

Deutsches Institut für Ernährungsforschung (DIfE) Potsdam - Rehbrücke,
Abteilung Pharmakologie
Arbeitsgruppe Physiologie des Energiestoffwechsels

Wirkung von Teecatechin Epigallocatechingallat auf den Energiestoffwechsel der Maus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
an der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Dipl.-Ernährungswiss. Maika Friedrich
geb. 01.11.1978, Magdeburg

Potsdam, Februar 2010

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung – keine Bearbeitung 3.0 Deutschland
Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2010/4815/>
URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-48159](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-48159)
<http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-48159>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	8
1.1 Die Entstehung eines neuzeitlichen Krankheitsbildes – Adipositas	8
1.1.1 Definition und Klassifikation der Adipositas	8
1.1.2 Ursachen von Übergewicht und Adipositas	9
1.1.3 Komorbiditäten und Komplikationen der Adipositas	10
1.1.4 Prävention und Therapie von Übergewicht und Adipositas	10
1.2 Grüner Tee – Vorkommen und Inhaltsstoffe	13
1.3 Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Teecatechine	15
1.4 Wirkungen der Teecatechine auf den Organismus	17
1.4.1 Antioxidative Effekte	17
1.4.2 Catechine und Krebs	18
1.4.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen	19
1.4.4 Antiadipogene Effekte	19
1.5 Ziel dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Versuchssubstanz	24
2.2 Tierexperimentelle Methoden	24
2.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen	25
2.2.2 Diätzusammensetzung	25
2.2.3 Versuchsdesign	27
2.2.3.1 Versuch 1: Untersuchungen zum kurz- und mittelfristigen Einfluss des EGCG auf Parameter des Energiestoffwechsels	27
2.2.3.2 Versuch 2: Kurz- und mittelfristige Dosis-Wirkungsbeziehung oraler TEAVIGO® - Applikation	28
2.2.3.3 Versuch 3: Untersuchungen zur Inkorporation diätetisch markierter Triglyceride	29
2.2.3.4 Versuch 4: Untersuchungen zur akuten Fettsäureoxidation und zur Darmpassage	31
2.2.4 Blut- und Gewebeentnahme	32
2.2.5 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels quantitativer NMR-Spektroskopie	33

2.2.6	Energieumsatzmessungen	34
2.2.7	Bestimmung der exogenen Substratoxidation mittels stabiler Isotope	37
2.2.7.1	Semi - quantitative <i>in vivo</i> Analyse der Substratoxidation mittels Atemtests	38
2.2.7.2	Inkorporation natürlich ¹³ C-angereicherter Triglyceride aus Maiskeimöl in verschiedene Organe und Gewebe	41
2.2.8	Untersuchung des Darmtransportes <i>in vivo</i>	42
2.3	Histologische Methoden	42
2.3.1	Präparation von Organen zur histologischen Analyse	42
2.3.2	Entwässerung und Einbettung von Formaldehydpräparaten	43
2.3.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	44
2.3.4	Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)	45
2.3.5	Färbung mit Ölrot O	45
2.4	Analytische Bestimmungsmethoden	46
2.4.1	Bestimmung des Energiegehaltes mittels Bombenkalorimetrie	46
2.4.2	Fettextraktion modifiziert nach FOLCH	47
2.4.3	Stickstoff-Bestimmung in Faeces mittels Elementaranalysator	48
2.5	Biochemische Methoden	48
2.5.1	Plasmaanalytik	49
2.5.1.1	Cholesterol	49
2.5.1.2	Freie Fettsäuren	50
2.5.1.3	Triglyceride	52
2.5.1.4	β-Hydroxybutyrat	54
2.5.2	Bestimmung der Triglyceride in der Leber	55
2.5.2.1	Extraktion der Lipide mittels HB-Puffer	56
2.5.2.2	Triglyceridbestimmung	56
2.5.3	Bestimmung des Glycogengehaltes der Leber	56
2.5.3.1	Extraktion des Glycogens mit Natronlauge	56
2.5.3.2	Glycogenbestimmung	57
2.5.4	Proteinbestimmung	59
2.6	Molekularbiologische Methoden	60
2.6.1	Grundlagen der Molekularbiologie	60
2.6.2	Allgemeines zum Arbeiten mit RNA	61
2.6.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen und Geweben	61
2.6.3.1	RNA-Isolierung mit PIG-B	62
2.6.3.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	62
2.6.3.3	Überprüfung der RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese	63
2.6.3.4	Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	64

2.6.4	Reinigung der RNA mittels DNase-Verdau	65
2.6.5	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription	66
2.6.6	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qPCR)	67
2.7	Statistische Auswertung	73
3	Ergebnisse	74
3.1	Einfluss des EGCG auf Körpermasse und Körperzusammensetzung	74
3.2	Ergebnisse der Blutplasma-Analytik	76
3.3	Effekte des EGCG auf die Energiebilanz und den Gastrointestinaltrakt	78
3.4	Effekte des EGCG auf die Leber	87
3.5	Einfluss des EGCG auf das Fettgewebe	98
3.6	Effekte des EGCG auf den Skelettmuskel	105
3.7	Wirkung des EGCG auf den Energieumsatz und die Substratoxidation	108
4	Diskussion	115
4.1	Lebertoxische Effekte bei oraler Applikation von EGCG	117
4.2	Physiologische Effekte von EGCG	120
4.2.1	Körpermasse und Körperzusammensetzung	120
4.2.2	Lebertriglyceride und -glycogen	121
4.2.3	Plasmaparameter	122
4.2.4	Lipid-Inkorporation in verschiedene Organe und Gewebe	124
4.3	Effekte von EGCG auf die Energiebilanz	125
4.3.1	Futtermittelaufnahme	125
4.3.2	Energieumsatz und Substratoxidation	126
4.3.3	Energieassimilation	130
4.4	Molekulare Mechanismen einer EGCG-Wirkung	134
4.4.1	Genexpression im Intestinaltrakt	135
4.4.2	Genexpression der Leber	139
4.4.3	Genexpression in peripheren Geweben	142
4.5	Schlussfolgerung	146
4.6	Ausblick	147
5	Zusammenfassung	149

6	<i>Summary</i>	150
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	152
	<i>Danksagung</i>	164

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Angptl4/FiAF	<i>Angiopoietin-like protein 4 / Fasting induced adipocyte factor</i>
ATGL	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under curve</i>
BAT	<i>brown adipose tissue</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
CD36/FAT	<i>Cluster of differentiation 36 / Fatty acid translocase</i>
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CPT1b	Carnitinpalmitoyltransferase 1b
C _T	<i>Threshold cycle</i>
Cyp7a1	Cholesterol 7 α -Hydroxylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOB	<i>Delta over baseline</i>
DP	Darmpassage
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EU	Energieumsatz
Fabp2	<i>Fatty acid binding protein 2</i>
FAS	<i>Fatty acid synthase</i> - Fettsäuresynthase
FATP4	<i>Fatty acid transport protein 4</i>
FFM	fettfreie Masse
FM	Fettmasse
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
Ggn	Glycogen
GK	Glucokinase
Glut2	Glucosetransporter 2
Glut4	Glucosetransporter 4
GPAT	Glycerophosphat-Acyltransferase
GTE	Grünteextrakt
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFD	Hochfettdiät
Hmgcr	HMG-CoA-Reduktase
HSL	hormonsensitive Lipase
i. p.	intraperitoneal
IRMS	<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> – Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie
KM	Körpermasse
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LPL	Lipoproteinlipase
MCAD	<i>Medium chain Acyl-CoA dehydrogenase</i>
MKM	metabolische Körpermasse

mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MRP	<i>Multidrug Resistance Protein</i>
NaOH	Natronlauge
NEFA	<i>non esterfied fatty acid</i> – nichtveresterte Fettsäuren
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
pa	postabsorptiv
PAS	<i>Periodic acid Schiff stain</i> – Perjodsäure-Schiff-Färbung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	Pee Dee Belemnite
PDE	Phosphodiesterase
PDHx	Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PIG-B	Phenol-Isoamylalkohol-Guanidiniumisothiocyanat- ² -Mercaptoethanol
PK	Pyruvatkinase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
Plin	Perilipin
PO	Palmitatoxidation
pp	postprandial
PPAR ²	<i>Peroxisome proliferator activated receptor</i> ²
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies
RQ	respiratorischer Quotient
SCD1	Stearoyl-CoA-Carboxylase
SD	Standarddiät
SGLT1	<i>Sodium dependent glucose transporter 1</i>
SO	Substratoxidation
StK	Stoffwechselfähig
TG	Triglyceride
TM	Trockenmasse
UCP	<i>uncoupling protein</i>
VO ₂	Sauerstoffverbrauch
WAT	<i>white adipose tissue</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung eines neuzeitlichen Krankheitsbildes – Adipositas

1.1.1 Definition und Klassifikation der Adipositas

Seit mehr als zwei Jahrzehnten lassen sich weltweit ein kontinuierlicher Anstieg des Körpergewichtes und damit eine erhöhte Prävalenz von Übergewicht und Adipositas verzeichnen. Global gesehen, waren im Jahre 2005 ca. 1,6 Milliarden Erwachsene übergewichtig und mindestens 400 Millionen adipös. Der Anteil übergewichtiger Kinder unter 5 Jahren lag bei ca. 20 Millionen (WHO, 2000).

Übergewicht und Adipositas werden definiert als eine anormale oder exzessive Körperfettansammlung, die mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko einhergeht. Zur Klassifizierung von Untergewicht, Übergewicht und Adipositas bei adulten Personen wird der *Body Mass Index* (BMI) herangezogen (Gl. 1-1).

$$\text{BMI}[\text{kg}/\text{m}^2] = \frac{\text{KM}[\text{kg}]}{I[\text{m}]^2}$$

(Gl. 1-1)

KM Körpermasse
I Körpergröße

Die Gewichtsklassifikation laut *World Health Organization* (WHO) und ein damit verbundenes Risiko für Begleiterkrankungen (Hauer, 2007) kann nach den in Tab. 1-1 genannten Kategorien erfolgen (WHO, 2000).

Tab. 1-1: Gewichtsklassifikation lt. WHO (WHO, 2000)

Kategorie	BMI (kg/m ²)	Risiko für Begleiterkrankungen
Untergewicht	< 18,5	niedrig
Normalgewicht	18,5 - 25	durchschnittlich
Übergewicht	≥ 25	erhöht
Adipositas	≥ 30	sehr hoch

In Deutschland sind derzeit etwa 50 % der erwachsenen Männer mit einem BMI ≥ 25 übergewichtig und ca. 18 % mit einem BMI ≥ 30 adipös. Bei den adulten Frauen sind etwa 25 % übergewichtig und ca. 20 % adipös (Mensink, 2005). Darüber hinaus wird in den

letzten Jahren auch ein kontinuierlicher Anstieg des Übergewichtes bei Kindern und Jugendlichen verzeichnet (Koletzko, 2002), so dass hierzulande ca. 9 % der Kinder zwischen 3 und 17 Jahren übergewichtig und ca. 6 % bereits adipös sind (WHO aufgerufen: 10/2009).

Neben dem Ausmaß des Übergewichtes (BMI) wird das metabolische und kardiovaskuläre Gesundheitsrisiko durch das Fettverteilungsmuster bestimmt. Die viszerale Fettverteilung korreliert besonders eng mit kardiovaskulären Risiken und damit verbundenen Komplikationen (Seidell et al. 1996; Despres et al. 2005). Das viszerale Fettdepot kann anhand des Taillenumfanges beurteilt werden (Lean et al., 1995). Eine abdominale Adipositas liegt bei Frauen bei einem Taillenumfang ≥ 88 cm und bei Männern bei ≥ 102 cm vor (WHO, 2000).

Die Speicherung der Fettdepots erfolgt geschlechtsspezifisch meist unterschiedlich. Die feminine Fettverteilung erfolgt vorwiegend peripher im subkutanen Hüft- und Oberschenkelbereich. Dieses Fett lässt sich, im Vergleich zur viszeralen Fettverteilung, nicht so leicht mobilisieren und birgt ein geringeres Gesundheitsrisiko. Bei Männern wird dagegen das Fett vorwiegend im Bereich des Stammes intraabdominal und subkutan eingelagert (Schulz, 1999). Das viszerale Fett ist metabolisch sehr aktiv und ist charakterisiert durch seine endokrine Funktion. Die Freisetzung von Hormonen und Cytokinen beeinflusst die Appetitregulation, den Energiemetabolismus und auch Atherosklerose (Badman & Flier, 2005).

1.1.2 Ursachen von Übergewicht und Adipositas

Die fundamentale Ursache von Übergewicht und Adipositas liegt energetisch gesehen in einem unausgeglichene Energiebudget, bei dem die Energieaufnahme die Energieabgabe chronisch übersteigt. Die Energiebalance gerät somit aus dem Gleichgewicht. Das wird unter anderem durch Fehlernährung, insbesondere dem erhöhten Konsum energiedichter mikronährstoffarmer Lebensmittel, erreicht. Bei einer positiven Energiebilanz wird die überschüssige Energie in Form von Triglyceriden ins Fettgewebe eingelagert. Diese Form der Energiereserve kann im Bedarfsfall wieder mobilisiert und zur Deckung des Energiebedarfes genutzt werden. Der Bewegungsmangel stellt einen weiteren ursächlichen Faktor in der Genese der Adipositas dar. Eine niedrige körperliche Aktivität bedeutet einen verminderten Energieumsatz für den Organismus, der die Entstehung von Übergewicht begünstigt. Auch Stress, endokrine Erkrankungen (z. B. Hypothyreose) und die Einnahme bestimmter Medikamente (z. B. Antidepressiva, Neuroleptika, Antidiabetika) können zur Entstehung einer Adipositas beitragen. Die genetische Disposition für die Adipositas wurde anhand von Zwillingsstudien mit ca. 70 %

angegeben, die von bestimmten Umweltfaktoren und äußeren Einflüssen zu 30 % abhängig ist. Eine Studie mit Adoptivkindern ergab einen starken Zusammenhang zwischen dem BMI und dem ihrer leiblichen Eltern (Stunkard et al. 1986, 1990).

1.1.3 Komorbiditäten und Komplikationen der Adipositas

Übergewicht und Adipositas führen zu einer Reihe körperlicher Beschwerden: Diabetes mellitus Typ II, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck, Gicht, Atherosklerose, sowie bestimmte Tumorerkrankungen. Das gleichzeitige Auftreten mehrerer Stoffwechselstörungen wird als metabolisches Syndrom verstanden, was heute als entscheidender Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten angesehen wird. Die hohe Morbidität führt insgesamt gesehen zu einer verkürzten Lebenserwartung. Als Folge des erhöhten Körpergewichtes treten auch orthopädische Probleme wie Rückenschmerzen und Kniebeschwerden auf. Durch das hohe Gewicht werden die Gelenke überlastet und können sich schneller abnutzen. Weitere Lasten übergewichtiger Menschen sind soziale Diskriminierung und seelische Probleme wie Minderwertigkeitskomplexe und mangelndes Selbstwertgefühl, sodass deren Lebensqualität oft eingeschränkt ist.

Das Auftreten dieser körperlichen Beschwerden verursacht hohe Kosten im Gesundheitssystem, die in den nächsten Jahren weiter ansteigen werden (Nationaler Aktionsplan gegen das Übergewicht, DAG e.V.). Momentan werden knapp 5 % aller Gesundheitsausgaben in den Industrieländern für die Behandlung der Adipositas und ihrer Folgen aufgewendet. Experten rechnen damit, dass die Kapazitäten des derzeitigen Gesundheitswesens nicht ausreichen, um die erwartenden Auswirkungen der Adipositasepidemie zu bewältigen.

1.1.4 Prävention und Therapie von Übergewicht und Adipositas

Aufgrund der hohen Krankheitskosten, der begrenzten Therapieerfolge und die mit einer Adipositas assoziierten Probleme ist die Prävention von Übergewicht notwendig. Ein besonderes Augenmerk gilt hierbei Kindern und Jugendlichen, denn sie haben ein nachhaltig wirksames Risiko im Hinblick auf das Auftreten chronischer Erkrankungen im Erwachsenenalter.

Die Prävention und Therapie von Adipositas zielen in erster Linie auf eine dauerhafte Umstellung der gegenwärtigen Ernährungs- und Lebensgewohnheiten ab. Durch eine ausgewogene kalorienreduzierte Ernährung, einer Verhaltenstherapie zur stärkeren

Wahrnehmung des Hunger- und Sättigungsgefühls und durch regelmäßiges körperliches Training kann eine Reduktion des Körpergewichtes erfolgen.

Durch eine Gewichtsreduktion können Übergewichtige und Adipöse enorme gesundheitliche Vorteile erzielen. Dazu zählt z. B. eine Verminderung der Blutfettwerte, sodass Risiken der damit verbundenen kardiovaskulären Folgeerkrankungen minimiert werden können.

Pharmakologische und chirurgische Intervention

Bei extremer Adipositas (BMI > 35) kann neben der Reduktionsdiät und ausreichender körperlicher Aktivität auch eine pharmakologische oder chirurgische Intervention erfolgen. Zu den chirurgischen Verfahren zählen z. B. Magenband, Magenballon, Gastroplastiken oder verschiedene Magen-Darm-Bypass-Techniken. Diese Methoden dienen dazu, die Nahrungszufuhr zu verkleinern oder die Verstoffwechslung der zugeführten Nahrung einzuschränken. Ansatzpunkte der Pharmazeutika sind die Beeinflussung der Appetit- und Sättigungsregulation, eine Steigerung der Stoffwechselrate und eine Hemmung der intestinalen Nährstoffausnutzung.

Der Wirkstoff Sibutramin hemmt die Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin in die Nervenzelle. Die Konzentration dieser Neurotransmitter im synaptischen Spalt steigt dadurch an und führt zu einer Erregung der Adrenozeptoren, was eine Appetitminderung zur Folge hat (Astrup, 1992). Aufgrund starker unerwünschter Nebenwirkungen wurde dieses Medikament in Deutschland als bedenklich eingestuft und ist nur in stark begrenzten Dosierungen zugelassen. In Italien wurde dieses Arzneimittel aufgrund von Todesfällen aus dem Verkehr gezogen, und in den USA ist es wegen der starken Nebenwirkungen erst gar nicht auf den Markt gekommen.

Ein weiterer Arzneiwirkstoff ist das Orlistat, ein semisynthetisches Derivat aus Lipstatin, das aus Bakterien isoliert wird. Sein Ansatzpunkt liegt in der intestinalen Hemmung der Fettverdauung. Orlistat inhibiert die gastrische und pankreatische Lipase durch kovalente Bindung an die Serin-Reste der Lipasen. Dadurch ist die Hydrolyse der Triacylglyceride im Intestinaltrakt eingeschränkt und die nachfolgende Absorption von Monoacylglyceriden und freien Fettsäuren vermindert. Geringe oder keine Aktivität zeigt das Orlistat gegenüber Amylase, Trypsin, Chymotrypsin und Phospholipasen (Guercioli, 1997). Somit bleibt die Hydrolyse der Proteine und Kohlenhydrate unbeeinflusst. Allerdings können nach Einnahme von Orlistat verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen auftreten. Dazu zählen eine Steatorrhoe, eine vermehrte Darmperistaltik sowie eine verminderte Resorption fettlöslicher Vitamine.

Da der Einsatz der oben genannten Pharmazeutika für den Menschen riskant und mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist, wurden in den letzten Jahren verstärkt nach natürlichen Inhaltsstoffen zur risikolosen Behandlung von Übergewicht und Adipositas gesucht.

Stimulierende Effekte aus natürlichen Nahrungsmitteln

Auf der Suche nach geeigneten Therapiemöglichkeiten der Adipositas richtet sich die Aufmerksamkeit auch auf natürliche pflanzliche Inhaltsstoffe. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Nahrungsmittel bzw. Nahrungsmittelinhaltsstoffe (z. B. Koffein, Ephedrin, Capsaicin, Grüner Tee) stimulierende Effekte auf das sympathische Nervensystem und somit eine Erhöhung des Energieumsatzes zur Folge haben (Rosenbaum et al., 1997; Diepvens et al., 2007). So kann der Einsatz dieser Substanzen unterstützend bei der Gewichtsreduktion bzw. präventiv bei übermäßiger Gewichtszunahme wirken.

Die thermogene Wirkung von Koffein erfolgt durch eine Inhibierung der Phosphodiesterase-Aktivität und die Stimulierung einzelner Substratflüsse im Organismus. Studien zeigten eine reduzierte Nahrungsaufnahme nach Koffein-Konsumption (Diepvens et al., 2007). Koffein kann auch die thermogene Wirkung von Ephedrin potenzieren, was sich in einer Gewichtsabnahme äußert (Astrup et al., 1992). Capsaicin, ein Alkaloid der Pflanzengattung *Capsicum*, konnte in Studien den Energieumsatz und die Fettoxidation erhöhen und den Appetit vermindern (Hsu & Yen, 2007; Belza & Jesson, 2005; Henry & Emery, 1986). Neue Studien an Mäusen belegen eine reduzierte Fettabsorption nach Fütterung einer Hochfettdiät und gleichzeitiger Gabe eines aus Pilzen stammenden Chitosan. Dieses pilzartige Chitosan ist ein Polyaminosaccharid, das Charakteristiken der Ballaststoffe aufweist und resistent gegenüber den Verdauungsenzymen ist. Das führte letztlich zu einer Verringerung der Körperfettmasse (Neyrinck et al., 2009).

Auch den im grünen Tee vorkommenden Catechinen werden zahlreiche positive Effekte zugeschrieben, deren metabolische Wirkungen getestet wurden (Dulloo et al., 1999; Liao, 2001; Hase et al., 2001; Murase et al., 2002).

1.2 Grüner Tee – Vorkommen und Inhaltsstoffe

Tee ist ein Aufgussgetränk aus verschiedenen Pflanzenteilen (Blüten, Blätter, Knospen) der immergrünen Teepflanze *Camellia sinensis* (Abb. 1-1). Nach Wasser ist Tee weltweit eines der meist konsumierten Getränke (Wolf et al., 2008).



Abb. 1-1: Teepflanze (*Camellia sinensis*, Quelle: Deutscher Teeverband, 2009)

Ursprünglich stammt Tee aus China. Heute wird er jedoch in über 30 Ländern der Welt angebaut, wobei China mit 1.160.000 t eines der größten Tee-Erzeugerländer ist (Deutscher Teeverband, 2009). Die Verwendung von Tee als Heilmittel hat eine lange Tradition. Es ist bekannt, dass Tee in China schon seit mindestens 4.700 Jahren wegen seiner medizinischen Eigenschaften getrunken wird (Weisburger, 1997). Anfang des 17. Jahrhunderts ist Tee durch den Teehandel der Holländer und Briten in Europa bekannt geworden (Wolf et al., 2008). Aus den Blättern des Teestrauches werden durch unterschiedliche Verarbeitungsprozesse grüner, schwarzer und Oolong Tee hergestellt. Bei grünem Tee werden die Blätter nach dem Welken für einige Minuten mit Wasserdampf behandelt oder in eisernen Pfannen erhitzt, um die blatteigenen Enzyme zu inaktivieren und eine Fermentation zu verhindern. Im Anschluss daran werden die Teeblätter gerollt und getrocknet (Franzke, 1996). Im Gegensatz dazu, werden zur Herstellung des schwarzen Tees die Blätter nach dem Welken gerollt und fermentiert. Durch den Fermentationsprozess werden die in den Teeblättern enthaltenen Flavonoide weitgehend zu Theaflavinen und Thearubiginen oxidiert (Crespy & Williamson, 2004; Feng, 2006; Cabrera et al., 2006). Somit unterscheidet sich der grüne vom schwarzen Tee hauptsächlich in einem höheren Gehalt an Catechinen.

Die meisten gesundheitlichen Wirkungen des grünen Tees gehen von seinen Polyphenolen aus. Polyphenole sind in der Natur weit verbreitet u.a. in Früchten, einigen Gemüsesorten, Rotwein und Schokolade (Donovan et al., 2001). Grüner Tee enthält durch den Erhitzungsschritt, bei dem die Polyphenoloxidase inaktiviert wird, die unveränderten Polyphenole wie sie auch im Teeblatt vorkommen. Eine Untergruppe der

Polyphenole sind die Flavonoide, die wiederum in Flavanole und Catechine eingeteilt werden. Die Catechine des grünen Tees machen bis zu 30 % der Trockenmasse aus. Sie werden wie folgt unterschieden: (Abb. 1-2): Epicatechin (EC), Epicatechin-Gallat (ECG), Epigallocatechin (EGC) und Epigallocatechingallat (EGCG). Strukturelle Unterschiede ergeben sich in der Anzahl der Hydroxylgruppen und in der Anwesenheit der Galloylgruppe. Das EGCG ist mit einem Anteil von bis zu 50 % des gesamten Catechingehaltes das vorwiegende Catechin des grünen Tees. Neben den Catechinen enthält grüner Tee Proteine (15 %), Ballaststoffe (26 %), andere Kohlenhydrate (7 %), Lipide (7 %), Mineralien (5 %), Aminosäuren (4 %) und Pigmente (2 %) (Cabrera et al., 2006).

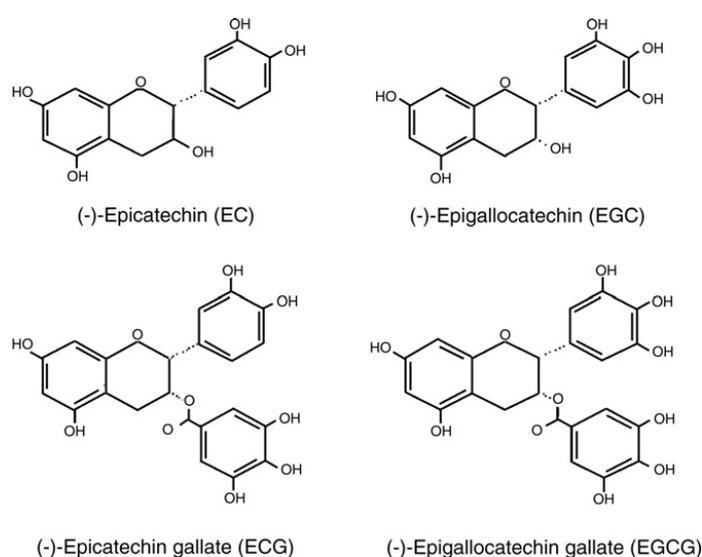


Abb. 1-2: Chemische Struktur der Hauptinhaltsstoffe des grünen Tees (Koo & Noh, 2007)

Ein weiterer Bestandteil des grünen Tees ist Koffein, was ca. 3 – 6 % ausmacht (Yang & Landau, 2000). So sind in einer Tasse grünem Tee zwischen 20 und 100 mg EGCG und 20 – 40 mg Koffein enthalten (Stangl et al., 2006; Khokhar & Magnusdottir, 2002). Die verschiedenen Teecatechine besitzen eine unterschiedliche biologische Aktivität, wobei das EGCG die höchste Aktivität zeigt (Chen et al., 1997). Von den Teecatechinen besitzt es die höchste Anzahl an Hydroxylgruppen an den drei Kohlenstoffringen, die für die Bildung von Hydrogenverbindungen von Bedeutung sind. Auch die im EGCG-Molekül enthaltene Galloylgruppe kann Interaktionen mit anderen Molekülen, z. B. Radikalen eingehen (Liao, 2001).

1.3 Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Teecatechine

Die potentiellen gesundheitsfördernden Effekte des grünen Tees sind nicht nur von der konsumierten Menge abhängig, sondern auch von der Biotransformation und Bioverfügbarkeit der Inhaltsstoffe. Letzteres zeigt auf, in welchem Ausmaß und mit welcher Geschwindigkeit eine Substanz am Ort der Wirkung zur Verfügung steht. Studien zufolge ergeben sich Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies (Maus, Ratte, Mensch), die außerdem von intestinalen, mikrobiellen und hepatischen Metabolismus, von Transportern und der chemischen Stabilität der Catechine abhängig sind (Higdon & Frei, 2003; Cabrera et al., 2006; Khan & Mukhtar, 2007; Feng, 2006).

Catechine unterliegen einer umfassenden Biotransformation in der Leber, im Dünndarm und im Colon. Sie beinhaltet die Methylierung, Glucuronidierung, Sulfatierung durch Phase-II-Enzyme und eine Aufspaltung der Ringstruktur (Feng, 2006). Studien zeigen, dass EGCG durch Methylierung vorwiegend zu 4'-O-methyl(-)-EGCG und 4',4'-O-dimethyl(-)-EGCG umgesetzt wird. Das EGCG-4''-O-glucuronid ist der vorwiegende Metabolit, der bei Mensch, Maus und Ratte in den Mikrosomen gebildet wird (Lambert & Yang, 2003; Khan & Mukhtar 2007). Da Teecatechine bereits vom Dünndarm zu verschiedenen Metaboliten und Spaltprodukten umgesetzt werden, spielt der Darm eine wichtige Rolle im Metabolismus und der Bioverfügbarkeit der Catechine bevor sie die Leber erreichen. Im Colon können die Metabolite bzw. die nicht vom Dünndarm absorbierten Catechine durch die Mikrobiota zu phenolischen Säuren und Valerolactonen umgesetzt werden. Die mikrobiellen Metabolite können entweder absorbiert oder mit den Faeces ausgeschieden werden (Li et al., 2000; Kohri et al., 2001; Spencer, 2003; Feng, 2006).

Alle Teecatechine konnten in der Portalvene identifiziert werden, was eine intestinale Absorption bedeutet (Okushio et al., 1996). Insgesamt ist die Bioverfügbarkeit der Catechine recht gering, was sich in niedrigen Plasmakonzentrationen nach einem Teekonsum widerspiegelt. Bei Ratten ist die Plasmakonzentration von EGCG nach chronischer Konsumtion einer 0,6 %igen Grünteelösung als Trinkwasser niedriger als der des EGC oder EC. Dagegen zeigen Mäuse nach Verabreichung derselben Grünteelösung eine höhere Konzentration an EGCG im Plasma im Vergleich zu EGC und EC (Kim et al., 2000). Lambert & Yang (2003) beziffern die Bioverfügbarkeit des EGCG bei Mäusen nach intragastrischer Applikation mit 12,4 %. In Humanstudien scheint das EGCG im Gegensatz zu den anderen Teecatechinen eine niedrigere Bioverfügbarkeit zu haben. Hier erreichen die Catechin-Level die höchsten Konzentrationen im Plasma nach 2 – 4 Stunden (Yang et al., 1998).

Zur Gewebeverteilung der Catechine nach Teekonsum bei Mensch und Tier gibt es leider nur wenige Informationen. Jedoch konnten Kim *et al.* (2000) im Tierversuch an Ratten und Mäusen erhebliche Mengen von EGC und EC im Ösophagus, Dickdarm, Niere, Blase, Lunge und Prostata detektieren. Die höchsten Konzentrationen des EGCG wurden im Dickdarm gefunden, während es in den anderen Organen und im Plasma nur in sehr geringen Konzentrationen vorkam - das lässt auf eine niedrige systemische Absorption des EGCG schließen. Ursache könnte eine Degradierung des EGCG bei einem pH-Wert > 7,4 im Darmlumen sein, da hier der pH-Wert zwischen 5 und 8 schwankt (Cai *et al.*, 2002). Es wird aber auch eine aktive Eliminierung der Catechine über *Multidrug Resistance* assoziierte Proteine (MRPs) diskutiert (Hong *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2006). Die MRPs gehören zur Familie der ATP-abhängigen Efflux-Transporter, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden. So konnte an der humanen Colon-Carcinoma-Zelllinie HT-29 gezeigt werden, dass EGCG und seine Methyl-Metabolite Substrate des MRP1 und MRP2 sind. MRP2 ist auf der apikalen Seite in Zellen des Darms, der Nieren und der Leber lokalisiert. Es wird vermutet, dass der vom Darm absorbierte EGCG-Anteil vor und nach seiner Methylierung durch die cytosolische Catechol-O-Methyltransferase (COMT) mittels MRP2-Transporter wieder zurück ins Darmlumen sezerniert werden kann. Nicht sezerniertes EGCG kann über die Portalvene zur Leber gelangen. Dagegen ist das MRP1 an der basolateralen Seite lokalisiert, so dass seine Substrate vom Zellinneren z. B. in den Blutstrom oder den intestinalen Zwischenraum abgegeben werden. Durch die Funktion des MRP1 wäre eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit des EGCG denkbar. Jedoch wurden im menschlichen Jejunum 10-fach höhere Expressionslevel an MRP2 ermittelt, so dass der Efflux von EGCG durch MRP2 prädominierend sein könnte und in einer niedrigen Bioverfügbarkeit resultiert (Taipalensuu *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003). Die Gewebe, die in direktem Kontakt mit dem Grünteeextrakt stehen oder an der Exkretion der Catechine beteiligt sind (Ösophagus, Dickdarm, Blase, Nieren), weisen die höchsten Konzentrationen aller untersuchten Teecatechine auf. Bei wiederholter Aufnahme akkumulieren die Catechine kaum im Plasma, da sie im Organismus schnell und ausgiebig metabolisiert werden. Nach Kim *et al.* (2000) könnte die wiederholte Aufnahme zu einer Adaptation der Tiere und ihrer intestinalen Mikrobiota führen, die mit einer erhöhten mikrobiellen Umsetzung der Catechine einhergeht. Die Eliminierung des EGCG erfolgt hauptsächlich mit der Galle über den Darm, während EGC und EC sowohl über den Urin als auch über die Galle ausgeschieden werden (Kim *et al.*, 2000; Cabrera *et al.*, 2006).

Insgesamt lässt sich eine speziesabhängige und umfassende Metabolisierung der Catechine verzeichnen. Dabei scheint es, dass sich Maus und Mensch bezüglich der EGCG-Bioverfügbarkeit ähnlicher sind als Mensch und Ratte (Lambert & Yang, 2003).

Vorangegangene Studien vermuten, dass nicht das EGCG selbst sondern seine Metaboliten die funktionellen Komponenten sind (Yu et al., 2005).

1.4 Wirkungen der Teecatechine auf den Organismus

In der Literatur sind mittlerweile unzählige *in vitro* und *in vivo* Studien zu den positiven Effekten der Teepolyphenole beschrieben. Dem grünen Tee werden antioxidative, antikanzerogene, antiinflammatorische, antivirale und antibakterielle Wirkungen zugesprochen. Darüber hinaus sind krebspräventive, neuroprotektive sowie Blutdruck- und Cholesterolspiegel senkende Eigenschaften beschrieben (Wolfram, 2007). Im Folgenden soll ein kleiner Überblick zu einigen ausgewählten Wirkungen aufgezeigt werden, wobei der positive Einfluss des EGCG auf die Adipositas ein besonderes Augenmerk darstellt.

1.4.1 Antioxidative Effekte

Die Teepolyphenole besitzen eine starke antioxidative Wirkung. Sie können freie Radikale abfangen, die durch Oxidation verschiedene Zellschädigungen verursachen. Freie Radikale werden im Körper natürlicherweise bei verschiedenen Stoffwechselfvorgängen, aber auch durch Umweltbelastungen wie UV-Strahlen und Rauchen gebildet. Sie können Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA verursachen. Die chemische Struktur der Catechine zeichnet sich durch das Vorhandensein benachbarter Dihydroxy- oder Trihydroxygruppen aus. Dadurch können sie mit reaktiven Sauerstoffspezies oder Metallionen Komplexe bilden und so die Entstehung freier Radikale verhindern. Dabei zeigt das EGCG von allen Catechinen das stärkste antioxidative Potential. Bereits 30 – 60 Minuten nach Gabe einer Einzeldosis grünen Tees wurde in einer klinischen Untersuchung eine bessere antioxidative Kapazität des Plasmas festgestellt (Leenen et al., 2000; Khan & Mukhtar, 2007). Ein Parameter der Lipidperoxidation, das Malondialdehyd, war im Plasma nach Konsum einer linolsäurereichen Diät nach vier Wochen deutlich reduziert (Freese et al., 1999). Verschiedene Erkrankungen stehen in enger Assoziation mit oxidativen Schäden im Gewebe. Dazu gehören z. B. Krebs- und Herzerkrankungen, Diabetes, Alzheimer Erkrankung aber auch das Altern (Cutler, 2005). Der Einsatz der Teecatechine als Antioxidantien kann demnach solche Erkrankungen positiv beeinflussen (Khan & Mukhtar, 2007; Chen et al., 2008).

Wie für alle anderen Antioxidantien (z. B. Vitamin C) sind für die Catechine auch prooxidative Eigenschaften beschrieben worden. Hohe Konzentrationen an EGCG können die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Zellkulturmedium induzieren, was auf ein prooxidatives Potential schließen lässt (Weisburg et al., 2004; Isbrucker et al., 2006). Nach Eintritt in die Zelle wurden reaktive Sauerstoffspezies (z. B. H_2O_2 , Hydroxylradikale) detektiert (Nakagawa et al., 2002; Yang et al., 2000). Yamamoto et al. (2003) stellte fest, dass zwar EGCG in Karzinomazellen intrazellulär oxidativen Stress verursachen kann, jedoch die ROS-Konzentration in normalen Zellen reduziert. Das zeigt, dass EGCG unterschiedliche biochemische Wege aktivieren kann. In Genotoxizitätsstudien von Isbrucker et al. (2006) konnte zwar eine bakterizide Aktivität des EGCG, aber keine mutagene Aktivität bei Bakterien als auch murinen Zellen festgestellt werden. Die orale Administration von EGCG führte nach einer Einzeldosis und über 10 Tage hinweg zu keinerlei mutagenen Veränderungen. Die intravenöse Injektion von EGCG führte, im Gegensatz zur diätetischen Administration, zwar zu höheren Plasmakonzentrationen des EGCG, jedoch blieben jegliche genotoxische Effekte aus. Zusammenfassend kann man von einer niedrigen Toxizität der Teecatechine ausgehen, denn zudem zeigt es beim Menschen eine geringe Bioverfügbarkeit (Schmidt et al., 2005). Jedoch steigt das Risiko der negativen Effekte durch den Einsatz pharmakologischer Dosen in der Prävention/Behandlung, in Situationen der Supplementation, genetischem Polymorphismus oder bei Interaktionen verschiedener Medikamente, die die Bioverfügbarkeit der Catechine erhöhen (Lambert et al., 2007).

