmodellen, auch in DSS-Mausmodellen, untersucht haben und zu dem eindeutigen Ergebnis erhöhter Mengen an Oxidantien bzw. Endprodukten der Oxidation kommen (136) (99). Histologisch kommt es bei diesem Modell zum Untergang von mukosalen Krypten und zur Infiltration von Entzündungszellen, pathogenetisch spielen aktivierte Immunzellen und Entzündungsmediatoren eine Rolle. Das von uns gewählte DSS-Modell ist zwar nur ein toxisches Modell, stellt aber durchaus eine Möglichkeit dar, die fraglichen ROS und deren Elimination durch EGCG zu untersuchen.

Im Rahmen unserer Experimente haben wir den Mäusen zusätzlich zum EGCG einen weiteren Stoff verabreicht: ein Alkaloid des Schwarzen Pfeffers, *Piper nigrum* (L.), (2E,4E)-5-(1,3-benzodioxol-5-yl)-1-piperidin-1-ylpenta-2,4-dien-1-one, genannt Piperin. Piperin ist in der Lage, die unter normalen Umständen geringe Bioverfügbarkeit von EGCG – ausgelöst durch eine intensive Dünndarmmetabolisierung und einen schnellen gastrointestinalen Transit - zu erhöhen. Die kombinierte Gabe von EGCG und Piperin reduziert beispielsweise die intestinale Glukuronidierung um 40-60% und führt damit zu höheren Konzentrationen von EGCG im Plasma. Zellkulturen mit HT-29 Zellen (humane Dickdarmkrebszellen) haben erbracht, dass Piperin die intrazellulären

Konzentrationen von EGCG-3-Glukuronid signifikant senkt, was zu höheren Mengen an freiem, ungebundenem EGCG führt (73).

In einem murinen DSS-Kolitis-Modell konnte gezeigt werden, dass die orale Verabreichung von EGCG in Kombination mit Piperin zu einer vermehrten Aktivität antioxidativ und damit schützend wirkender Enzyme wie SOD und GPO führt, die Gewebekonzentrationen von ROS in der Darmmukosa reduziert und das Auftreten proinflammatorisch wirkender Zytokine wie IL-6 und TNF- α signifikant senkt. Ausserdem kam es auf Genebene zu einer Herunterregulation von ERCC6, das für Proteine der DNA-Reparatur codiert. Die Expression des Gens GSR, das für die im Sauerstoffmetabolismus schützend wirkende Glutathion-Reduktase codiert, war hingegen heraufgeregelt. Diese Reduktion der Entzündungsprozesse zeigte sich durch eine geringere Neutrophileninfiltration und resultierte in weniger Gewebeschäden, einer stabilen Länge des Dickdarms, stabilem Gewicht und einem besseren Abschneiden in Überlebensversuchen.

Unter physiologischen Bedingungen werden vermehrt Antioxidanzien produziert, wenn es zu der Situation eines benignen oxidativen Stresses kommt - GPO, Cu/Zn-SOD (84) und CAT sind die am häufigsten anzutreffenden enzymatischen Antioxidantien (50). Im Gegensatz dazu brechen die oxidativen Schutzmechanismen in Organen ein, wenn es zu starkem und langanhaltendem oxidativen Stress kommt (83).

Eine Analyse, die lediglich die Konzentration von Antioxidantien in Betracht zieht und dabei die Konzentration der ROS vernachlässigt, wäre also unvollständig. Vorliegende Ergebnisse von geringeren Mengen antioxidativer Enzyme in der Kolonmukosa der Kontrollgruppen bestätigen, dass das DSS-Modell schweren oxidativen Stress im Kolon auszulösen vermag. Die durch die ROS hervorgerufene Inaktivierung einer oder mehrerer Enzymklassen ist der naheliegendste Grund für die Schwächung im System der Antioxidantien (107). Verminderte Cu/Zn-SOD Protein- und Aktivitätsniveaus in resezierter Mukosa und Mukosabiopsien (92) von CED Patienten im aktiven Stadium unterstützen oben genannte Theorie zum oxidativen Stress.

Im Laufe der Entzündung bei CED kommt es also zur Bildung großer Mengen ROS in der Darmmukosa. Diese reagieren mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der zellulären Lipiddoppelschicht. Es entwickelt sich eine Kettenreaktion der Lipidperoxidation, viele benachbarte Fettsäuremoleküle der Zellmembran sind von der Peroxidation betroffen. Schließlich ändert sich die Permeabilität und Selektivität der Membran, die Aktivität der Membrankanäle, der Rezeptoren und der zellulären Enzyme (103). In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass das Endprodukt der oben genannten Lipidperoxidation, MDA, in der Kolonmukosa unbehandelter Kontrollgruppen erhöht ist.

Die großen Mengen ROS im Entzündungsprozess, der durch DSS-Gabe ausgelöst wurde, führte zu Mukosaschäden durch Lipidperoxidation. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Daten überein, die in Mukosabiopsien von Patienten mit CED erhöhte Mengen an MDA gefunden haben (18) (79). Es lässt sich also festhalten, dass Patienten mit CED im Vergleich mit gesunden Probanden einen dramatischen Anstieg oxidierten Moleküle in vielen Organen, vor allem aber im Kolongewebe, aufweisen. Bezüglich der Frage, ob der durch die ROS ausgelöste oxidative Stress mit der Aktivität der CED korreliert, gibt es keine eindeutigen Ergebnisse. Holmes et al. fanden beispielsweise bei Patienten mit einer aktiven CU im Vergleich zu Patienten mit nicht aktiver CU einen 1.7-fachen Anstieg oxidierten Glutathions im Kolongewebe (61).

Fettlösliche Antioxidantien wie Tocopherol und Ascorbinsäure bieten einen gewissen antioxidativen Schutz, EGCG dagegen ist ein starker Chelat-Bildner (57) und ist im Vergleich ein effektiveres Antioxidanz (116). Im hier vorliegenden experimentellen Kolitismodell waren die Konzentrationen von MDA im Kolon von mit EGCG und Piperin behandelten Gruppen signifikant reduziert, was für geringere Mengen an ROS im Kolongewebe spricht.

Große Mengen von Peroxiden ziehen neutrophile Granulozyten chemotaktisch an (26) und haben einen Einfluss auf deren Zytokinproduktion. Diese chemotaktische Attrahierung ist einer der Gründe für die Akkumulation Neutrophiler im Kolon, die sich durch die erhöhte MPO-Aktivität in den Gruppen zeigte, die nur mit Wasser oder nur mit Piperin gavagiert wurden. Die Reduktion

von ROS und somit der Peroxide ist also höchstwahrscheinlich einer der Gründe für die signifikant geringeren Mengen neutrophiler Granulozyten in den Gruppen, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden. Durch die gesteigerte Infiltration neutrophiler Granulozyten in die Epithelschicht kommt es histologisch zu sogenannten Kryptenabszessen, die hoch mit der Krankheitsaktivität bei CED korrelieren. Da Neutrophile wiederum beispielsweise durch den „oxidative burst“ einen entscheidenden Beitrag zur Produktion freier Radikale leisten, sollte die geringere Zahl Neutrophiler zu einer mildereren Manifestation der gastrointestinalen Entzündung führen.

Einhergehend mit der erhöhten antioxidativen Kapazität im Kolongewebe der Gruppen, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden, fand sich auch ein verstärktes Auftreten der antioxidativ wirksamen Enzyme SOD und GPO.