1.4.2 Catechine und Krebs

Eine gesundheitsfördernde Wirkung des grünen Tees zeigt sich auch in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen. Die meisten im südostasiatischen Raum durchgeführten Studien zeigen eine inverse Beziehung zwischen dem Teekonsum und der Entstehung gastrointestinaler Krebserkrankungen, da hier der grüne Tee vorwiegend getrunken wird (Khan & Mukhtar, 2007). So kann grüner Tee mit großer Wahrscheinlichkeit zu den krebsvorbeugenden Substanzen gerechnet werden. Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind dabei vielfältig: antioxidative Wirkung, direkte Bindung der karzinogenen Substanzen, Induktion der Phase-II-Enzyme wie UDP-Glucuronosyltransferase und Induktion der Apoptose. Epidemiologische Studien an Krebspatienten zeigten, dass sich der Ausbruch der Krebserkrankung um 8,7 Jahre bei Frauen und um 3,0 Jahre bei Männern hinauszögert, wenn der Konsum von grünem Tee auf mehr als zehn Tassen pro Tag erhöht wird (Imai et al., 1997; Chen et al., 2008).

1.4.3 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mittlerweile weltweit eine häufige Todesursache dar (WHO, 2005). Die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist von verschiedenen Faktoren abhängig, die durch diätetische Komponenten moduliert werden können (Khan & Mukhtar, 2007). Die Aufnahme von gesättigten Fetten sowie Rauchen können diesen Prozess beschleunigen. Ein Risikofaktor in der Entwicklung verschiedener Herzerkrankungen ist ein erhöhter Cholesterolspiegel im Plasma. Atherosklerotische Plaques können an der Innenseite der Arterien herausragen, das Lumen verengen und so zu einem verminderten Blutfluss führen. Die protektiven Eigenschaften in Bezug auf die Oxidation der Lipoproteine könnten der Entstehung von Atherosklerose und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen vorbeugen (Khan & Mukhtar, 2007). Brown & Goldstein (1998) vermuten, dass die Reduktion der Plasma-Cholesterolllevel das Resultat einer erhöhten Expression des LDL-Rezeptors (*low density lipoprotein*) ist, der zur Beseitigung des Cholesterols aus dem Plasma vonnöten ist.

1.4.4 Antiadipogene Effekte

Adipozyten nehmen in der Lipidhomöostase eine entscheidende Rolle ein und sind für die Speicherung von Triglyceriden und im Bedarfsfall für die Freisetzung von Fettsäuren verantwortlich. Übergewicht und Adipositas sind durch eine vermehrte Fettansammlung gekennzeichnet, die zu einer Reihe metabolischer Störungen wie Diabetes, Bluthochdruck und Herzerkrankungen führen. Die über den Bedarf hinausgehende Energie kann das Fettgewebe durch Hypertrophie und Hyperplasie der Adipozyten speichern. Der Prozess der Adipozytendifferenzierung wird durch genetische, endokrine, metabolische, neurologische, pharmakologische, Umwelt- und Ernährungsfaktoren reguliert (Moon et al., 2007).

Traditionell wurde die Langzeitkonsumption von grünem Tee auch zur Gewichtsabnahme empfohlen. Da nun Adipositas zu einem massiven Gesundheitsproblem geworden ist, ist das Interesse an der Untersuchung dieser positiven Eigenschaft in den letzten Jahren immer stärker in den Mittelpunkt gerückt. Dabei sind sowohl *in vitro* Versuche beschrieben, die auf zellulärer Ebene die genauen Wirkmechanismen untersuchen, als auch *in vivo* Versuche, die die komplexe Wirkung auf den Fettstoffwechsel im Organismus analysieren.

in vitro Effekte

In Zellkulturversuchen an Adipozyten konnte eine dosisabhängige Inhibierung der Adipozytendifferenzierung festgestellt werden (Wolfram et al., 2005). Außerdem wurde die Akkumulation der Lipide in den Fettzellen unterdrückt. Es konnte auch eine verminderte Genexpression der Transkriptionsfaktoren PPAR γ 2 und C/EBP α , die in den Adipozyten vorwiegend an der Regulation der Adipogenese beteiligt sind, festgestellt werden (Furuyashiki et al., 2004).

Dulloo et al. (2000) hat eine Stimulierung der Thermogenese durch einen Grüntee-Extrakt im braunen Fettgewebe nachgewiesen. Die thermogene Wirkung des grünen Tees wird dem Koffein- und Catechingehalt zugeschrieben. Teecatechine können die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) inhibieren, die das freigesetzte Noradrenalin infolge einer Sympathikus-Aktivierung degradiert. Die Wirkung des Noradrenalins wird somit hinausgezögert. Koffein inhibiert die Aktivität der Phosphodiesterasen, die für den durch Noradrenalin induzierten cAMP-Abbau verantwortlich sind (Dulloo et al., 2000; Wolfram et al., 2006a). Daher könnten EGCG und Koffein synergistisch die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und dadurch die thermogene Wirkung vermitteln (Wolfram et al., 2006a).

Effekte des grünen Tees wurden auch in Bezug auf die Lipolyse untersucht. Catecholamine sind die Hormone, die hauptsächlich für die Stimulierung der Lipolyse im Fettgewebe verantwortlich sind. Im Zellkulturversuch an Adipozyten wurde nach kurz- und langfristiger Inkubation unterschiedlicher Dosen EGCG die Freisetzung von Glycerol aus den Zellen bestimmt. Jedoch zeigte das EGCG hier keine deutlichen Effekte auf die Lipolyse (Wolfram et al., 2006a).

Weiterhin könnten Teecatechine eine potentielle Rolle in der Reduktion der Kohlenhydrat- und Fettabsorption durch Hemmung verschiedener Verdauungsenzyme (α -Amylase, Saccharidasen, gastrische und pankreatische Lipase) und des natriumabhängigen Glucosetransporters SGLT1 (*sodium glucose cotransporter 1*) spielen (Wolfram et al., 2006a; Kobayashi et al., 2000; Juhel et al., 2000).

in vivo Effekte aus Tierversuchs- und Humanstudien

Grüner Tee kann die Körper- und Fettmasse reduzieren (Moon et al., 2007). Dieser antiadipogene Effekt wird durch die Beschreibung vieler *in vivo* Daten unterstützt, die zu einer Verminderung der Futteraufnahme, Lipidabsorption, Plasma-Triglyceride und Leptin-Spiegel führten. Aber auch eine Erhöhung des Energieumsatzes, der Fettoxidation und der faecalen Lipidexkretion sind beschrieben.

Viele Maus- und Rattenmodelle konnten unter Fütterung einer Hochfettdiät bei gleichzeitiger Verabreichung von grünem Tee bzw. eines Grünteeextraktes (GTE) eine verminderte Körperfettansammlung verzeichnen (Choo, 2003; Hasegawa et al., 2003; Murase et al., 2002; Klaus et al., 2005). Eine mögliche Erklärung wird in der thermogenen Wirkung des grünen Tees und einer damit verbundenen Erhöhung des Energieumsatzes gesehen (Wolfram et al., 2006a). Der Synergismus zwischen dem Koffein- und Polyphenolanteil des grünen Tees kann die sympathische Stimulierung der Thermogenese verlängern (Dulloo et al., 1999). Murase et al. (2002) beobachteten bei Mäusen durch Supplementation eines Grünteeextraktes, der einen sehr geringen Koffeinanteil aufwies, erniedrigte Cholesteroll-, Glucose-, Insulin- und Leptin-Spiegel im Plasma. Diese Arbeitsgruppe zeigte auch, dass die hepatische β -Oxidation bei GTE behandelten Tieren erhöht war, während sie im Darm, braunen Fettgewebe und Skelettmuskel unbeeinflusst blieb. Die Reduktion des Körperfettanteils bei C57BL/6J Mäusen war durch eine verminderte Expression lipogener Enzyme (Acetyl Coenzym A Carboxylase, Fettsäure-Synthase, Glycerophosphat-Acyltransferase) im weißen Fettgewebe begleitet, so dass EGCG vermutlich zu einer verminderten Lipogenese im Fettgewebe führte (Wolfram et al., 2005). Die EGCG-Supplementation bei *New Zealand Black* (NZB)-Mäusen führte ebenso zu einer dosisabhängigen Reduktion der diätinduzierten Adipositas. In der Aktivitätsphase der Mäuse konnte ein erniedrigter respiratorischer Quotient (RQ) festgestellt werden, der auf eine erniedrigte Lipogenese und erhöhte Lipolyse schließen lässt (Klaus et al., 2005).

Epidemiologische Studien konnten auch beim Menschen einen geringeren Körperfettanteil ermitteln (Wolfram et al., 2006a). So zeigte Wu et al. (2003) in einer durchgeführten Studie in Taiwan, dass der ständige Teekonsum über 10 Jahre hinweg in einem geringeren prozentualen Körperfettanteil und einem schmaleren Taillenumfang resultiert. Als Ursache für den Verlust des Körperfettes wird hier eine erhöhte Fettoxidation vermutet. Bei moderat übergewichtigen Personen führte die Aufnahme eines GTE in Kapselform zu einer 4,6 %igen Reduzierung der Körpermasse (Chantre & Lairon, 2002). In Studien von Hase et al. (2001) und Tsuchida et al. (2002) führte der Konsum der Teecatechine zu einer geringen Körpergewichtabnahme, die jedoch von einer ausgeprägten Körperfettverminderung, insbesondere des viszeralen Fettgewebes, begleitet war. Darüber hinaus wurde von Kovacs et al. (2004) untersucht, ob die Teecatechine die Körpergewichtszunahme nach einer vorangegangenen Gewichtsreduktion beeinflussen können. Die Probanden konsumierten in den ersten 4 Wochen eine Reduktionsdiät. In den anschließenden 13 Wochen wurde die habituelle Ernährungsweise weitergeführt, jedoch mit Supplementation eines Grünteeextraktes oder eines Placebos. Effekte des GTE auf die Körpergewichtszunahme nach einer

Reduktionsdiät wurden hier nicht gefunden. Die Autoren nehmen an, dass die Effektivität der GTE-Supplementation durch den habituellen Koffeinkonsum negativ beeinträchtigt wurde. Das bestätigte dieselbe Arbeitsgruppe in einer nachfolgenden Studie mit gleich bleibendem Versuchsschema – allerdings wurden Probanden mit einem gewohnheitsmäßigen hohen und niedrigen Koffeinkonsum untersucht. Interessanterweise scheint es so, dass Probanden mit einer niedrigen habituellen Koffeinaufnahme und gleichzeitiger Supplementation eines GTE in der Phase der Körpergewichtserhaltung weiterhin Körpermasse und –fett verlieren. Sie zeigten einen höheren Energieumsatz und einen erniedrigten RQ, was auf eine höhere Fettoxidation während der Phase der Körpergewichtserhaltung hindeutet (Westerterp-Plantenga et al., 2005; Wolfram et al., 2006b).

Zusammenfassend konnten die Humanstudien eine Reduktion der Körpermasse und des Körperfettanteils ermitteln. Diese Effekte stimmen mit denen in Tierversuchen beobachteten Wirkungen überein, allerdings erfolgen sie in einem geringeren Ausmaß (Wolfram et al., 2006a). In den oben beschriebenen Studien wurden entweder grüner Tee oder verschiedene Grünteeextrakte verwendet, so dass die Beeinflussung des Energie- und Fettstoffwechsels auf die Catechine und den Koffeingehalt zurückzuführen ist. Besonders eine Kombination dieser aktiven Komponenten könnte in der Reduktion und Prävention der Adipositas zum Einsatz kommen. Auch eine Kombination aus diätetischer Supplementation und Ausdauertraining scheint die β -Oxidation zu begünstigen und führt zu einer erhöhten Ausdauerleistung bei Mäusen (Murase et al., 2005, 2006). Die genauen molekularen Mechanismen, die im Versuchstier und im Menschen zu einer Verminderung der Körperfettmasse führen, müssen in weiteren Studien geklärt werden. Es ist denkbar, dass das EGCG und seine vielfältigen Metaboliten über unterschiedliche Stoffwechselwege eine Wirkung erzielen.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Untersuchung antiadipogener Eigenschaften einiger Nahrungsmittelinhaltsstoffe ist in den letzten Jahren zu einem wichtigen Forschungsfeld geworden. Das kann zu einer Entdeckung natürlich vorkommender Agenzien führen, die in der Reduktion und Prävention von Adipositas Einsatz finden könnten. Diverse Studien an Mensch und Tier konnten eine günstige Beeinflussung der Körpermasse und verschiedener Stoffwechselformparameter nach Teekonsum bzw. der Gabe eines Grünteeextraktes aufzeigen. Da in manchen Studien Interaktionen verschiedener Teekomponenten

aufgezeigt wurden, lag hier ein besonderes Interesse an der Untersuchung des vorwiegend im grünen Tee vorkommenden Polyphenols EGCG. Viele der in der Literatur beschriebenen Wirkungen wurden nach langfristiger Einnahme beobachtet. Es ist nicht klar, ob die Veränderungen in Langzeitstudien direkt durch EGCG oder indirekt infolge der Fettreduktion hervorgerufen werden. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde deshalb eine kurze bzw. mittelfristige Dauer der Applikation ausgewählt, bei der sich Veränderungen in der Körperzusammensetzung noch nicht deutlich manifestierten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den Einfluss des Teepolyphenols EGCG auf den Energie- und Substratstoffwechsel nach kurz- und mittelfristiger Applikation detailliert zu untersuchen. Die Maus wurde als Untersuchungsmodell ausgewählt, da sie und der Mensch in der Bioverfügbarkeit des EGCG recht ähnlich sind. Es galt herauszufinden, welchen Einfluss EGCG nach kurz- und mittelfristiger Applikation auf verschiedene physiologische Parameter im Mausmodell hat. Der Energie- und Fettmetabolismus nach kurz- und mittelfristiger Applikation sollte im Hinblick auf die Energiebilanz und auf molekularer Ebene untersucht werden, um mögliche Mechanismen aufzudecken.

2 Material und Methoden

Diese Arbeit basiert auf vier Tierversuchen zur kurz- und mittelfristigen Wirkung des Grüntee-Extraktes TEAVIGO[®] auf den Energiestoffwechsel der Maus. Unterschiede lagen dabei bei der Applikationsart der Testsubstanz, den unterschiedlichen Dosierungen und der Diätzusammensetzung.

2.1 Versuchssubstanz

Alle hier aufgeführten Experimente wurden mit dem Grüntee-Extrakt TEAVIGO[®] (Abb. 2-1) durchgeführt. TEAVIGO[®] ist ein gereinigter Extrakt aus den Blättern des grünen Tees, der von DSM Nutritional Products (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde. Der Extrakt enthält mindestens 94 % Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) und ist frei von Koffein. Da TEAVIGO[®] sowohl licht-, wärme- als auch sauerstoffempfindlich ist, wurde bei der Verarbeitung und Lagerung stets auf diese Eigenschaften geachtet. Den Tieren wurde der Extrakt entweder über das Futter oder mit Hilfe einer Schlundsonde *per os* verabreicht. Genauere Angaben zu den Applikationsarten und Dosierungen sind im Studiendesign (siehe 2.2.3.) beschrieben.



Abb. 2-1: TEAVIGO[®] (DSM Nutritional Products, Basel, Schweiz)

2.2 Tierexperimentelle Methoden

Alle durchgeführten Experimente erfolgten unter der Leitung von Prof. Dr. S. Klaus und Dr. K.J. Petzke nach Genehmigung durch die zuständige Behörde und im Einklang mit den Richtlinien des Landesamtes für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurerneuerung / Referat Tierarzneimittelüberwachung, Tierschutz, Grenzveterinär-dienst des Landes Brandenburg (Frankfurt/Oder). Die Versuche wurden im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke durchgeführt.

2.2.1 Tiermodell und Haltungsbedingungen

Für die im weiteren Verlauf beschriebenen Versuche wurden männliche C57BL/6N-Mäuse (Tierzucht Charles River, Sulzfeld) im Alter von 10-12 Wochen und einem Anfangsgewicht von ca. 20 g verwendet. Die Anzahl der verwendeten Tiere und die Einteilung der Gruppen sind in den jeweiligen Versuchdesigns beschrieben. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere 1 - 2 Wochen lang an die Haltungsbedingungen adaptiert und erhielten während dieser Zeit Standardfutter (Haltungsdiät V1534-0, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Tab. 2-1). Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum (22°C Lufttemperatur, 50-60 % Luftfeuchte, 12 h-Tag-Nacht-Zyklus) in Makrolonkäfigen (Typ II) mit Einstreu gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.2 Diätzusammensetzung

In der Adaptationsphase wurde den Tieren eine Haltungsdiät (Standarddiät, Tab. 2-1) gefüttert. Während des Versuchszeitraumes bekamen die Mäuse eine Hochfettdiät gefüttert. Diese wurde entweder von Altromin (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) bezogen (Hochfettdiät C1057, Mehl- und Pelletform, Tab. 2-1) bzw. selbst hergestellt (Tab. 2-2). Genauere Angaben zu den in den Versuchen verwendeten Diäten und der EGCG-Dosierung sind bei den einzelnen Versuchdesigns beschrieben (2.2.3).

Tab. 2-1: Zusammensetzung der Haltungsdiät (Standarddiät) und der Hochfettdiät (HFD) lt. Herstellerangaben

Inhaltsstoff	Haltungsdiät V1534-0	Hochfettdiät C1057
	Sniff	Altromin
Kohlenhydrate [%]	41,2	52,0
Rohprotein [%]	19,0	17,0
Rohfaser [%]	4,9	4,0
Rohfett [%]	3,3	15,0
Asche [%]	6,4	6,0
Umsetzbare Energie [kJ]	12,8	14,6

Tab. 2-2: Nährstoffquellen der semisynthetischen Hochfettdiäten

Inhaltsstoffe [g/100 g]	Versuch 3 (siehe 2.2.3.3)	Versuch 4 (siehe 2.2.3.4)
Casein ¹	20	18
Weizenstärke ²	40	43
Saccharose ³	5	5
Palmkernfett ⁴		18
Leinöl ⁵		1
Distelöl ⁶		1
Maiskeimöl ⁷	17	
Cellulose ⁸	11	7
Mineralstoffmischung ⁹	5	5
Vitaminmischung ¹⁰	2	2
Wasser, ml	30	30
Energiegehalt [kJ/g]	19,9	21,3

¹ Dauermilchwerk Peiting GmbH, Landshut (86 % Rohprotein)

² Kröner GmbH, Ibbenbüren/Westfalen

³ Nordzucker GmbH, Uelzen

⁴ OTHÜNA, Ostthüringer Nahrungsmittelwerk Gera GmbH, Gera

⁵ LARU Langensiep & Ruckebier GmbH, Bottrop

⁶ Kunella Feinkost GmbH, Cottbus

⁷ Mazola® Unilever Deutschland GmbH, Hamburg

⁸ J.Rettenmaier und Soehne GmbH, Rosenberg

⁹ Mineral-Spurenelement-Vormischung C1000 pro 100 g: Ca, 930 mg; P, 730 mg; Mg, 80 mg; Na, 440 mg; K, 710 mg; S, 170 mg; Cl, 360 mg; Fe, 20 mg; Mn, 10 mg; Zn, 3 mg; Cu, 800 mg; J, 40 mg; F, 400 mg; Se, 20 mg; Co, 10 mg
(Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage)

¹⁰ Vitaminmischung C1000 pro 100 g: A, 0,45 mg; Cholecalciferol, 1,13 mg; K₃, 1 mg; Thiamin, 2 mg; Riboflavin, 2 mg; B-6, 1,5 mg; B-12, 3 mg; Niacin, 5 mg; Panthothensäure, 5 mg; Folsäure, 1 mg; Biotin, 20 mg; Cholinchlorid, 100 mg; p-Aminobenzoesäure, 10 mg; Inositol, 10 mg; E, 16,4 mg
(Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage)

2.2.3 Versuchsdesign

Um die Wirkungen des EGCG zu untersuchen, wurden mehrere Tierversuche mit unterschiedlichem Studiendesign durchgeführt.

2.2.3.1 Versuch 1: Untersuchungen zum kurz- und mittelfristigen Einfluss des EGCG auf Parameter des Energiestoffwechsels

In diesem Versuch sollten die kurz- und mittelfristigen Effekte einer EGCG-Applikation auf Parameter des Energiestoffwechsels, insbesondere des Energieumsatzes, untersucht werden. Dazu wurden zwei Teilversuche durchgeführt (Abb. 2-2).

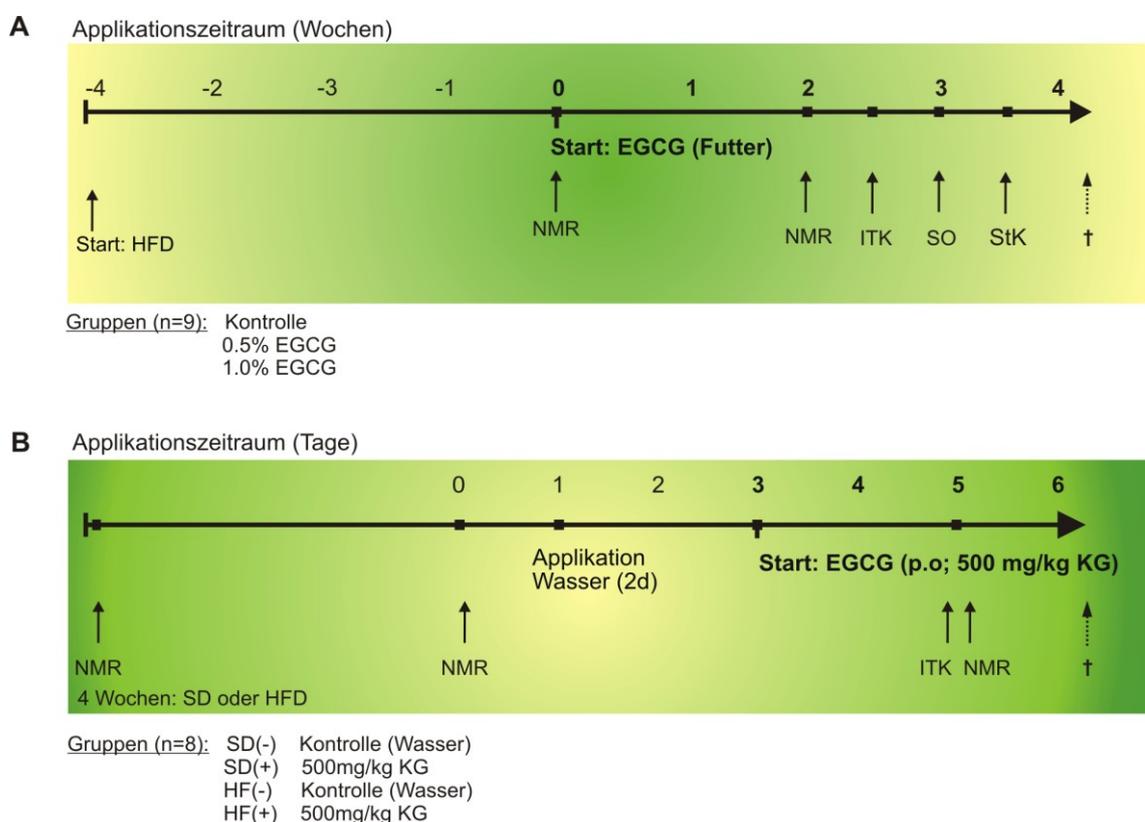


Abb. 2-2: Zeitlicher Verlauf der durchgeführten Tierversuchsstudien zur Untersuchung der Wirkung von EGCG auf Parameter des Energiestoffwechsels bei Mäusen nach kurz- (1A) und mittelfristiger (1B) Applikation

- NMR Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektroskopie (siehe 2.2.5)
- ITK Indirekte Tierkalorimetrie; Bestimmung der Parameter des Energieumsatzes (siehe 2.2.6)
- SO Substratoxidation mittels stabiler Isotope (siehe 2.2.7.1)
- StK Stoffwechselkäfig
- † Tötung

Im Versuch 1A sollte der mittelfristige Einfluss des EGCG auf eine diätinduzierte Adipositas untersucht werden. Dazu wurde den Mäusen zunächst über 4 Wochen eine Hochfettdiät (HFD, Altromin C1057, Tab. 2-1) gefüttert. Daran schloss sich die Versuchsphase von 4 Wochen mit und ohne diätetische EGCG-Supplementation (Gruppen: Kontrolle, 0.5 % EGCG, 1.0 % EGCG; n=9) an. Das EGCG wurde mit der mehlförmigen HFD vermischt und in speziellen Futterraufen angeboten. Die Körpermasse und der Futterverbrauch wurden zwei- bis dreimal wöchentlich bestimmt. Zu Beginn des Versuches und nach zwei Wochen wurde die Körperzusammensetzung mittels NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*) ermittelt. Die Energieumsatzmessung erfolgte mit Hilfe der Indirekten Tierkalorimetrie (ITK). Einfluss des EGCG auf die exogene Substratoxidation (SO) von Glucose, Leucin und Palmitat wurde mit stabilen Isotopen bestimmt. Ergebnisse zur Energiebilanz wurden mit Stoffwechselkäfigen (StK) ermittelt. Stoffwechselkäfige (Tecniplast Buguggiate, Italien) ermöglichen eine getrennte Erfassung und Untersuchung von Faeces und Harn. Die Mäuse verblieben für 5 Tage in den Stoffwechselkäfigen.

Im Versuch 1B sollte der kurzfristige Einfluss des EGCG auf den Energiestoffwechsel unter Fütterung einer HFD als auch einer Standarddiät (SD, Tab. 2-1) untersucht werden. Wie schon im ersten Teilversuch (1A) wurde den Mäusen vor Versuchsbeginn eine HFD bzw. SD über 4 Wochen gefüttert. Zur Gewöhnung an die orale Applikation mittels Schlundsonde, wurde den Mäusen zunächst Wasser über zwei Tage oral appliziert. Das EGCG wurde den Mäusen schließlich *per os* über eine Schlundsonde in Abhängigkeit der Körpermasse (500 mg/kg KM) über drei Tage hinweg verabreicht (Gruppen: SD(-), SD(+), HF(-), HF(+), n=8). Die Körperzusammensetzung wurde mittels NMR und der Energieumsatz mit Hilfe der ITK bestimmt.

2.2.3.2 Versuch 2: Kurz- und mittelfristige Dosis-Wirkungsbeziehung oraler TEAVIGO®-Applikation

Da bei dem vorher beschriebenen Kurzzeitversuch (2.2.3.1) nach oraler Applikation des EGCG makroskopische und mikroskopische Veränderungen der Leber beobachtet wurden, dienten die im Folgenden beschriebenen Versuche (Abb. 2-3) zur Abschätzung eines möglichen toxischen Potentials der Testsubstanz TEAVIGO®. Den Mäusen wurde eine HFD (HFD C1057, Altromin GmbH, Lage) gefüttert. Dann erfolgte täglich 2 Stunden vor Beginn der Dunkelheit (16 Uhr) die orale Applikation des EGCG in verschiedenen Dosierungen (Kontrolle, 125, 250, 500 mg/kg KM; n=6) über einen Zeitraum von 5 Tagen (2A) bzw. 14 Tagen (2B).

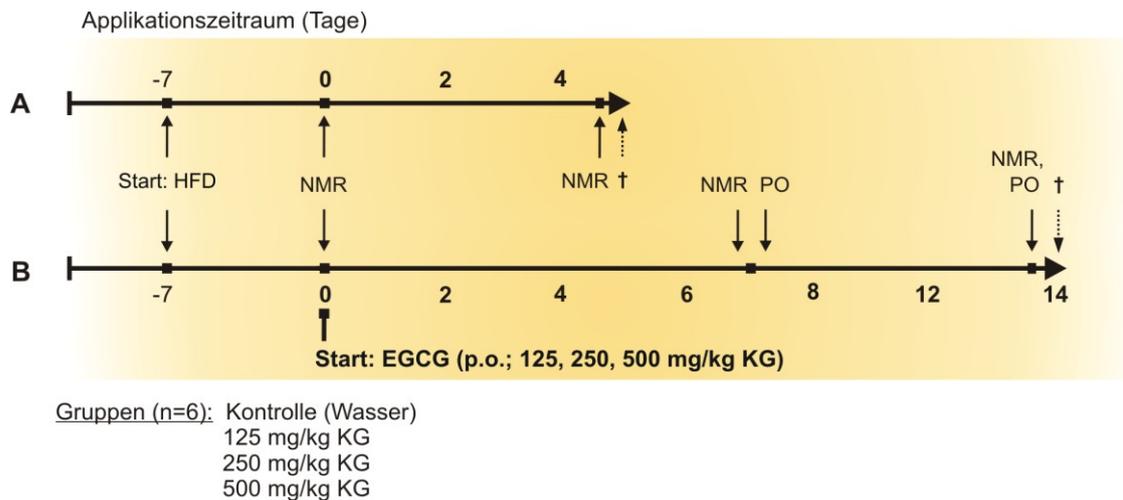


Abb. 2-3: Versuchsablauf zur kurz- (A) und mittelfristigen (B) Dosis-Wirkungsbeziehung einer oraler TEAVIGO®-Applikation bei Mäusen

NMR Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels NMR-Spektroskopie (siehe 2.2.5)

PO Palmitatoxidation mittels stabiler Isotope (siehe 2.2.7.1)

Neben der Bestimmung der Futteraufnahme und der Körpermasse wurde die Körperzusammensetzung mittels NMR bestimmt. Die exogene Fettsäureoxidation (Palmitat) mittels stabiler Isotope wurde nur im 14-tägigen Versuch nach 7 und 14 Tagen bestimmt. Am Ende der beiden Versuche wurden Organe und Gewebe entnommen und bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden Teile des großen Leberlappens zur histologischen Analyse in Einbettkassetten überführt und in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert.

2.2.3.3 Versuch 3: Untersuchungen zur Inkorporation diätetisch markierter Triglyceride

Vorversuch

In einem Vorversuch wurde zunächst der optimale Zeitpunkt zur Bestimmung der Inkorporation diätetischer Triglyceride gewählt. Dazu wurden die Mäuse von einer SD (δ -Wert: $-23,53\text{‰}$) auf eine maiskeimöhlhaltige HFD (^{13}C -angereichert, (δ -Wert: $-15,95\text{‰}$) umgestellt und diese über 4 Wochen gefüttert. Atemgasproben, Organe und Gewebe wurden wöchentlich entnommen und die ^{13}C -Anreicherung mittels Massenspektrometrie bestimmt (siehe 2.2.7). Die Darstellung der ^{13}C -Anreicherung über die Zeit ergab zunächst einen Anstieg, der nach ca. 2 Wochen in eine Sättigung überging (Abb. 2-4). Um also Unterschiede in der ^{13}C -Inkorporation in Abhängigkeit einer EGCG-Supplementation zu detektieren, wurde ein Versuchszeitraum von einer Woche gewählt, da zu diesem Zeitpunkt in allen ausgewählten Organen und Geweben Unterschiede in der ^{13}C -Anreicherung vorlagen und keine Sättigung erreicht war.

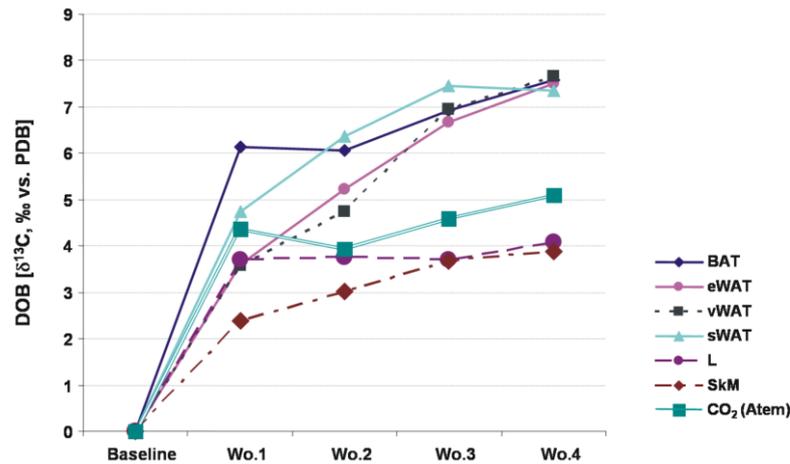
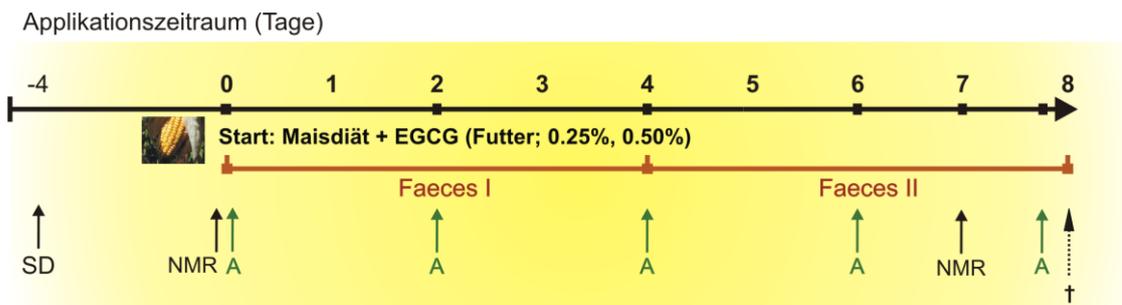


Abb. 2-4: ¹³C-Anreicherung in ausgesuchten Organen und Geweben sowie der Ausatemluft bei Mäusen nach Umstellung von einer Standarddiät (SD) auf eine ¹³C-haltige Hochfett diät (HFD); DOB = Delta over Baseline

EGCG-Versuch

Aus dem Vorversuch ergab sich für die Bestimmung der ¹³C-Inkorporation in Abhängigkeit einer EGCG-Applikation ein Fütterungszeitraum von einer Woche. Die Mäuse wurden auch hier von einer SD auf eine semisynthetische HFD, die Maiskeimöl als einzige Fettquelle enthielt, umgestellt (Abb. 2-5). Die Grundlagen dazu sind unter dem Punkt 2.2.7.2 beschrieben. Das EGCG wurde mit dem Futter verabreicht (Gruppen: Baseline-Gruppe (SD), Kontrolle, 0.25%, 0.50% EGCG (HFD), n=8).



Gruppen (n=8): Baseline-Gruppe (SD)
 Kontrolle
 0.25% EGCG
 0.50% EGCG } (HFD)

Abb. 2-5: Versuchsdesign zur Untersuchung der ¹³C-Inkorporation diätetisch markierter Triglyceride bei Mäusen

- NMR Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels NMR-Spektroskopie (siehe 2.2.5)
- A Atemgasprobe zur Bestimmung der ¹³C-Anreicherung mittels IRMS (siehe 2.2.7.1)
- † Tötung

Zu Beginn und am Ende des Versuches wurde die Körperzusammensetzung ermittelt. Körpermasse und Futteraufnahme wurden regelmäßig alle 2 Tage bestimmt. Des Weiteren sollte die Energieausscheidung bestimmt werden – dazu wurden die Faeces gesammelt (2 Sammelperioden à 4 Tage), um nachfolgend den Energiegehalt zu ermitteln. Während dieser Zeit enthielten die Käfige der Mäuse anstelle der Einstreu Filterpapier. Atemgasproben (A) wurden alle zwei Tage genommen, die zur Bestimmung der Fettoxidation herangezogen wurden. Am Ende des Versuches wurden die Tiere getötet (Futterentzug über Nacht), und Plasma und Organe zur weiteren Analyse (Histologie, Massenspektrometrie, Genexpression) entnommen.

2.2.3.4 Versuch 4: Untersuchungen zur akuten Fettsäureoxidation und zur Darmpassage

Bei diesem Versuch (Abb. 2-6) wurde die akute Fettsäureoxidation mit Hilfe stabiler Isotope (Palmitat) bestimmt. Ein weiterer Untersuchungsansatz lag in der Bestimmung der Darmpassage. Den Mäusen wurde eine semisynthetische HFD über einen Zeitraum von 5 Tagen gefüttert. Futteraufnahme und Körpermasse wurden täglich ermittelt. Die Körperzusammensetzung wurde zu Beginn und am Ende des Tierversuches bestimmt. Die akute Palmitatoxidation (PO) wurde bereits ein Tag nach Futterumstellung untersucht. Die Darmpassage (DP) wurde am Tag der Tötung mit Hilfe einer Aktivkohlesuspension ermittelt (siehe 2.2.8).