Es stellt sich in diesem Zusammenhang jedoch die Frage, ob die Effekte, die an den hier gemessenen molekularen Endpunkten wie antioxidativen Enzymen oder MPO-Konzentration zu sehen sind, einfach die nachgeschaltete Folge der Reduktion der ROS in Kolongewebe und den Kolonzellen sind, oder ob es sich bei den Ergebnissen um eine direkte Interaktion des EGCG mit verschiedenen molekularen Zielen wie SOD (95) handelt, unabhängig von den antioxidativen Eigenschaften des EGCG. Eine Arbeit spricht aufgrund ihrer Ergebnisse eher für die erste Variante: es konnte gezeigt werden, dass die Mukosa von CED-Patienten hohe Konzentrationen fäkaler Bakterien sowie bakterielle Einschlusskörperchen aufweist, welche positiv mit dem Schweregrad der Entzündung korrelieren (135). Daraus lässt sich folgern, dass die Veränderungen in der Darmflora bei CED nicht Folge der Entzündung sind, sondern Ausdruck einer beispielsweise durch ROS gestörten intestinalen Barriere. Folgend kann die pathogenetische Rolle der veränderten Darmflora in einem zweiten Schritt darin bestehen, dass sie bei initial gestörter intestinaler Barriere die Folge einer akuten Entzündung sein kann, das intestinale Immunsystem permanent stimuliert und so eher zu einer Chronifizierung der Entzündung beiträgt. Ergebnisse früherer Arbeiten zeigen, dass physiologischerweise eine verminderte Reaktivität des intestinalen

Immunsystems auf die eigene Darmflora besteht, diese Toleranz beim MC aber durchbrochen ist (32).

Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Real-time PCR Analysen zu Genen, die mit oxidativem Stress bzw. antioxidativem Schutz in Verbindung stehen, können nicht abschließend klären, ob EGCG seine Wirkung eher über eine allgemein antioxidative und damit antientzündliche Eigenschaft entfaltet oder ob es direkt mit molekularen Zielen interagiert. Die nähere Betrachtung der veränderten Genexpressionsmuster von 84 Genen, die für antioxidative Proteine, Proteine des Sauerstoffmetabolismus und Sauerstoff-Transporterproteine codieren, legt aber nahe, dass die gefundenen Effekte vorrangig den antioxidativen Eigenschaften geschuldet sind. Zwar können die gefundenen Ergebnisse vor allem aufgrund der kleinen Stichprobe nicht das Signifikanzniveau erreichen, dennoch liefern sie wertvolle Hinweise zur Wirkung von EGCG auf Epithelzellen. Zwei Gene traten dabei besonders hervor: ERCC6 und GSR. ERCC6, das nach Behandlung mit EGCG und Piperin eine fast fünffache Herunterregulation erfährt, codiert für eine wichtige ATPase, die an der Basen- und Nucleotid-Exzisionsreparatur bei DNA-Schäden im Zellkern und in den Mitochondrien beteiligt ist (127) (78). Insbesondere an der Reparatur von Schäden durch ROS, also durch oxidativen Stress, ist das codierende Protein beteiligt. 8-Hydroxyguanin und 8-Hydroxyadenin sind als Marker für oxidative DNA-Schäden (30) bei einem Ausfall von ERCC6 stark erhöht (140), beim Cockayne Syndrom kommt es durch den Ausfall von ERCC6 oxidantienbedingt zu schweren neurodegenerativen Schäden und vorzeitiger Alterung. Die in den hier durchgeführten Versuchen gefundene reaktive Herunterregulation der Expression von ERCC6 spricht also für eine Reduktion des oxidativen Stresses durch ROS und weiter für weniger DNA-Schäden durch Sauerstoffradikale - das Reparaturprotein wird in den Epithelzellen weniger gebraucht. Zu einer etwa vierfachen Heraufregulation der Genexpression kommt es bei GSR, das für die Glutathion-Reduktase codiert. Y-Glutamyl-Cysteyl-Glycin (Glutathion) schützt auf zellulärer Ebene vor Karzinogenen und ROS, muss aber stets durch die Glutathion-Reduktase wieder in seine reduzierte Form zurückgebracht werden (31). Geschieht dies nicht, kommt es unter anderem durch ROS zu

mitochondrial betonten Gewebeschäden (64), eine Reduktion oder ein Ausfall der Glutathion-Reduktase erhöht die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber oxidativem Stress (45). Umgekehrt führt - wie bereits beschrieben - chronischer und starker oxidativer Stress bei antioxidativen Enzymen zu einer Funktionseinschränkung, möglicherweise aufgrund einer Expressionsverminderung. In den mit EGCG und Piperin behandelten Gruppen scheint der oxidative Stress der Epithelzellen aber nur leicht erhöht zu sein, da in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.6 auch die Glutathion-Reduktase ein normales, sogar erhöhtes Expressionsmuster aufweist. Durch die Behandlung mit dem antioxidativ wirkenden EGCG ist die Genexpression der Glutathion-Reduktase nicht eingeschränkt. Leider bleibt auch in diesem Fall die Eingangsfrage nach der genauen Wirkweise des EGCG unbeantwortet.

Die antiinflammatorischen Effekte des EGCG konnten auch in den von uns durchgeführten Zellkulturversuchen mit RAW 264.7 Zellen bestätigt werden, in denen sich eine starke und signifikante Reduktion der zellulären Sekretion von TNF- α und IL-6 bei den Zellen zeigte, die mit einer Kombination von EGCG und Piperin behandelt wurden. In diesem Fall zeigte sich sogar eine Reduktion von IL-6 and TNF- α bei den Zellen, die mit EGCG allein behandelt wurden. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Daten (128), bei denen ebenfalls die alleinige EGCG-Behandlung antiinflammatorische Wirkung zeigte. Weitere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass die alleinige EGCG-Gabe proinflammatorische Signalwege wie NF- κ B, AP-1 (96), p38 Kinase und c-Jun NH2-terminale Kinase inhibiert und proinflammatorische Zytokine reguliert (96) (151). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die singuläre EGCG-Behandlung bei rheumatoider Arthritis zu einer Verminderung der IL-6 Produktion synovialer Fibroblasten führt (6), die Sekretion von IL-6 und TNF- α in humanen keratinozytären HaCaT Zellen (82) und von IL-8 in epithelialen Caco-2 Zellen (98) reduziert.

Bezüglich der Wirksamkeit von EGCG ist wahrscheinlich, dass gerade freies, nichtgebundenes EGCG starke antiinflammatorische Effekte entfalten kann. In den von uns durchgeführten Zellkulturversuchen mit RAW Zellen führte nur die

Behandlung mit der Kombination aus EGCG und Piperin zu einer relevanten und übergreifenden Reduktion der TNF- α and IL-6 Sekretion, während die Behandlung mit EGCG allein keine vergleichbaren Effekte hervorbrachte. Dieses Ergebnis zeigt eine hohe Korrelation mit den erhobenen *in vivo* Daten, die signifikante klinische Effekte nur bei den Gruppen zeigen, die mit EGCG *und* Piperin behandelt wurden. Eine Erklärung dafür könnte in der Fähigkeit des Piperins liegen, intrazelluläres glukuronidiertes EGCG zu reduzieren. Die größeren Mengen an freiem EGCG könnte folglich dessen Potential erhöhen, zelluläre Entzündungsreaktionen abzumildern (73).

Auch wenn die entzündungshemmenden Eigenschaften nicht genau bis auf molekulare Ebene verstanden sind, ist EGCG gerade in der kombinierten Gabe mit dem die Bioverfügbarkeit erhöhenden Piperin in der Lage, die klinischen Zeichen einer Kolitis signifikant zu verbessern. Wichtig ist in diesem Zusammenhang zu betonen, dass in keiner der allein mit Piperin behandelten Kontrollgruppen nennenswerte antiinflammatorische Effekte zu beobachten waren, die einen signifikanten Unterschied zu den mit Wasser gavagierten Kontrollgruppen ergeben hätte. Es ist also davon auszugehen, dass keiner der antiinflammatorischen oder antioxidativen Effekte im Experiment der Wirkung des Piperins zugeschrieben werden kann.

Im hier angewandten Kolutismodell resultierte die Behandlung mit der Kombination aus EGCG und Piperin durch eine stark verminderte kolitogene Entzündungsreaktion in einem verbesserten Überleben der Mäuse. Die mit EGCG und Piperin behandelten Mäuse zeigten eine deutlich stabilere Gewichtsentwicklung und hatten eine deutlich verlängerte Überlebenszeit. Die histologischen Untersuchungen erbrachten signifikant mildere Entzündungszeichen bei den Tieren, die mit EGCG und Piperin behandelt wurden. Dies korreliert in einem hohen Maße mit der Beobachtung einer signifikant reduzierten MPO-Aktivität. Diese Ergebnisse unterstützen die These der ROS als wichtiges Agens im Rahmen der kolitogenen Entzündung.

Die hier gefundenen Ergebnisse werden durch andere Studien unterstützt (2) (86). In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass in

diesen Fällen deutlich höhere Konzentrationen an EGCG (10mg/kg, 50mg/kg Körpergewicht i.p.) im Versuchsprotokoll vorgesehen waren, hier das Alkaloid Piperin aber keinen Eingang in die Studien fand. Die hier verwandten höheren Dosen sind höchstwahrscheinlich der geringeren Bioverfügbarkeit des EGCG geschuldet.

Zusammenfassung und Ausblick

Es lässt sich also zusammenfassend sagen, dass unsere phytochemischen Untersuchungen des Catechins EGCG der Pflanze *Camellia sinensis* (L.) Kuntze in Bezug auf das murine DSS-Kolitis-Modell die antioxidativen und antientzündlichen Eigenschaften des EGCG herausstellten. Vor allem bei der gleichzeitigen Gabe des *Piper nigrum* (L.) Alkaloids Piperin war das therapeutische Potential des EGCG sichtbar, da Piperin in den hier durchgeführten Versuchen wesentlich zu einer höheren Bioverfügbarkeit des EGCG beitrug. Die Haupteffekte der Behandlung mit EGCG waren neben einer Reduktion von ROS und einem geringeren Leukozyteninfiltrat im Kolongewebe eine verminderte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α in Makrophagenzellen. Die antioxidativ wirkenden Enzyme SOD und GPO wiesen unter der Behandlung mit EGCG ein normales Aktivitätsniveau auf und konnten die Zellen vor ROS schützen. EGCG führte auf Genebene in primär isolierten Kolonepithelzellen zu einer verminderten Expression des ERCC6-Gens, während die Expression der Glutathion-Reduktase erhöht war. In der Zusammenschau führten diese Einzeleffekte zu einer signifikanten Verbesserung des kolitogenen Krankheitsgeschehens: die behandelten Mäuse zeigten weniger histologische Schäden in der Kolonschleimhaut, hatten einen stabileren Gewichtsverlauf und überlebten signifikant länger.

Da sowohl der weltweite Konsum des Grünen Tees als auch des Schwarzen Pfeffers (Weltproduktion 277.000 Tonnen im Jahre 2007) sehr hoch ist, wird sich die gleichzeitige Nahrungsaufnahme beider Produkte in vielen Diäten finden. Dies könnte ein Grund für die vielen gesundheitsförderlichen Effekte des EGCG sein (121) (134) und deutet den Bedarf weiterer phytochemischer und nahrungsmitteltechnischer Untersuchungen zur Fragestellung des

therapeutischen Potentials des Grünen Tees und des EGCG bezüglich humaner chronisch entzündlicher Darmerkrankungen an.

5 Originaldaten und Literaturverzeichnis

5.1 Originaldaten

Versuch „GTP 8“: Beispiel für einen Gewichtsverlauf. Dargestellt sind die Originalgewichte in Gramm der Gruppe 1 („Ko“, Verabreichung von PBS), Gruppe 2 („Pip“, Verabreichung von Piperin) und Gruppe 3 („E“, Verabreichung von EGCG und Piperin). Die Abbildung 1 basiert auf Berechnungen dieser Originaldaten.

	1. Tag	8. Tag	10. Tag	15. Tag	17. Tag	20. Tag	22. Tag	25. Tag	27. Tag	29. Tag	32. Tag	34. Tag	36. Tag
Ko 0 ♀	18,2	20	20,2	19,7	19,4	20,8	20,4	21,3	20,5	19,1	18,5	19,2	19,7
Ko 1 ♀	18,2	19,4	20	19,7	18	20,3	21,5	21,3	20,7	20,2	21,6	21,7	21,4
Ko 2 ♀	19,5	20,8	21	20,5	20,1	22	22,5	22,2	22,2	21,3	19,4	21,1	22,1
Ko 3 ♀	19	20	19,9	19,6	19,3	20,9	21,4	21,4	20,3	19,2	18,6	20,3	20,8
Ko 4 ♀	19,8	20,4	20,6	20	18,2	20,5	20,9	21,3	20,9	21	21	21,8	21,3
Pip 0 ♀	17,8	18,4	18,8	17,2	16,2	16,7	17,8	17,8	16,4	16,1	16,8	17,6	17,8
Pip 1 ♀	17,6	18,5	19,2	18,4	16,4	18,3	18,4	19,8	18,7	18,7	19,6	19,9	19,8
Pip 2 ♀	18,3	18,8	18,4	18,1	17	18,2	18,9	19,6	17,6	18,2	18,7	19,5	19,9
Pip 3 ♀	18,6	19,5	19,9	18,1	16,7	17,8	18,5	19,3	18,6	19,2	20,5	21,3	21,5
Pip 4 ♀	18,5	19,4	19,6	18,8	17,2	20,1	20,4	20,5	19,4	19,4	19,4	20,4	20,4
E 0 ♀	19,7	21,3	21	21	19,1	19,1	20,3	21,8	21,5	22	23,3	23,4	24
E 1 ♀	18,4	19,7	19,9	19,1	18,9	20,4	21	21	21,1	20,5	21,7	21,3	21,8
E 2 ♀	19,5	21,9	21,8	22	20,4	23,1	23,3	23,6	22,6	23,3	22,8	22,6	23,2
E 3 ♀	18,8	19,9	20	20,2	18,9	20,8	20,6	20,8	20,4	20,2	20,6	22	21,6
E 4 ♀	19,5	21,7	21,5	21,8	20,4	22,4	22,7	23	21,9	22,3	23,3	22,8	22,8

(Fortsetzung)

	39. Tag	41. Tag	43. Tag	46. Tag	48. Tag	50. Tag	53. Tag	55. Tag	57. Tag	59. Tag	61. Tag
Ko 0 ♀	20,5	21,4	21	19,3	22,1	21,5	21,8	21,7	19,5	17,7	19,6
Ko 1 ♀	21,7	20,7	21,6	21	22,1	22,1	22,8	22	21	21,5	22,3
Ko 2 ♀	22,2	23,4	22,4	23,3	24,2	23,9	24,1	21,6	20,1	18,5	17,5
Ko 3 ♀	20,7	21,2	20,9	20,8	22,4	22,1	22,1	21,2	19,7	17,2	16,6
Ko 4 ♀	22,7	22,3	21,3	22,7	22,5	22,3	22,6	21,1	18,8	18	16,5

Pip 0 ♀	19,4	20,5	19,7	20	20,4	20,5	20,7	19,5	18,4	17,6	18,7
Pip 1 ♀	20,4	20,8	20,5	20	20,7	20,4	21,3	19	16,7	14,3	
Pip 2 ♀	20,1	21	20,5	20,7	21	20,8	21,2	18,5	17,2	15,6	16
Pip 3 ♀	21,3	20,9	21,5	21,1	21,7	22,2	21,9	20,7	18,7	15,7	
Pip 4 ♀	20,9	19,6	18,5	16,1	15,9	16,4	17,6	16,4	14,9		
E 0 ♀	23,6	23,6	23,7	23,8	24,1	23,8	24,2	23,2	22,8	22	22,6
E 1 ♀	22,1	21,7	22,1	21,5	22,7	22,3	23,1	21,7	21,2	21,1	21,1
E 2 ♀	23,6	22,1	22,8	23,6	24,8	24,9	22,2	24,2	23,5	24,5	24,8
E 3 ♀	21,6	21,5	21,7	21,3	22	21,7	22,5	22,5	21,3	21,3	21,5
E 4 ♀	23,3	22,4	22,1	22,2	22,3	23,5	23,8	23,7	23,4	24,3	25,2

Versuch „GTP 7“ und „GTP 8“: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der Gewichtsdaten.