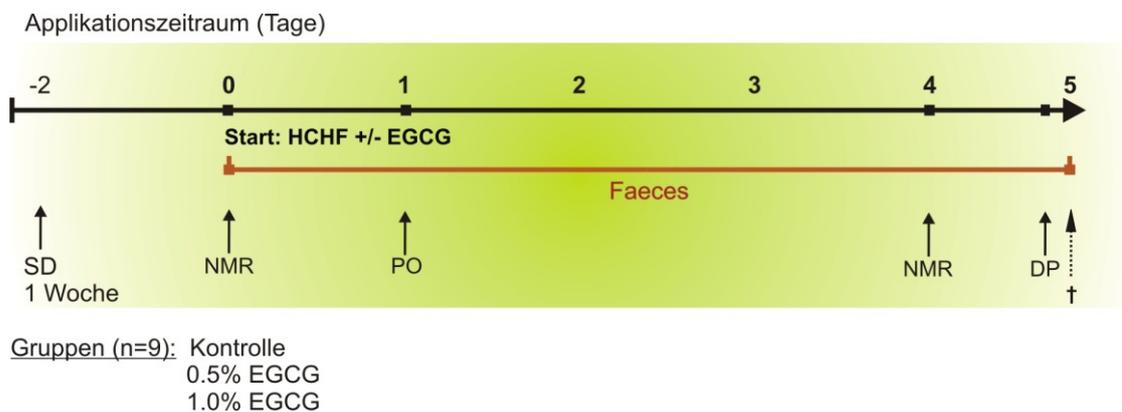


Abb. 2-6: Versuchsdesign zur Untersuchung der akuten Fettsäureoxidation und zur Darmpassage

NMR	Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels NMR-Spektroskopie (siehe 2.2.5)
PO	Palmitatoxidation mittels stabiler Isotope (siehe 2.2.7.1)
DP	Bestimmung der Darmpassage (siehe 2.2.8)
†	Tötung

2.2.4 Blut- und Gewebeentnahme

Wie aus den verschiedenen Versuchsdesigns (2.2.3) ersichtlich wird, wurden die Tiere nach unterschiedlichen Fütterungszeiträumen getötet. Die Mäuse befanden sich im Versuch 1 im postprandialen Zustand, während sie in den Versuchen 2 - 4 im postabsorptiven Zustand (14 - 16h) waren.

Blutentnahme

Die Mäuse wurden zunächst mit Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Zum Zeitpunkt der Narkose wurde durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit Hilfe einer heparinisierten (Natrium-Heparin) Kapillare (Haematokrit-Einmalkapillare, Hirschmann® Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) Blut entnommen. Zur Gewinnung von Plasma wurde das Blut in heparinisierte Plastikgefäße (Microvette®200, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) aufgefangen. Die Plasmaproben verblieben für mindestens 20 Minuten auf Eis und wurden dann zur Abtrennung der festen Blutbestandteile zentrifugiert (10 min, 4°C, 10.000 g). Im Anschluss daran wurde das Plasma aliquotiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Gewebeentnahme

Nach terminaler Blutentnahme und Tötung der Tiere wurden folgende Organe und Gewebe zügig entnommen:

- Leber
- viszerales Fettgewebe (epididymal)
- braunes Fettgewebe
- Skelettmuskel (*M. quadriceps femoris*)
- Darmmucosa (proximal)

Leber und epididymales Fettgewebe wurden unmittelbar nach der Entnahme gewogen. Alle Organe und Gewebe wurden in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.5 Bestimmung der Körperzusammensetzung mittels quantitativer NMR-Spektroskopie

Die Körperzusammensetzung der Tiere kann mittels *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Messung bestimmt werden. Die NMR-Spektroskopie ist eine nicht invasive Methode, die am lebenden Tier durchgeführt werden kann. Sie liefert Informationen zur Quantifizierung unterschiedlicher Körpergewebe wie Muskelmasse, Fettmasse und Extrazellularflüssigkeit.

Grundlagen

Atomkerne und Teilchen mit ungerader Protonen- und/oder Neutronenanzahl besitzen einen Spin und können in einem äußeren magnetischen Feld nur eine bestimmte Orientierung annehmen. Wasserstoffprotonen (^1H) besitzen, im Gegensatz zu anderen Atomen und Molekülen, eine hohe Affinität, sich im Magnetfeld auszurichten und sind darüber hinaus reichlich im Organismus vorhanden. Beim Entfernen des Magnetfeldes verändert sich auch wieder die Ausrichtung der Protonen. Wird nun senkrecht zum magnetischen Feld zusätzlich ein elektromagnetisches Wechselfeld (z. B. Radiowellen) angelegt, so können die Protonen diese Energie absorbieren und ihre Anordnung verändern. Beim Abschalten des Wechselfeldes verlieren die Protonen ihre Anordnung und geben die absorbierte Energie frei. Die Intensität dieses Signals kann zur Bestimmung der Anzahl der Wasserstoffkerne in den Geweben herangezogen werden. Um zwischen Fett- und Muskelgewebe zu unterscheiden, wird die Relaxationszeit bestimmt. Das ist die Zeit, die die Wasserstoffkerne von der Freisetzung der Radiowellen-induzierten Energie bis zum Erreichen ihrer zufälligen Konfiguration benötigen. Im Fettgewebe ist die Relaxationszeit der Protonen im Vergleich zu wässrigen Protonen viel kürzer, was eine Unterscheidung zulässt (Kallweit et al., 1997; Ellis, 2000).

Durchführung

Jeweils zu Beginn und am Ende eines Versuches wurde die Körperzusammensetzung der Mäuse bestimmt. Die Mäuse wurden dazu in ein Kunststoffröhrchen gesetzt, um die Körperzusammensetzung im NMR-Gerät (Minispec MQ10, Bruker Optik GmbH, Ettlingen) zu ermitteln. Die Messdauer betrug 2 x 1 min (Doppelbestimmung). Die Daten wurden über die Software WIN-NMR ausgegeben. Die Werte der Doppelbestimmung wurden gemittelt und zur Berechnung der fettfreien Körpermasse (FFM, Gl. 2-1) herangezogen.

$$\text{Fettfreie Masse [g]} = \text{Körpermasse [g]} - \text{Fettmasse [g]}$$

(Gl. 2-1)

2.2.6 Energieumsatzmessungen

Grundlagen

Die Energiegewinnung im Organismus erfolgt unter Normalbedingungen durch den oxidativen Abbau der zugeführten energiereichen Makronährstoffe bzw. der im Organismus gespeicherten Energie (Kohlenhydrate bzw. Glycogen, Fette und Proteine) und deren Umsetzung zu Kohlendioxid, Wasser, stickstoffhaltigen Endprodukten, Wärme und mechanischer Arbeit (Noack, 1995; Grote, 2000). Die aufgenommenen Makronährstoffe werden im Intestinaltrakt in ihre Einzelkomponenten zerlegt und resorbiert. Die Abbauprodukte energiereicher Verbindungen gelangen über den Citratzyklus schließlich in die Atmungskette. Durch das Zusammenspiel von Citratzyklus und Atmungskette wird die ATP-Versorgung gewährleistet. In der Atmungskette produzieren die Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung den wichtigsten Energielieferanten für sämtliche Stoffwechselprozesse, Adenosintriphosphat (ATP). Da der O₂-Verbrauch mit der Energie- bzw. Wärmeproduktion korreliert und es für O₂ kaum Speicherkapazitäten im Organismus gibt, kann dieser zur Bestimmung der Parameter des Energieverbrauches herangezogen werden (Schutz, 1995).

Mit Hilfe der indirekten Kalorimetrie im offenen System kann der Energieumsatz bestimmt werden. Dabei wird die vom Körper abgegebene Energie nicht direkt über die Wärmeabgabe des Körpers (direkte Kalorimetrie), sondern indirekt über den Sauerstoffverbrauch (VO₂) und die Kohlendioxidproduktion (VCO₂) gemessen. Die Berechnung des Energieumsatzes (EU) erfolgt anhand der erfassten Messwerte unter Berücksichtigung des im Harn ausgeschiedenen Stickstoffs (N_{ex}) nach Frenz (1995, Gl. 2-2):

$$\text{EU [kJ]} = 16,17 \cdot \text{VO}_2 \text{ [l]} + 5,03 \cdot \text{VCO}_2 \text{ [l]} - 5,98 \cdot \text{N}_{\text{ex}} \text{ [g]}$$

(Gl. 2-2)

Die Messwerte wurden einer Volumenkorrektur unterzogen und auf Standardbedingungen (Temperatur: 273 K, Luftdruck: 760 Torr, Luftfeuchte: 0%) umgerechnet. Die Korrektur erfolgte nach der Gleichung von Haldane (Jequier & Felber, 1987; Gl. 2-3).

$$VO_2 \text{ [l/h]} = VFI \text{ [l/h]} \cdot \frac{\left(\frac{\Delta FO_2 \text{ [Vol\%]}}{100} - \frac{\Delta FCO_2 \text{ [Vol\%]}}{100} \cdot \frac{FIO_2 \text{ [Vol\%]}}{100} \right)}{1 - \frac{FIO_2 \text{ [Vol \%]}}{100}}$$

(Gl. 2-3)

VO_2	O_2 -Verbrauch
VFI	gemessene Flussrate des Luftstroms
ΔFO_2	gemessene O_2 -Differenz zwischen einströmender und abgesaugter Luft
ΔFCO_2	gemessene CO_2 -Differenz zwischen einströmender und abgesaugter Luft
FIO_2	20.94 Vol%, entspricht dem O_2 -Gehalt der Luft, der als konstant angenommen wird

Der Anteil des produzierten Kohlendioxides wurde nach folgender Gleichung (Gl. 2-4) berechnet:

$$VCO_2 \text{ [l/h]} = VFI \text{ [l/h]} \cdot \frac{\Delta FCO_2 \text{ [Vol\%]}}{100}$$

(Gl. 2-4)

VCO_2	CO_2 -Produktion
VFI	gemessene Flussrate des Luftstroms
ΔFCO_2	gemessene CO_2 -Differenz zwischen einströmender und abgesaugter Luft

Der Substratstoffwechsel kann anhand des respiratorischen Quotienten (RQ) charakterisiert werden. Der RQ gibt Aufschluss darüber, welchen Anteil die Oxidation eines Makronährstoffes (Kohlenhydrate, Fette, Proteine) am Energieverbrauch hat. Der RQ bezeichnet das Verhältnis zwischen gebildeten Volumen CO_2 und verbrauchten Volumen O_2 (Gl. 2-5).

$$RQ = \frac{VCO_2}{VO_2}$$

(Gl. 2-5)

Der RQ ist abhängig von Nährstofftyp und dessen Umbau im Organismus. Bei reiner Kohlenhydratoxidation liegt er bei 1,00, bei reiner Fettoxidation beträgt er 0,70 und bei Proteinoxidation nimmt er einen Wert von 0,80 an. Der normale Bereich des RQ kann unter bestimmten Bedingungen unterschritten (vermehrter Fett- und Proteinabbau infolge

eines reduzierten Glucosestoffwechsels bei Diabetes oder Fasten) bzw. überschritten (kohlenhydratinduzierte Lipogenese, z. B. bei der Kohlenhydratmast) werden.

Der Gesamtenergieumsatz (kJ/d) ergab sich als Mittelwert aller Einzelmessungen eines Tages.

Versuchsdurchführung

Die Messung des Gesamtenergieumsatzes der Mäuse mittels ITK erfolgte nach kurz- und langfristiger Gabe des Grüntee-Extraktes TEAVIGO® (Versuch 1, siehe 2.2.3.1). Im Langzeitversuch wurde der EU nach drei Wochen Fütterung der Versuchsdiet und im Kurzzeitversuch nach drei Tagen EGCG-Applikation bestimmt.

Die ITK-Anlage ist aus sechs Respirationskäfigen, den Analysatoren und einem Computer zur Datenerfassung aufgebaut. Die Respirationskäfige werden kontinuierlich mit Hilfe von Membranpumpen mit Luft aus der Klimaanlage (O_2 : 20,94 Vol%, CO_2 : 0,03 Vol%, N_2 : 78,16 Vol%) durchströmt. Für jeweils eine Minute wird der Gasstrom mit Hilfe von Magnetventilen zu den O_2 - und CO_2 -Analysatoren geleitet (Hartmann & Braun, VO_2 -Analysator Magnos 16 und VCO_2 -Analysator Uras 14, Frankfurt/Main). Das CO_2 im Luftstrom wird durch Infrarotmessung im Vergleich zum Referenzgas ermittelt. Das Messprinzip des O_2 -Analysators beruht auf die paramagnetischen Eigenschaften des Sauerstoffmoleküls. Beide Analysatoren wurden täglich vor Beginn der Messung gegen die in die Käfige einströmende Luft kalibriert.

Die Mäuse wurden für 23 Stunden (ca. 9:00 bis 8:00 Uhr des folgenden Tages) in luftdicht abgeschlossene Respirationskäfige mit einem Luftdurchsatz von ~30 l/h gesetzt. Die Respirationskäfige waren zur Erhaltung einer konstanten Umgebungstemperatur (22°C) in Klimaschränken (Vötsch Industrietechnik, Reiskirchen-Lindenstruth) untergebracht. Der Anteil der O_2 -Konsumption (VO_2) und CO_2 -Produktion (VCO_2) wurden für jedes Tier in einem 6-Minuten-Intervall bestimmt. Der EU wurde nach der Gl. 2-2 (Frenz, 1999) berechnet. Den Mäusen wurde das Futter um 16 Uhr zugeteilt, um den Einfluss des EGCG unter postabsorptiven als auch postprandialen Bedingungen zu untersuchen. Im Kurzzeitversuch war die Futtergabe gleichzeitig mit der oralen EGCG-Applikation verbunden.

2.2.7 Bestimmung der exogenen Substratoxidation mittels stabiler Isotope

Grundlagen

Viele in der Natur vorkommende Elemente zeigen hinsichtlich ihres Atomaufbaus kleine Variationen. Bei gleicher Anzahl an Protonen und Elektronen variiert die Anzahl an Neutronen. Diese Variationen der Elemente bezeichnet man als Isotope. Sie verhalten sich chemisch identisch, unterscheiden sich jedoch aufgrund der abweichenden Anzahl an Neutronen in ihrem Atomgewicht (unterschiedliche Massezahl). Durch diesen Gewichtsunterschied reagieren sie etwas anders auf physikalische Prozesse, wodurch sich die Mengenverhältnisse von "normalen", "leichten" und "schweren" Isotopen in chemischen Verbindungen bestimmen lassen. Durch den Einsatz von stabilen Isotopen ist es möglich, dynamische Stoffwechselwege im Körper zu verfolgen und quantitative Aussagen über deren Anreicherung in verschiedenen Körpergeweben zu treffen. Der Einsatz stabiler Isotope zeichnet sich besonders darin aus, dass sie keine radioaktive Strahlung emittieren und somit unbedenklich für Mensch und Tier sind.

Das für unsere Studien verwendete stabile Isotop ^{13}C ist eine natürliche Variante des Kohlenstoffs, die auch in der Nahrung enthalten ist. Die natürliche Häufigkeit liegt bei 1,108 Atom%. Die natürliche Anreicherung des Körpers an ^{13}C variiert in Abhängigkeit von Ernährungsweise und Oxidationsvorgängen im Körper. Die mit der Nahrung zugeführte Energie wird unter Verbrauch von Sauerstoff (O_2) zu Kohlenstoffdioxid (CO_2), Wasser (H_2O) und Harnstoff abgebaut. Die Anreicherung des CO_2 in der Ausatemluft widerspiegelt somit die Verbrennung endogener Nährstoffe. Wird nun ein stabilisiertes markiertes Substrat (z. B. ^{13}C -markierte Fettsäuren, Glucose, Aminosäuren) oder ein natürlicherweise angereichertes Substrat wie Maiskeimöl (Mais \rightarrow C4-Pflanze) als zusätzlicher Brennstoff zugeführt, so ändert sich das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis der Ausatemluft in Richtung des schwereren Isotops. Der Anteil des exogen zugeführten Substrates lässt sich anhand der Identifizierung des ^{13}C in der Ausatemluft errechnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen die ^{13}C -Anreicherung im CO_2 der Atemluft nach oraler Verabreichung von ^{13}C -markierter Glucose, Leucin und Palmitinsäure als Maß für die Glucose-, Aminosäure- und Fettsäureoxidation *in vivo* bestimmt und zum anderen wurde die Inkorporation einer ^{13}C -angereicherten Diät (Maiskeimöl) in verschiedene Gewebe und Organe der Versuchstiere untersucht.

2.2.7.1 Semi - quantitative in vivo Analyse der Substratoxidation mittels Atemtests

Prinzip

Mit Hilfe von Atemtests, bei denen ein stabilisotop markiertes Substrat (U-¹³C-Glucose, U-¹³C-Leucin, 1-¹³C-Palmitat) verabreicht wird, lässt sich eine Aussage zur exogenen Substratoxidation treffen. Glucose und Leucin waren uniform markiert. Ihre Oxidation liefert schließlich ¹³CO₂, was über die Lunge abgeatmet wird. Das hier verwendete 1-¹³C-Palmitat war an der Carboxylgruppe markiert. Dieses Kohlenstoffatom durchläuft als letztes die β-Oxidation, so dass das Erscheinen des ¹³C in der Ausatemluft den kompletten Abbau der Fettsäure bedeutet. Im weiteren Verlauf wird das Palmitat oxidativ zu Acetyl-CoA abgebaut. Die aktivierten Acetylreste werden in den Citratzyklus eingeschleust und weiter zu CO₂ abgebaut, welches über die Lunge abgeatmet und somit in der Ausatemluft massenspektrometrisch gemessen werden kann (Gl. 2-6).



(Gl. 2-6)

Messprinzip der IRMS

Die ¹³C-Anreicherung in der Atemluft wurde mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS: *Isotope Ratio Mass Spectrometry*) gemessen (BreathMAT, Thermo Scientific Corp., Bremen; Abb. 2-7). Entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z) können Elemente getrennt werden. Dabei werden verschiedene schwere Isotope eines Elementes infolge unterschiedlicher Ablenkung im Magnetfeld getrennt und anschließend simultan detektiert. Die Proben müssen dafür in Gasform vorliegen. Die wesentlichen Elemente eines Massenspektrometers sind: Ionenquelle, Analysator und Detektoren. Die Ionisierung erfolgt im Hochvakuum (10⁻⁸ Torr), indem Elektronen von einer Kathode emittiert werden und auf das Probengas treffen. Dabei wird ein Elektron herausgeschlagen und es entstehen Ionen mit positiver Ladung (CO₂⁺). Die Ionen werden dann durch das Magnetfeld in Abhängigkeit ihres Masse/Ladungsverhältnisses abgelenkt und über kreisförmige Bahnen in Auffangvorrichtungen (Faraday-Cups) geleitet, in denen die Entladung gemessen wird. Die Isotopomere können simultan bestimmt werden. Aus der Anzahl der Entladungen pro Zeiteinheit berechnen sich die Verhältnisse der Massen 45/44 (CO₂) und damit die ¹³C/¹²C-Verhältnisse (Finnigan Software ISODAT).

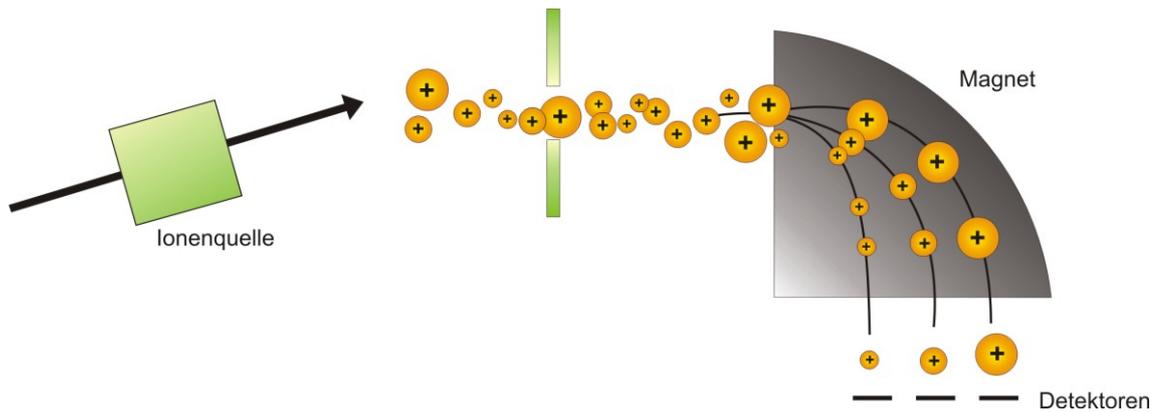


Abb. 2-7: Aufbau eines Massenspektrometers (modifiziert nach www-linux.gsi.de)

Die Isotopenanreicherungen werden in der δ -Notation ($\delta^{13}\text{C}$ -Werte) angegeben. Hierbei wird die ^{13}C -Anreicherung relativ zum Isotopenverhältnis des natürlichen internationalen Standards (PDB, *Pee Dee Belemnite*) angegeben (Gl. 2-7).

$$\delta^{13}\text{C} \left[\text{‰} \right] = \frac{\left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{\delta^{12}\text{C}} \right)_{\text{Probe}} - \left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{\delta^{12}\text{C}} \right)_{\text{Standard}}}{\left(\frac{\delta^{13}\text{C}}{\delta^{12}\text{C}} \right)_{\text{Standard}}} \cdot 10^3$$

(Gl. 2-7)

Die Delta Over Baseline-Werte (DOB) ergeben sich aus der Differenz den jeweiligen $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (t_x) und des Basiswertes (t_0) (Gl. 2-8).

$$\text{DOB} \left[\text{‰} \right] = (\delta^{13}\text{C})_{t_x} - (\delta^{13}\text{C})_{t_0}$$

(Gl. 2-8)

Versuchsablauf

Zur Untersuchung der exogenen Glucoseoxidation kam der $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glucose-Atemtest zur Anwendung. $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glucose (Cambridge Isotope Lab, Inc. Andover, MA, USA) wurde in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und den Mäusen in Abhängigkeit ihrer Körpermasse ($10 \mu\text{mol/kg}$) intraperitoneal in einem Volumen von $50 \mu\text{l}/20 \text{g}$ Körpermasse injiziert. Vor Tracer-Gabe wurde zur Berücksichtigung der variablen ^{13}C -Anreicherung im Organismus der Basiswert bestimmt (0 Minuten, 5-fach Bestimmung). Weitere Atemgasproben wurden nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 und 120 Minuten (Doppelbestimmung) genommen. Zur Entnahme der Atemluft wurde die Maus in ein ca. 150 ml großes Gefäß gesetzt, das

luftdicht verschließbar und mit einem 3-Wege-Hahn zur Entnahme der Atemgasprobe ausgestattet war (Abb. 2-8).

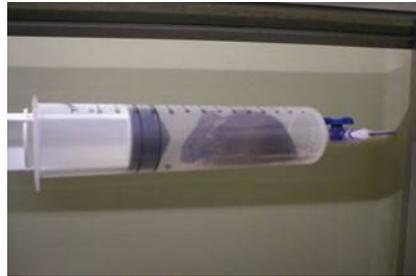


Abb. 2-8: Entnahme einer Atemgasprobe bei Maus

Das Gefäß wurde verschlossen, und nach 30 Sekunden wurden Atemproben von ca. 10 ml mittels vakuisierter Glasröhrchen (Exetainer[®], Labco Ltd., High Wycombe, U.K.) zur weiteren Lagerung und Messung entnommen. Die restliche Zeit verblieben die Tiere in ihrem normalen Käfig.

Die exogene Leucinoxidation wurde mit Hilfe des uniform markierten Tracers U-¹³C-Leucin (Cambridge Isotope Lab, Inc. Andover, MA, USA) untersucht. Der Versuchs- und Zeitablauf erfolgte analog zur oben beschriebenen Glucoseoxidation. Die *i.p.* Applikation erfolgte auch hier in Abhängigkeit der Körpermasse (25 µmol/kg) in einem Volumen von 50 µl/20 g Körpergewicht.

Der [1-¹³C]-Palmitinsäure-Atemtest wurde zur Untersuchung der exogenen Fettsäureoxidation benutzt. Dazu wurde den Mäusen ¹³C-markiertes Kalium-Palmitat (Cambridge Isotope Lab, Inc. Andover, MA, USA) verabreicht. Das Kalium-Palmitat wurde durch kräftiges Mischen bei 60°C mit 5 % Lecithin (Emultop, Cargill Texturizing Solutions Deutschland GmbH & Co. KG, Hamburg) emulgiert und in sterilem Wasser gelöst. Der Tracer wurde in Abhängigkeit der Körpermasse (60 µmol/kg) durch orale Applikation (Schlundsonde) in einem Volumen von 50 µl/20 g Körpergewicht verabreicht. Die variable ¹³C-Anreicherung im Organismus wurde als Basiswert (0 Minuten, 5-fach Bestimmung) vor Tracer-Gabe bestimmt. Weitere Atemgasproben wurden dann nach 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180, 210, 240, 270 und 300 Minuten (Doppelbestimmung) genommen.

2.2.7.2 Inkorporation natürlich ^{13}C -angereicherter Triglyceride aus Maiskeimöl in verschiedene Organe und Gewebe

Grundlagen

Mit der Nahrungsaufnahme gelangen die drei Makronährstoffe Kohlenhydrate, Fette und Proteine in den Organismus und werden zur Energiegewinnung herangezogen. Überschüssig aufgenommene und nicht benötigte Nährstoffe gelangen in die körpereigenen Speicher. Ein fast unendliches Depot stellt dabei das Fettgewebe dar. Die Fettgewebszusammensetzung des Körpers widerspiegelt somit die diätetische Fettaufnahme (Fernández-Quintela et al., 2007). Um die Inkorporation diätetischer Fette in unterschiedliche Organe und Gewebe in Abhängigkeit einer EGCG-Supplementation zu untersuchen, wurde den Mäusen eine Hochfettdiät angeboten, deren einzige Fettquelle aus Maiskeimöl stammte. Mais gehört zu den C4-Pflanzen, die im Vergleich zu C3-Pflanzen ($\delta^{13}\text{C}$ -Wert: -25‰) einen weiteren Weg zur Kohlenstofffixierung entwickelt haben und aufgrund ihres Hatch-Slack-Zyklus der Photosynthese den „schwereren“ Kohlenstoff ($\delta^{13}\text{C}$ -Wert: -11‰) produzieren. Damit führt der Verzehr von C4-Pflanzen bei Menschen und Tieren zu einem Anstieg des basalen $^{13}\text{CO}_2$ in der Atemluft.

Versuchsablauf

Wie aus dem Studiendesign (2.2.3.3) hervorgeht, wurden die Mäuse von einer Standarddiät, die keine C4-haltigen Komponenten enthält, auf eine Mais-Hochfett-Diät umgestellt. Die in regelmäßigen Abständen gewonnenen Atemgasproben wurden wie bereits oben beschrieben mittels IRMS (BreathMAT, Thermo Scientific Corp., Bremen, 2.2.7.1) gemessen. Die Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung von Plasma, Organ- und Gewebeproben (Leber, Skelettmuskel, eWAT, sWAT, visWAT, BAT) sowie Faecesproben erfolgte mittels EA-IRMS (Elementaranalysator-IRMS). Hierbei ist ein Elementaranalysator (EA 1108, Fisons Instruments, Italien) mit einem IRMS (Delta C, Finnigan MAT, Bremen) gekoppelt. Das Prinzip der Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung ist unter Punkt 2.2.7.1 beschrieben. Bei der Kopplung mit einem Elementaranalysator wurden die zu untersuchenden Proben (feste Proben: ca. 0,25 - 0,50 mg, flüssige Proben: 10 μl) in Zinnkapseln (LÜDI SWISS AG, Flawil, Schweiz) abgewogen. Die Plasmaproben wurden zusätzlich im Heizblock bei ca. 35°C eingengt. Unter Sauerstoffatmosphäre konnten die eingewogenen Proben in einem Oxidationsofen verbrannt und direkt in ihre gasförmigen Oxidations- oder Pyrolyseprodukte überführt werden (Metges & Petzke, 1997).

Die Darstellung der Isotopenverhältnisse erfolgt auch hier über die δ -Notation, die gegen den internationalen Standard PDB gemessen wurde (2.2.7.1). Bei der Auswertung wurde von der ^{13}C -Anreicherung in den Hochfettgruppen jeweils der Mittelwert der Standarddiät-Gruppe des jeweiligen Organs als Basiswert subtrahiert (Gl. 2-9).

$$\text{DOB} \left[\text{‰} \right] = (\delta^{13}\text{C})_x - \text{MW} (\delta^{13}\text{C})_{\text{Basis}}$$

(Gl. 2-9)

2.2.8 Untersuchung des Darmtransportes *in vivo*

Die Bestimmung der Darmpassage erfolgte unter Zuhilfenahme einer Aktivkohle-suspension (10 % Aktivkohleauspension in 5 % Gummi arabicum; Puig & Pol, 1998; Capasso et al., 2005), die den Mäusen in Abhängigkeit des Körpergewichtes 20 Minuten vor Tötung *per os* appliziert wurde (0.1 ml/10 g KG_{Maus}). Der Dünndarm wurde entnommen und dessen Länge vom Pylorus bis zur Ileocaecalklappe bestimmt. Anhand der schwarzen Aktivkohlesuspension konnte die Strecke bestimmt werden, die der Marker im Dünndarm zurückgelegt hatte. Prozentual zur Gesamtlänge des Dünndarms ergab sich die Transitstrecke des Markers (Gl. 2-10), die somit eine Aussage zur Darmpassage lieferte.

$$\text{Transit [\%]} = \frac{l_{\text{gesamt}} - l_x}{l_{\text{gesamt}}} \cdot 100$$

(Gl. 2-10)

l_{gesamt} Gesamtlänge des Dünndarms vom Pylorus bis zur Ileocaecalklappe in cm
 l_x zurückgelegte Strecke des Markers (Aktivkohlesuspension) in cm

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Präparation von Organen zur histologischen Analyse

Am Ende der Tierversuche wurde von den Lebern Teile zur histologischen Analyse entnommen. Dabei wurden vom großen Leberlappen Aliquots entnommen und in Einbettkassetten überführt. Die Proben wurden per Immersionsfixation in 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei Raumtemperatur gelagert. Formaldehyd führt zu einer reversiblen Vernetzung der Proteine, wodurch jegliche

Enzymaktivität gestoppt wird. Des Weiteren wurden Aliquots der Leber für Kryoschnitte genommen.

2.3.2 Entwässerung und Einbettung von Formaldehydpräparaten

Zur Herstellung von Paraffinpräparaten wurden die in Formaldehyd-fixierten Leberproben zunächst 24 h unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend im Entwässerungsautomaten Hypercenter XP (Shandon, England) folgender Behandlung unterzogen (Tab. 2-3).

Tab. 2-3: Gewebeeinbettung der Leberpräparate

Medium	Temperatur	Zeit
Ethanol 55 %	40°C	45 min
Ethanol 70 %	40°C	50 min
Ethanol 96 % I	40°C	30 min
Ethanol 70 % II	40°C	60 min
Ethanol, absolut I	40°C	80 min
Ethanol, absolut II	40°C	150 min, im Vakuum
Toluol I	40°C	120 min, im Vakuum
Toluol II	40°C	150 min, im Vakuum
Paraffin I	60°C	90 min, im Vakuum
Paraffin II	60°C	150 min, im Vakuum

Nach der Entwässerung der Präparate mittels einer in Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben in einem Intermedium (Toluol) inkubiert und schließlich in einer Ausgießstation (Histocentre 2, Shandon, England) in Paraffin eingebettet.

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM 355, Microm, Walldorf) bzw. eines Kryostaten (HM 500 OM, Microm, Walldorf) wurden 2 µm dünne Schnitte angefertigt, die auf Objektträger aufgezogen und getrocknet wurden. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Schnitte entparaffiniert, dehydriert und rehydriert (Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Schritte zum Rehydrieren und Dehydrieren von Gewebeschnitten

Rehydrieren der Schnitte		Dehydrieren der Schnitte	
Medium	Zeit	Medium	Zeit
Toluol I	2,5 min	EtOH, 70 %	1 min
Toluol II	3,5 min	EtOH, 96 %	2 min
Ethanol, absolut I	2,5 min	Ethanol, absolut I	2,5 min
Ethanol, absolut I	3,5 min	Ethanol, absolut I	3,5 min
Ethanol, 96 %	2 min	Toluol I	3 min
Ethanol, 70 %	2 min	Toluol II	4 min
Ethanol, 40 %	2 min		
dH ₂ O	2 min		

Die Präparate wurden anhand der unter Punkt 2.3.3 bis 2.3.5 beschriebenen Färbetechniken am Lichtmikroskop (Eclipse E 1000, Nikon, Düsseldorf) untersucht.

2.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Routinemethode für morphologische Untersuchungen. Anhand von zwei verschiedenen Einzelfärbungen werden die Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma, Bindegewebe sowie Muskulatur rot angefärbt. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (Tab. 2-4). Im Anschluss daran wurden die entparaffinierten Schnitte in zwei Einzelfärbungen nach folgendem Schema gefärbt:

1. Färbung:	Hämalaun (nach P. Mayer)	1 min
(Kernfärbung)	Leitungswasser, fließend	6 min
	dH ₂ O	20 s
2. Färbung:	1 % wässrige Eosinlösung	45 s
(Plasmafärbung)	Leitungswasser, fließend	30 s
	dH ₂ O	30 s

Die gefärbten Leberpräparate wurden schließlich über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (Tab. 2.4) und auf einem Objektträger mit Deckglas und Histofluid (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Köningshofen) als Dauerpräparat eingedeckt.

Mayer's Hämalaun: 1 g Hämatoxylin, 1000 ml dH₂O, 200 mg Natriumjodat, 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure

1 % Eosinlösung: 10 g Eosin, 1000 ml dH₂O, 300 µl 100%ige Essigsäure

2.3.4 Perjodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Die PAS-Reaktion (*Periodic acid Schiff stain*) dient dem Nachweis kohlenhydrathaltiger Komponenten wie z. B. Glycogen, Glycoproteine, Cellulose. Durch die Perjodsäure werden zunächst die unsubstituierten Glykolgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert. In einer zweiten Reaktion reagieren die Aldehydgruppen mit dem im Schiff-Reagenz vorhandenen schwefelsauren Fuchsin und bilden rot-violette Komplexe. Zur Kerngegenfärbung lassen sich im Anschluss Hämatoxylinlösungen verwenden.

Die Schnitte wurden wie in Tab. 2-4 beschrieben entparaffiniert und in Wasser gebracht. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in frisch zubereiteter 1 %iger Perjodsäurelösung. Dann wurden die Schnitte 2 Minuten in dH₂O gespült. Für 15 Minuten wurden die Präparate in Schiffsches Reagenz inkubiert und 3 x 2 Minuten in Sulfitwasser (18 ml 10%iges Natriumsulfit, 300 ml dH₂O, 15 ml 1M Salzsäure) getaucht. Nach erneuten Spülen in fließendem Leitungswasser für 15 Minuten wurden die Zellkerne mit Mayer's Hämalaun gegengefärbt. Abschließend wurden die Schnitte ein weiteres Mal in fließendem Leitungswasser (5 min) gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingeschlossen.

2.3.5 Färbung mit Ölrot O

Mit Ölrot O lassen sich alle Lipide anfärben. Dazu wurden Gefrierschnitte von formolfixierten Material hergestellt. Diese wurden mit Wasser ausgewaschen und dann für 5 Minuten in 60 %igen Isopropanol gebracht. Die Färbung erfolgte für 10 Minuten in verdünnter, frisch filtrierter Ölrot O-Gebrauchslösung. Anschließend wurde kurz in 60 %igem Isopropanol differenziert, mit dH₂O ausgewaschen und mit Mayer's Hämalaun-Lösung gegengefärbt. Nach Auswaschen mit dH₂O, wurden die Präparate für 10 Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut und schließlich in Opti-Mount (Richard-Allen-Scientific) eingeschlossen. Die Lipide sind dadurch kräftig rot gefärbt und die Kerne blau.