ONEWAY ANOVA

weight

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,295	2	,147	10,514	,001
Innerhalb der Gruppen	,294	21	,014		
Gesamt	,589	23			

Versuch „GTP 7“ und „GTP 8“: Post-hoc-Test: Multipler Mittelwertsvergleich per Turkey-Test zur inhaltlichen Klärung der Mittelwertsunterschiede der Gewichtsdaten.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: weight

	(I) treatment	(J) treatment	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Obergrenze	Untergrenze
Tukey-HSD	Ctrl.	Piperine	,0188909	,0700439	,961	-,157660	,195441
		EGCG + Piperine	-,2190031(*)	,0529482	,001	-,352463	-,085543
	Piperine	Ctrl.	-,0188909	,0700439	,961	-,195441	,157660
		EGCG + Piperine	-,2378940(*)	,0700439	,007	-,414445	-,061343
	EGCG + Piperine	Ctrl.	,2190031(*)	,0529482	,001	,085543	,352463
		Piperine	,2378940(*)	,0700439	,007	,061343	,414445

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Versuch „GTP 8“: Log-Rang Test zum Gruppenvergleich der Gruppe 1 (Kontrollgruppe PBS, n = 5) und Gruppe 3 (EGCG + Piperin, n = 5) im Rahmen der Überlebensanalyse.

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,242	1	,134

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Gruppe.

Versuch „GTP 7“ und „GTP 8“: Log-Rang Test zum Gruppenvergleich der Gruppen 1 (Kontrollgruppe PBS, n = 10) und Gruppen 3 (EGCG + Piperin, n = 10) im Rahmen der Überlebensanalyse.

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,600	1	,032

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Gruppe.

Versuch „GTP 7“ und „GTP 8“: Log-Rang Test zum Gruppenvergleich der Gruppen 2 (Kontrollgruppe Piperin, n = 10) und Gruppen 3 (EGCG + Piperin, n = 10) im Rahmen der Überlebensanalyse.

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,110	1	,146

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von Gruppe.

Versuch „GTP 9“ und „GTP 10“: Beispiel für Kolonlängen. Dargestellt sind die Originallängen in cm der Gruppe 1 („Ko“, Verabreichung von PBS), Gruppe 2 („Pip“, Verabreichung von Piperin) und Gruppe 3 („E“, Verabreichung von EGCG und Piperin). Die Abbildung 5 basiert auf Berechnungen dieser Originaldaten.

	GTP 9	GTP 10	Mittelw.
Ko 0 ♀	6.2	6.2	6.2
Ko 1 ♀	5.6	5.4	5.5
Ko 2 ♀	5.6	5	5.3
Ko 3 ♀	4.7	4.9	4.8
Pip 0 ♀	6	6.4	6.2
Pip 1 ♀	6.1	6.3	6.2
Pip 2 ♀	5.7	5.7	5.7
Pip 3 ♀	5.9	5.1	5.5
E 0 ♀	6.7	6.9	6.8
E 1 ♀	6.3	6.1	6.2
E 2 ♀	6.3	6.3	6.3
E 3 ♀	6.5	6.1	6.3

Versuch „GTP 9“: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der Längendaten.

ONEWAY ANOVA

bowel lenght

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	1,712	2	,856	4,762	,039
Innerhalb der Gruppen	1,618	9	,180		
Gesamt	3,329	11			

Versuch „GTP 9“: Post-hoc-Test: Multipler Mittelwertsvergleich per Turkey-Test zur inhaltlichen Klärung der Mittelwertsunterschiede der Längendaten.

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: bowel length
Tukey-HSD

(I) treatment	(J) treatment	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Obergrenze	Untergrenze
Ctrl.	Piperine	-,45000	,29977	,335	-1,2870	,3870
	EGCG + Piperine	-,92500(*)	,29977	,032	-1,7620	-,0880
Piperine	Ctrl.	,45000	,29977	,335	-,3870	1,2870
	EGCG + Piperine	-,47500	,29977	,301	-1,3120	,3620
EGCG + Piperine	Ctrl.	,92500(*)	,29977	,032	,0880	1,7620
	Piperine	,47500	,29977	,301	-,3620	1,3120

* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau .05 signifikant.

Versuch „GTP 7“: Beispiel für MPO-Konzentrationen. Dargestellt sind die Originalkonzentrationen in mU/mg Kolongewebe der Gruppe 1 („Ko“, Verabreichung von PBS), Gruppe 2 („Pip“, Verabreichung von Piperin) und Gruppe 3 („E“, Verabreichung von EGCG und Piperin). Die Abbildung 6 basiert auf Berechnungen dieser Originaldaten.

GTP 7	
Ko 0 ♀	1328
Ko 1 ♀	637
Ko 2 ♀	1520
Ko 3 ♀	637
Ko 4 ♀	979
Pip 0 ♀	1332
Pip 1 ♀	1449
Pip 2 ♀	1142
Pip 3 ♀	1032
Pip 4 ♀	k. Ergebnis
E 0 ♀	401
E 1 ♀	k. Ergebnis
E 2 ♀	317
E 3 ♀	304
E 4 ♀	743

Versuch „GTP 7“: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der MPO-Konzentrationen.

ONEWAY ANOVA

MPO

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	1371926,469	2	685963,235	7,868	,009
Innerhalb der Gruppen	871878,300	10	87187,830		
Gesamt	2243804,769	12			

Versuch „GTP 7“: Beispiel für MDA-Konzentrationen. Dargestellt sind die Originalkonzentrationen in mmol/g Kolongewebe der Gruppe 1 („Ko“, Verabreichung von PBS), Gruppe 2 („Pip“, Verabreichung von Piperin) und Gruppe 3 („E“, Verabreichung von EGCG und Piperin). Die Abbildung 7 basiert auf Berechnungen dieser Originaldaten.

	GTP 7
Ko 0 ♀	8.82
Ko 1 ♀	9.62
Ko 2 ♀	9.78
Ko 3 ♀	9.03
Ko 4 ♀	9.77
Pip 0 ♀	9.87
Pip 1 ♀	9.43
Pip 2 ♀	8.43
Pip 3 ♀	8.87
Pip 4 ♀	9.55
E 0 ♀	3.5
E 1 ♀	6
E 2 ♀	4.13
E 3 ♀	4.95
E 4 ♀	5.48

Versuch „GTP 7“: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der MDA-Konzentrationen.

ONEWAY ANOVA

MDA

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	67,472	2	33,736	66,597	,000
Innerhalb der Gruppen	6,079	12	,507		
Gesamt	73,551	14			

Zellkulturversuche mit RAW 264.7-Zellen: Dargestellt sind die Originalkonzentrationen von TNF- α und IL-6 in mg/ml Überstand der Gruppe 1 („Ctrl.“, keine Stimulation oder Behandlung), Gruppe 2 („Ctrl. + LPS“, Stimulation durch LPS), Gruppe 3 („150 μ M EGCG“, Stimulation durch LPS und Behandlung mit EGCG), Gruppe 4 („150 μ M EGCG+ 100 μ M Piperine“, Stimulation durch LPS und Behandlung mit EGCG und Piperin und Gruppe 5 („150 μ M Piperine“, Stimulation durch LPS und Behandlung mit Piperin). Die Abbildung 9 basiert auf Berechnungen der Mittelwerte dieser Originaldaten.

		Ctrl.	Ctrl.+LPS	150 μ M EGCG	150 μ M EGCG+ 100 μ M Piperine	150 μ M Piperine
TNF- α	1.	3,15	2989	2948	84	2961
	2.	0,85	3219	2309	43	1397
	3.	2	3353	2458	57	2004
IL-6	1.	18	1712	937	42	1408
	2.	23	1642	501	29	1510
	3.	24	1640	523	9	984

Zellkulturversuche mit RAW 264.7-Zellen: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der TNF- α -Konzentrationen.

ONEWAY ANOVA

TNF α

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	25962721,733	4	6490680,433	42,266	,000
Innerhalb der Gruppen	1535660,645	10	153566,065		
Gesamt	27498382,378	14			

Zellkulturversuche mit RAW 264.7-Zellen: Ergebnis der Varianzanalyse zur Testung signifikanter Mittelwertsunterschiede der IL-6-Konzentrationen.

ONEWAY ANOVA

IL6

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	6604328,400	4	1651082,100	58,922	,000
Innerhalb der Gruppen	280213,333	10	28021,333		
Gesamt	6884541,733	14			

5.2 Literaturverzeichnis

1. **Abaseman S, Waterhouse A, Korver O** (2001) The health effects of tea and tea components: opportunities for standardizing research methods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 41: 387-412.
2. **Abboud PA, Hake PW, Burroughs TJ, Odoms K, O'Connor M, Mangeshkar P, Wong HR, and Zingarelli B** (2008) Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. *Eur J Pharmacol* 579: 411-417.
3. **Acheson ED and True Love SC** (1961) Early weaning in the aetiology of ulcerative colitis. A study of feeding in infancy in cases and controls. *Br Med J* 2: 929-933.
4. **Adhami VM, Ahmad N, and Mukhtar H** (2003) Molecular targets for green tea in prostate cancer prevention. *J Nutr* 133: 2417S-2424S.
5. **Adrian HG** (1990) Das Teebuch. Geschichte und Geschichten. Anbau, Herstellung und Rezepte, VMA, Wiesbaden
6. **Ahmed S, Marotte H, Kwan K, Ruth JH, Campbell PL, Rabquer BJ, Pakozdi A, and Koch AE** (2008) Epigallocatechin-3-gallate inhibits IL-6 synthesis and suppresses transsignaling by enhancing soluble gp130 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14692-14697.
7. **Ahn SC, Kim GY, Kim JH, Baik SW, Han MK, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Kang JH, Kim BH, Oh YH, and Park YM** (2004) Epigallocatechin-3-gallate, constituent of green tea, suppresses the LPS-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 148-155.
8. **Andres PG and Friedman LS** (1999) Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28: 255-281, vii.
9. **Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K,**

- Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, and Neurath MF** (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6: 583-588.
10. **Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, and Karin M** (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 270: 286-290.
 11. **Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, and Keshavarzian A** (2000) Oxidant-induced intestinal barrier disruption and its prevention by growth factors in a human colonic cell line: role of the microtubule cytoskeleton. *Free Radic Biol Med* 28: 727-738.
 12. **Banchereau J and Steinman RM** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
 13. **Barnes PJ and Karin M** (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-1071.
 14. **Bilotta JJ and Waye JD** (1989) Hydrogen peroxide enteritis: the "snow white" sign. *Gastrointest Endosc* 35: 428-430.
 15. **Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, and Lochs H** (2006) Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? *Gut* 55: 342-347.
 16. **Calkins BM** (1989) A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 34: 1841-1854.
 17. **Cao W, Vrees MD, Kirber MT, Fiocchi C, and Pricolo VE** (2004) Hydrogen peroxide contributes to motor dysfunction in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G833-843.
 18. **Chiarpotto E, Scavazza A, Leonarduzzi G, Camandola S, Biasi F, Teggia PM, Garavoglia M, Robecchi A, Roncari A, and Poli G** (1997) Oxidative damage and transforming growth factor beta 1 expression in pretumoral and tumoral lesions of human intestine. *Free Radic Biol Med* 22: 889-894.

19. **Chung FL, Schwartz J, Herzog CR, and Yang YM** (2003) Tea and cancer prevention: studies in animals and humans. *J Nutr* 133: 3268S-3274S.
20. **Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT, and Blumberg RS** (1999) Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13938-13943.
21. **Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, and Sedergran DJ** (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69: 238-249.
22. **Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, Di Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Ferrau O, Mansi C, Ingrosso M, and Valpiani D** (1998) Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol* 27: 397-404.
23. **Crama-Bohbouth GE, Arndt JW, Pena AS, Verspaget HW, Tjon ATRT, Weterman IT, Pauwels EK, and Lamers CB** (1988) Value of indium-111 granulocyte scintigraphy in the assessment of Crohn's disease of the small intestine: prospective investigation. *Digestion* 40: 227-236.
24. **Crespy V and Williamson G** (2004) A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 134: 3431S-3440S.
25. **Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, and Lennard-Jones J** (1998) Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 115: 1066-1071.
26. **Curzio M, Esterbauer H, Poli G, Biasi F, Cecchini G, Di Mauro C, Cappello N, and Dianzani MU** (1987) Possible role of aldehydic lipid

- peroxidation products as chemoattractants. *Int J Tissue React* 9: 295-306.
27. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, and Salvemini D** (2001) Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135-159.
 28. **Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, Bloemena E, Pena AS, Meuwissen SG, and Van Rees EP** (1998) Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol* 114: 385-391.
 29. **Dirks E, Forster S, Thom M, Quebe-Fehling E, and Goebell H** (1994) Prospective study of the incidence and prevalence of ulcerative colitis in a large urban population in Germany (western Ruhr area). *Z Gastroenterol* 32: 332-337.
 30. **Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, and Rodriguez H** (2002) Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115.
 31. **Douglas KT** (1987) Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 59: 103-167.
 32. **Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, and Meyer zum Buschenfelde KH** (1995) Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 102: 448-455.
 33. **Ekbom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, and Zack MM** (1990) Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: a case-control study. *Am J Epidemiol* 132: 1111-1119.
 34. **Enck P and Schafer R** (1996) Psychosocial factors in Crohn disease--an overview. *Z Gastroenterol* 34: 708-713.
 35. **Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, and Chu FF** (2001) Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G848-855.

36. **Faubion WA, Jr., Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, and Sandborn WJ** (2001) The natural history of corticosteroid therapy for inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 121: 255-260.
37. **Feng WY** (2006) Metabolism of green tea catechins: an overview. *Curr Drug Metab* 7: 755-809.
38. **Fiocchi C** (1998) Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205.
39. **Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, Raso A, Orlando A, Oliva L, Giofre MR, Maggio A, Mattaliano A, Macaluso A, and Cottone M** (2005) Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol* 100: 2730-2736.
40. **Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, Kozu T, Tada Y, Suga K, Imai K, and Nakachi K** (1998) Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res* 402: 307-310.
41. **Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, and Strober W** (1996) Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 157: 1261-1270.
42. **Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, and Coggon D** (1994) Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343: 766-767.
43. **Gonnella PA and Neutra MR** (1984) Membrane-bound and fluid-phase macromolecules enter separate prelysosomal compartments in absorptive cells of suckling rat ileum. *J Cell Biol* 99: 909-917.
44. **Graham HN** (1992) Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21: 334-350.
45. **Grant CM, Collinson LP, Roe JH, and Dawes IW** (1996) Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress

- and is a target gene for γ AP-1 transcriptional regulation. *Mol Microbiol* 21: 171-179.
46. **Grisham MB, MacDermott RP, and Deitch EA** (1990) Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation* 14: 669-680.
 47. **Grisham MB, Volkmer C, Tso P, and Yamada T** (1991) Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 101: 540-547.
 48. **Gross V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KD, and Scholmerich J** (1994) Free radicals in inflammatory bowel diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatogastroenterology* 41: 320-327.
 49. **Gutteridge JM** (1995) Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828.
 50. **Halliwell B and Whiteman M** (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231-255.
 51. **Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, and Schreiber S** (1999) Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 65: 1647-1655.
 52. **Harborne JB** (1998) *Phytochemical Dictionary- A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*, Taylor & Frost, London.
 53. **Harborne JB and Williams CA** (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
 54. **Haslam E** (1998) *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition & Physiological Action: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge.
 55. **Haslam E** (1998) *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, Cambridge University Press, Cambridge.