Ölrot O-Stammlösung

0,5 g Ölrot O in
100 ml 99 %igem Isopropanol lösen

Gebrauchslösung (Färbelösung)

6 Teile der Stammlösung mit

4 Teilen dH₂O mischen, 24 h bei Raumtemperatur inkubieren und filtrieren

2.4 Analytische Bestimmungsmethoden**2.4.1 Bestimmung des Energiegehaltes mittels Bombenkalorimetrie**

Um die Energieaufnahme und die Energieausscheidung zu ermitteln, wurde der Energiegehalt der Futter- und Faecesproben mit Hilfe eines Bombenkalorimeters (IKA-Kalorimetriesystem C5003, IKA®-Werke, Staufen) mit adiabatischen Messprinzip bestimmt. Das Kalorimetersystem besteht aus einer Verbrennungsbombe (Druck- und Aufschlussgefäß), dem Kalorimeterwasser, dem Rührer und einem Thermometer. Die zu messenden Proben werden nach elektrischer Zündung im Aufschlussgefäß ca. 15 Minuten unter reinem Sauerstoff verbrannt. Die dabei frei werdende Reaktionswärme wird auf das umliegende Kalorimeterwasser übertragen und erhöht dessen Temperatur. Aus dem Anstieg der Wassertemperatur, der Masse der zu untersuchenden Substanz und der Wärmekapazität des Kalorimetersystems berechnet sich der spezifische Brennwert H₀ der Probe nach folgender Gleichung (Gl. 2-11):

$$H_0 \text{ [J/g]} = \frac{C \text{ [J/K]} \cdot \Delta T \text{ [K]} - Q_F \text{ [J]}}{m \text{ [g]}}$$

(Gl. 2-11)

- C Wärmekapazität des Kalorimetersystems
- ΔT gemessene Temperaturerhöhung des Kalorimetersystems
- Q_F Summe aller Fremdenergien
- m Masse der zu bestimmenden Substanz

Der Brennwert H₀ wurde nach Beendigung der Messung in J/g errechnet und auf dem Display des Gerätes angezeigt. Ca. 1 g Trockensubstanz der Futter- und Faecesproben wurden in einen Quarztiegel eingewogen, im Aufschlussgefäß platziert und über einen Baumwollfaden mit dem Zünddraht verbunden. Basierend auf den Energiegehalten der Futter- und Faecesproben ließ sich die Differenz zwischen Energieaufnahme und Energieausscheidung berechnen (ΔE, Gl. 2-12) und daraus die relative Verdaulichkeit (Gl. 2-13) ermitteln.

$$\Delta E = E_{\text{auf}} - E_{\text{aus}}$$

(Gl. 2-12)

$$\text{rel. Verdaulichkeit [\%]} = \frac{\Delta E}{E_{\text{auf}}} \cdot 100$$

(Gl. 2-13)

- ΔE Differenz zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe
 E_{auf} Energieaufnahme
 E_{aus} Energieausscheidung

2.4.2 Fettextraktion modifiziert nach FOLCH

Das Gesamtfett wurde aus Faecesproben nach einer modifizierten Methode nach FOLCH (Folch et al., 1957) mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (Flüssigphasenextraktion) extrahiert. Die Faecesproben wurden über 2-3 Tage lyophilisiert (Modulyo 4K, Edwards) und anschließend im Mörser pulverisiert. Davon wurden 200 mg Faeces in 10 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Nach Zugabe von 2 ml Chloroform-Methanol (2:1, v/v) wurden die Faecesproben im Eisbad ca. 1 Minute bei 20.000 U/min homogenisiert (Ultra Turrax T25, IKA[®]-Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen). Nach weiterer Zugabe von 2 ml Chloroform-Methanol (2:1, v/v) zu den Proben, wurden diese für 15-30 Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben mit 800 µl 0,58 %iger Natriumchlorid-Lösung versetzt, kräftig gemischt und dann zentrifugiert (2300 g, 5 min, 4°C). Die untere Phase (Fette und Chloroform) wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und in Glasröhrchen (10 ml) gesammelt. Die obere wässrige Phase und die Interphase wurden erneut zweimal durch Zugabe von 2 ml Chloroform-Methanol (5:1, v/v) extrahiert, gemischt und zentrifugiert (2.300 g, 5 min, 4°C). Unlösliche Rückstände wurden durch ein mit Extraktionsgemisch angefeuchtetes Filter (MN 615 ff, MACHERY & NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) abgetrennt. Das Filtrat wurde in ein getrocknetes, gewogenes 10 ml Glasröhrchen aufgefangen, unter einem Stickstoffstrom im Heizblock zur Trockne gebracht und das Gewicht des Rückstandes ermittelt. Der konzentrierte Lipidextrakt wurde im Trockenschrank (kelvitron[®] t, Heraeus Instruments GmbH, Hanau) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (ca. 4 h, 60°C) und nach dem Abkühlen gewogen. Die Massendifferenz der Glasröhrchen mit und ohne Lipidextrakt ergab den Gesamtfettgehalt der eingewogenen Faecesproben (Gl. 2-14 und Gl. 2-15).

$$FM_{\text{Einwaage}} [\text{g}] = TM_{\text{G+Lipidextrakt}} [\text{g}] - TM_{\text{G,leer}} [\text{g}]$$

(Gl. 2-14)

$$FM_{\text{Faeces}} [\text{g}] = \frac{TM_{\text{Faeces}} [\text{g}] \cdot FM_{\text{Einwaage}} [\text{g}]}{TM_{\text{Einwaage}} [\text{g}]}$$

(Gl. 2-15)

FM_{Einwaage}	Fettmasse der eingewogenen Faecesprobe
$TM_{\text{G+Lipidextrakt}}$	Trockenmasse des Glasröhrchens (G) mit Lipidextrakt
$TM_{\text{G, leer}}$	Trockenmasse des Glasröhrchens (G)
FM_{Faeces}	Gesamtfettmasse der Faecesprobe
TM_{Faeces}	Trockenmasse der Faecesprobe
TM_{Einwaage}	Trockenmasse der eingewogenen Faecesprobe

2.4.3 Stickstoff-Bestimmung in Faeces mittels Elementaranalysator

Der Stickstoffanteil in den Faecesproben wurde mittels Elementaranalysator (Vario EL N, Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau) bestimmt. Dazu wird die lyophilisierte Probe (ca. 0,25 mg) in Zinnkapseln (LÜDI SWISS AG, Flawil, Schweiz) exakt abgewogen und mit reinem Sauerstoff katalytisch zu Stickoxiden, Kohlendioxid und Wasser oxidiert (950-1000°C, Kupferoxid, Cerdioxid, Bleichromat). Eine anschließende Reduktion der Stickoxide (NO, NO₂) im Reduktionsofen (650°C, Kupferoxid, Kupfer zur O₂-Elimination) ermöglicht die vollständige Umsetzung zu molekularem Stickstoff (N₂), der an einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) quantifiziert wird. Das Prinzip der Quantifizierung erfolgt über die Messung der Wärmeleitfähigkeit des Trägergases mit der Hitzedrahtmethode (Petzke et al., 2005).

2.5 Biochemische Methoden

Die Plasmaproben aus den Versuchen wurden auf Cholesterol, freie Fettsäuren, Triglyceride und β-Hydroxybutyrat untersucht. Dazu wurde zunächst eine 1:2 Verdünnung der Plasmaproben hergestellt, die zur kolorimetrischen Bestimmung der aufgeführten Parameter herangezogen wurde.

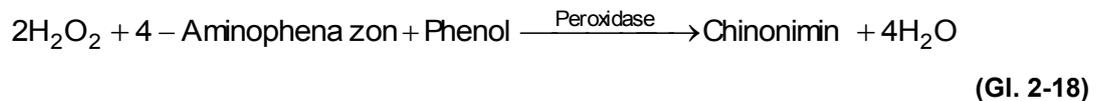
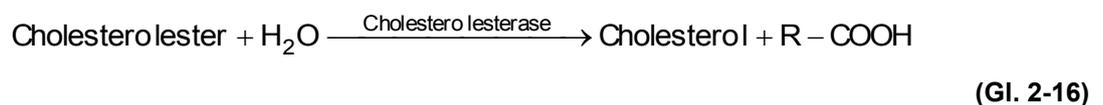
Aus den Leberproben der Tiere wurden die Triglyceride (TG) und der Glycogen-Gehalt (Ggn) biochemisch quantifiziert. Dazu erfolgte vorher eine Extraktion mit HB-Puffer (TG) bzw. Natronlauge (Ggn), was im weiteren Verlauf beschrieben ist.

2.5.1 Plasmaanalytik

2.5.1.1 Cholesterol

Prinzip

Cholesterol wurde mit dem enzymatischen Farbtest CHOLESTEROL *liquicolor* (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden) bestimmt. Das Reaktionsprinzip beruht darauf, dass das Cholesterol nach enzymatischer Hydrolyse (Cholesterolesterase) und Oxidation (Cholesteroxidase) aus der veresterten Form freigesetzt wird. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid reagiert unter Anwesenheit von Phenol und der Peroxidase mit 4-Aminophenazon zu einem Chinonimin-Farbstoff, der als Indikator fungiert. Die Extinktion wird spektrophotometrisch gemessen. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional zur Konzentration des Cholesterol in den untersuchten Proben (Gl. 2-16 bis Gl. 2-18).



Zur Quantifizierung des Cholesterol diene eine Cholesterol-Standardreihe. Mit dem zum Kit gehörenden Standard (Cholesterol, 200 mg/dl) wurde zunächst die Standardreihe mit Wasser hergestellt (Tab. 2-5).

Tab. 2-5: Konzentrationen der Standardreihe zur Bestimmung des Cholesterols in Plasmaproben; Standard: Cholesterol (200 mg/dl)

	Konzentration (mg/dl)
Konzentration 1	50
Konzentration 2	100
Konzentration 3	150
Konzentration 4	200

Durchführung

Die Plasmaproben wurden in Triplikaten und die Standards (Doppelbestimmung) in eine 96-well-Platte aufgetragen. 5 µl der 1:2 Plasmaverdünnung (mit Wasser) wurden in die

Platte pipettiert und mit 150 µl des Enzymreagenzes (RGT) versetzt, gemischt und zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben und des Standards gegen den Reagenzienleerwert (Wasser) bei 500 nm gemessen (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Die Berechnung der Cholesterolkonzentration in den Plasmaproben erfolgte über die lineare Regressionsgleichung der Standardreihe (Gl. 2-19).

$$y = m \cdot x + n$$

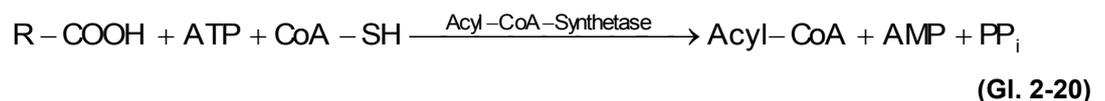
(Gl. 2-19)

- y Extinktion
- x Konzentration
- m Steigung der Geraden
- n Schnittpunkt mit der y-Achse

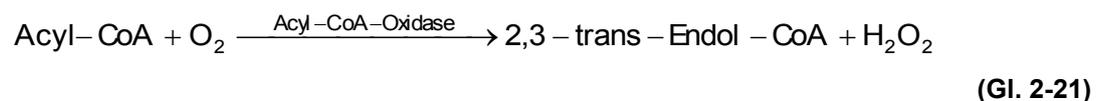
2.5.1.2 Freie Fettsäuren

Prinzip

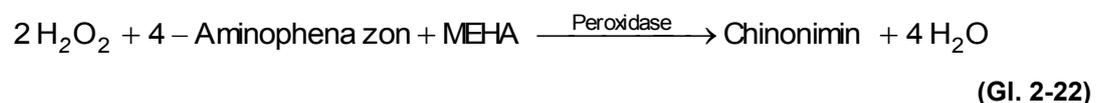
Die quantitative Bestimmung der freien Fettsäuren im Plasma wurde mit dem NEFA-C-Test (Wako Chemicals GmbH, Neuss) durchgeführt. Das Reaktionsprinzip ist in den folgenden Gleichungen (Gl. 2-20 bis Gl. 2-22) dargestellt.



(Gl. 2-20)



(Gl. 2-21)



(Gl. 2-22)

- R-COOH Fettsäuren
- ATP Adenosintriphosphat
- CoA-SH Coenzym A
- AMP Adenosinmonophosphat
- PP_i Phosphorsäure

Die in den Proben enthaltenen unveresterten Fettsäuren werden in Gegenwart des Enzyms Acyl-CoA-Synthetase und ATP zu Acyl-Coenzym A, AMP und PP_i umgesetzt. Acyl-CoA kann dann in Anwesenheit der Acyl-CoA-Oxidase zu 2,3-trans-Endol-CoA reagieren. Das dabei gebildete Wasserstoffperoxid setzt schließlich 4-Aminophenazon und MEHA mit Hilfe der Peroxidase in einen roten Chinonimin-Farbstoff um, der photometrisch bestimmt werden kann.

Durchführung

Die Plasmaproben wurden mit Wasser 1:2 verdünnt und in Triplikaten (jeweils 5 μ l) in eine Mikrotiterplatte (96-well) aufgetragen. Die Bestimmung der Standardreihe (Tab. 2-6) und des Leerwertes erfolgte als Doppelbestimmung. Nach Zugabe von 50 μ l der Lösung A (Acyl-CoA-Synthetase, Coenzym A, ATP) zu den Proben wurde die Platte für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten die Zugabe von 100 μ l der Lösung B (Acyl-CoA-Oxidase, Peroxidase) und eine weitere Inkubation für 10 Minuten bei 37°C. Schließlich wurde die Absorption bei 550 nm gemessen (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall).

Tab. 2-6: Konzentration der Standardreihe zur Bestimmung der freien Fettsäuren im Plasma; Standard: Oleinsäure (1,0 mmol/l)

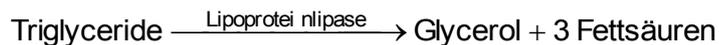
	Konzentration (mmol/l)
Konzentration 1	0,05
Konzentration 2	0,10
Konzentration 3	0,20
Konzentration 4	0,30
Konzentration 5	0,50
Konzentration 6	0,70
Konzentration 7	1,00

Die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma wurde nach Abzug des Reagenzienleerwertes über die Extinktionen der Standardreihe nach linearer Regression bestimmt (Gl. 2-19).

2.5.1.3 Triglyceride

Prinzip

Die Triglyceride im Plasma wurden mit dem Serum Triglyceride Determination Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) bestimmt. Der Nachweis findet über die Glycerol-Konzentration statt, die sich aus der enzymatischen Spaltung der Triglyceride ergibt (Gl. 2-23).



(Gl. 2-23)

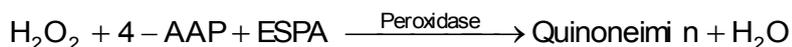
Bei dem hier verwendeten Test wird zunächst das freie Glycerol bestimmt. Triglyceride werden dann hydrolytisch durch die Lipase in Glycerol und freie Fettsäuren gespalten. Das entstehende Glycerol wird mittels Glycerolkinase und ATP zu Glycerol-1-Phosphat umgesetzt (Gl. 2-24). Dies wird in einem weiteren Schritt von der Glycerol-Phosphat-Oxidase in Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid umgewandelt (Gl. 2-25). Wasserstoffperoxid wird schließlich über eine Peroxidase-Reaktion zu einem Farbstoff umgesetzt (Gl. 2-26), dessen Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt werden kann.



(Gl. 2-24)



(Gl. 2-25)



(Gl. 2-26)

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
G-1-P	Glycerol-1-Phosphat
DAP	Dihydroxyacetonphosphat
4-AAP	4-Aminoantipyrin
ESPA	Natrium-N-Ethyl-N-(3-sulfopropyl) m-anisidin (sodium N-ethyl-N-(3-sulfopropyl) m-anisidine)

Durchführung

Die Plasmaproben wurden 1:2 mit Wasser verdünnt und in Triplikaten zu je 5 µl auf die 96-well-Platte aufgebracht. Der Glycerolstandard (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Konzentration 2,5 mg/ml, Tab. 2-7) und der Reagenzienleerwert (dH₂O) wurden als Doppelbestimmung aufgetragen.

Tab. 2-7: Konzentration der Glycerol-Standardreihe zur Bestimmung der Triglyceride im Plasma; Standard: Glycerol (2,5 mg/ml)

	Konzentration (mg/ml)
Konzentration 1	0,075
Konzentration 2	0,150
Konzentration 3	0,300
Konzentration 4	0,625
Konzentration 5	1,250
Konzentration 6	1,875
Konzentration 7	2,500

Zur Überprüfung der Lipase-Aktivität wurde ein Lipid-Standard (Lymphocheck[®] Assayed Chemistry Control, Level 1 und 2, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit folgenden Konzentrationen und Verdünnungen verwendet:

Level 1	1910 ng/µl
Level 2	958 ng/µl
Level 1, 1:20 verdünnt	96 ng/µl
Level 2, 1:40 verdünnt	24 ng/µl

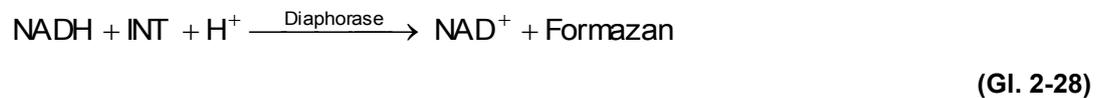
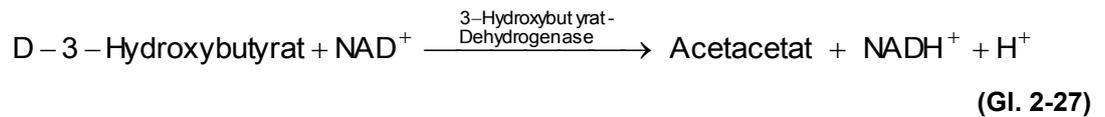
Nach Zugabe von 100 µl des Reagenz A (*Free Glycerol Reagent*) je Probe bzw. Standard und einer 5-minütigen Inkubation bei 37°C konnte die Absorption (E1) bei 540 nm photometrisch bestimmt werden (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Durch die Zugabe des Reagenz B (*Triglyceride Reagent*) wurden die in den Plasmaproben befindlichen Triglyceride durch die Lipase gespalten und schließlich zu dem Quinonimin-Farbstoff umgesetzt werden.

Anhand der Extinktionen und definierten Konzentrationen der Standardreihe wurde unter Verwendung der linearen Regression eine Regressionsgerade ermittelt (Gl. 2-19), die zur Berechnung der Triglyceride in den Proben diente.

2.5.1.4 β -Hydroxybutyrat

Prinzip

Die Plasmaproben wurden hinsichtlich der Konzentration an β -Hydroxybutyrat untersucht (D-3-Hydroxybuttersäure, Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG, Darmstadt). Das ist einer der drei Ketonkörper, die in der Leber gebildet werden. Die Synthese des β -Hydroxybutyrat (β -HB) erfolgt aus Acetacetat mit Hilfe des Enzyms D- β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase. Auf diesem Prinzip beruht die enzymatische Quantifizierung (Gl. 2-27 bis Gl. 2-28).



Das im Plasma enthaltene β -Hydroxybutyrat wird in Gegenwart der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) zu Acetacetat und NADH oxidiert. Das entstehende NADH kann durch die Diaphorase Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) zu Formazan umsetzen, was photometrisch gemessen werden kann.

Durchführung

5 μl der 1:2 verdünnten Plasmaproben (Dreifachbestimmung) und die Leerwerte (dH_2O) wurden in eine 96-well-Platte pipettiert. Es wurde ein Reaktionsmix aus den mitgelieferten Lösungen hergestellt. Pro Reaktion bestand der Mix aus: 30 μl Reagenz 1 (Kaliumphosphat/Triethanolaminpuffer, Triton X-100), 10 μl Reagenz 2 (Lipoamid-dehydrogenase, NADPH-Dehydrogenase, NAD) und 10 μl Reagenz 3 (Iodonitrotetrazoliumchloridlösung). 50 μl des Reaktionsmix und 95 μl dH_2O wurden pro vorgelegter Plasmaprobe (5 μl) dazu gegeben. Die Platte wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann erfolgte die erste Messung der Extinktion (E1) bei 492 nm (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Die zweite Messung der Extinktion (E2) wurde nach Zugabe von 2,5 μl Reagenz 4 (3-Hydroxybutyratdehydrogenase) und 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion ein drittes Mal (E3) gemessen.

Die Konzentration des gebildeten Formazan ist proportional zur Konzentration des β -Hydroxybutyrat in den Plasmaproben, so dass dessen Extinktion zur Berechnung der Konzentration herangezogen werden kann.

$$\Delta E_{\text{Leerwert}} = (E2 - E1)_{\text{Leerwert}} - 2 \cdot (E3 - E2)_{\text{Leerwert}} \quad (\text{Gl. 2-29})$$

$$\Delta E_{\text{Probe}} = (E2 - E1)_{\text{Probe}} - 2 \cdot (E3 - E2)_{\text{Probe}} \quad (\text{Gl. 2-30})$$

Zunächst wird die Differenz aus den drei Extinktionsmessungen (E1-E3) jeweils für die Proben- und die Leerwerte ermittelt (Gl. 2-29 bis Gl. 2-30). Daran erfolgt die Berechnung der Differenz zwischen Probe- und Leerwert (Gl. 2-31).

$$\Delta E = \Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}} \quad (\text{Gl. 2-31})$$

Die Berechnung der Konzentration erfolgte dann über die Schichtdicke gemäß folgender Gleichung (Gl. 2-32):

$$c_{\beta\text{-HB}} = \frac{V \cdot MW_{\beta\text{-HB}}}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E [\text{g/l}] \quad (\text{Gl. 2-32})$$

V	Endvolumen (ml)
MW	Molekulargewicht β -HB (104,1 g/mol)
ε	Extinktionskoeffizient von Formazan bei 492 nm (19,9 l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
d	Schichtdicke (1 cm)
v	Probenvolumen (ml)

Schließlich wurden die berechneten Konzentrationen der Triplikate gemittelt und die 1:2-Verdünnung der Plasmaproben berücksichtigt.

2.5.2 Bestimmung der Triglyceride in der Leber

Zur Bestimmung des Triglyceridgehaltes der Leber erfolgte zunächst eine Extraktion der Triglyceride mit HB-Puffer. Anschließend konnten die extrahierten Triglyceride mit dem Triglyceride Determination Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) bestimmt werden.

2.5.2.1 Extraktion der Lipide mittels HB-Puffer

Die tiefgefrorenen Leberproben wurden unter flüssigen Stickstoff im Mörser pulverisiert, und ca. 50 mg Leber wurden zur Extraktion benötigt (Kryoröhrchen). Nach Zugabe von 1 ml HB-Puffer wurden die Proben homogenisiert (SpeedMill, Analytik Jena AG, Jena, 1,5 min, 10 Zirkoniumkugeln) und zentrifugiert (23.100 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 70°C im Wasserbad geschüttelt. Die Proben wurden dann im Eis für ca. 5 Minuten gekühlt und erneut zentrifugiert (23.100 g, 10 min, 4°C). Der so gewonnene Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

HB-Puffer

10 mM Natriumdihydrogenphosphat
1 mM EDTA
in dH₂O lösen, pH 7,4
+ 1 % Polyoxyethylen-10-tridecylether (v/v)

2.5.2.2 Triglyceridbestimmung

Das Prinzip und die Durchführung der Triglyceridbestimmung ist unter dem Punkt 2.5.1.3 beschrieben. Die Lipidextrakte wurden unverdünnt eingesetzt (Triplikate zu je 5 µl). Bei der Herstellung der Glycerol-Standardreihe, des Lipid-Standards sowie des Leerwertes wurde anstelle des Wassers HB-Puffer verwendet.

Der ermittelte Triglyceridgehalt der Leberproben wurde auf den Proteingehalt der Leber bezogen. Die Proteinbestimmung ist unter 2.5.4 beschrieben.

2.5.3 Bestimmung des Glycogengehaltes der Leber

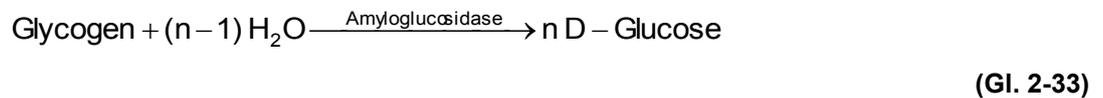
2.5.3.1 Extraktion des Glycogens mit Natronlauge

Die zermörserten Leberproben (ca. 50 mg Einwaage) wurden in Cryoröhrchen mit 750 µl 0,1 N Natronlauge (NaOH) versetzt und homogenisiert (SpeedMill, Analytik Jena AG, Jena, 1,5 min, 10 Zirkoniumkugeln). Das Homogenat wurde für 45 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben nach 15, 25 und 35 Minuten gevortext. Anschließend wurde das Homogenat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (12.400 g, 10 min, 4°C). Die Überstände wurden in neue Reaktionsgefäße aliquotiert (2x 150 µl) und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

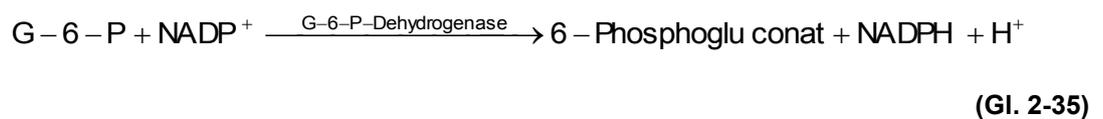
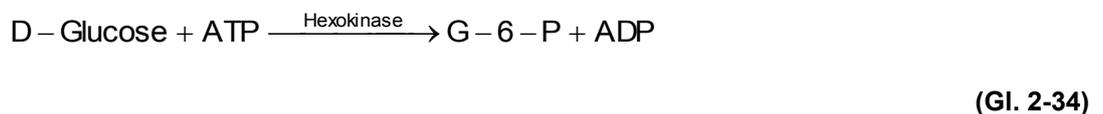
2.5.3.2 Glycogenbestimmung

Prinzip

Glycogen wird in Gegenwart des Enzyms Amyloglucosidase zu D-Glucose hydrolysiert (Gl. 2-33).



Die so entstandene Glucose kann durch die Hexokinase und in Anwesenheit von ATP zu Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und ADP umgesetzt werden (Gl. 2-34). Schließlich kann das G-6-P durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert werden, wobei eine Reduktion des zugesetzten NADP^+ zu NADPH erfolgt (Gl. 2-35).



Die Menge der so gewonnenen Glucose ist proportional zur Menge des gebildeten NADPH, was photometrisch bestimmt werden kann und somit Rückschlüsse auf den Glycogengehalt der Leberproben zulässt.

Durchführung

Die Glycogenbestimmung erfolgte nach dem oben genannten Prinzip (Gl. 2-33 bis Gl. 2-35) mit dem gebrauchsfertigen Stärke-Kit der Firma Boehringer Mannheim GmbH/R-Biopharm AG (Darmstadt). Parallel wurden zwei Messungen durchgeführt, mit und ohne Amyloglucosidase, um sowohl die freie Glucose als auch die aus Glycogen stammende Glucose zu bestimmen.

Anhand einer Standardreihe erfolgte die Berechnung der Glycogengehalte in den Leberproben. Zunächst wurde eine Glycogen-Stammlösung aus 20 mg Glycogen (Glycogen from bovine liver Type IX, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 1 ml 0,1 N NaOH hergestellt, die dann für die Verdünnungsreihe verwendet wurde (Tab. 2-8).

Tab. 2-8: Konzentration der Glycogen-Standardreihe (Glycogen: 20 mg/ml NaOH)

	Konzentration (µg/µl)
Konzentration 1	0,05
Konzentration 2	0,10
Konzentration 3	0,20
Konzentration 4	0,50
Konzentration 5	1,00
Konzentration 6	2,00
Konzentration 7	3,00

Im ersten Schritt erfolgte enzymatisch die saure Hydrolyse des Glycogen zu Glucose. Dazu wurden 50 µl der 1:3 mit 0,1 N NaOH verdünnten Extrakte in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und durch Zugabe von 1 µl Essigsäure der pH-Wert abgesenkt. Dem Ansatz wurden 100 µl Lösung 1 (enthält Amyloglucosidase) bzw. 100 µl dH₂O (zur Bestimmung der freien Glucose) hinzu gegeben und im Schüttelwasserbad für 15 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (23.100 g, 10 min, 20°C) und der Überstand (30 µl) zur weiteren Analyse verwendet.

30 µl des Überstandes wurden als Triplikate auf eine 96-well-Platte aufgetragen – Standard und Reagenzienleerwert wurden in einer Doppelbestimmung erfasst. Nach Zugabe von 100 µl dH₂O und 100 µl Lösung 2 (NADP und ATP) wurden die Platte 3 Minuten geschüttelt, kurz zentrifugiert und die erste Extinktion (E1) bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall). Dann wurden 12 µl der 1:6 verdünnten Lösung 3 (Hexokinase, G-6-P-Dehydrogenase) zugesetzt und 15 Minuten geschüttelt. Schließlich wurde eine zweite Extinktionsmessung (E2) bei 340 nm durchgeführt.

Die Berechnung des Glycogengehaltes in den Leberextrakten erfolgte anhand folgender Gleichungen (Gl. 2-36 bis Gl. 2-38):

$$\Delta E_{(+)\text{Amyloglucosidase}} = E2_{(+)\text{Amyloglucosidase}} - E1_{(+)\text{Amyloglucosidase}} \quad (\text{Gl. 2-36})$$

$$\Delta E_{(-)\text{Amyloglucosidase}} = E2_{(-)\text{Amyloglucosidase}} - E1_{(-)\text{Amyloglucosidase}} \quad (\text{Gl. 2-37})$$

$$E_{\text{Probe}} = \Delta E_{(+)\text{Amyloglucosidase}} - \Delta E_{(-)\text{Amyloglucosidase}} \quad (\text{Gl. 2-38})$$

Zunächst wurden die Differenzen aus den beiden Extinktionsmessungen für die Proben mit und ohne Amyloglucosidase-Zugabe gebildet, so dass dann der Anteil der freien Glucose ($\Delta E_{(-) \text{ Amyloglucosidase}}$) von dem Anteil der aus Glycogen gebildeter Glucose ($\Delta E_{(+) \text{ Amyloglucosidase}}$) subtrahiert werden konnte. Die so ermittelten Extinktionen des Standards und die dazugehörigen Konzentrationen dienten der Erstellung einer linearen Regressionsgeraden (Gl. 2-19). Der Glycogengehalt der Leber (c_{Ggn}) ergab sich nach folgender Gleichung (Gl. 2-39):

$$c_{\text{Ggn}} = \frac{E_{\text{Probe}} - E_{\text{Leerwert}}}{m}$$

(Gl. 2-39)

c_{Ggn}	Konzentration des Glycogen
E_{Probe}	Extinktion der Probe
E_{Leerwert}	Extinktion des Leerwertes
m	Anstieg der Regressionsgeraden

Die Konzentration des Glycogen wurde schließlich unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors auf den Proteingehalt der Leber bezogen.

2.5.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der HB- und NaOH-Extrakte erfolgte nach einer modifizierten Methode nach LOWRY (D_c Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Über zwei Teilreaktionen können Proteine quantitativ nachgewiesen werden. In der ersten Reaktion bildet sich im alkalischen Milieu ein blau-violetter Komplex durch die Wechselwirkungen zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen. In der zweiten Reaktion werden die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen reduziert, die wiederum gelbes Folin-Ciocalteu-Reagenz zu einem blauen Farbstoff reduzieren, der photometrisch gemessen werden kann.

Als Proteinstandard wurden 10 mg BSA (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in 1 ml dH₂O (HB-Extrakte) bzw. 1 ml 0,1 N NaOH (NaOH-Extrakte) gelöst. Diese Stammlösungen wurden dann zu den in Tab. 2-9 dargestellten Konzentrationen mit HB-Puffer bzw. 0,1 N NaOH verdünnt.

Tab. 2-9: Konzentration der Protein-Standardreihe (10 mg/ml BSA)

	Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Konzentration 1	0,1
Konzentration 2	0,2
Konzentration 3	0,3
Konzentration 4	0,4
Konzentration 5	0,5
Konzentration 6	0,6
Konzentration 7	0,7
Konzentration 8	0,8
Konzentration 9	1,0

Die HB-Extrakte wurden für die Proteinbestimmung 1:3 mit HB-Puffer verdünnt und die NaOH-Extrakte 1:20 bzw. 1:30 mit dH_2O . Auf eine 96-well-Platte wurden jeweils 15 μl Probe (Triplikate), Standard und Probenleerwert (Doppelbestimmung) aufgetragen und mit 25 μl eines Gemisches aus Reagenz A (alkalische kupferhaltige Tartrat-Lösung) und Reagenz S (Stabilisatorlösung) versetzt (1 ml Reagenz A + 20 μl Reagenz S). Nach kurzem Mischen wurden 200 μl Reagenz B (Folinreagenz) zugefügt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer (Power Wave 340, BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall) gemessen werden.

Die Berechnung der Proteingehalte erfolgte anhand der Extinktionen nach Abzug des Probenleerwertes über die lineare Regressionsgerade des Standards (Gl. 2-19) und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Grundlagen der Molekularbiologie

Die genetische Information ist in der Doppelhelix der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Die Grundbausteine des genetischen Codes sind die Desoxyribonukleide Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin. Die Reihenfolge dieser Basen determiniert die Aminosäuresequenz von Proteinen, die zur Funktionserhaltung des Organismus notwendig ist. Die Proteinbiosynthese eines bestimmten Gens setzt die Umsetzung der DNA-Information in die entsprechende Aminosäuresequenz voraus. Durch Transkription wird zunächst der entsprechende DNA-Abschnitt in eine korrespondierende *messenger*-RNA (mRNA) umgeschrieben, die eine Mittlersubstanz zwischen DNA und Protein

darstellt. Bei der nachfolgenden Translation an den Ribosomen wird die mRNA nach dem Prinzip der Basenpaarung übersetzt. Diese Übersetzung erfolgt mit Hilfe von Adaptermolekülen, den Transfer-RNAs (tRNA). Durch sie entsteht eine Polypeptidkette, die nach weiteren posttranslationalen Modifikationen das aktive Protein ergibt. Die Bestimmung der RNA liefert aufgrund dieser Prinzipien wichtige Informationen bezüglich der Genexpression und ermöglicht somit Rückschlüsse auf Regulationsmechanismen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen.

2.6.2 Allgemeines zum Arbeiten mit RNA

RNA ist weit weniger stabil als DNA und unterliegt dem raschen Abbau von in biologischem Material enthaltenen endogenen und in der Laborumgebung omnipräsent exogenen Ribonukleasen (RNasen). Um beim Arbeiten mit RNA qualitative und quantitative gute Ergebnisse zu erzielen, muss eine Kontamination mit RNasen vermieden werden. Dies wurde durch das kontinuierliche Tragen von Einweghandschuhen während aller RNA-Arbeiten erreicht. Thermostabile wässrige Lösungen, Glas- und Plastikwaren (z. B. Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) wurden in einem Dampfdruckautoklaven (H+P Labortechnik, Oberschleißheim) autoklaviert (120°C, 2 bar, 20 min). Für RNA-Arbeiten benötigte Glasmaterialien, Mörser, Pistill, Pinzetten, Dispergierwerkzeug und Zirkoniumkugeln wurden im Trockenschrank sterilisiert (180°C, 4 Stunden). Außerdem wurde DEPC-behandeltes (Diethylpyrocarbonat) Wasser verwendet. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine, die sich im katalytischen Zentrum vieler RNasen befinden. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wird eine 0,1 %ige (v/v) DEPC-Lösung mit sterilem Wasser angesetzt, die über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und dann autoklaviert wird. Dabei zerfällt das DEPC zu CO₂ und Ethanol. Arbeitsflächen, Apparaturen und Pipetten wurden vor Gebrauch mit RNase AWAY[®] (Molecular BioProducts Inc., San Diego) dekontaminiert.

2.6.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Organen und Geweben

Die Isolierung von RNA aus Geweben ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt. Nur die Gene, die in der Zelle transkribiert werden, liegen als RNA vor.

2.6.3.1 RNA-Isolierung mit PIG-B

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Organen und Geweben (Darmmucosa, Leber, eWAT, Skelettmuskel) erfolgte mittels des monophasigen Reagenz PIG-B, dessen Hauptinhaltsstoffe Phenol, Isoamylalkohol, Guanidiniumisothiocyanat und Beta-Mercaptoethanol sind (Weber et al., 1998, siehe 2.6.3.4). Das Reagenz beruht auf Modifizierungen der Originalmethode von Chomczynski & Sacchi (1987).

Das in flüssigen Stickstoff pulverisierte Gewebe (Darmmucosa: 40 mg, Leber: 30-50 mg, eWAT: 250 mg, Skelettmuskel: 70 mg) wurde mit 1 ml PIG-B (siehe 2.6.3.4) versetzt und anschließend homogenisiert (SpeedMill, Analytik Jena AG, Jena; 2 min, 10 Zirkoniumkugeln). Daran folgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten. Die Zellen werden dadurch lysiert und die darin enthaltenen Enzyme inaktiviert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben gut durchmischt (15 s) und dann weitere 10-15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Im nachfolgenden Zentrifugationsschritt (18.400 g, 15 min, 4°C) trennte sich das Gemisch in drei Phasen: obere wässrige Phase (RNA), Interphase (DNA und leichte Proteine) und untere lösungsmittelhaltige Phase (DNA, Proteine, Lipide). Die in der oberen Phase enthaltene RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach kurzem Mischen wurden die Proben ein weiteres Mal für 5-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (18.400 g, 15 min, 4°C). Um Salz- und Isopropanolreste zu entfernen, wurde das entstandene Pellet mit 70 % igen Ethanol versetzt und zentrifugiert (18.400 g, 5 min, 4°C). Nach dem Waschen wurde das Pellet getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser (Darmmucosa, Leber: 100 µl, eWAT, Skelettmuskel: 40 µl) gelöst. Zum besseren Lösen der RNA, wurden die Proben für 10 min bei 65°C in den Heizblock gestellt. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration und Reinheit der RNA kann photometrisch bestimmt werden. Dazu wird die Konzentration bei den Wellenlängen $\lambda = 260 \text{ nm}$ (RNA) und $\lambda = 280 \text{ nm}$ (Proteine) bestimmt. Eine $OD_{260\text{nm}}$ von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 µg/ml RNA bei einem Lichtweg von 1 cm. Kontamination der RNA mit Proteinen, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen (z. B. Phenol) kann das Verhältnis von $OD_{260\text{nm}}/OD_{280\text{nm}}$ zeigen. Der Extinktionskoeffizient für weitere RNA-Arbeiten sollte nahe 2,0 liegen.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde von den RNA-Extrakten eine 1:100 Verdünnung (3,5 µl RNA + 346,5 µl TE-Puffer, pH 8,0) hergestellt. Gemessen wurden die Proben im UV-VIS-Spektrometer (Spekol® 1500, Analytik Jena AG, Jena) in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke (Hellma, Müllheim).