56. **Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, and Strober W** (2002) Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. *Immunity* 17: 629-638.
57. **Hider RC, Liu ZD, and Khodr HH** (2001) Metal chelation of polyphenols. *Methods Enzymol* 335: 190-203.
58. **Higdon JV and Frei B** (2003) Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43: 89-143.
59. **Hoffmann JC, Pawlowski NN, Kuhl AA, Hohne W, and Zeitz M** (2002) Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology* 70: 121-130.
60. **Hollander D** (1999) Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep* 1: 410-416.
61. **Holmes EW, Yong SL, Eiznhamer D, and Keshavarzian A** (1998) Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 43: 1088-1095.
62. **Holtmann MH, Schutz M, Galle PR, and Neurath MF** (2002) Functional relevance of soluble TNF-alpha, transmembrane TNF-alpha and TNF-signal transduction in gastrointestinal diseases with special reference to inflammatory bowel diseases. *Z Gastroenterol* 40: 587-600.
63. **Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, and Thomas G** (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-823.
64. **Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, and Meister A** (1991) Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1913-1917.
65. **Janssen E** (2003) Janssens Tee Almanach, Felicitas Hübner Verlag, Lehrte.
66. **Kaplan EL MP** (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Ass* 53: 457-481.

-
67. **Kaplan M, Mutlu EA, Benson M, Fields JZ, Banan A, and Keshavarzian A** (2007) Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders. *Complement Ther Med* 15: 207-216.
 68. **Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C, and Winship D** (1992) Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 103: 177-185.
 69. **Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, Aiso S, and Tsuchiya M** (1988) Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 33: 951-955.
 70. **Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, and Verspaget HW** (2003) Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 201: 28-36.
 71. **Kruidenier L and Verspaget HW** (2002) Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther* 16: 1997-2015.
 72. **Kuhnle G, Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C, and Hahn U** (2000) Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 507-512.
 73. **Lambert JD, Hong J, Kim DH, Mishin VM, and Yang CS** (2004) Piperine enhances the bioavailability of the tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. *J Nutr* 134: 1948-1952.
 74. **Lambert JD, Lee MJ, Lu H, Meng X, Hong JJ, Seril DN, Sturgill MG, and Yang CS** (2003) Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. *J Nutr* 133: 4172-4177.
 75. **Lambert JD and Yang CS** (2003) Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *J Nutr* 133: 3262S-3267S.

-
76. **Lamm ME** (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* 51: 311-340.
 77. **Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, and Binder V** (1994) Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 107: 3-11.
 78. **Licht CL, Stevnsner T, and Bohr VA** (2003) Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet* 73: 1217-1239.
 79. **Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, and Mullin GE** (1996) Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 41: 2078-2086.
 80. **Lin YL and Lin JK** (1997) (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 52: 465-472.
 81. **Lu H, Meng X, and Yang CS** (2003) Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of catechol-O-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate. *Drug Metab Dispos* 31: 572-579.
 82. **Luo D, Min W, Lin XF, Wu D, Xu Y, and Miao X** (2006) Effect of epigallocatechingallate on ultraviolet B-induced photo-damage in keratinocyte cell line. *Am J Chin Med* 34: 911-922.
 83. **MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, and Thompson JA** (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11853-11858.
 84. **Marklund SL** (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *Biochem J* 222: 649-655.
 85. **Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, Nikolaus S, Andus T, Schubert S, Olson A, Bao W, Folsch UR, and Schreiber S** (2002) Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated

- with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. *Pharmacogenetics* 12: 509-515.
86. **Mazzon E, Muia C, Paola RD, Genovese T, Menegazzi M, De Sarro A, Suzuki H, and Cuzzocrea S** (2005) Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic Res* 39: 1017-1025.
 87. **Meyer CT, Brand M, DeLuca VA, and Spiro HM** (1981) Hydrogen peroxide colitis: a report of three patients. *J Clin Gastroenterol* 3: 31-35.
 88. **Miles AM and Grisham MB** (1994) Antioxidant properties of aminosalicylates. *Methods Enzymol* 234: 555-572.
 89. **Monte M, Davel LE, and Sacerdote de Lustig E** (1997) Hydrogen peroxide is involved in lymphocyte activation mechanisms to induce angiogenesis. *Eur J Cancer* 33: 676-682.
 90. **Moser G** (2001) Guidelines of the DGVS. Psychosomatic aspects. German Society of Digestive and Metabolic Diseases. *Z Gastroenterol* 39: 67-68.
 91. **Mosmann TR and Sad S** (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-146.
 92. **Mulder TP, Verspaget HW, Janssens AR, de Bruin PA, Pena AS, and Lamers CB** (1991) Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* 32: 1146-1150.
 93. **Mullane KM, Kraemer R, and Smith B** (1985) Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods* 14: 157-167.
 94. **Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, and Binder V** (1994) Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 35: 360-362.
 95. **Na HK, Kim EH, Jung JH, Lee HH, Hyun JW, and Surh YJ** (2008) (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme

- expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* 476: 171-177.
96. **Na HK and Surh YJ** (2006) Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate. *Mol Nutr Food Res* 50: 152-159.
 97. **Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, and Hara Y** (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med* 21: 895-902.
 98. **Netsch MI, Gutmann H, Aydogan C, and Drewe J** (2006) Green tea extract induces interleukin-8 (IL-8) mRNA and protein expression but specifically inhibits IL-8 secretion in caco-2 cells. *Planta Med* 72: 697-702.
 99. **Nieto N, Torres MI, Fernandez MI, Giron MD, Rios A, Suarez MD, and Gil A** (2000) Experimental ulcerative colitis impairs antioxidant defense system in rat intestine. *Dig Dis Sci* 45: 1820-1827.
 100. **Nikolaus S, Raedler A, Kuhbacker T, Sfikas N, Folsch UR, and Schreiber S** (2000) Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet* 356: 1475-1479.
 101. **Nusrat A, Turner JR, and Madara JL** (2000) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G851-857.
 102. **Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K** (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
 103. **Ohyashiki T, Ohtsuka T, and Mohri T** (1986) A change in the lipid fluidity of the porcine intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. Studies using pyrene and fluorescent stearic acid derivatives. *Biochim Biophys Acta* 861: 311-318.
 104. **Okushio K, Suzuki M, Matsumoto N, Nanjo F, and Hara Y** (1999) Methylation of tea catechins by rat liver homogenates. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 430-432.

-
105. **Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, and Binder V** (1991) Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 324: 84-88.
 106. **Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, and Abbas AK** (1997) Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6: 411-417.
 107. **Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, and Remacle J** (1990) Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 51: 283-297.
 108. **Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, and Targan SR** (1997) A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 159: 6276-6282.
 109. **Porath D, Riegger C, Drewe J, and Schwager J** (2005) Epigallocatechin-3-gallate impairs chemokine production in human colon epithelial cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1172-1180.
 110. **Pravda J** (2005) Radical induction theory of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 11: 2371-2384.
 111. **Rao R, Baker RD, and Baker SS** (1999) Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. *Biochem Pharmacol* 57: 685-695.
 112. **Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, and Holycross M** (1997) Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 273: G812-823.
 113. **Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, and Ricciardi-Castagnoli P** (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-367.
 114. **Rezaie A, Ghorbani F, Eshghtork A, Zamani MJ, Dehghan G, Taghavi B, Nikfar S, Mohammadirad A, Daryani NE, and Abdollahi M**

- (2006) Alterations in salivary antioxidants, nitric oxide, and transforming growth factor-beta 1 in relation to disease activity in Crohn's disease patients. *Ann N Y Acad Sci* 1091: 110-122.
115. **Rezaie A, Parker RD, and Abdollahi M** (2007) Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Dis Sci* 52: 2015-2021.
116. **Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, and Pridham JB** (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22: 375-383.
117. **Riedle B and Kerjaschki D** (1997) Reactive oxygen species cause direct damage of Engelbreth-Holm-Swarm matrix. *Am J Pathol* 151: 215-231.
118. **Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, and Hudson TJ** (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 29: 223-228.
119. **Ritchie JK, Wadsworth J, Lennard-Jones JE, and Rogers E** (1987) Controlled multicentre therapeutic trial of an unrefined carbohydrate, fibre rich diet in Crohn's disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295: 517-520.
120. **Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, and Stockbrugger RW** (1998) Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 243-249.
121. **Sano J, Inami S, Seimiya K, Ohba T, Sakai S, Takano T, and Mizuno K** (2004) Effects of green tea intake on the development of coronary artery disease. *Circ J* 68: 665-670.

122. **Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, and Jewell DP** (1996) Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 14: 199-202.
123. **Schleinkofer OF** (1982) *Der Tee*, de Gruyter, Berlin New York.
124. **Schmid RM, Adler G, and Liptay S** (1998) Activation of NFkappaB in inflammatory bowel disease. *Gut* 43: 587-588.
125. **Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, and Schulzke JD** (1999) Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116: 301-309.
126. **Schwedhelm E, Maas R, Troost R, and Boger RH** (2003) Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress. *Clin Pharmacokinet* 42: 437-459.
127. **Selby CP and Sancar A** (1997) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J Biol Chem* 272: 1885-1890.
128. **Shin HY, Kim SH, Jeong HJ, Kim SY, Shin TY, Um JY, Hong SH, and Kim HM** (2007) Epigallocatechin-3-gallate inhibits secretion of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 through the attenuation of ERK and NF-kappaB in HMC-1 cells. *Int Arch Allergy Immunol* 142: 335-344.
129. **Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, and van Blankenstein M** (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39: 690-697.
130. **Sies H** (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.
131. **Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RN, Blake DR, and Rampton DS** (1992) Chemiluminescence assay of mucosal reactive

- oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 103: 186-196.
132. **Skrzydłewska E, Ostrowska J, Farbiszewski R, and Michalak K** (2002) Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. *Phytomedicine* 9: 232-238.
133. **Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, Luegering A, Heidemann J, Lebiedz P, Rijcken E, Kiesel L, Domschke W, Kucharzik T, and Maaser C** (2007) Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. *Inflamm Bowel Dis* 13: 1385-1390.
134. **Su LJ and Arab L** (2002) Tea consumption and the reduced risk of colon cancer -- results from a national prospective cohort study. *Public Health Nutr* 5: 419-425.
135. **Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, and Lochs H** (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54.
136. **Tham DM, Whitin JC, and Cohen HJ** (2002) Increased expression of extracellular glutathione peroxidase in mice with dextran sodium sulfate-induced experimental colitis. *Pediatr Res* 51: 641-646.
137. **Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, and Wakefield AJ** (1996) Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *Bmj* 312: 95-96.
138. **Timmer A and Goebell H** (1999) Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995--a prospective study in an urban population in Germany. *Z Gastroenterol* 37: 1079-1084.
139. **Trier JS** (1991) Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 20: 531-547.
140. **Tuo J, Jaruga P, Rodriguez H, Bohr VA, and Dizdaroglu M** (2003) Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. *Faseb J* 17: 668-674.

-
141. **Vaidyanathan JB and Walle T** (2002) Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metab Dispos* 30: 897-903.
 142. **Varilek GW, Yang F, Lee EY, deVilliers WJ, Zhong J, Oz HS, Westberry KF, and McClain CJ** (2001) Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity. *J Nutr* 131: 2034-2039.
 143. **Wang ZY, Cheng SJ, Zhou ZC, Athar M, Khan WA, Bickers DR, and Mukhtar H** (1989) Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat Res* 223: 273-285.
 144. **Watzl B LC** (2005) Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln, Hippokrates, Stuttgart.
 145. **Wirtz S and Neurath MF** (2000) Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 15: 144-160.
 146. **Wright JP, Froggatt J, O'Keefe EA, Ackerman S, Watermeyer S, Louw J, Adams G, Girdwood AH, Burns DG, and Marks IN** (1986) The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980-1984. *S Afr Med J* 70: 10-15.
 147. **Yakes FM and Van Houten B** (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 514-519.
 148. **Yang CS, Maliakal P, and Meng X** (2002) Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 25-54.
 149. **Yi S** (1984) Die Welt in einer Tasse Tee, Wien.
 150. **Yin MJ, Yamamoto Y, and Gaynor RB** (1998) The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396: 77-80.
 151. **Zingarelli B, Hake PW, Burroughs TJ, Piraino G, O'Connor M, and Denenberg A** (2004) Activator protein-1 signalling pathway and

apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis. *Immunology* 113: 509-517.

5.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Klinik des MC und der CU.
- Tab. 2 Flavonoid-Unterklassen und deren Unterscheidungsmerkmale aus Haslam, E., 1998.(55).
- Tab. 3 Flavonoidkonzentrationen in verschiedenen Teesorten.

5.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 *Camellia sinensis var. japonica* im Botanischen Garten Bielefeld.
- Abb. 2a Molekularstruktur der sechs Untergruppen der Flavonoide.
- Abb. 2b Molekularstruktur des EGCG.
- Abb.3a Bild einer durch DSS-Gabe an Kolitis erkrankten C57/BL6-Maus.
- Abb.3b Gewichtsverlauf relativer Gewichte der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“ über einen Zeitraum von 61 Tagen.
- Abb. 4 Kaplan-Meier-Schätzer für das Überleben der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“.
- Abb. 5 Histologiebilder des Kolons der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“, H.-E.-Färbung.
- Abb. 6 Mittlere Punktwerte der verblindet erhobenen histologischen Auswertung der Kolonmukosa der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“.
- Abb. 7 Mittlere Werte der Kolonlänge der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG und Piperine“.
- Abb. 8 Mittlere Werte der MPO-Aktivität im Kolongewebe der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“.

- Abb. 9 Mittlere Werte der MDA-Konzentrationen im Kolongewebe der Experimentalgruppen „Ctrl.“, „Piperine“ und „EGCG + Piperine“.
- Abb. 10 Immunhistochemische Färbung des Kolongewebes, Färbung der Enzyme SOD und GPO im Kolongewebe der Experimentalgruppen „Ctrl.“ und „EGCG + Piperine“.
- Abb. 11 Mittlere TNF- α - und IL-6-Konzentrationen, produziert von RAW 264.7 Zellen nach LPS-Stimulation und verschiedener Behandlung mit EGCG u./ Piperin.
- Abb. 12 Expression der Gene ERCC6 und GSR in Kolonepithelzellen von Mäusen.

6 Danksagung und Lebenslauf

6.1 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Torsten Kucharzik, Priv.-Doz. Dr. Christian Maaser, Priv.-Doz. Dr. Andreas Lügering, Priv.-Doz. Dr. Jan Heidemann und Dr. Sabine Westphal. Sie haben gerade außerhalb der „ordentlichen“ Veranstaltungen an der Universität mein Wissen, mein Interesse und mein Verständnis für Wissenschaft und Forschung geweckt und entwickelt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Laborchefin Dr. Sabine Westphal. Eine solche intensive, umfassende und positive Betreuung und Unterstützung kann sich jeder Doktorand nur wünschen. Sonja Dufentester und Elke Weber danke ich für die exzellente technische Unterstützung.

Ich danke meiner Familie, besonders meinen Eltern Inge und Georg Brückner und meinen Großeltern Margarete und Max Brückner, die mir das Studium der Humanmedizin und diese Arbeit ermöglicht haben und mich auch darüber hinaus stets unterstützt und mir zur Seite gestanden haben.

Danke an Stefan, Maria, Olli und Jens.