2.6.3.3 Überprüfung der RNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können RNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Damit kann die Gesamt-RNA auf eine mögliche Degradierung durch RNasen überprüft werden. Da RNA als einzelsträngige Polypeptidkette dazu neigt, sich durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrückenbindung zu falten, müssen diese doppelsträngigen Bereiche durch Denaturierung voneinander getrennt werden. Das ist Voraussetzung zur Auftrennung der RNA-Fragmente nach dem Molekulargewicht. Unter Einsatz von denaturierenden Reagenzien (z. B. Formaldehyd) und einer Inkubation bei 65°C, bleibt die RNA linear.

Vorbereitung des Agarosegels und der Proben

Die Gießapparatur (Agagel Mini bzw. Compact L/XL, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) wurde abgedichtet und der Probenkamm eingesetzt. Für ein 1,1 %iges Gel, wurden 0,5 g Agarose (großes Gel: 3 g Agarose) und 43,5 g autoklaviertes Wasser (bzw. 210 g dH₂O) in einem Becherglas eingewogen und in der Mikrowelle aufgeköcht. Unter dem Abzug wurden der Gellösung 5 ml 10xMOPS und 1,5 ml Formaldehyd (bzw. 30 ml 10xMOPS, 9 ml Formaldehyd) zugesetzt und durch Schwenken gemischt. Die Gellösung wurde in den vorbereiteten Gelschlitten gefüllt und polymerisierte darin aus.

Den Proben (1 µg RNA) wurden 5 µl Denaturierungspuffer und 1 µl Ethidiumbromid-verdünnung (0,5 mg / ml) zugesetzt. Im Anschluss daran erfolgten die Denaturierung der RNA-Extrakte im Heizblock (15 Minuten, 65°C) und eine kurze Inkubation auf Eis. Dann wurden die Proben mit 1 µl Laufpuffer versetzt und in die Probenaschen des Agarosegels aufgetragen.

Elektrophorese

Der vorbereitete Gelschlitten wurde in die Elektrophoresekammer (Agagel Mini bzw. Compact L/XL, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) eingesetzt und die RNA-Extrakte in die Probenaschen des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der RNA erfolgte im Gel bei 90 V für ca. 30 Minuten in 1xMOPS (PS 9009 TC, Gibco BRL® Life

Technologies™, Karlsruhe). Die negativ geladene RNA wandert aufgrund der Phosphatgruppen im elektrischen Feld in Richtung der positiven Anode. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid ließ sich die RNA im Chemilumineszenz- und Fluoreszenz-Dokumentationssystem BioDocAnalyse UViprochemi (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) sichtbar machen. Nach dem Gellauf sollten 2 Banden sichtbar sein. Die obere Bande stellt dabei die 28S rRNA und die untere Bande die 18S rRNA dar (eventuell t-RNA sichtbar).

2.6.3.4 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Allgemein verwendete Chemikalien (*pro analysis*-Qualität) wurden über folgende Firmen bezogen: ABgene (Hamburg), ABIMED GmbH (Langenfeld), Applied Biosystem (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg), ICN Biomedicals GmbH (Frankfurt am Main), G. Kisker GbR (Steinfurt), Merck KGaA (Darmstadt), Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Sorenson (Salt Lake City) oder VWR International GmbH (Darmstadt).

Spezielle Puffer und Lösungen:

FIG-B

Guanidinthiocyanat	100 g
1 M Tris-HCl, pH 4,5	10,6 ml
0,2 M EDTA pH 8,0	10,6 ml
Sarcosyl (<i>N</i> -Laurylsarcosin)	0,5 g
Phenol (wassergesättigt)	203 ml
Isoamylalkohol	9 ml
8-Hydroxyquinolin	0,425 g
β-Mercaptoethanol	2,1 ml

Gesamtvolumen 425 ml, pH 4,5
lichtgeschützt bei 4°C lagern

DEPC-Wasser

0,1% DEPC (v/v) in autoklavierten dH₂O

Inkubation bei 37°C über Nacht

Lösung autoklavieren

TE-Puffer

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
autoklaviertes dH ₂ O	
pH 8,0 einstellen, autoklavieren	

10xMOPS

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM
pH 5,5 – 7,0; autoklavieren (Farbumschlag nach gelb)	

1xMOPS - Elektrophoresepuffer

10xMOPS	100 ml
ad 1 l mit autoklavierten dH ₂ O	

Denaturierungspuffer

10xMOPS	100 µl
37% Formaldehyd	175 µl
50 % Formamid	500 µl
ad 1 ml mit autoklavierten dH ₂ O	

Laufpuffer

Glycerol	500 µl
autoklaviertes dH ₂ O	400 µl
10xMOPS	100 µl
Spatelspitze Bromphenolblau	

Ethidiumbromidverdünnung

0,1 % Ethidiumbromid	50 µl
autoklaviertes dH ₂ O	950 µl

2.6.4 Reinigung der RNA mittels DNase-Verdau

Um mögliche Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA zu minimieren, wurden die RNA-Extrakte mit dem TURBO DNA-free™-Kit (Ambion/Applied Biosystems, Darmstadt) gereinigt. Dafür wurde ca. 10 µl RNA (zwischen 5-40 µg RNA) mit 7 µl DEPC-behandeltem Wasser, 2 µl Turbo DNase Puffer und 1 µl DNase für 30 Minuten bei 37°C im Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) inkubiert. Im Anschluss daran wurden 2 µl DNase-Inaktivierungsreagenz zu den

Proben gegeben und bei Raumtemperatur 2 Minuten gevortext. Die Proben wurden zentrifugiert (10.000 g, 2 min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am Photometer (Spekol® 1500, Analytik Jena AG, Jena) in einer 1:100 Verdünnung (3,5 µl RNA + 346,5 µl TE-Puffer, pH 8,0). Die gereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6.5 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Mit Hilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) wurde die isolierte RNA nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Diese Reaktion wird durch die Reverse Transkriptase katalysiert, einer RNA-abhängige DNA-Polymerase. Zunächst wird von der einzelsträngigen RNA ein RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert, bei dem anschließend der RNA-Anteil abgebaut wird. Schließlich erfolgt die Vervollständigung der einzelsträngigen DNA zum Doppelstrang. Die so erhaltene cDNA kann als Vorlage in einer anschließenden PCR oder quantitativen *real-time* PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren und Rückschlüsse auf die Expression verschiedener Gene zu erhalten.

Ausgehend von 1 µg RNA wurden die entsprechenden Volumina in eine 24-*well*-PCR-Platte (Thermofast®24, ABgene® Germany, Hamburg) mit 1 µl Randomprimer und DEPC-Wasser (Gesamtvolumen von RNA und DEPC-H₂O → 10 µl) gegeben und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert (Peltier Thermal Cycler PTC-200, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA). Der nachfolgende Reaktionsansatz wurde pro Probe zum RNA-Template zugefügt:

5x Reaction Buffer	4 µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	1 µl
dNTP Mix [10 mM]	2 µl
DEPC H ₂ O	1 µl

Daran schloss sich eine 5-minütige Inkubation bei 25°C an. Zum Schluss wurde dem Reaktionsansatz 1 µl Reverse Transkriptase zugesetzt und folgendes Temperaturprogramm befolgt:

10 min	25°C	(Annealing)
60 min	42°C	(Elongation)
10 min	70°C	(Denaturieren)

Abschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, zentrifugiert und nach Zugabe von 180 µl DEPC-H₂O für die nachfolgende quantitative *real-time* PCR auf 5 ng/µl verdünnt. Die so erzeugte cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.6.6 Quantitative *Real-Time*-PCR (qPCR)

Grundlagen

Die quantitative *real-time*-PCR (qPCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*). Sie ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte und erlaubt somit die Quantifizierung kleinster DNA-Mengen. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung laserinduzierter Fluoreszenzsignale, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (Echtzeitanalyse). Die Reaktion wird anhand fluoreszierender Reporterfarbstoffe (z. B. interkalierende Farbstoffe, spezifische Hybridisierungs sonden) verfolgt. Bei dieser Arbeit wurde neben den üblichen Oligonucleotid-Primern (*forward* und *reverse* Primer), eine für die Zielsequenz spezifische Hydrolysesonde zugesetzt, die mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert ist – einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende (FAM → 6-Carboxy-Fluorescein) und einem Quencherfarbstoff am 3'-Ende (TAMRA → 6-Carboxy-tetramethyl-rhodomin). Die Reporterfluoreszenzemission wird bei intakter Sonde durch die Nähe zum Quencher unterdrückt. Die Sonde bindet bei der PCR an die Zielsequenz und wird durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch werden Reporter- und Quencherfarbstoff voneinander getrennt, beide Farbstoffe können Licht emittieren und der Anstieg der Reporterfluoreszenz wird gemessen. Das Fluoreszenzsignal steigt proportional zur Anzahl synthetisierter PCR-Produkte.

Primerdesign

Die Auswahl der Primer erfolgte anhand der Software *Primer Express*[®] V2.0 (Applied Biosystems Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt) oder *Primer3* V4.0 (Rozen & Skaletsky 2000). Die dafür benötigten Sequenzen wurden mit der Datenbank *PubMed Nucleotide* ermittelt. Die Oligonukleotide wurden von BioTeZ Berlin-Buch GmbH synthetisiert. Die Lyophilisate wurden gemäß den Herstellerangaben durch Zugabe von sterilen dH₂O zu 50 µM-Stocklösungen resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Primersequenzen

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 2-10) aufgeführt.

Tab. 2-10: Sequenzen der verwendeten Primer zur Untersuchung der Genexpression mittels qPCR

Bezeichnung/ Accession Nr.	Sequenzen (3' → 5')
18SrRNA NR_003278	f acc aca tcc aag gaa ggc ag r ttt tcg tca cta cct ccc c p 6-FAM - agg cgc gca aat tac cca ctc cc - TAMRA
ACC NM_133360	f ttt cac tgt ggc ttc tcc ag r tgc att tca ctg ctg caa ta p 6-FAM - cca ttg ttg gcg ata aga acc ttc tca - TAMRA
ACCβ NM_133904	f ctt tgg caa caa gca agg ta r aag aga gcc tgc ctg aac at p 6-FAM - agg cac agt ccc tcg gga cc - TAMRA
Angptl4/FiAF AF_278699	f ggg acc tta act gtg cca ag r ccg tgg gat aga gtg gaa gt p 6-FAM - cca cca gcc acc aga gag gct -TAMRA
ATGL AY_894805	f aac acc agc atc cag ttc aa r ggt tca gta ggc cat tcc tc p 6-FAM - cga agg ctc tct tcc cgc ca - TAMRA
CD36/FAT NM_007643	f cca agc tat tgc gac atg at r ca gcg tag ata gac ctg caa a p 6-FAM - tgg cac aga cgc agc ctc ct - TAMRA
CPT1b NM_009948	f gaa gag atc aag ccg gtc at r ctc cat ctg gta gga gca ca p 6-FAM - tgg gca cca tac cca gtg cc - TAMRA
Cyp7a1 NM_007824	f ctt gag cca gag tcc aat gct r ggc aac ctc ctg caa ttc a p 6-FAM - tag cca act tgc cgc agt gcc ca - TAMRA
Fabp2 NM_007980	f gtt gtg ttt gag ctc ggt gt r agc aat cag ctc ctt tcc at p 6-FAM-tcc ctc aat ggt cca ggc cc -TAMRA
FAS NM_007988	f ttg atg att cag gga gtg ga r tta cac ctt gct cct tgc tg p 6-FAM - cat aga ccc gcc gag cca gg - TAMRA
FATP4 NM_011989	f ttc atc aag acg gtc agg ag r acc att gaa gca aac agc ag p 6-FAM - tca gga gca cca tgc cac ca - TAMRA
G6Pase NM_008061	f acg tat gga ttc cgg tgt tt r ggt aga tcc ggg aca gac ag p 6-FAM - cgt tca gct gca cag ccc aga - TAMRA
GK NM_010292	f gcg gga gga aga cct gaa ga r tcc aac ttc tga gcc ttc tg p 6-FAM - cag ctt cag gcc acg gtc ca - TAMRA

Glut1 NM_011400	f cgg gta tca atg ctg tgt tc r gtc cag ctc gct cta caa ca p 6-FAM - tgt acg cca cca tcg gct cc - TAMRA
Glut2 NM_031195	f atc cag gcg aat tta tcc ag r ctg ttc cta acc ggg atg at p 6-FAM - ccc acc gac atg aag atg gtg c - TAMRA
Glut4 AB_008453	f cta tgc tgg cca aca atg tc r ccc tga tgt tag ccc tga gt p 6-FAM - aat gcc gcg gcc tcc tat ga - TAMRA
GPAT NM_008149	f ctt ggc cga tgt aaa cac ac r tcc ttc cat ttc agt gtt gc p 6-FAM - ttg aac cca cag tca acc cag tcc - TAMRA
Hmgcr NM_008255	f ggc caa cta ctt tgt gtt cat gac r cct cac ggc ttt cac gag aa p 6-FAM - tct tcc cgg cct gtg tgt cgc t - TAMRA
HSL NM_001039507	f tgc ttg gtt caa ctg gag ag r gta act ggg tag gct gcc at p 6-FAM - ctg ctg ccc gaa ggg aca ca - TAMRA
Leptin NM_008493	f act tca ttc ctg ggc ttc ac r gat tct cca ggt cat tgg ct p 6-FAM - cct cac cag cct gcc ttc cc - TAMRA
PDHx NM_175094	f gag caa gtt gga ggt ggt tt r tgc tcc atc gta gga gac ag p 6-FAM - agg atc cgc ctg cag cag ct - TAMRA
PEPCK NM_011044	f ttt gta gga gca gcc atg ag r tga tga tct tgc cct tgt gt p 6-FAM - ctg cag cag ctg tgg cct ca - TAMRA
PK NM_013631	f ccc atg agt acc atg cag ag r cac ggg tct gta gct gag atg p 6-FAM - tcc atc gcc aac att cgg ga - TAMRA
Plin NM_001113471	f tgg acc acc tgg agg aaa ag r ttc gaa ggc ggg tag aga tg p 6-FAM - ccc ggc tct tca ata ccc tcc aga aaa ga - TAMRA
PPARγ NM_011146	f gct caa gta tgg tgt cca tga gat c r tga gat gag gac tcc atc ttt att ca p 6-FAM - aca cga tgc tgg cct ccc tg - TAMRA
SCD1 NM_009127	f ttc ttc tct cac gtg ggt tg r cgg gct tgt agt acc tcc tc p 6-FAM - cgc aaa cac ccg gct gtc aa - TAMRA
SGLT1 NM_019810	f cgc cag tac tct ctt cac ca r acg agg atg aac aac ctt cc p 6-FAM - aca cca aga tcc gga aga agg ca - TAMRA

Durchführung

Die benötigten Primer und die Sonde (*probe*) für die qPCR wurden zunächst wie folgt aus den 50 µM-Stammlösungen verdünnt:

<i>forward</i> Primer	3 µM
<i>reverse</i> Primer	3 µM
Sonde (<i>probe</i>)	2 µM

Für die zu untersuchenden Gene wurde jeweils ein Mix aus Primern, der Sonde und dem TaqMan® Universal Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) hergestellt. Der TaqMan® Universal Master Mix ist ein bereits optimierter Puffer, der alle notwendigen Substanzen (u.a. AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, dNTP's, passive Referenz) enthält, außer den Primern, der Sonde und der cDNA. Pro Reaktionsansatz ergeben sich:

0,5 µl	<i>forward</i> Primer
0,5 µl	<i>reverse</i> Primer
0,5 µl	Sonde (<i>probe</i>)
2,5 µl	TaqMan® Universal Master Mix, No AmpErase® UNG

Neben den Zielgenen wurden ein Referenzgen (18SrRNA) und eine Negativkontrolle (NTC → *no template control*, DEPC-H₂O) mit auf die 384-*well*-Platte gebracht. Referenzgene werden nicht reguliert und unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert.

1 µl cDNA (5 ng/µl) pro Probe (Triplikate) bzw. 1 µl DEPC-H₂O (NTC, 5-fach Bestimmung) wurde mit einer Mehrkanalpipette in eine 384-*well*-Platte (Quali-PCR-Platten, G. Kisker GbR, Steinfurt) aufgetragen. Luftbläschen wurden durch kurzes Zentrifugieren entfernt. Pro *well* wurden 4 µl des oben beschriebenen Mix hinzugefügt, und die Platte nochmals zentrifugiert. Schließlich wurde die Platte mit einer Klebefolie (MicroAmp® 384-Well Optical Adhesive Film, Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) verschlossen. Die Änderung in der Reporterfluoreszenz wurde im ABI Prism Sequence Detection System 7900 HT (Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) mit folgendem Temperaturprogramm bestimmt (Tab. 2-11).

Tab. 2-11: Temperaturprogramm der qPCR.

Schritt:	Ampli Taq Gold® Aktivierung	PCR	
		40 Zyklen	
		Denaturierung	Annealing, Extension
Temperatur	95°C	95°C	60°C
Zeit	10 min	15 s	1 min

In einem ersten Schritt wird die Taq-Polymerase aktiviert. Dann folgen abwechselnd die Denaturierung der cDNA und ein sog. *Annealing/Extension-Schritt*, bei dem sich die Primer spezifisch an das DNA-Template anlagern und eine Verlängerung der Nucleotide erfolgt. Eine Extensionstemperatur unter 72°C begünstigt die Bindung der Sonde, sodass ihre Hydrolyse durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase effizienter verläuft.

Auswertung

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge gilt der C_T -Wert (*threshold cycle*). Der C_T -Wert bezeichnet die Anzahl an Zyklen, die notwendig ist um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Bei einer 100 %igen Effizienz ist eine Verdopplung der Produktmenge mit jedem Zyklus zu verzeichnen. Die C_T -Werte wurden mit der SDS Software 2.3 (Applied Biosystems Applera GmbH, Darmstadt) berechnet. Nach Abzug der *Baseline* konnte der *Threshold* (Schwellenwert) für jedes Gen bestimmt werden. Der *Threshold* wurde in der logarithmischen Darstellung der Amplifikationsgraphik so gesetzt, dass die Fluoreszenz signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und im unteren Drittel der linearen Phase des Kurvenverlaufes liegt. In diesem linearen Anstieg wird bei optimaler *real-time* PCR-Effizienz von einer Verdopplung der PCR-Produkte ausgegangen (Livak & Schmittgen 2001). Wird ein Gen in einem bestimmten Gewebe stark exprimiert, liegt zu Beginn der PCR-Reaktion schon eine große Anzahl von cDNA-Kopien vor, so dass der festgelegte *Threshold* bereits nach wenigen Zyklen erreicht wird. Je stärker ein Gen in einem bestimmten Gewebe exprimiert wird, desto kleiner der C_T -Wert.

Die eingesetzten Primer wurden zunächst auf ihre Funktionalität und Effizienz überprüft. Für die zu untersuchenden Gewebe wurde eine Verdünnungsreihe aus gepoolter cDNA hergestellt (Tab. 2-12), die zur Berechnung der Primereffizienz diente.

Tab. 2-12: cDNA-Menge der Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Primereffizienz

	cDNA-Menge [ng]
Konzentration 1	0,05
Konzentration 2	0,20
Konzentration 3	1
Konzentration 4	5
Konzentration 5	20
Konzentration 6	50

Die graphische Darstellung der logarithmierten initialen Konzentrationen der Verdünnungsreihe (x-Achse) gegen die C_T -Werte (y-Achse) ergab eine Regressionsgerade, deren Anstieg zur Berechnung der Effizienz genutzt wurde (Gl. 2-40, Vaerman et al., 2004). Die Effizienzen lagen in der Regel bei 85 - 100 %.

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

(Gl. 2-40)

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach Normalisierung auf ein Referenzgen (hier: 18SrRNA, Gl. 2-41).

$$\Delta C_T = C_{T(\text{Zielgen})} - C_{T(18\text{SrRNA})}$$

(Gl. 2-41)

Der berechnete ΔC_T -Wert wurde dann von dem fiktiven Wert 36 subtrahiert (Gl. 2-42). Dabei wird angenommen, dass bei einem C_T -Wert von 36 keine Amplifikation der 18SrRNA erfolgt, weil die Reaktionsbedingungen (z. B. Primerkonzentrationen, MgCl_2 -Konzentration) zum Ende der PCR nicht mehr optimal sind.

$$\Delta\Delta C_T = 36 - \Delta C_T$$

(Gl. 2-42)

Die exponentiellen $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden durch Potenzieren zur Basis 2 in eine lineare Form überführt (Gl. 2-43).

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

(Gl. 2-43)

Schließlich wurde die relative Genexpression des zu untersuchenden Gens der EGCG-behandelten Proben auf die nicht behandelte Kontrollgruppe bezogen (Gl. 2-44).

$$\text{normierte Genexpression} = \frac{\text{Relative Genexpression (Behandlungsgruppe)}}{\text{Relative Genexpression (Mittelwert, Kontrollgruppe)}}$$

(Gl. 2-44)

2.7 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Kalkulationsprogramms Excel (Microsoft Corporation) und die statistische Auswertung mit der Software GraphPad Prism[®] 4.0 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, USA). Alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse in Tabellen und Graphiken repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD) bzw. Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM). Die Daten wurden zunächst mit dem D'Agostino-Pearson-Test bzw. Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei einer Normalverteilung der Daten wurden parametrische Test zur weiteren Analyse angewendet. Mittels Varianzanalyse (ANOVA – *analysis of variance*) und anschließenden Post-Hoc Test (Tukey-Kramer-Test) konnten die Gruppen miteinander verglichen werden. Nicht normalverteilte Daten wurden logarithmisch transformiert und erneut auf Normalverteilung getestet. Bei Ablehnung der Normalverteilung nach Transformation wurde der Kruskal-Wallis-Test als nicht-parametrischer Test ausgewählt und Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Dunn's Multiple Comparison-Test ermittelt. Die Korrelation nach Pearson diente zur Feststellung von Beziehungen zwischen einigen ausgewählten Parametern.

Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen, so dass Unterschiede mit einem $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. Standarddiät).

3 Ergebnisse

Die in der Literatur beschriebenen Tierversuchstudien zu den Wirkungen des grünen Tees bzw. Grünteeextrakte haben verschiedene Applikationsarten verwendet, z. B. oral, intraperitoneal, intravenös oder diätetisch. In Anlehnung an vorangegangene Experimente (Klaus et al., 2005) wurde die orale und diätetische Applikationsform im Rahmen dieser Arbeit gewählt. Die unterschiedliche Dauer und Art der TEAVIGO®-Applikation sowie die unterschiedlichen Fettquellen der verwendeten Diäten führten dazu, dass die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse voneinander abweichen. So muss deutlich zwischen der oralen EGCG-Gabe per Schlundsonde und der diätetischen Applikation unterschieden werden. Dazu kommt, dass die Verabreichung des EGCG verschiedene kurz- und langfristige Effekte zur Folge hatte.

3.1 Einfluss des EGCG auf Körpermasse und Körperzusammensetzung

Die unter Punkt 2.2.3 beschriebenen Tierversuche weichen bezüglich der Körpermasse durch die unterschiedliche Dauer und Art der TEAVIGO®-Applikation voneinander ab. Bei der diätetischen Supplementation mit EGCG waren die Unterschiede im Körpergewicht zwischen der Kontrollgruppe und den mit TEAVIGO®- behandelten Tieren am deutlichsten zu beobachten. Diese Form der Applikation (Versuch 1A, und Versuch 4) führte bei kurz- als auch mittelfristiger Behandlung zu einer Reduktion der Körpermasse (Abb. 3-1).

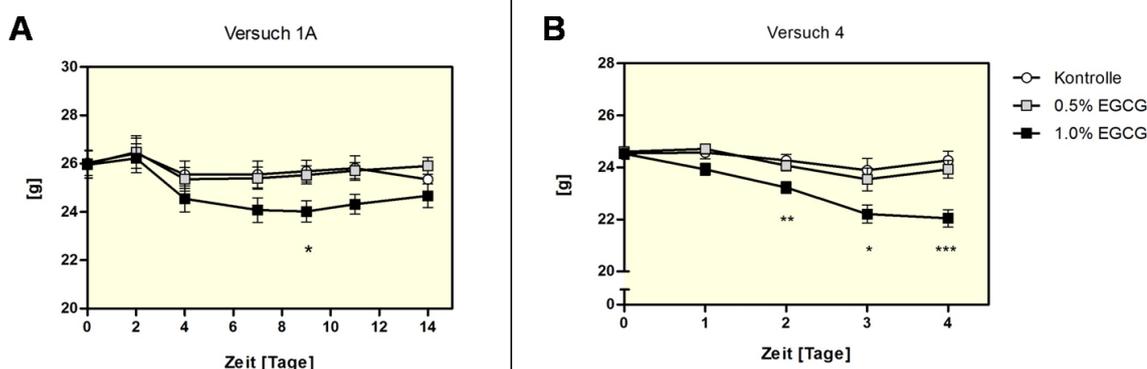


Abb. 3-1: Körpermasseentwicklung der Mäuse bei Fütterung einer Hochfettdiät und diätetischer Supplementation mit TEAVIGO® (0.5 % und 1.0 %) über 14 Tage (A) und 4 Tage (B); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Die Körperzusammensetzung der Mäuse wurde zu Beginn und am Ende der einzelnen Versuche mittels quantitativer NMR-Spektroskopie bestimmt. Parameter der

Körperzusammensetzung für Versuch 1A und 4 sind in den nachfolgenden Tabellen (Tab. 3-1 und Tab. 3-2) dargestellt.

Tab. 3-1: Körpermasse und Körperzusammensetzung der Mäuse nach 2-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische Supplementation von TEAVIGO® (Versuch 1A); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
Körpermasse, initial [g]	26,0 ± 0,5	26,0 ± 0,6	26,0 ± 0,6
Körpermasse, final [g]	25,3 ± 0,5	25,9 ± 0,4	24,7 ± 0,5
Δ Körpermasse [g]	-0,7 ± 0,4	-0,1 ± 0,3	-1,3 ± 0,3
Fettmasse, initial [g]	4,4 ± 0,4	4,5 ± 0,3	4,8 ± 0,3
Fettmasse, final [g]	3,2 ± 0,3	3,4 ± 0,3	2,3 ± 0,2
Δ Fettmasse [g]	-1,3 ± 0,2	-1,1 ± 0,3	-2,5 ± 0,2 **
FFM, initial [g]	21,7 ± 0,2	21,5 ± 0,6	21,2 ± 0,6
FFM, final [g]	22,4 ± 0,2	21,5 ± 0,6	21,2 ± 0,6
Δ FFM [g]	-0,7 ± 0,2	-1,3 ± 0,5	-1,3 ± 0,9

(Δ-Werte = Tag 14 – Tag 0)

Tab. 3-2: Körpermasse und Körperzusammensetzung der Mäuse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische Supplementation von TEAVIGO® (Versuch 4); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
Körpermasse, initial [g]	24,5 ± 0,2	24,6 ± 0,2	24,5 ± 0,2
Körpermasse, final [g]	24,3 ± 0,4	23,9 ± 0,3	22,0 ± 0,3 ***
Δ Körpermasse [g]	-0,2 ± 0,3	-0,7 ± 0,3	-2,5 ± 0,3 ***
Fettmasse, initial [g]	2,6 ± 0,2	2,7 ± 0,1	2,9 ± 0,2
Fettmasse, final [g]	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2	1,9 ± 0,1 ***
Δ Fettmasse [g]	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1	-1,0 ± 0,1 ***
FFM, initial [g]	22,0 ± 0,2	22,0 ± 0,2	21,7 ± 0,3
FFM, final [g]	21,0 ± 0,2	21,1 ± 0,2	20,2 ± 0,3
Δ FFM [g]	-1,0 ± 0,3	-0,8 ± 0,2	-1,5 ± 0,3

(Δ-Werte = Tag 5 – Tag 0)

So zeigte sich in beiden Versuchen, dass die Reduktion des Körpergewichtes auf eine Verminderung der Fettmasse zurückzuführen ist. Effekte des EGCG auf die Körper- und Fettmasse schienen nach kurzfristiger Applikation deutlich stärker ausgeprägt zu sein und unterschieden sich signifikant von den Kontrolltieren. Die fettfreie Masse blieb durch das EGCG weitgehend unbeeinflusst.

Dagegen führte die orale Gabe des TEAVIGO® in unterschiedlichen Dosierungen (Versuch 2A, Versuch 2B) über einen Zeitraum von 5 bzw. 14 Tagen zu keinen bedeutenden Veränderungen der Körpermasse (Abb. 3-2).

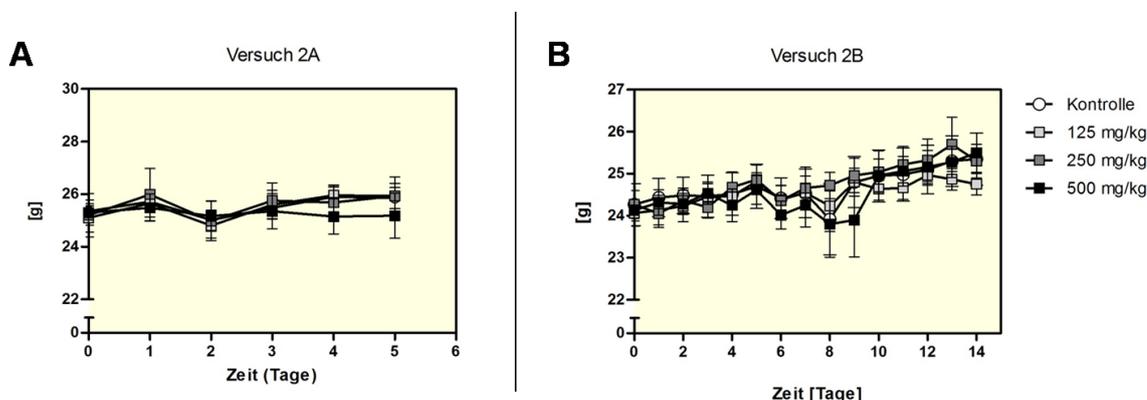


Abb. 3-2: Körpermasseentwicklung der Mäuse bei Fütterung einer Hochfettdiät und täglicher oraler Applikation des TEAVIGO® (0.5 % und 1.0 %) über 5 Tage (A) und 14 Tage (B); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Einfluss des EGCG auf die Körperzusammensetzung ließ sich unter oraler EGCG-Gabe in verschiedenen Dosierungen (125, 250, 500 mg/kg KM) nicht feststellen (Daten hier nicht dargestellt).

3.2 Ergebnisse der Blutplasma-Analytik

Triglyceride, Freie Fettsäuren, Cholesterol, β -Hydroxybutyrat

Die in der Literatur beschriebenen positiven Wirkungen des grünen Tees auf verschiedene Parameter des Blutplasmas wurden auch in dieser Arbeit untersucht. Die nachfolgende Tabelle zeigt verschiedene Plasmaparameter nach Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät mit und ohne TEAVIGO®-Supplementation (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Postabsorptive Plasmaparameter nach 7-tägiger Fütterung einer Mais-Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne diätetische EGCG-Supplementation (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.25 % EGCG	0.50 % EGCG
Triglyceride [mg/ml]	3,10 ± 0,29	3,59 ± 0,29	2,89 ± 0,36
freie Fettsäuren [mM]	1,18 ± 0,06	1,00 ± 0,05	0,97 ± 0,04 *
Cholesterol [mg/dl]	83,70 ± 4,34	93,47 ± 3,51	101,90 ± 7,03
β -Hydroxybutyrat [mg/dl]	4,61 ± 0,18	4,95 ± 0,26	4,57 ± 0,31

Das EGCG hatte keinen Einfluss auf die Triglyceride, Cholesterol und β -Hydroxybutyrat im Blutplasma nach Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät über 7 Tage hinweg. Die freien Fettsäuren waren in der 0.5 %igen EGCG-Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt.

Tabelle 3-4 zeigt die Ergebnisse der Blutplasma-Analyse des Versuches 4 unter postabsorptiven (14-16 h Futterentzug) und postprandialen (Futterzugang über Nacht) Bedingungen, die nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät unter EGCG-Gabe bestimmt wurden sind.

Tab. 3-4: Triglyceride, freie Fettsäuren und Cholesterol im Blutplasma der Mäuse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetischer EGCG-Supplementation unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen (Versuch 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
<i>postabsorptiv</i> (n = 8-9)			
Triglyceride [mg/ml]	9,43 \pm 0,96	8,11 \pm 0,90	5,38 \pm 0,61 **
freie Fettsäuren [mM]	1,22 \pm 0,08	1,06 \pm 0,16	0,83 \pm 0,10
Cholesterol [mg/dl]	114,8 \pm 7,7	111,0 \pm 7,3	117,0 \pm 5,4
<i>postprandial</i> (n = 3-4)			
Triglyceride [mg/ml]	15,93 \pm 1,00	6,16 \pm 0,53 **	5,75 \pm 0,50 **
freie Fettsäuren [mM]	0,81 \pm 0,10	0,69 \pm 0,07	0,71 \pm 0,12
Cholesterol [mg/dl]	122,5 \pm 16,9	121,5 \pm 1,05	119,2 \pm 10,8

Die diätetische EGCG-Supplementation über 4 Tage führte sowohl unter postabsorptiven als auch postprandialen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion der Triglyceride im Blutplasma. Der Effekt ist unter postprandialen Umständen stärker ausgeprägt. Freie Fettsäuren und Cholesterol blieben durch EGCG unbeeinflusst.

¹³C-Anreicherung im Blutplasma

Die ¹³C-Anreicherung im Blutplasma der Mäuse wurde nach 7-tägiger Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät und unter EGCG-Gabe mittels Massenspektrometrie gemessen (Abb. 3-3). Eine hohe ¹³C-Anreicherung indiziert einen hohen Lipid-Turnover.

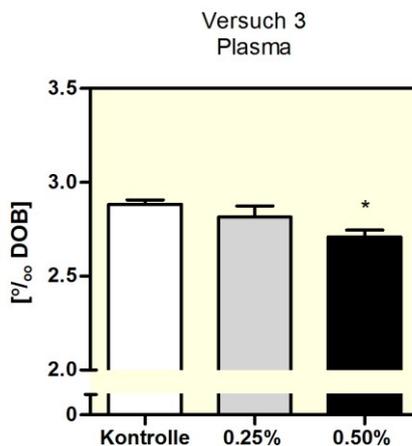


Abb. 3-3: Postprandiale ^{13}C -Anreicherung im Blutplasma der Mäuse nach Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät und diätetischer Supplementation von TEAVIGO®; ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Das Blutplasma der 0.5 %igen EGCG-Gruppe zeigte eine signifikant erniedrigte ^{13}C -Anreicherung und scheint weniger diätetische ^{13}C -markierte Triglyceride zu enthalten.

3.3 Effekte des EGCG auf die Energiebilanz und den Gastrointestinaltrakt

Wie eingangs erwähnt, wurden für die Tierversuche verschiedene Diäten verwendet. Die Gründe, die dazu geführt haben, werden im Folgenden beschrieben. Beim Versuch 1A wurde den Mäusen die Hochfettdiät in Pulverform angeboten, da das TEAVIGO® empfindlich gegenüber der Wärmebildung, die beim Pelletieren der Diät mit einer Maschine entsteht, ist. In diesem Versuch ließ sich leider keine genaue Futterrückwaage durchführen, da das Futter im Käfig der Mäuse breit verstreut lag.

Der Faktor der ungenauen Futterrückwaage sollte im darauf folgenden Versuch (Versuch 1B) vermieden werden, indem die Hochfettdiät in Pelletform gefüttert wurde, und die Testsubstanz durch orale Applikation in einer Konzentration von 500 mg/kg KM erfolgte (Klaus et al., 2005). In weiteren Versuchen wurde jedoch wieder auf die Supplementation der Diät mit TEAVIGO® zurückgegriffen, da die orale Applikation zu unerwarteten Veränderungen in der Leber führte, die unter dem Punkt 3.3 ausführlich beschrieben sind. Beim Versuch 3 lag der Schwerpunkt der Untersuchung in der Inkorporation diätetischer Triglyceride, die natürlicherweise mit ^{13}C angereichert sind. So wurde hier Maiskeimöl als Fettquelle ausgewählt, um den Einfluss des EGCG auf die Inkorporation exogener Lipide in diverse Organe und Gewebe aufzuklären.

Effekte des EGCG auf den Gastrointestinaltrakt wurden im Hinblick auf die Energieaufnahme, Energieabgabe, ^{13}C -Anreicherung der Faeces sowie auf die Expression verschiedener Gene der Versuche 3 und 4 untersucht.

Energiebilanz und relative Verdaulichkeit

Die Untersuchung der Energiebilanz in Abhängigkeit der EGCG-Gabe gibt wichtige Aufschlüsse über die Entwicklung der Körpermasse. Durch die Bestimmung des Energiegehaltes der aufgenommenen Nahrung und der ausgeschiedenen Faeces lässt sich eine Aussage zur Energiebilanz und zur assimilierten Energie machen.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-5) sind exemplarisch aus dem Versuch 3, in dem das EGCG diätetisch verabreicht wurde, einige Energiebilanz-Daten aufgeführt.