6.2 Lebenslauf



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Frau
Dr. rer. nat. Sabine Westphal
Medizinische Klinik und Poliklinik B
unter Station 8
Universitätsklinikum Münster
Domagkstraße 3 a
48149 Münster

Tierschutz
Durchführung von Tierversuchen; Genehmigung gem. § 8 Tierschutzgesetz
Ihr Antrag vom 02.04.2008

Sehr geehrte Frau Dr. Westphal,

auf Grund des § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Bekanntmachung der
Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006 (BGBl. I S. 1206) erteile
ich Ihnen unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs die Genehmigung
zur Durchführung des nachstehenden Tierversuches

**„Wirksamkeitsstudie zum Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) bei
chronischer Darmentzündung“;**

Ihrem Genehmigungsantrag und Ihrem o.g. Schreiben entsprechend obliegt
die Verantwortung für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens folgenden
Personen:

Verantwortliche Leiterin: Frau Dr. rer. nat. Sabine Westphal
Stellvertretender Leiter: Herr PD Dr. med. Andreas Lügering

Diese Genehmigung ist für die Dauer von 36 Monaten ab dem 01.07.2008
befristet bis zum

31.07.2011.

Die Genehmigung wird unter den folgenden Bedingungen erteilt und mit
folgenden Auflagen verbunden:

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-50.10.36.08.128

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 01.07.2008

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 bis Haltestelle

"Siemensstraße" oder mit

Buslinie 235 bis Haltestelle

"Blitzkuhlenstraße" und 10 Min.

Fußweg in Richtung Trabrenn-

bahn bis Siemensstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12

1.

Für die Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf folgende Tierart in folgender Anzahl verwendet werden:

339 Mäuse

Die Mäuse sind, in Anlehnung an die Empfehlungen der GV-SOLAS, bei einem Gewichtsverlust von > 20% vorzeitig aus dem Versuch zu nehmen und tierschutzgerecht zu töten. In den Versuchen sollten möglichst Tiere beiderlei Geschlechts zu gleichen Anteilen eingesetzt werden, um geschlechtsspezifische Unterschiede zu erfassen. Ist dies nicht möglich, sind nur Tiere eines Geschlechts einzusetzen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

2.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgt in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Medizinischen Fakultät. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren.

3.

An der Durchführung des Tierversuchsvorhabens darf neben dem Leiter und dem Stellvertreter des Versuchsvorhabens folgende Person beteiligt werden:

Frau Sonja Dufentester

Die bezeichnete Person darf ausschließlich die im Genehmigungsantrag aufgeführten Eingriffe oder Behandlungen im Rahmen der zulässigen Verantwortlichkeitsstufe durchführen.

4.

- a) Für die Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes sowie der hier erteilten Auflagen ist der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Leiter/in des Tierversuchsvorhabens oder der/die in dieser Genehmigung bezeichnete Vertreter/in verantwortlich (§ 9 Abs. 3 TierSchG).
- b) Jeder beabsichtigte Wechsel der Versuchsleiter- oder Stellvertreterposition ist dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW unverzüglich anzuzeigen (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

5.

- a) Diese Genehmigung gilt nur für die Art, Durchführung und Dauer der Eingriffe oder Behandlungen im Umfang des von Ihnen schriftlich beantragten Tierversuchsvorhabens.
- b) Änderungen genehmigter Versuchsvorhaben sind dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW anzuzeigen (§ 8a Abs. 7 Satz 2 TierSchG).

6.

- a) Der Widerruf dieser Genehmigung kann erfolgen, wenn gegen eine der Bedingungen oder eine der Auflagen dieser Genehmigung verstoßen wird.
- b) Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens wird gemäß § 8a Abs. 5 TierSchG untersagt, wenn Tierversuche entgegen tierschutzrechtlicher Bestimmungen durchgeführt werden oder wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer gesetzten Frist abgeholfen wird.

7.

Natürliche und juristische Personen und nicht rechtsfähige Personenvereinigungen haben der zuständigen Behörde auf Verlangen die Auskünfte zu erteilen, die zur Durchführung der der Behörde durch das Tierschutzgesetz übertragenen Aufgaben erforderlich sind, § 16 Abs. 2 TierSchG. Der Inhaber dieser Genehmigung ist auskunftspflichtig nach § 16 Abs. 3 Satz 2 TierSchG und hat die mit der Überwachung beauftragten Personen zu unterstützen.

8.

Die Kennzeichnungen der Käfige oder Einrichtungen, in denen Versuchstiere gehalten werden, sind mit dem zuständigen beamteten Tierarzt abzustimmen.

9.

Ist ein Transport der Versuchstiere zwischen Operations- und Tierhaltungsraum unvermeidbar, so ist dafür Sorge zu tragen, dass mit Hilfe geeigneter Behältnisse dieser Transport so durchgeführt wird, dass negative Beeinflussungen durch äußere Einflüsse (z. B. Witterung, Lärm etc.) ausgeschlossen sind. Es ist insbesondere darauf zu achten, dass die Tiere keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Seite 4 / 01.07.2008

Gegen diesen Bescheid kann nunmehr innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich bei mir, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW, Leibnizstraße 10, 45659 Recklinghausen, einzulegen oder dort zur Niederschrift zu erklären. Falls die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden sollte, würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Hinweise:

1.

Diese Genehmigung ist zeitlich bis zum dem o. g. Termin befristet.

Hierzu werden folgende Hinweise gegeben:

- a) Vor Ablauf der Genehmigungsfrist ist ggf. der Abschluss des Tierversuchsvorhabens mitzuteilen.
- b) Sollte das Tierversuchsvorhaben innerhalb des zeitlichen Genehmigungsrahmens noch nicht abgeschlossen sein, ist rechtzeitig vor Ende der Genehmigungsfrist – über den zuständigen Tierschutzbeauftragten – ein Antrag auf Verlängerung des Tierversuchsvorhabens zu stellen.
- c) Sollte die Absicht bestehen, nach Abschluss dieses Versuches einen gleichen oder ähnlichen Versuch durchzuführen, weise ich schon jetzt darauf hin, dass mit den erneuten Antragsunterlagen gleichzeitig ein zusammenfassender Ergebnisbericht über das jetzt genehmigte Versuchsvorhaben vorzulegen ist.

2.

Auf die Einhaltung der allgemeinen Vorschriften des Tierschutzgesetzes in Bezug auf die Haltung, Betreuung, Ernährung und Pflege der Versuchstiere (§ 2 TierSchG) sowie der Vorschriften für die Durchführung von Tierversuchsvorhaben (§§ 9 und 9a TierSchG) i. V. m. den Straf- und Bußgeldvorschriften der §§ 17 bis 20 TierSchG wird hingewiesen.

3.

Evtl. erforderliche Ausnahmegenehmigungen nach dem Tierschutzgesetz (§ 9 Abs. 1 und Abs. 2 Nr. 7) oder anderen gesetzlichen Bestimmungen bleiben von dieser Genehmigung unberührt.

4.

Wer Tierversuche nach § 7 Abs. 1 TierSchG an Wirbeltieren durchführt, ist nach der Verordnung über die Meldung zu Versuchszwecken oder zu bestimmten anderen Zwecken verwendeter Wirbeltiere vom 4. November 1999 (BGBl. I S. 2156) - Versuchstiermeldeverordnung – verpflichtet, der zuständigen Behörde für jedes Kalenderjahr bis zum 31. März des folgenden Jahres Meldungen nach dem Muster der Anlage zur Versuchstiermeldeverordnung zu erstatten. Zuständige Behörde nach § 1 der Verordnung über Zuständigkeiten auf dem Gebiet des Tierschutzrechts (GV. NW. S. 508) ist hier die Kreisordnungsbehörde.

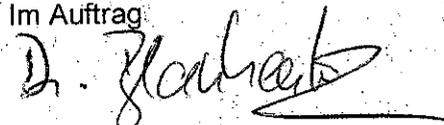
Dieser Bescheid ist nicht gebührenpflichtig.

Bitte geben Sie bei Änderungsanzeigen, Rückfragen oder sonstigen Ergänzungen stets das Aktenzeichen: **8.87-50.10.36.08.128** an.

Es wird empfohlen, allen an der Tierversuchsdurchführung beteiligten Personen diese Genehmigung zur Kenntnis zu geben.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



(Dr. Blankenhorn)