Tab. 3-5: Gesamtfutteraufnahme, Gesamtenergieaufnahme, Trinkwasserverbrauch und prozentuale Energieausscheidung der Kontrolle und der mit EGCG behandelten Tiere nach Fütterung einer Hochfettdiät über 7 Tagen (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.25 % EGCG	0.50 % EGCG
Futteraufnahme, gesamt [g]	21,3 ± 0,5	22,3 ± 0,6	23,1 ± 0,6
Energieaufnahme, gesamt [kJ]	427,4 ± 9,3	445,5 ± 12,8	455,1 ± 12,6
Trinkwasserverbrauch, gesamt [g]	26,8 ± 1,1	25,9 ± 0,8	24,4 ± 0,7
Energieausscheidung [%]	13,9 ± 0,3	15,0 ± 0,2 **	16,2 ± 0,2 **

Die Futter- und Energieaufnahme der Mäuse war in allen Gruppen sehr ähnlich und unterschied sich nicht voneinander. Auch der Trinkwasserverbrauch der einzelnen Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Jedoch war die Energieausscheidung durch die Supplementation mit EGCG signifikant erhöht. Das zeigte sich konsistent über alle Versuchsansätze hinweg und war unabhängig von der Applikationsart der Testsubstanz (Abb. 3-4). Bei den mit EGCG behandelten Mäusen ließ sich eine erhöhte Faecesausscheidung beobachten. Die Bestimmung des Energiegehaltes der Faeces mittels Bombenkalorimetrie ergab keine Unterschiede im Energiegehalt pro Gramm ausgeschiedene Faeces. Allerdings zeigten die EGCG-Gruppen durch die erhöhte Faecesproduktion eine signifikant erhöhte Gesamtenergieausscheidung im Vergleich zu den Kontrolltieren.

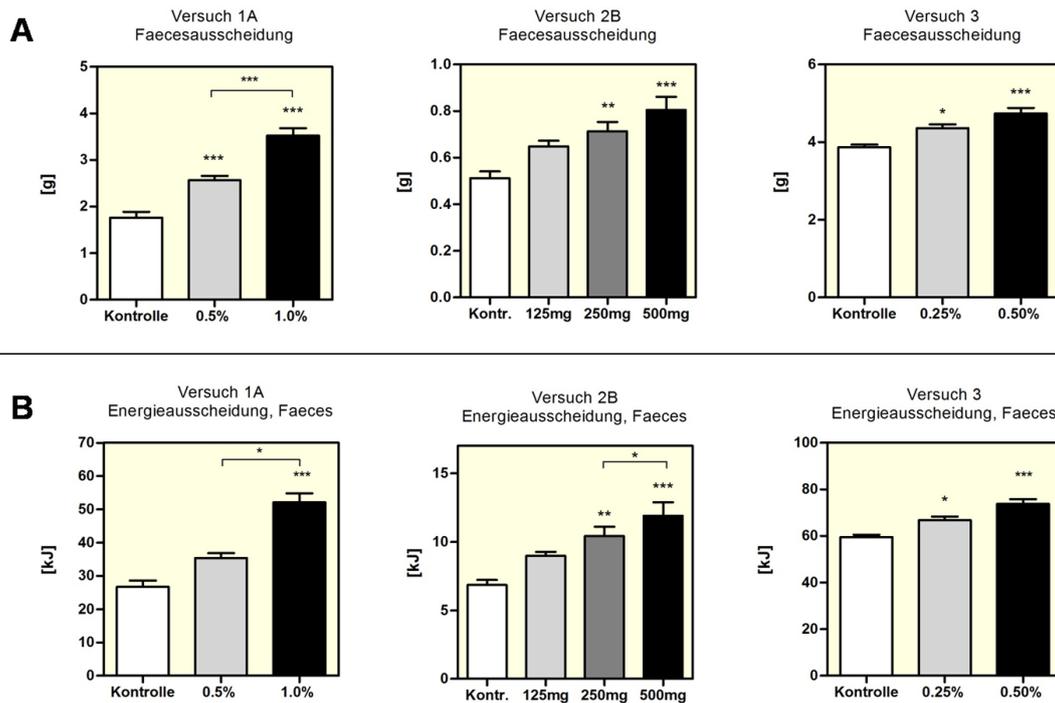


Abb. 3-4: Faecesproduktion (A) und Gesamtenergieausscheidung (B) der Mäuse nach Fütterung einer Hochfettdiät mit diätetischer (Versuch 1A, Versuch 3) und oraler Applikation (Versuch 2B) von EGCG in unterschiedlichen Dosierungen; ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Die Berechnung der relativen Verdaulichkeit der Nahrung gibt darüber Aufschluss, in welchem Ausmaß die Nahrung dem Organismus zur Verfügung gestellt und assimiliert wird (Abb. 3-5).

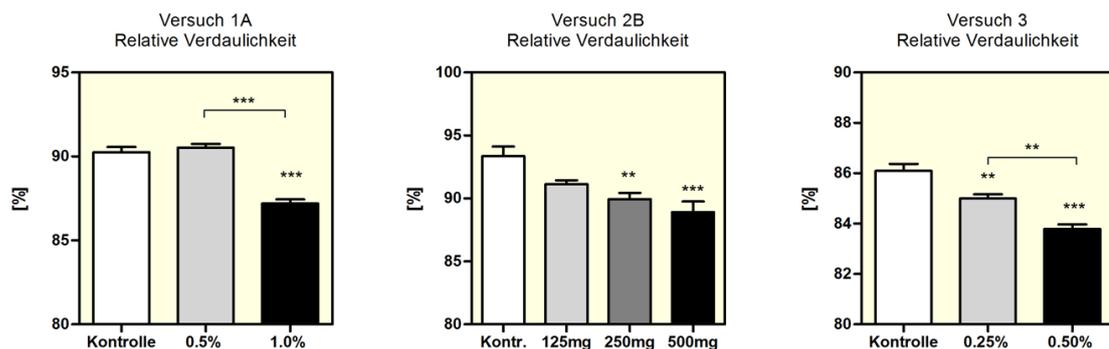


Abb. 3-5: Relative Verdaulichkeit der Nahrung bei Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät mit und ohne diätetische (Versuch 1A und Versuch 3) und orale Applikation (Versuch 2B) von EGCG in unterschiedlichen Dosierungen; ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

In allen Versuchen, bei denen das TEAVIGO® sowohl täglich oral appliziert (Versuch 2B) als auch diätetisch supplementiert (Versuch 1A, Versuch 3) wurde, zeigten die mit EGCG behandelten Mäuse eine signifikant herabgesetzte Verdaulichkeit der Nahrung. Somit schieden die EGCG-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant mehr Energie aus (Tab. 3-6). Die erhöhte Energieausscheidung wurde in weiteren Analysen im Hinblick auf den Fett- und Cholesterolgehalt untersucht. Die genauere Betrachtung ergab eine erhöhte Fettausscheidung bei den 0.50 % EGCG-Tieren. Die faecale Cholesterolausscheidung war jedoch bei den mit Grünteeextrakt behandelten Tieren signifikant erniedrigt.

Tab. 3-6: Ergebnisse zur Fettbilanz der Mäuse bei 7-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne EGCG-Supplementation (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.25 % EGCG	0.50 % EGCG
Fettaufnahme, gesamt [g]	3.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Fettoausscheidung, gesamt [mg]	18.5 ± 0.9	20.0 ± 1.1	21.7 ± 1.0 *
Fettoausscheidung [%]	5.7 ± 0.3	6.0 ± 0.2	6.4 ± 0.3
Cholesterol, Faeces [mg]	726.6 ± 31.2	631.6 ± 15.8 *	550.9 ± 19.4 ***

¹³C-Anreicherung in den Faeces

Nach Diätumstellung von einer Standard- auf eine maiskeimöhlhaltige Hochfettdiät (Versuch 3) ergab die Bestimmung der ¹³C-Anreicherung in den Faeces eine signifikant erhöhte Anreicherung des ¹³C-Isotopes in der 0.50 %igen EGCG-Gruppe (Abb. 3-6). Die mit der Testsubstanz behandelten Mäuse schieden mehr exogenes Fett mit den Faeces aus, was mit der erhöhten gravimetrisch bestimmten Fettoausscheidung übereinstimmt (Tab. 3-6).

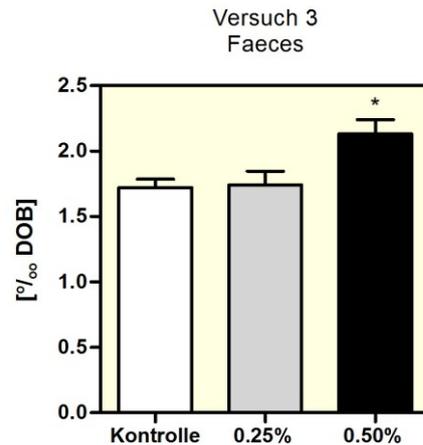


Abb. 3-6: ^{13}C -Anreicherung in den Faeces der Mäuse nach 7-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät die mit unterschiedlichen EGCG-Dosen (0.25 %, 0.50 %) supplementiert wurde (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Neben dem Fettanteil wurde der Stickstoffgehalt in den Faeces mittels Elementaranalysator bestimmt. Diese Untersuchung ergab für die mit TEAVIGO[®] - behandelten Tiere eine signifikant erhöhte faecale Stickstoffausscheidung. Der Stickstoffgehalt im Harn der Mäuse nach 3-wöchiger Fütterung einer HFD (Versuch 1A) ergab ebenfalls eine signifikant erhöhte Stickstoffausscheidung bei den behandelten Tieren (Abb. 3-7).

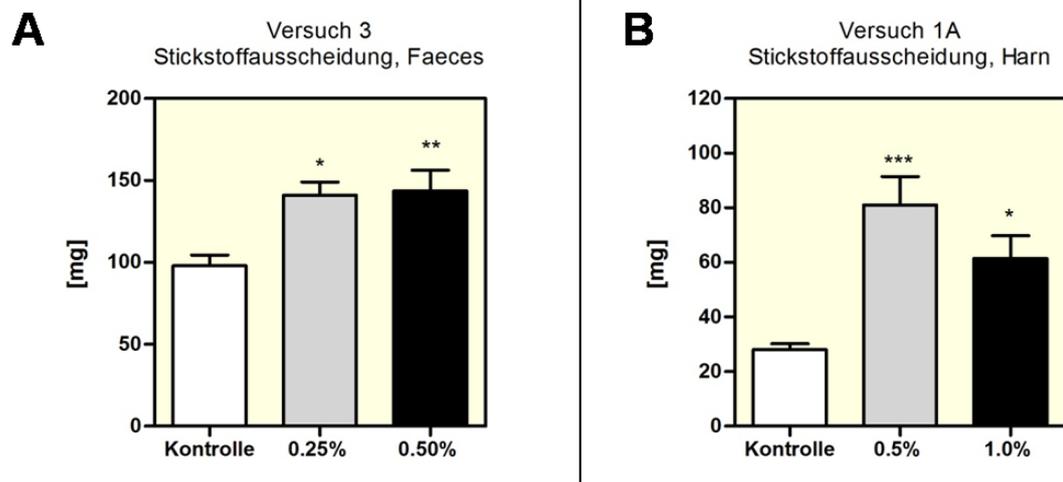


Abb. 3-7: Stickstoffausscheidung in den Faeces (Versuch 3) und im Harn (Versuch 1A) der Mäuse nach Fütterung einer Hochfettdiät mit und ohne Supplementation von EGCG; ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Darmtransit

Aufgrund der signifikant erhöhten Faecesausscheidung bei den EGCG-Tieren wurde der Darmtransit mit Hilfe einer Aktivkohle-Suspension untersucht (Abb. 3-8).

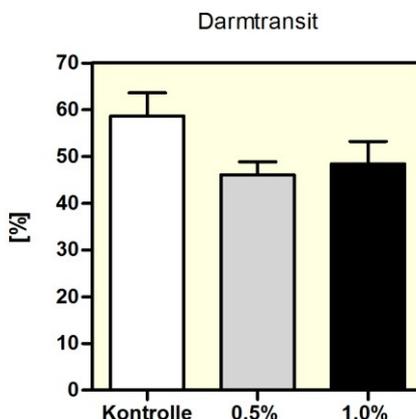


Abb. 3-8: Darmpassage der mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne EGCG-behandelten Mäuse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät und oraler Applikation einer Aktivkohle-Suspension (Versuch 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Die Suspension wurde den Mäusen per Schlundsonde intragastrisch appliziert. Nach 20 Minuten wurden die Tiere getötet und die Strecke bestimmt, die die Aktivkohle in dieser Zeit im Dünndarm zurückgelegt hatte. Die Länge des Dünndarms wurde vom Pylorus bis zum Caecum bestimmt, so dass sich die Darmpassage prozentual zur Gesamtlänge des Dünndarms darstellen ließ (Puig & Pol, 1998; Capasso et al., 2005). Tendenziell zeigten die EGCG-Gruppen eine verlangsamte Darmpassage, jedoch waren die Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren statistisch nicht signifikant.

Genexpression in der Darmmucosa

Wegen der oben beschriebenen Effekte des EGCG auf die Faeces- und Energieausscheidung wurde die Expression verschiedener Fettsäure- und Glucosetransporter in der Darmmucosa bestimmt (Versuch 3, Abb. 3-9).

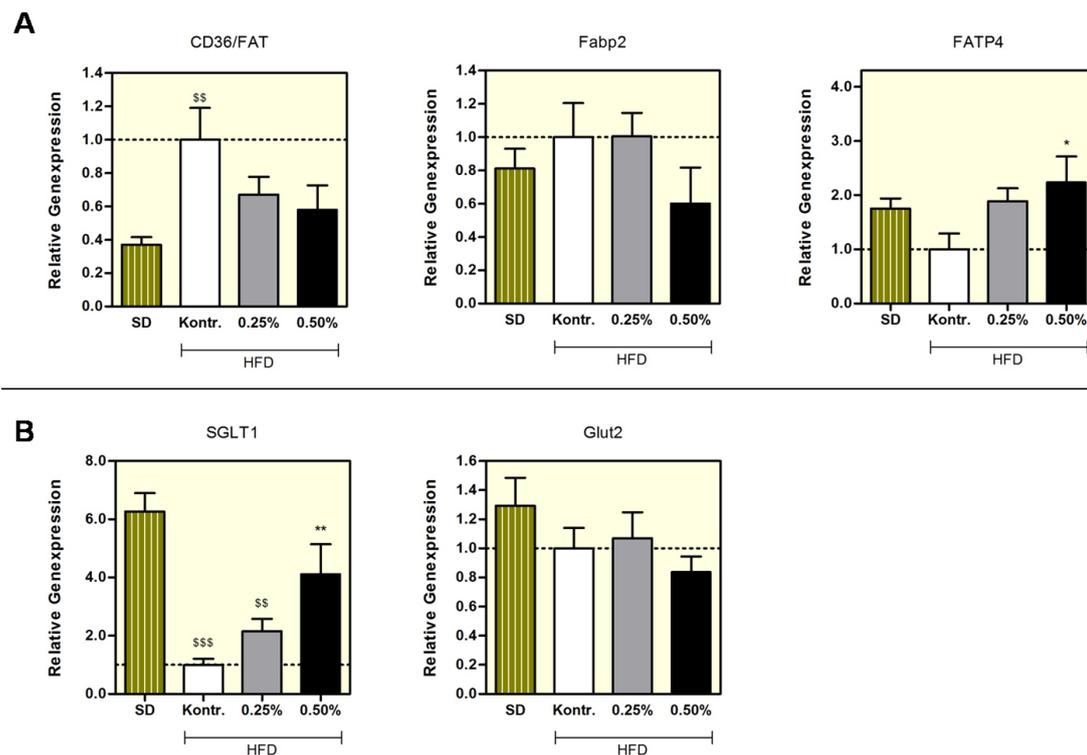


Abb. 3-9: Genexpression verschiedener Fettsäure- (A) und Glucosetransporter (B) in der Darmmucosa nach 7-tägiger Fütterung einer Mais-Hochfettdiät mit (0,25 %, 0,50 %) und ohne diätetische EGCG-Supplementation im Vergleich zur Standarddiät (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD) (CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*, Fabp2: *fatty acid binding protein 2*, FATP4: *fatty acid transport protein 4*, SGLT1: *sodium dependent glucose transporter 1*, Glut2: *Glucosetransporter 2*)**

Die untersuchten Fettsäure- und Glucosetransporter in der Darmmucosa (Versuch 3) waren postabsorptiv sehr unterschiedlich exprimiert. Einen großen Einfluss auf die Expression hatte die angebotene Diät (Standarddiät vs. Hochfettdiät).

Das integrale Membranprotein CD36/FAT, welches vorwiegend im proximalen Dünndarm an der apikalen Seite der Epithelzellen lokalisiert ist, bindet u.a. Lipoproteine, Phospholipide und langkettige Fettsäuren (Poirier et al., 1996; Chen et al., 2001). Im Vergleich zur Standarddiät war die Expression von CD36/FAT unter Hochfettdiät signifikant erhöht. Ein hoher Fettanteil in der Nahrung scheint damit zu einer höheren Expression des CD36/FAT zu führen. Die Supplementation des EGCG mit der Diät führte tendenziell zu einer verminderten Genexpression des CD36/FAT. Ein weiteres intestinales Gen, das an der Aufnahme, dem intrazellulären Metabolismus und dem Transport von Fettsäuren beteiligt ist, ist das *fatty acid binding protein 2* (Fabp2, Abumrad et al., 1999). Die Expression des Fabp2 wurde in diesem Versuch nicht von der angebotenen Diät und EGCG beeinflusst. Das FATP4 (*fatty acid transport protein 4*) der intestinalen Zellen wurde als Fettsäure-Transporter vorgeschlagen (Stahl et al., 1999). Darüber hinaus

besitzt es eine Acyl-CoA-Synthetase Aktivität (Hall et al., 2003, 2005). Die Expression des FATP4 war in der 0.5 %igen EGCG-Gruppe signifikant erhöht.

Der Transport der Glucose in die Enterozyten erfolgt auf der apikalen Seite durch den natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT1 (*sodium dependent glucose transporter*) und auf der basolateralen Seite über den Glucosetransporter Glut2 (Wright et al., 1998). Bei dem SGLT1 ließ sich erneut eine diätabhängige Expression erkennen. Bei Fütterung einer Hochfettdiät, die im Vergleich zur Standarddiät weniger Kohlenhydrate enthält, war die Expression signifikant erniedrigt. Tiere mit 0.5 % EGCG in der Hochfettdiät hatten, im Vergleich zu den Kontrolltieren, eine signifikant erhöhte SGLT1-Expression im Dünndarm.

Bei Angptl4/FiAF (*Angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipocyte factor*) handelt es sich um ein Glycoprotein, das vorwiegend im weißen und braunen Fettgewebe aber auch in anderen Geweben wie Herz, Skelettmuskel, Leber und Darm exprimiert wird. Angptl4/FiAF wird mit der Regulation des Lipidstoffwechsels und der Angiogenese in Verbindung gebracht (Kersten et al., 2000; Dutton & Trayhurn, 2008). Mäuse auf Hochfettdiät zeigten im Vergleich zu Tieren, denen eine Standarddiät gefüttert wurde, eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression von Angptl4/FiAF in der Darmmucosa (Abb. 3-10). EGCG hatte bei Tieren mit Hochfettdiät keinen großen Einfluss, tendenziell ließ sich eine Erhöhung durch EGCG erkennen.

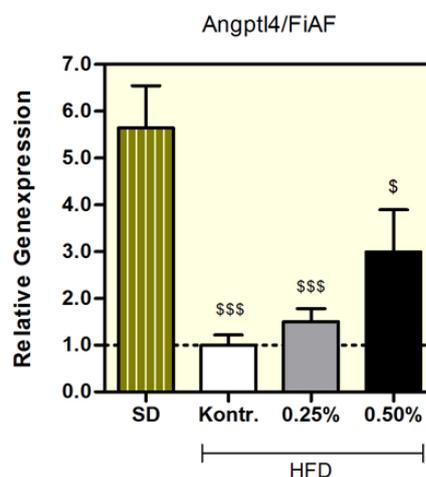


Abb. 3-10: Expression des LPL-Inhibitors Angptl4/FiAF in der Darmmucosa nach 7-tägiger Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne Applikation von TEAVIGO® in der Diät (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(LPL: Lipoproteinlipase, Angptl4/FiAF: *Angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipocyte factor*)

Im Versuch 4 wurden die oben genannten Gene ebenfalls bezüglich ihrer Expression in der Darmmucosa im postabsorptiven und postprandialen Zustand der Mäuse untersucht. Anhand der Abbildung 3-11 wird ersichtlich, dass sich die Kontrollen in ihrer Expression der ausgewählten Gene (CD36/FAT und Fabp2) voneinander unterscheiden.

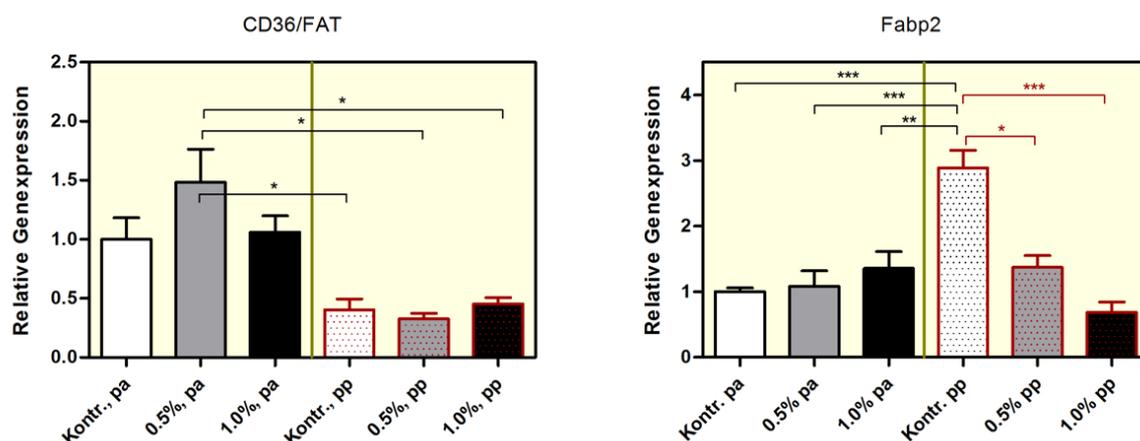


Abb. 3-11: Vergleich der relativen Genexpression unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen anhand der CD36/FAT und Fabp2-Genexpression in der Darmmucosa von Mäusen, denen eine Hochfett-diät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische TEAVIGO®-Supplementation über 4 Tage gefüttert wurde (Versuch 4), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle, pa)**

(pa – postabsorptiv, pp – postprandial; CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*, Fabp2: *fatty acid binding protein 2*)

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-7) wird durch den vom Fütterungszustand bedingten Unterschied in der Genexpression zwischen postabsorptiv und postprandial unterschieden.

Tab. 3-7: Relative Genexpression in der Darmmucosa nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische EGCG-Supplementation unter postabsorptiven (n=8-9) und postprandialen (n=3-4) Bedingungen (Versuch 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
<i>postabsorptiv</i>			
CD36/FAT	1,00 ± 0,18	1,49 ± 0,26	1,06 ± 0,14
Fabp2	1,00 ± 0,06	1,08 ± 0,23	1,35 ± 0,24
FATP4	1,00 ± 0,12	1,01 ± 0,14	0,97 ± 0,07
SGLT1	1,00 ± 0,12	1,37 ± 0,22	1,69 ± 0,20 *
Glut2	1,00 ± 0,18	2,63 ± 0,36 ** ↑	2,73 ± 0,35 ** ↑
Angptl4/FiAF	1,00 ± 0,14	1,06 ± 0,24	0,95 ± 0,16

<i>postprandial</i>											
CD36/FAT	1,00	±	0,22	0,81	±	0,12	1,13	±	0,14		
Fabp2	1,00	±	0,09	0,47	±	0,06 **	↓	0,24	±	0,05 ***	↓
FATP4	1,00	±	0,21	0,75	±	0,20		0,68	±	0,11	
SGLT1	1,00	±	0,16	0,96	±	0,26		0,78	±	0,06	
Glut2	1,00	±	0,20	0,52	±	0,23		2,02	±	0,26 **	↑
Angptl4/FiAF	1,00	±	0,03	0,79	±	0,22		0,59	±	0,08	

(CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*, Fabp2: *fatty acid binding protein 2*, FATP4: *fatty acid transport protein 4*, SGLT1: *sodium dependent glucose transporter 1*, Glut2: *Glucosetransporter 2*, Angptl4/FiAF: *Angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipocyte factor*)

Die postabsorptiven Genexpressionsdaten des Versuchs 4 decken sich nicht mit denen vom Versuch 3, was auf eine unterschiedliche Diätzusammensetzung und einen anderen Fütterungszeitraum zurückzuführen ist. Die gefasteten Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Expression der untersuchten Fettsäure-Transporter. Die SGLT1- und Glut2-Expression war in den EGCG-behandelten Gruppen postabsorptiv signifikant erhöht. Mäuse, die über Nacht Zugang zum Futter hatten, wiesen im Versuch 4 eine signifikant erniedrigte Fabp2-Expression und eine erhöhte Glut2-Expression in der Darmmucosa auf nach EGCG-Behandlung.

3.4 Effekte des EGCG auf die Leber

Die Leber stellt mit ihrer zentralen Rolle im Stoffwechsel eines der wichtigsten Organe dar. Zu ihren Aufgaben zählen z. B. die Verwertung der resorbierten Nahrungsbestandteile, die Gallenproduktion und damit einhergehend der Abbau und die Ausscheidung diverser Stoffwechselprodukte und Fremdstoffe. Da das EGCG intestinal absorbiert wird und über die Portalvene zur Leber gelangt, wurden Effekte des Teecatechins auf den Triglycerid- und Glycogengehalt, die Inkorporation diätetischer ¹³C-angereicherter Triglyceride sowie die Expression wesentlicher Gene betrachtet.

Morphologische Veränderungen nach oraler EGCG-Applikation

Völlig unerwartet wurde bei der Tötung der Mäuse nach oraler Applikation des TEAVIGO® über 3 Tage hinweg (Versuch 1B, siehe 2.2.3.1) eine makroskopische Veränderung der Leber bei Tieren der HF-Gruppe mit EGCG-Applikation beobachtet. Die Leber war bei einigen Tieren äußerlich auffällig marmoriert. Die makroskopische Veränderung blieb bei Fütterung einer Standarddiät und EGCG-Applikation aus. Die weitere histologische Analyse der Leberproben erfolgte in den Versuchen 2A und 2B anhand der oralen Applikation verschiedener Dosierungen (125, 250, 500 mg/kg KM TEAVIGO®). Die

Abbildungen 3-12 und 3-13 zeigen das morphologische Erscheinungsbild der Leber von Mäusen, die mit unterschiedlichen Dosierungen des TEAVIGO® über 5 bzw. 14 Tage behandelt worden sind.

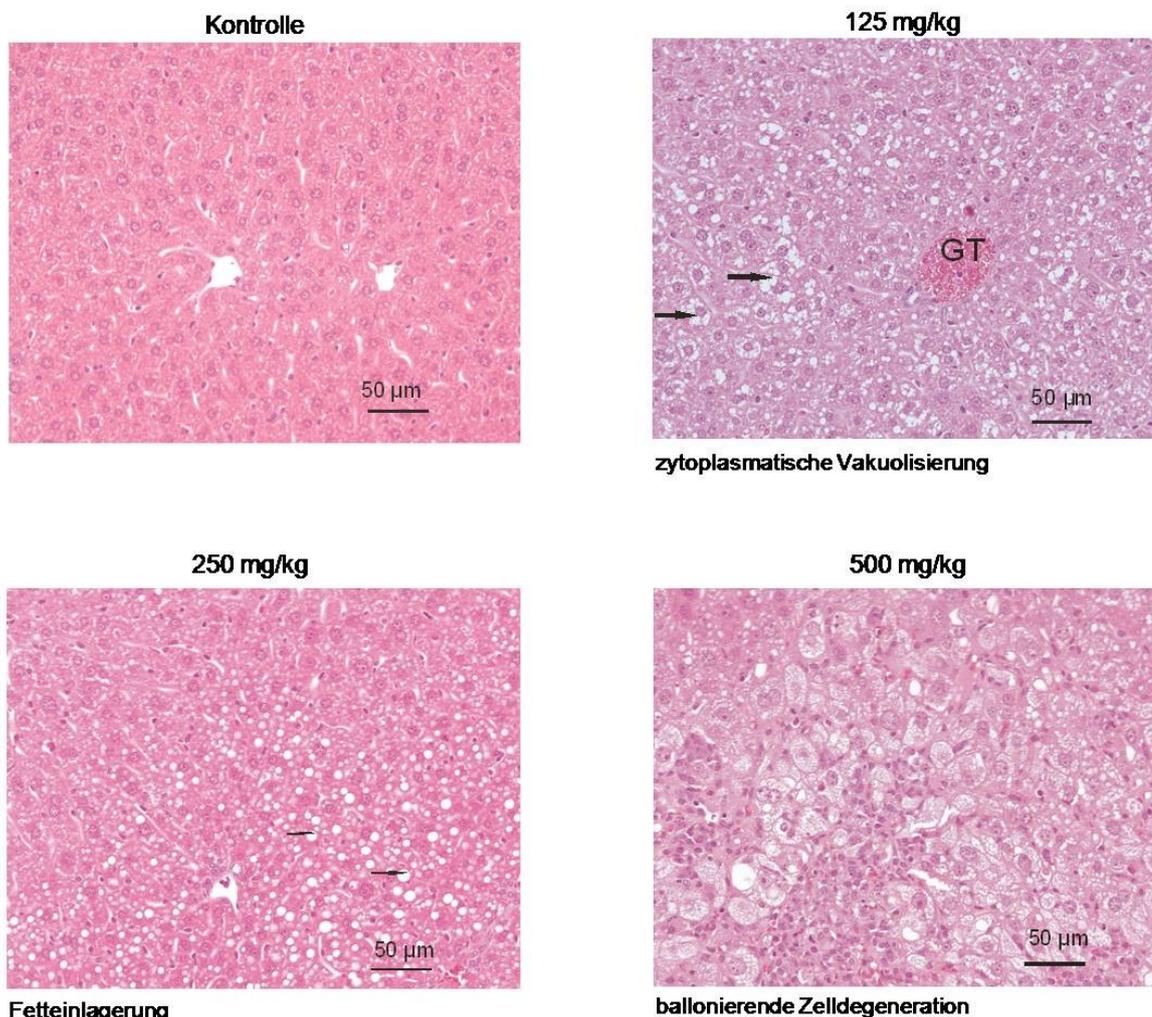


Abb. 3-12: Morphologie der Leber nach 5-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät (Versuch 2A) und täglicher oraler TEAVIGO®-Applikation in unterschiedlichen Dosierungen (0, 125, 250, 500 mg/kg KM); H&E-Färbung

Die histologischen Bilder belegen, dass hepatischen Veränderungen nur bei Mäusen vorkamen, denen einmal täglich oral TEAVIGO® in verschiedenen Dosierungen (125, 250, 500 mg/kg KM) über 5 bzw. 14 Tage hinweg appliziert wurde. Als Folge einer toxischen Schädigung reagiert die Leber in der Regel mit degenerativer Verfettung, vakuolärer Zelldegeneration, Ballonierung der Hepatozyten, Koagulationsnekrose, Cholestase, Pigmentspeicherung, mitotischen Formen und einer Schwellung von Kupffer-Zellen. Diese Anzeichen sind zum Teil reversibel und können letztlich zum nekrotischen Zelluntergang führen. Im Anfangsstadium der Nekrose ist die Morphologie durch eine Volumenzunahme (Ballonierung) der Zelle gekennzeichnet, was aus den Abbildungen ersichtlich wird.

Ursache dafür ist eine verminderte Wahrnehmung der Plasmamembran in ihrer selektiven Wirkung gegenüber äußeren Einflüssen. Somit kann der osmotische Gradient zu einer Mengenzunahme im Zytoplasma beitragen (Geier & Trauntwein, 2008).

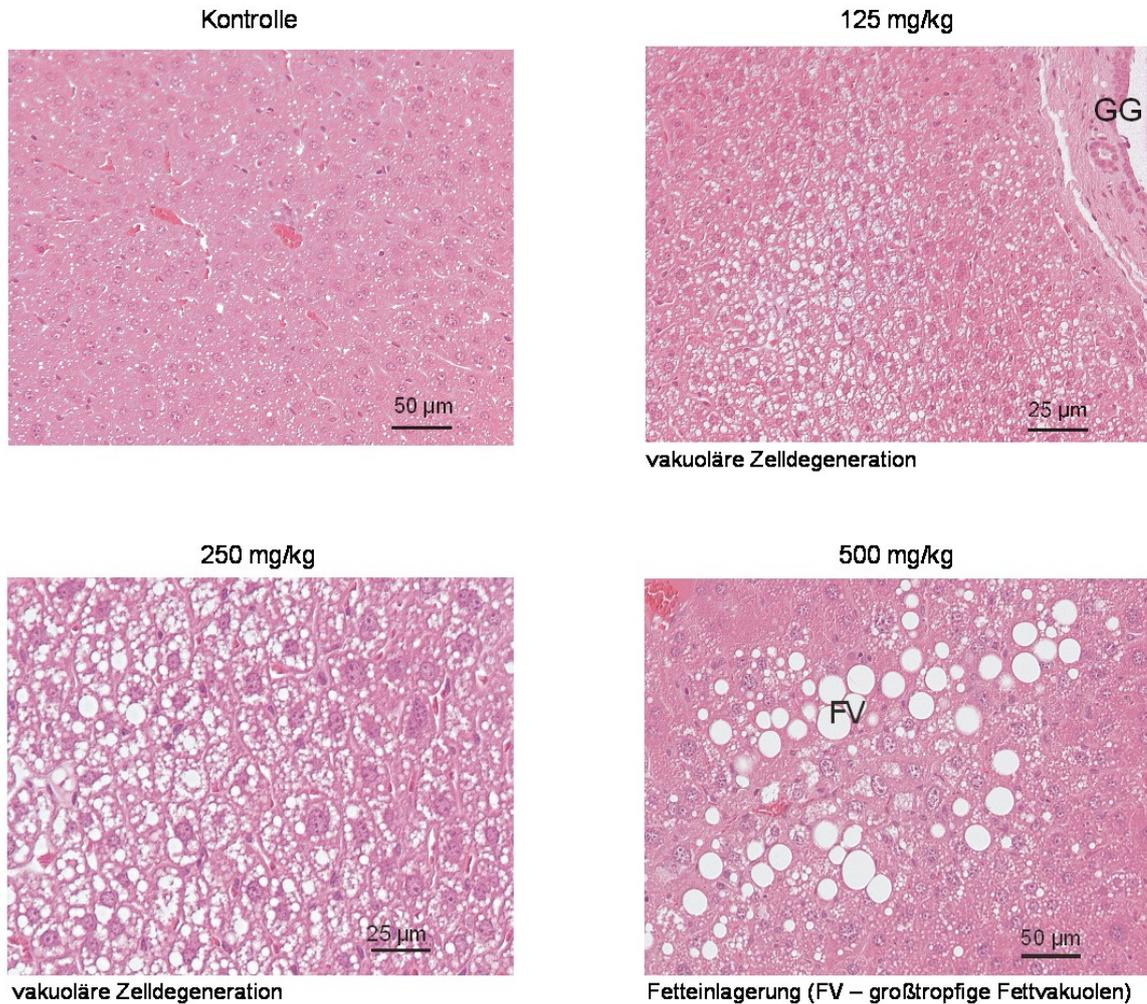


Abb. 3-13 Morphologie der Leber nach 14-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät (Versuch 2B) und täglicher oraler TEAVIGO®-Applikation (0, 125, 250 und 500 mg/kg KM); H&E-Färbung

Um das Ausmaß der Leberschädigung bei den einzelnen Tieren zu beurteilen, wurde das folgende Bewertungssystem (Tab. 3-8) benutzt. Die Leber wurde im Hinblick auf eine Fettveränderung, Vakuolisierung und Nekrose beurteilt.

Tab. 3-8: Bewertungssystem zur Bestimmung der Anzahl an Mäusen, die von einer histo-pathologischen Veränderung betroffenen waren

Bewertungsschema

- :	fehlend
+ :	leicht
++ :	moderat
+++ :	stark

Mäuse, die eine moderate bis starke histo-pathologische Läsion der Leber aufwiesen, wurden gezählt und in die Bewertung eingeschlossen. Für jede Gruppe wurde das Ausmaß der Leberveränderung prozentual dargestellt und in Fetteinlagerung, Vakuolisierung und Nekrose unterteilt (Abb. 3-14).

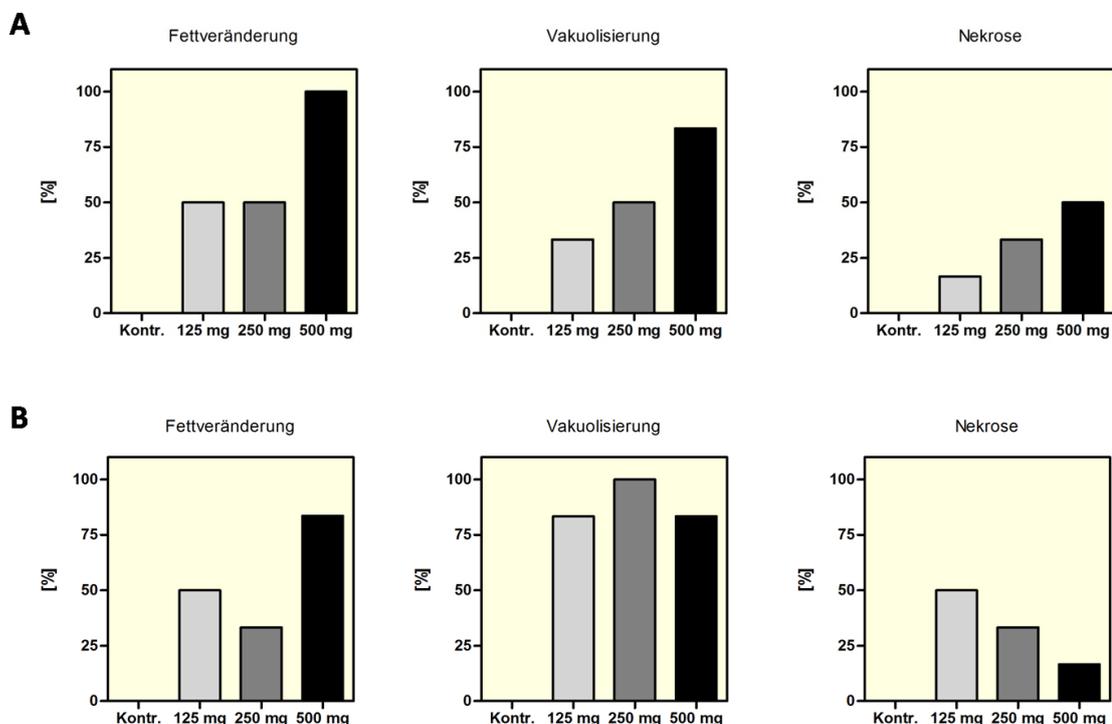


Abb. 3-14: Prozentuales Ausmaß der Leberveränderungen der einzelnen Gruppen (n=6) unterteilt in Fettveränderung, Vakuolisierung und Nekrose nach oraler 5- (A) bzw. 14-tägiger (B) Applikation des TEAVIGO® (Versuch 2A, 2B)

Sowohl nach 5- als auch nach 14-tägiger Applikation des EGCG in unterschiedlichen Dosierungen (0, 125, 250, 500 mg/kg KM) ließen sich auffällige morphologische Veränderungen in der Leber detektieren. Hepatische Veränderungen bei den mit TEAVIGO®- behandelten Mäusen waren einhergehend mit verstärkter Fetteinlagerung, zytoplasmatischer Vakuolisierung und ballonierender Zelldegeneration, was zum Zelluntergang führen kann. In weiteren Versuchen (Versuch 3 und 4) wurde geklärt, ob

eine diätetische Applikation des TEAVIGO® zu nekrotischen Veränderungen führt. Abbildung 3-15 zeigt das morphologische Erscheinungsbild der Leber bei Fütterung einer Hochfettdiät und 1.0 %iger EGCG-Supplementation.

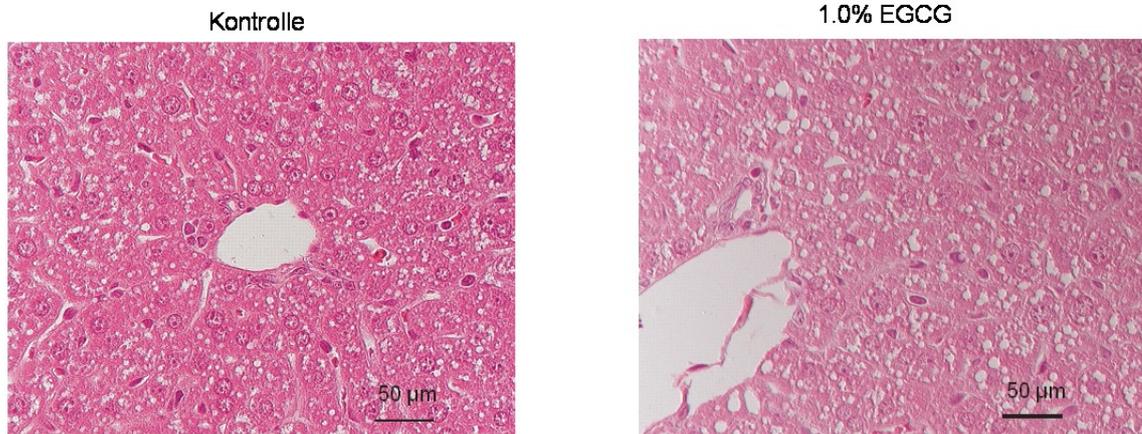


Abb. 3-15 Morphologie der Leber nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät (Versuch 4) und diätetischer Applikation des EGCG (1.0 %); H&E-Färbung

Die diätetische Supplementation der Hochfettdiät mit EGCG zeigte in allen eingesetzten Konzentrationen keine auffälligen Erscheinungen. Diese Form der Applikation wurde, im Vergleich zu der oralen Gabe, von den Mäusen gut toleriert und ging mit keinerlei nekrotischen Veränderungen einher.

Inkorporation diätetischer Lipide in die Leber

Die Inkorporation diätetischer Lipide in verschiedene Organe der Maus wurde mit Hilfe einer Mais-Hochfettdiät untersucht. Mais zählt zu den C4-Pflanzen, die natürlicherweise den schwereren Kohlenstoff ^{13}C enthalten. Durch Umstellung von einer Standard- auf eine maiskeimöhlhaltige Diät, konnte die Inkorporation des ^{13}C -Isotopes in die Leber bestimmt werden (Abb. 3-16). Eine hohe ^{13}C -Anreicherung indiziert einen hohen Lipid-Turnover.

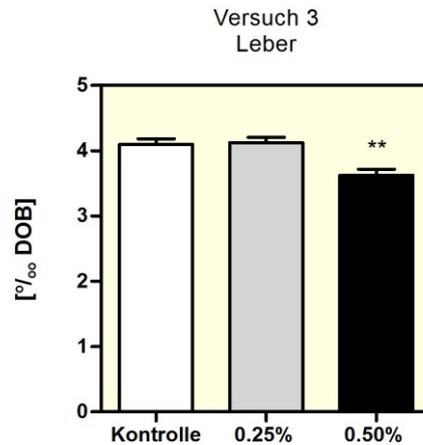


Abb. 3-16: ¹³C-Anreicherung in der Leber von Mäusen nach Umstellung von einer Standard- auf eine Mais-Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne Supplementation von EGCG (Versuch 3); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** vs. Kontrolle)

Mäuse mit 0.5 % EGCG in der Diät zeigten eine signifikant erniedrigte Inkorporation ¹³C-markierter Triglyceride in die Leber. Die Leber dieser Mäuse enthielt somit weniger exogene Triglyceride als die Kontrollgruppe.

Quantifizierung von Triglyceriden und Glycogen in der Leber

Mittels Ölrot O-Färbung der Lebertriglyceride (Abb. 3-17) konnte ein verminderter Fettgehalt in der Leber der EGCG-Mäuse unter postprandialen Bedingungen nachgewiesen werden. Keine Unterschiede wurden dagegen unter postabsorptiven Bedingungen festgestellt.

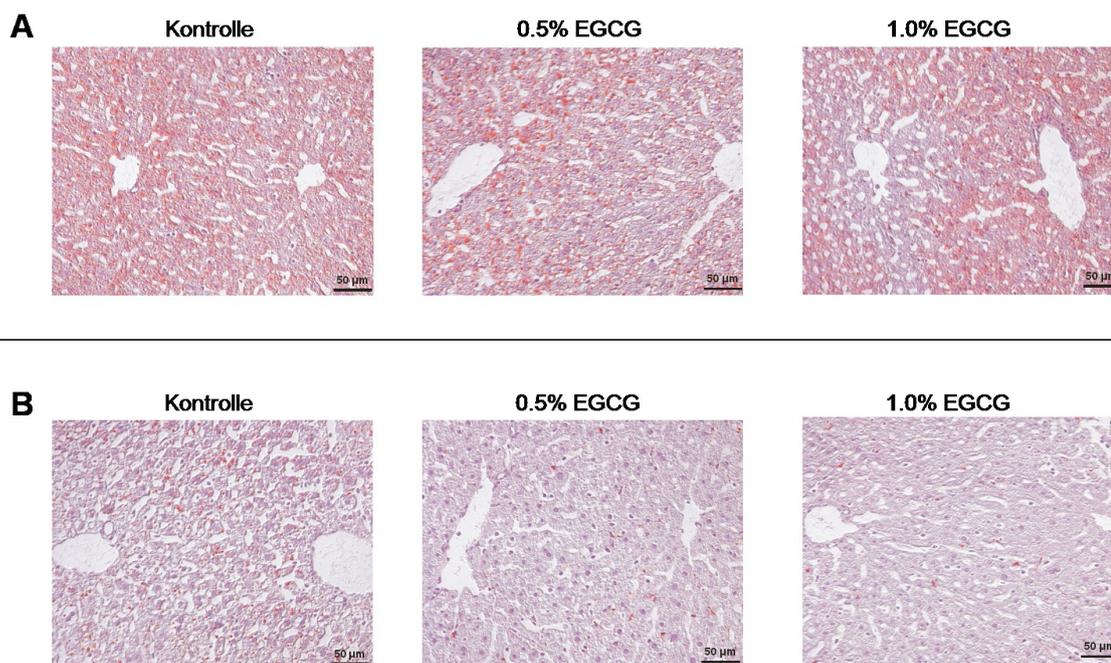


Abb. 3-17: Ölrot O-Färbung der Lebertriglyceride nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät mit (0.5 % und 1.0 %) und ohne Supplementation von EGCG unter postabsorptiven (A) und postprandialen (B) Bedingungen (Versuch 4)

Die biochemische Quantifizierung der Triglyceride (Abb. 3-18) ergab ein ähnliches Ergebnis wie die histologische Analyse.

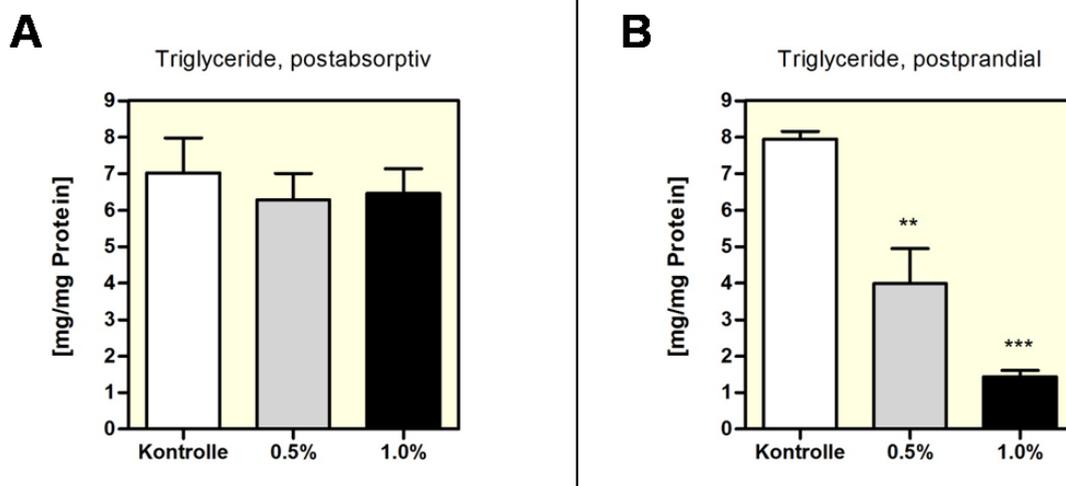


Abb. 3-18: Triglyceridgehalt in der Leber der Mäuse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät mit (0.5 % und 1.0 %) und ohne diätetische Applikation von TEAVIGO® unter postabsorptiven (A) und postprandialen (B) Bedingungen (Versuch 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät wiesen die Tiere mit diätetischer EGCG-Supplementation im gefütterten Zustand einen signifikant erniedrigten Triglyceridgehalt in

der Leber auf. Unter postabsorptiven Bedingungen unterschieden sich die Lebertriglyceride der untersuchten Gruppen nicht voneinander.

Neben den Triglyceriden wurde der Glycogengehalt in der Leber der Mäuse biochemisch quantifiziert (Abb. 3-19). Hier zeigten Mäuse mit EGCG-Supplementation sowohl unter postabsorptiven als auch unter postprandialen Bedingungen einen signifikant erniedrigten Glycogengehalt.

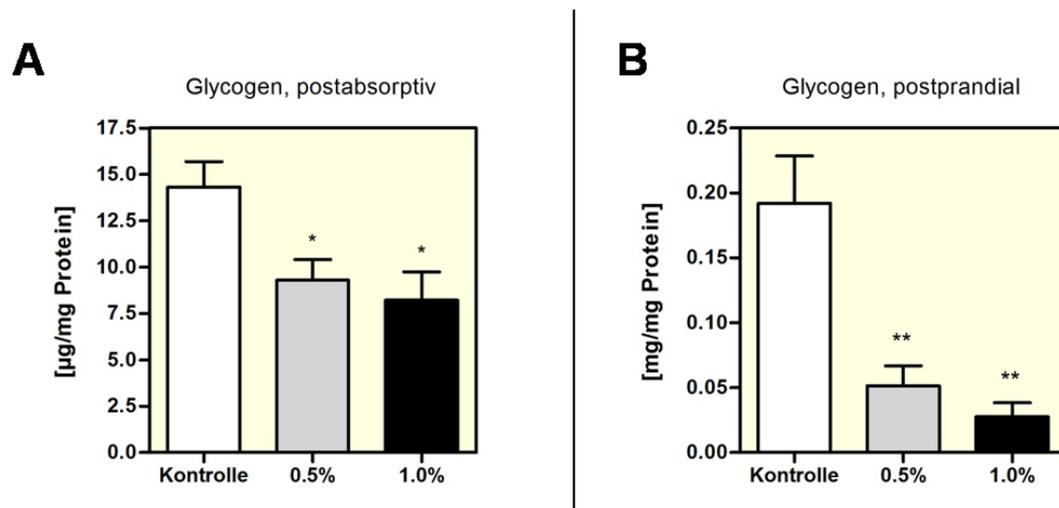


Abb. 3-19: Glycogengehalt in der Leber der Mäuse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät mit (0.5 % und 1.0 %) und ohne diätetische Applikation von TEAVIGO® (Versuch 4); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 * vs. Kontrolle)**

Genexpression in der Leber

Die Expression verschiedener Gene, die an der Glycolyse, Gluconeogenese und dem Fettsäure-Metabolismus beteiligt sind, wurden mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus den Versuchen 3 und 4 ausgewählt, da bei dieser Art der Applikation keine morphologischen Veränderungen der Leber zu erkennen waren. Das EGCG wurde in beiden Versuchen der Hochfett-diät zugesetzt. Die Mäuse des Versuchs 3 befanden sich ca. 14 – 16 h im postabsorptiven Zustand und bekamen eine maiskeimöhlhaltige Hochfett-diät gefüttert. Im Versuch 4 wurde die Genexpression sowohl postprandial (n = 8 - 9) als auch postabsorptiv (n = 3 - 4) untersucht.

In der Abbildung 3-20 sind Daten zur relativen Genexpression in der Leber aus dem Versuch 3 dargestellt, wobei Enzyme der Glycolyse, oxidativer Decarboxylierung und Gluconeogenese betrachtet wurden.

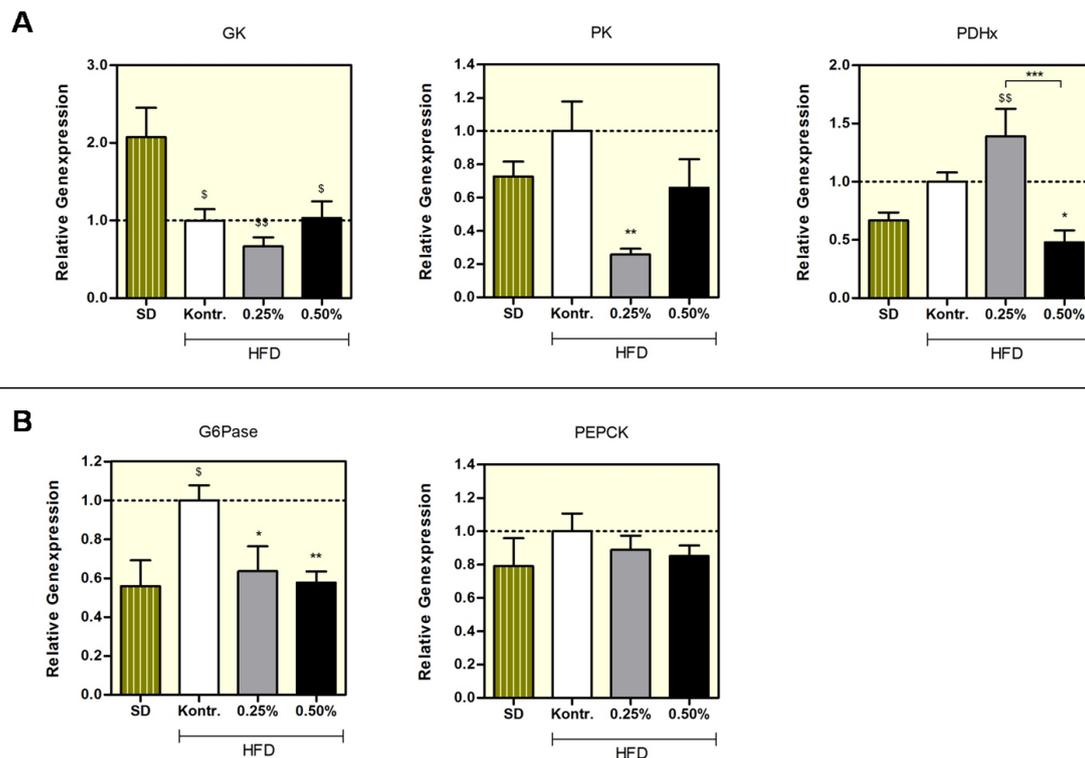


Abb. 3-20: Relative Genexpression von Enzymen, die an Glycolyse und oxidativer Decarboxylierung (A) sowie Gluconeogenese (B) in der Leber beteiligt sind (Versuch 3); Mäusen wurde 7 Tage eine Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne TEAVIGO® gefüttert; ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(GK: Glucokinase, PK: Pyruvatkinase, PDHx: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, G6Pase: Glucose-6-phosphatase, PEPCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase)

Zwischen der Standard- und Hochfettdiät ließen sich Unterschiede in der Genexpression verzeichnen. Die GK war bei Fütterung einer Hochfettdiät, im Gegensatz zur Standarddiät, stark erniedrigt. Die entgegengesetzt laufende Reaktion der Gluconeogenese, die Hydrolyse des Glucose-6-phosphats zu Glucose, wird durch die G6Pase katalysiert. Die Expression dieses Membranproteins war sowohl bei Standarddiät als auch EGCG-Behandlung signifikant reduziert. Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex ist ein Multienzymkomplex, der für die Energiegewinnung aus Glucose essentiell nötig ist, und die Verbindung zwischen Glycolyse und Citratzyklus bildet (Rehner & Daniel, 2002). Die Expression von PDHx war bei Mäusen mit 0.5 % EGCG im Futter signifikant erniedrigt.

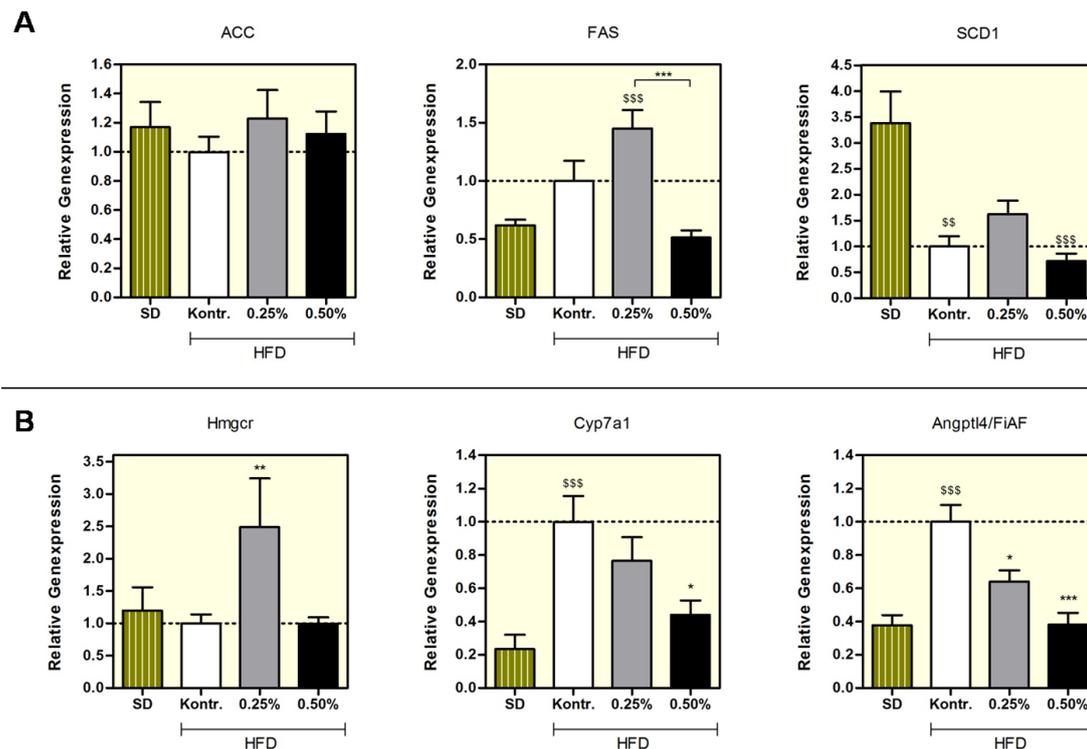


Abb. 3-21: Relative Expression von Genen des Fett- und Cholesterolmetabolismus in der Leber von Mäusen nach 7-tägiger Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät und EGCG-Supplementation (0.25 %, 0.50 %) (Versuch 3), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, FAS: Fettsäure-Synthase / *fatty acid synthase*, SCD1: Stearoyl-CoA-Desaturase, Hmgcr: HMG-CoA-Reduktase, Cyp7a1: Cholesterol 7α -Hydroxylase, Angptl4/FiAF: *Angiopoietin-like protein 4 / Fasting-induced adipose factor*)

Die Expression von Genen, die am Fett- und Cholesterolmetabolismus beteiligt sind, wurde durch die angebotene Diät reguliert (Abb. 3-21). So war die Expression von SCD1, dem Schlüsselenzym der Biosynthese einfach ungesättigter Fettsäuren, bei Fütterung einer Hochfettdiät signifikant erniedrigt. Cholesterol kann im Organismus *de novo* synthetisiert werden. Das Schlüsselenzym dafür ist die HMG-CoA-Reduktase. Eine erhöhte Expression ließ sich in der HFD-Gruppe mit 0.25 % EGCG verzeichnen, während sie in den übrigen Gruppen unverändert blieb. Die Endprodukte des Cholesterols sind die Gallensäuren, die ausschließlich in der Leber mit Hilfe der Cholesterol 7α -Hydroxylase (Cyp7a1) synthetisiert werden. Eine verringerte Expression dieses Enzyms konnte bei 0.5 % EGCG in der Hochfettdiät und bei Fütterung einer Standarddiät beobachtet werden. Ein weiteres Gen, welches am Energiemetabolismus durch Inhibierung der Lipoproteinlipase-Aktivität beteiligt ist (Kersten et al., 2000; Dutton & Trayhurn, 2008), ist Angptl4/FiAF (*Angiopoietin-like protein 4 / Fasting-induced adipose factor*). Angptl4/FiAF wird durch Fasten im weißen Fettgewebe und in der Leber hochreguliert (Kersten et al., 2000). Die Fütterung einer Hochfettdiät führte zu einer Hochregulation der FiAF-

Expression. EGCG führte zu einer verminderten Expression des Angptl4/FiAF-Gens in der Leber.

Die nachfolgende Tabelle 3-9 zeigt die Genexpression verschiedener hepatischer Gene im postabsorptiven als auch postprandialen Zustand (Versuch 4), die am Glucose-, Fett- und Cholesterolverstoffwechslung beteiligt sind.

Tab. 3-9: Postabsorptive und postprandiale Genexpression in der Leber von Mäusen nach 4-tägiger Fütterung einer semisynthetischen Hochfettdiät (Versuch 4), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG	
<i>postabsorptiv</i>				
GK	1,00 ± 0,13	1,14 ± 0,19	0,68 ± 0,15	
PK	1,00 ± 0,17	1,20 ± 0,17	1,38 ± 0,20	
PDHx	1,00 ± 0,13	1,10 ± 0,19	0,81 ± 0,17	
G6Pase	1,00 ± 0,16	1,03 ± 0,13	1,40 ± 0,39	
PEPCK	1,00 ± 0,07	1,13 ± 0,09	0,78 ± 0,04	
ACC	1,00 ± 0,09	1,12 ± 0,15	0,94 ± 0,15	
FAS	1,00 ± 0,16	1,31 ± 0,23	0,99 ± 0,14	
SCD1	1,00 ± 0,18	0,63 ± 0,11	0,14 ± 0,02 ***	↓
Hmgcr	1,00 ± 0,24	2,10 ± 0,45	0,97 ± 0,30	
Cyp7a1	1,00 ± 0,25	2,39 ± 0,45	2,73 ± 0,72 *	↑
Angptl4/FiAF	1,00 ± 0,12	1,71 ± 0,35	0,97 ± 0,14	
<i>postprandial</i>				
GK	1,00 ± 0,14	0,77 ± 0,11	1,13 ± 0,12	
PK	1,00 ± 0,22	0,84 ± 0,15	0,61 ± 0,16	
PDHx	1,00 ± 0,20	0,94 ± 0,22	0,57 ± 0,05	
G6Pase	1,00 ± 0,14	0,72 ± 0,20	0,48 ± 0,16	
PEPCK	1,00 ± 0,20	1,38 ± 0,16	0,82 ± 0,06	
ACC	1,00 ± 0,33	0,42 ± 0,02	0,33 ± 0,04 *	↓
FAS	1,00 ± 0,34	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,09 *	↓
SCD1	1,00 ± 0,13	0,56 ± 0,05 *	0,31 ± 0,08 **	↓
Hmgcr	1,00 ± 0,30	0,69 ± 0,18	0,63 ± 0,12	
Cyp7a1	1,00 ± 0,09	0,76 ± 0,26	1,59 ± 0,23	
Angptl4/FiAF	1,00 ± 0,10	0,94 ± 0,21	0,28 ± 0,04 **	↓

(GK: Glucokinase, PK: Pyruvatkinase, PDHx: Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, G6Pase: Glucose-6-phosphatase, PEPCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, FAS: Fettsäure-Synthase / *fatty acid synthase*, SCD1: Stearoyl-CoA-Desaturase 1, Hmgcr: HMG-CoA-Reduktase, Cyp7a1: Cholesterin 7 α -Hydroxylase, Angptl4/FiAF: *Angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipose factor*)

Es wurde bereits erwähnt, dass die Genexpression in den untersuchten Organen und Geweben des Versuchs 4 aufgrund des postabsorptiven und postprandialen Zustandes der Mäuse verschieden ist. Vergleicht man die Genexpression der Kontrollgruppen miteinander, resultierte das in z.T. gegensätzlichen Expressionsmustern (siehe Abb. 3-11). In der Leber ließ sich postabsorptiv bei Tieren mit 0.5 % EGCG in der Diät eine verminderte Expression der SCD1-mRNA verzeichnen. In dieser Gruppe konnte eine signifikant erhöhte Expression von Cyp7a1 detektiert werden, was auf einen gesteigerten Cholesterolkatabolismus schließen lässt. Gefütterte Mäuse zeigten eine reduzierte Glut2-vermittelte Glucoseaufnahme in die Leber. Auffällig ist, dass die Expression lipogener Enzyme (ACC, FAS, SCD1) bei einem Anteil von 0.5 % EGCG in der Diät vermindert war.

3.5 Einfluss des EGCG auf das Fettgewebe

Effekte des EGCG auf die Körperfettmasse

Wie bereits unter Punkt 3.1 erwähnt, führte die diätetische EGCG-Applikation zu einer Reduktion der Körpermasse. Die Körperzusammensetzung mittels quantitativer NMR-Spektroskopie ergab in den EGCG-Gruppen eine signifikant erniedrigte Fettmasse. Die diätetische Supplementation der Testsubstanz resultierte sowohl kurz- als auch langfristig in einer Verminderung der Körperfettmasse (Abb. 3-22).

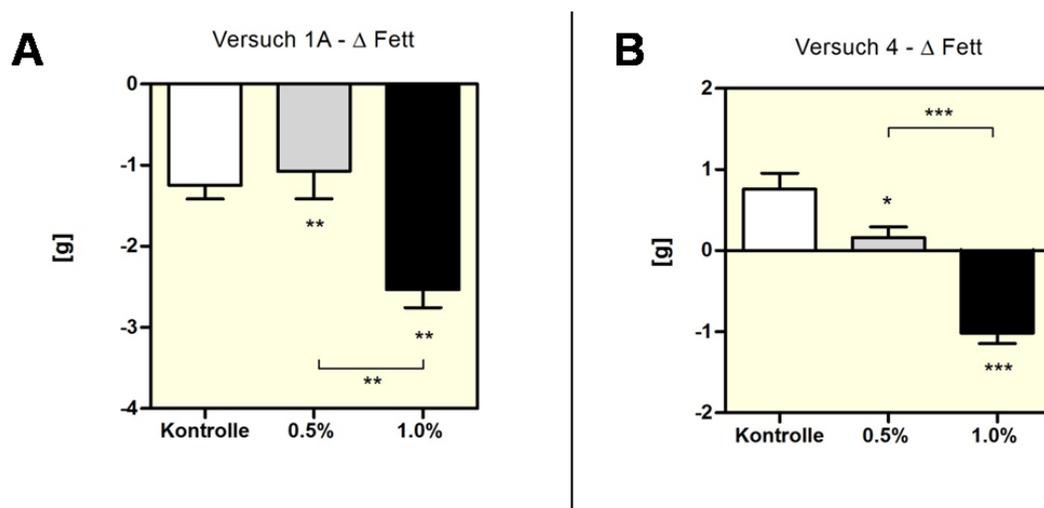


Abb. 3-22: Veränderung der Körperfettmasse der Mäuse nach Fütterung einer Hochfettdiät und diätetischer Supplementation mit TEAVIGO® (0.5 % und 1.0 %) nach 14 Tagen (A) und 4 Tagen (B) (Versuche 1A und 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Die Reduktion der Körperfettmasse nach oraler Applikation über 5 bzw. 14 Tage wies keine signifikanten Veränderungen auf. Am Tag der Tötung wurde die Masse des epididymalen Fettgewebes (eWAT) ermittelt (Abb. 3-23). Sie korreliert gut mit dem

Gesamtkörperfettgehalt (Abb. 3-24). Die Masse des eWAT bei Versuchende erbrachte keine signifikanten Unterschiede nach oraler Applikation, jedoch konnte nach diätetischer Supplementation eine signifikant erniedrigte Fettmasse festgestellt werden.

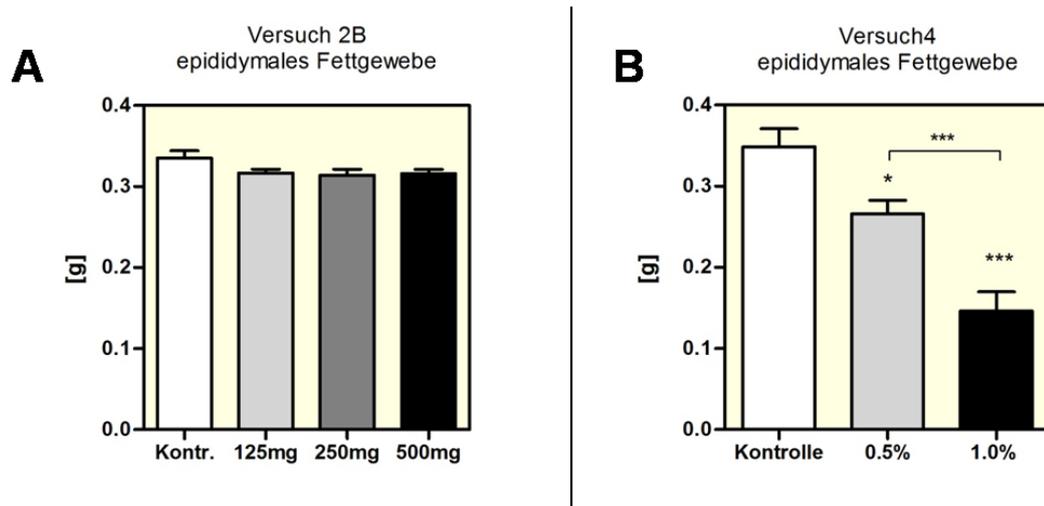


Abb. 3-23: Masse des epididymalen Fettgewebes bei Versuchende nach oraler (A) und diätetischer (B) Applikation des EGCG über einen Zeitraum von 5 bzw. 4 Tage (Versuche 2A und 4); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

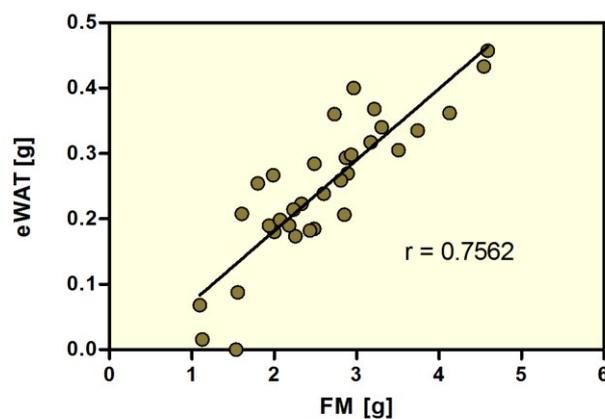


Abb. 3-24: Korrelation der mittels NMR-Spektroskopie bestimmten Fettmasse (FM) und der Masse des epididymalen Fettgewebes (eWAT) der Mäuse bei Versuchende (Versuch 4)

Inkorporation diätetischer Lipide ins Fettgewebe

Im Versuch 3 wurde die Inkorporation exogener Triglyceride in verschiedene Organe, u.a. ins Fettgewebe der Maus untersucht. Dazu wurde den Mäusen eine maiskeimöhlhaltige (Mais → C4-Pflanze) Hochfettdiät gefüttert, die im Gegensatz zur zuvor gefütterten

Standarddiät, eine größere natürliche ^{13}C -Anreicherung aufwies. Da die Fettgewebzusammensetzung die diätetische Aufnahme der Fette widerspiegelt, konnte mit Hilfe dieses Versuchsansatzes die Inkorporation untersucht werden. Nach einem Fütterungszeitraum von einer Woche wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die ^{13}C -Anreicherung in den Geweben massenspektrometrisch bestimmt. Nach Abzug der ^{13}C -Anreicherung in der Standarddiät-Gruppe konnte die Veränderung des Isotopenverhältnisses nach Diätumstellung im Fettgewebe bestimmt werden (Abb. 3-25). Eine hohe ^{13}C -Anreicherung indiziert einen hohen Lipid-Turnover.

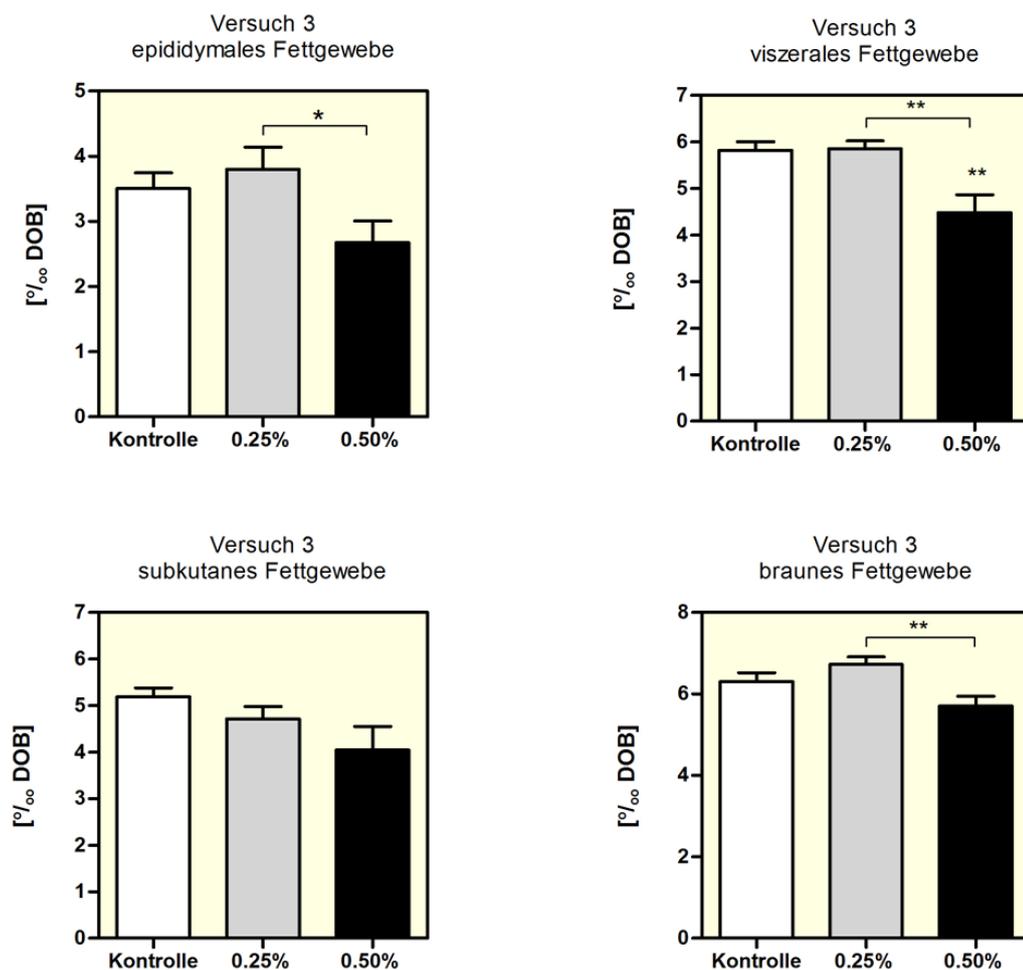


Abb. 3-25: ^{13}C -Anreicherung in unterschiedlichen Fettgeweben (epididymal, viszeral, subkutan und braunes Fettgewebe) nach Fütterung einer natürlicherweise mit ^{13}C -angereicherten Hochfettdiät (Fettquelle: Maiskeimöl) und diätetischer Supplementation (0.25 % und 0.50 %) von TEAVIGO[®] (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

In allen untersuchten Fettgeweben ließ sich eine verminderte Inkorporation des ^{13}C -Isotopes verzeichnen. Signifikante Unterschiede zeigten sich vor allem in den viszeralen und braunen Fettgeweben. Die Gruppe mit 0.5 % EGCG in der Diät wies die niedrigste

^{13}C -Anreicherung im Fettgewebe auf, was auf eine verminderte Inkorporation diätetischer Fette hindeutet.

Genexpression im weißen Fettgewebe

Die Adipozyten des Fettgewebes stellen einen wichtigen Energiespeicher dar. Die im Überschuss aufgenommene Nahrungsenergie wird hier in Form von Triglyceriden gespeichert und wird im Bedarfsfall in Form von Glycerol und Fettsäuren wieder freigesetzt. Neben der Speicherfunktion hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass das Fettgewebe eine wichtige endokrine Funktion besitzt (Trayhurn & Beattie, 2001).

Die Applikation des Grünteepolyphenols TEAVIGO[®] zeigte eine signifikante Verminderung der Körperfettmasse (siehe 3.1). Die mit einer Körperfettreduktion verbundenen Wirkungen des EGCG (Versuch 3 und 4) wurden auf Ebene der Expression diverser Enzyme untersucht, die an der Lipolyse und Lipogenese beteiligt sind. Im Adipozyten gespeicherte Triglyceride liegen in Form von kleinen Fetttröpfchen vor, die von einer Schutzschicht, dem Perilipin (Plin), umgeben sind. Diese Proteinhülle schützt die Triglyceride vor der hormonsensitiven Lipase (HSL), die den lipolytischen Abbau von Triglyceriden zu Glycerol und Fettsäuren katalysiert (Langin et al., 1996). Neben der HSL ist ein weiteres lipolytisches Enzym, ATGL (*adipose triglyceride lipase*), maßgeblich am Triglycerid-Katabolismus beteiligt (Abb. 3-26, Zimmermann et al., 2004).

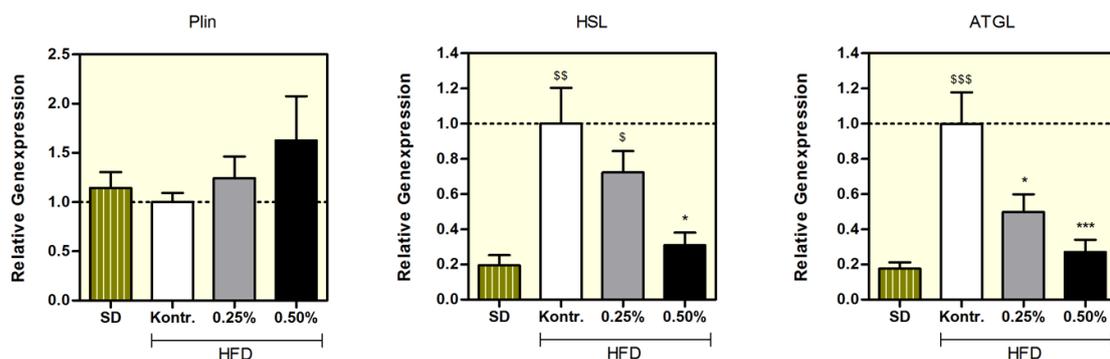


Abb. 3-26: Relative Genexpression im Fettgewebe der Mäuse nach Fütterung einer Standard- bzw. Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.5 %) und ohne TEAVIGO[®]-Supplementation (Versuch 3), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(Plin: Perilipin, HSL: hormonsensitive Lipase, ATGL: *adipose triglyceride lipase*)

Die Lipolyse war bei Fütterung einer Hochfettdiät, im Vergleich zur Standarddiät, signifikant erhöht. Das diätetisch verabreichte EGCG führte unter diesen Versuchsbedingungen (Versuch 3) zu einer signifikant verminderten Expression der ATGL und HSL.

Die Lipogenese erfolgt in mehreren Teilreaktionen im Cytosol. Durch Carboxylierung von Acetyl-CoA mittels Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) entsteht das für die Fettsäure-Biosynthese benötigte Malonyl-CoA. Die Fettsäuresynthase (FAS) katalysiert im Anschluss daran sämtliche Teilreaktionen der Fettsäure-Biosynthese. Die Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD1) ist an der Biosynthese einfach ungesättigter Fettsäuren beteiligt (Rehner & Daniel, 2002). Für die Triglyceridsynthese müssen sowohl Glycerol als auch freie Fettsäuren vorliegen und aktiviert werden. Die Veresterung des Glycerol-3-phosphat mit Acyl-CoA wird von der Glycerophosphat-Acyltransferase (GPAT) katalysiert (Igal et al., 2001). Enzyme der Fettsäure- und Triglyceridbiosynthese im Fettgewebe des Versuchs 3 sind in der Abbildung 3-27 dargestellt.

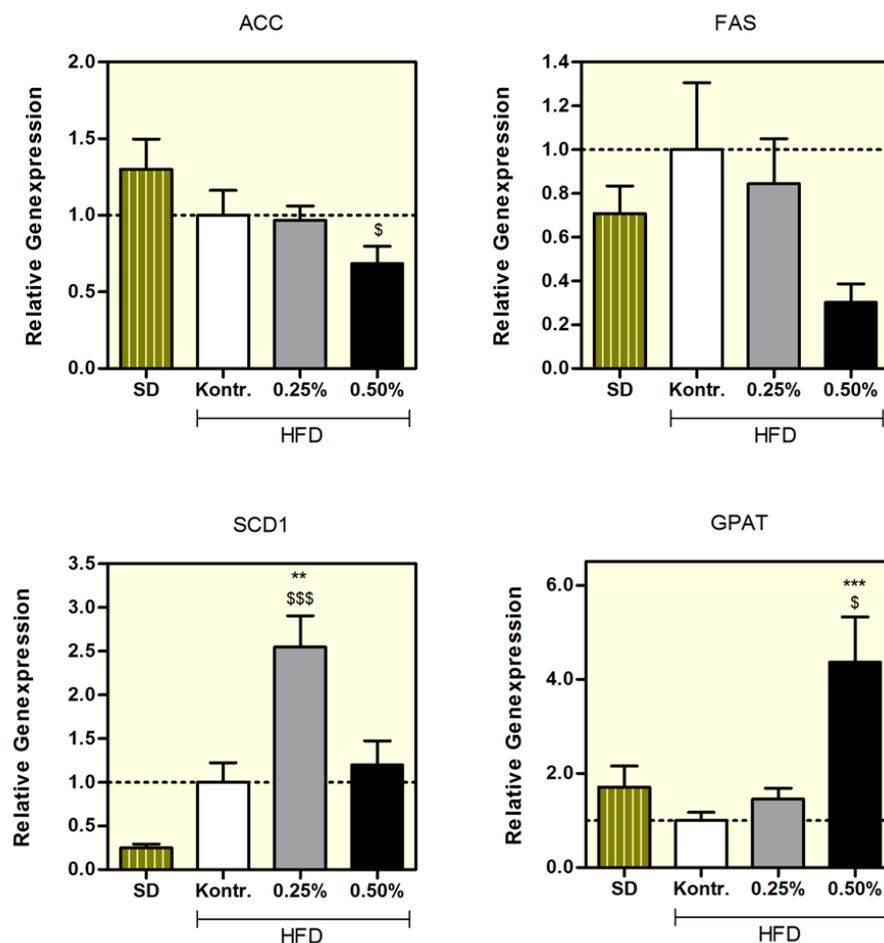


Abb. 3-27: Relative Expression lipogener Enzyme im Fettgewebe von Mäusen nach Fütterung einer Standard- bzw. Hochfettdiät, die mit EGCG (0.25 %, 0.50 %) supplementiert war (Versuch 3), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, FAS: *fatty acid synthase* / Fettsäuresynthase, GPAT: Glycerophosphat-Acyltransferase, SCD1: Stearoyl-CoA-Desaturase 1)

Im Vergleich zur Standarddiät war die Bereitstellung des Malonyl-CoA bei Tieren mit 0.5 % EGCG in der Diät signifikant erniedrigt. Tendenziell zeigte diese Gruppe auch eine erniedrigte FAS-mRNA Expression im Fettgewebe nach 7-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät. In der Gruppe mit 0.25 % EGCG ließ sich eine signifikant erhöhte Expression der SCD1-mRNA verzeichnen. Die Expression von GPAT war in der 0.5 % EGCG-Gruppe am höchsten.

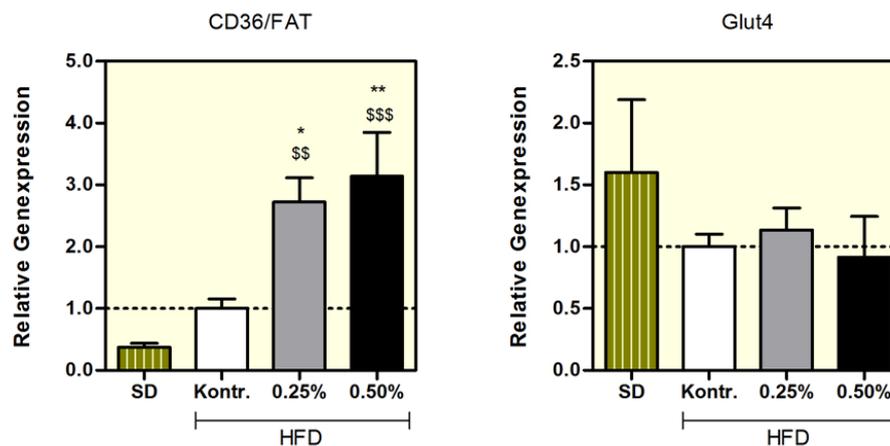


Abb. 3-28: Relative Expression von Genen, die an der Substrataufnahme und dem Substratfluss im Fettgewebe beteiligt sind (Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$ vs. SD)**

(Mäusen wurde über 7 Tage eine maiskeimölhaltigen Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne TEAVIGO® in der Diät gefüttert; CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*; Glut4: Glucosetransporter 4)

Die Glucoseaufnahme in die Adipozyten erfolgt insulinabhängig mit Hilfe des Glucosetransporters Glut4 (Rehner & Daniel, 2002). Ein Einfluss durch die Diät und die EGCG-Supplementation ließ sich im Versuch 3 nicht erkennen. CD36/FAT ist am Transport langkettiger Fettsäuren beteiligt (Bonen et al., 2006). Dosisabhängig zeigt sich in den EGCG-Gruppen eine erhöhte CD36/FAT-Expression im Vergleich zur Standard- und Hochfettdiät (Abb. 3-28).

Das Fettgewebe ist an der Bildung diverser Hormone und Adipokine beteiligt. Die Expression von Leptin und Angptl4/FiAF wurde unter Einfluss von EGCG betrachtet (Abb. 3-29).

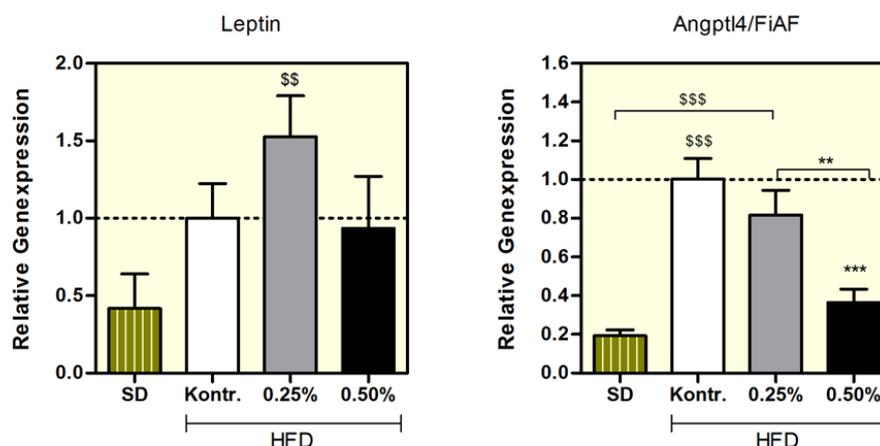


Abb. 3-29: Relative Leptin- und Angptl4/FiAF-Expression im Fettgewebe von Mäusen nach 7-tägiger Fütterung einer Standard- bzw. Hochfettdiät mit (0.25 %, 0.50 %) und ohne EGCG-Applikation (Versuch 3), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle; $p < 0,05$ \$, $p < 0,01$ \$\$, $p < 0,001$ \$\$\$, vs. SD)**

(Angptl4/FiAF: *angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipose factor*)

Die Expression der Leptin-mRNA im Fettgewebe zeigte bei den mit Hochfettdiät gefütterten Mäusen keine Unterschiede. Das Angptl4/FiAF war bei der 0.5 % EGCG-Gruppe, im Vergleich zur Kontrolle, signifikant erniedrigt.

Im Versuch 4 wurde die Expression der oben genannten Gene sowohl postabsorptiv als auch postprandial bestimmt (Tab. 3-10).

Tab. 3-10: Relative Genexpression im Fettgewebe von Mäusen unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen nach Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne EGCG-Supplementation (Versuch 4), ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
<i>postabsorptiv</i>			
Plin	1,00 ± 0,13	0,52 ± 0,05 ** ↓	0,33 ± 0,09 *** ↓
HSL	1,00 ± 0,16	0,47 ± 0,08	2,08 ± 0,28 *** ↑
ATGL	1,00 ± 0,16	0,67 ± 0,09	0,97 ± 0,23
ACC	1,00 ± 0,18	1,10 ± 0,13	0,80 ± 0,12
FAS	1,00 ± 0,19	0,24 ± 0,05 ** ↓	0,33 ± 0,15 * ↓
GPAT	1,00 ± 0,31	0,28 ± 0,04 * ↓	1,46 ± 0,19
SCD1	1,00 ± 0,38	0,17 ± 0,03 ** ↓	0,19 ± 0,02 ** ↓
CD36/FAT	1,00 ± 0,32	0,25 ± 0,03 * ↓	0,75 ± 0,14
Glut4	1,00 ± 0,17	0,30 ± 0,05 ** ↓	1,51 ± 0,18 * ↑
PPARγ	1,00 ± 0,14	0,62 ± 0,08 * ↓	0,45 ± 0,10 ** ↓
Leptin	1,00 ± 0,22	0,99 ± 0,18	0,31 ± 0,06 * ↓
Angptl4/FiAF	1,00 ± 0,10	0,48 ± 0,06	2,23 ± 0,34 *** ↑

postprandial

Plin	1,00	±	0,39	1,32	±	0,11	0,43	±	0,11	
HSL	1,00	±	0,74	1,31	±	0,16	2,72	±	0,46	
ATGL	1,00	±	0,49	2,92	±	0,12 **	↑	1,95	±	0,27
ACC	1,00	±	0,23	2,74	±	0,39 *	↑	0,94	±	0,25
FAS	1,00	±	0,70	1,11	±	0,18		1,26	±	0,31
GPAT	1,00	±	0,39	0,26	±	0,07		1,24	±	0,08
SCD1	1,00	±	0,54	0,47	±	0,06		0,99	±	0,13
CD36/FAT	1,00	±	0,19	0,72	±	0,19		2,01	±	0,10
Glut4	1,00	±	0,72	1,14	±	0,14		2,47	±	0,74
PPARγ	1,00	±	0,50	1,55	±	0,08		0,33	±	0,04
Leptin	1,00	±	0,64	0,80	±	0,10		0,44	±	0,12
Angptl4/FiAF	1,00	±	0,61	0,69	±	0,12		2,14	±	0,30

(postabsorptiv: 14-16 h Futterentzug, postprandial: Mäuse hatten nachts Zugang zum Futter; Plin: Perilipin, HSL: hormonsensitive Lipase, ATGL: *adipose triglyceride lipase*, ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, FAS: *fatty acid synthetase* / Fettsäuresynthase, GPAT: Glycerophosphat-Acyltransferase, SCD1: Stearoyl-CoA-Desaturase, CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*, Glut4: Glucosetransporter 4, PPAR γ : *peroxisome proliferator activated receptor γ* , Angptl4/FiAF: *angiopoietin-like protein 4 / fasting-induced adipose factor*)

Auffällig ist, dass die EGCG-Applikation unter postabsorptiven Bedingungen (14-16 h Futterentzug) mehr Gene in ihrer Expression beeinflusste. Unter diesen Umständen war die Expression von Perilipin, welches die Fettvakuolen vor Lipolyse schützt (Brasaemle, 2007), bei EGCG behandelten Tieren signifikant vermindert. Gleichzeitig wiesen diese Mäuse eine erhöhte HSL-Expression im WAT auf. Offensichtlich wurden lipogene Enzyme (FAS, GPAT, SCD1, PPAR γ) durch diätetisches EGCG in geringerem Ausmaß exprimiert. Auch die Aufnahme und der Transport langkettiger Fettsäuren *via* CD36/FAT ergab eine niedrigere Expression dieses Membranproteins bei EGCG-Mäusen. Die Supplementation der Hochfettdiät mit 1.0 % TEAVIGO[®] ergab reduzierte Leptin-mRNA-Spiegel. Postprandial war nur die Expression der HSL und ATGL durch den Grünteeextrakt tendenziell bzw. signifikant erhöht.

3.6 Effekte des EGCG auf den Skelettmuskel

Die im Zuge der NMR-Spektroskopie ermittelte Körperzusammensetzung zeigte keine Unterschiede bezüglich der fettfreien Masse (FFM) nach kurz- als auch längerfristiger Applikation von EGCG (Daten nicht dargestellt). Darüber hinaus wurde die Inkorporation diätetischer Triglyceride in den Skelettmuskel und die Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit der TEAVIGO[®]-Applikation untersucht.

¹³C-Anreicherung im Skelettmuskel

Der Einfluss des EGCG auf die Inkorporation exogener Lipide wurde im Skelettmuskel mit Hilfe der maiskeimöhlhaltigen Hochfett-diät untersucht (Versuch 3). Die ¹³C-Anreicherung im Skelettmuskel war bei Mäusen mit 0.5 % EGCG im Futter im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erniedrigt (Abb. 3-30).

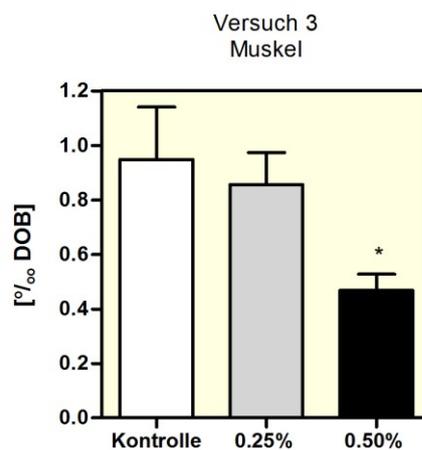


Abb. 3-30: ¹³C-Anreicherung im Skelettmuskel der Mäuse nach 7-tägiger Fütterung einer Hochfett-diät und gleichzeitiger diätetischer Applikation (0.25 %, 0.50 %) des EGCG (Versuch 3); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** vs. Kontrolle)

Genexpression im Skelettmuskel

Die Expression von Genen, die an der Substrataufnahme, der Lipogenese und der β -Oxidation beteiligt sind, wurden mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR untersucht. Tabelle 3-11 zeigt die Genexpression im Skelettmuskel unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen nach 4-tägiger Fütterung und diätetischer TEAVIGO[®]-Supplementation (Versuch 4).

Tab. 3-11: Relative Genexpression im Skelettmuskel der Mäuse nach Fütterung einer semisynthetischen Hochfettdiät und diätetischer EGCG-Applikation (0.5 %, 1.0 %) unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen (Versuch 4); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** vs. Kontrolle)

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
<i>postabsorptiv</i>			
Glut1	1,00 ± 0,09	0,56 ± 0,04 *** ↓	0,58 ± 0,05 *** ↓
Glut4	1,00 ± 0,06	0,33 ± 0,02 *** ↓	0,27 ± 0,05 *** ↓
CD36/FAT	1,00 ± 0,10	0,88 ± 0,08	1,07 ± 0,07
ACCβ	1,00 ± 0,09	0,58 ± 0,11 * ↓	0,53 ± 0,06 *** ↓
FAS	1,00 ± 0,25	0,75 ± 0,22	0,63 ± 0,13
GPAT	1,00 ± 0,12	0,41 ± 0,07 * ↓	0,25 ± 0,04 *** ↓
SCD1	1,00 ± 0,29	0,61 ± 0,16	0,19 ± 0,03 * ↓
CPT1b	1,00 ± 0,07	0,98 ± 0,06	0,63 ± 0,08 ** ↓
<i>postprandial</i>			
Glut1	1,00 ± 0,17	1,33 ± 0,07	0,69 ± 0,03
Glut4	1,00 ± 0,01	1,10 ± 0,04	0,45 ± 0,07 ** ↓
CD36/FAT	1,00 ± 0,08	0,88 ± 0,08 ↓	1,38 ± 0,06 * ↑
ACCβ	1,00 ± 0,03	1,69 ± 0,11 ** ↑	0,61 ± 0,05 * ↓
FAS	1,00 ± 0,20	1,06 ± 0,16	0,23 ± 0,09 * ↓
GPAT	1,00 ± 0,08	2,23 ± 0,27 ** ↑	0,52 ± 0,08
SCD1	1,00 ± 0,15	1,35 ± 0,10	0,21 ± 0,04 ** ↓
CPT1b	1,00 ± 0,00	1,16 ± 0,02	1,12 ± 0,10

(Glut1: Glucosetransporter 1, Glut4: Glucosetransporter 4, CD36/FAT: *cluster of differentiation 36 / fatty acid translocase*, ACCβ: Acetyl-CoA-Carboxylase β, FAS: Fettsäure-Synthase *fatty acid synthase*, GPAT: Glycerophosphat-Acyltransferase, SCD1: Stearoyl-CoA-Desaturase 1, CPT1b: Carnitinpalmitoyltransferase b)

Die Genexpression im Skelettmuskel nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit und ohne Applikation von TEAVIGO® in der Diät führte zu unterschiedlichen Expressionsmustern im gefasteten und gefütterten Zustand der Mäuse. So war die postabsorptive Glucoseaufnahme in den Muskel bei den EGCG-Tieren signifikant erniedrigt. Lipogene Enzyme wie ACCβ, GPAT und SCD1 waren bei 1.0 %iger TEAVIGO®-Gabe postabsorptiv ebenfalls signifikant erniedrigt. In der 1.0 % EGCG-Gruppe war die Genexpression von CPT1b postabsorptiv signifikant reduziert.

Im gefütterten Zustand ließ sich bei Tieren mit 1.0 % EGCG in der Diät eine signifikant erniedrigte Glut4-Expression im Skelettmuskel verzeichnen. Gene wie ACCβ, FAS und SCD1, die an der Lipogenese beteiligt sind, wurden postprandial unter Einfluss von EGCG (1.0 %) in geringerem Ausmaß exprimiert.

3.7 Wirkung des EGCG auf den Energieumsatz und die Substratoxidation

Der Einfluss des Grünteeextraktes TEAVIGO® auf den Energieumsatz und die Substratoxidation wurde mittels indirekter Tierkalorimetrie und stabiler Isotopentechnik untersucht. Es wurden sowohl kurz- als auch langfristige Wirkungen einer EGCG-Applikation untersucht, die im Folgenden ausführlicher beschrieben sind.

Langfristige Applikation des EGCG

In der nachstehenden Tabelle (Tab. 3-12) sind verschiedene Parameter des Energieumsatzes dargestellt, die nach 3-wöchiger Fütterung der Mäuse mittels indirekter Tierkalorimetrie gewonnen wurden.

Tab. 3-12: O₂-Verbrauch (VO₂), Energieumsatz (EU) und Energieumsatz pro metabolischer Körpermasse (EU/MKM) der 23 h-Energieumsatz-Messung (ITK) nach 3 Wochen Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 % EGCG) und ohne diätetischer Supplementation des EGCG (Versuch 1A); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 * vs. Kontrolle)**

	Kontrolle	0.5 % EGCG	1.0 % EGCG
<i>postabsorptiv</i>			
VO ₂ [l/d/Tier]	2,11 ± 0,06	2,26 ± 0,04	2,14 ± 0,05
EU [kJ/d/Tier]	41,3 ± 1,2	44,3 ± 0,7	41,9 ± 1,0
EU/MKM [kJ]	677,1 ± 18,9	681,4 ± 8,7	670,9 ± 12,5
<i>postprandial</i>			
VO ₂ [l/d/Tier]	2,51 ± 0,05	2,60 ± 0,04	2,44 ± 0,05
EU [kJ/d/Tier]	50,06 ± 1,00	52,69 ± 0,75	49,58 ± 0,90
EU/MKM [kJ]	785,1 ± 16,3	810,3 ± 9,74	795,2 ± 14,5

(postabsorptiv: 08:00 – 16:00 Uhr → Mäuse hatten kein Futterzugang; postprandial: 16:00 – 06:00 Uhr → Futterzugang)

Die ITK-Messung erfolgte über einen Zeitraum von 23 h. Den Tieren wurde morgens mit Beginn der Messung das Futter entzogen. Freien Zugang zum Futter hatten sie von 16:00 Uhr, 2 Stunden vor Beginn der Dunkel- und Aktivitätsphase, bis zum Ende der Messperiode am nächsten Tag. Damit konnte die Wirkung des EGCG auf postabsorptive und postprandiale ITK-Parameter untersucht werden. Die diätetische Supplementation von EGCG hatte auf den O₂-Verbrauch und den Energieumsatz keinen Einfluss. Es zeigten sich lediglich Unterschiede zwischen postabsorptiven und postprandialen Bedingungen. Niedrigere Werte im O₂-Verbrauch und Energieumsatz waren unter postabsorptiven Umständen zu verzeichnen. Einen deutlichen Unterschied zeigte der Verlauf des respiratorischen Quotienten in der Dunkelphase (Abb. 3-31). Am Anfang der ITK-Messung hatten die Mäuse kein Futter, so dass der RQ nahe 0,7 liegt und der Energiebedarf hauptsächlich aus der Fettoxidation gedeckt wurde. Den Tieren wurde 2

Stunden vor Beginn der Dunkelheit (16:00 Uhr) Zugang zum Futter gewährt. Nach Futtergabe ließ sich ein Anstieg des RQ in allen Gruppen verzeichnen. Jedoch lag der RQ bei den EGCG-gefütterten Mäusen in der Dunkelphase deutlich über dem der Kontrollgruppe. Der mittlere RQ in der Dunkelphase war durch das EGCG signifikant erhöht, was auf eine höhere Oxidation von Kohlenhydraten schließen lässt.

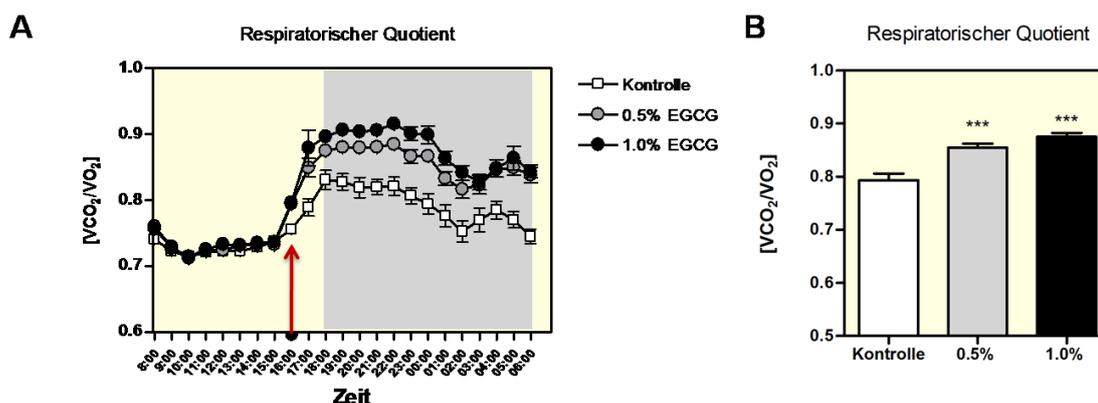


Abb. 3-31: Verlauf des Respiratorischen Quotienten (A) der Mäuse nach 3-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät in unterschiedlichen EGCG-Dosierungen (Versuch 1A) über einen Messzeitraum von 23 h und mittlerer RQ der Dunkelphase (B); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

(Pfeil indiziert die Futtergabe um 16:00 Uhr, graue Fläche stellt die Dunkelphase von 18:00 – 06:00 Uhr dar)

In Abhängigkeit der EGCG-Applikation wurde die Oxidation der drei Makronährstoffe mit Hilfe stabiler Isotope bestimmt. Es wurden die exogene Glucose-, Leucin- und Palmitatoxidation untersucht. Durch Verabreichung eines stabilisotop markierten Substrates konnte die ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse gemessen werden. Abbildung 3-32 zeigt den Verlauf der exogenen Glucoseoxidation und die Darstellung der *Area under curve*. Die Supplementation von EGCG hatte auf die Oxidation der U- ^{13}C -Glucose keinen Einfluss.

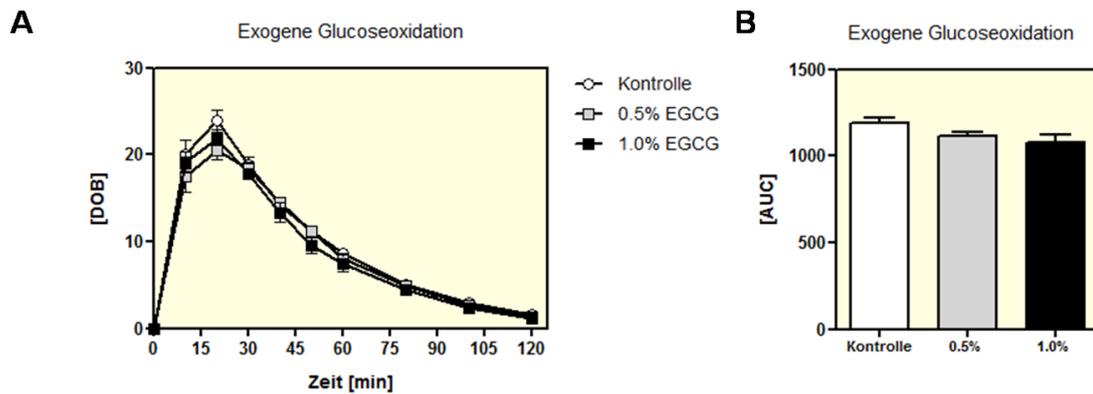


Abb. 3-32: ^{13}C -Anreicherung im Atem der Mäuse (A) und Darstellung der AUC (B) zur Bestimmung der exogenen Glucoseoxidation ($\text{U-}^{13}\text{C}$ -Glucose-Atemtest) mittels stabiler Isotopentechnik nach 2-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische Supplementation von EGCG (Versuch 1A); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Als Marker der Proteinoxidation wurde den Mäusen $\text{U-}^{13}\text{C}$ -Leucin verabreicht und die ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen (Abb. 3-33). Ein Effekt des EGCG auf die exogene Leucinoxidation konnte mit dieser Methode nicht festgestellt werden.

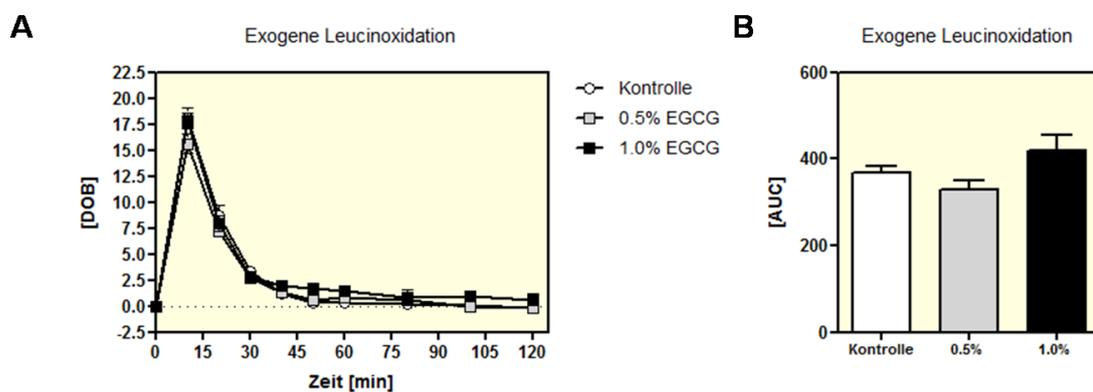


Abb. 3-33: ^{13}C -Anreicherung im Atem der Mäuse (A) und Darstellung der AUC (B) zur Bestimmung der exogenen Leucinoxidation mittels stabiler Isotopentechnik ($\text{U-}^{13}\text{C}$ -Leucin-Atemtest) nach 2-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetische Supplementation von EGCG (Versuch 1A); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Die exogene Palmitatoxidation wurde mit Hilfe des $[1-^{13}\text{C}]$ -Palmitat untersucht (Abb. 3-34). Dieser Tracer ist am Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe markiert, was als letztes die β -Oxidation durchläuft. Das Erscheinen des ^{13}C in der Ausatemluft stellt den kompletten Abbau der Fettsäure dar.

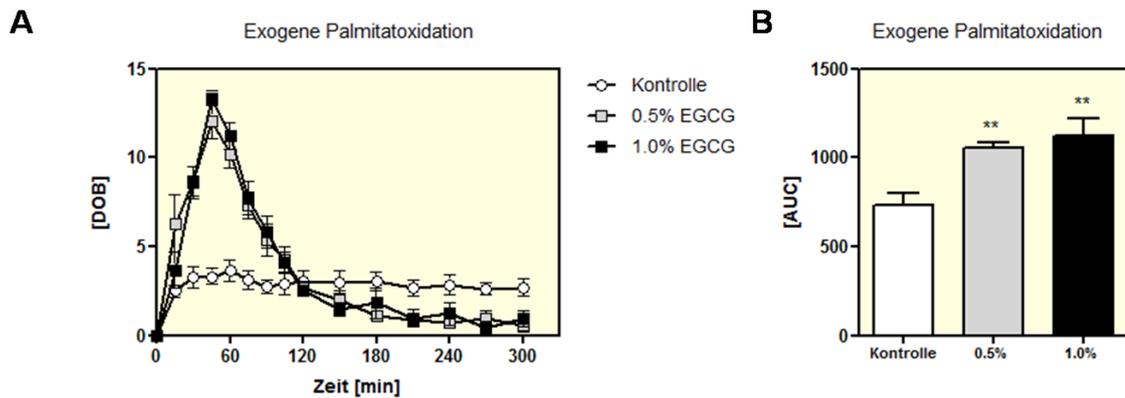


Abb. 3-34: Verlauf (A) und Area under curve (B) der exogenen Fettsäureoxidation ([1-¹³C]-Palmitat-Atemtest) nach 3-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetischer Supplementation des Grünteeextraktes TEAVIGO® (Versuch 1A); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 * vs. Kontrolle)**

Die Oxidation des 1-¹³C-Palmitat resultierte in einer höheren ¹³C-Anreicherung in der Atemluft der Mäuse mit EGCG-Supplementation in der Diät. Somit hatten die EGCG-behandelten Tiere eine erhöhte Fettoxidation.

Die Ergebnisse der exogenen Substratoxidation sind konträr zu den Daten, die mit Hilfe der ITK ermittelt wurden. Die EGCG-Gruppen zeigten in der ITK einen signifikant erhöhten RQ im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Effekt konnte jedoch nicht anhand einer erhöhten exogenen Glucose- und erniedrigten Palmitatoxidation nachgewiesen werden.

Kurzfristige Applikation des EGCG

Effekte des EGCG bezüglich des Energieumsatzes nach kurzfristiger Applikation (Versuch 1B) wurden mit Hilfe der indirekten Tierkalorimetrie ermittelt und sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3-13) dargestellt.

Tab. 3-13: O₂-Verbrauch, Energieumsatz (EU) und Energieumsatz pro metabolischer Körpermasse (EU/MKM) der 23 h-Energieumsatz-Messung nach 3-tägiger Fütterung einer Standard- bzw. Hochfettdiät mit (500 mg/kg KM) und ohne oraler Applikation des EGCG (Versuch 1B); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** vs. Kontrolle)

	SD	SD(+)	HF	HF(+)
<i>postabsorptiv</i>				
VO ₂ [l/d/Tier]	2,07 ± 0,05	1,98 ± 0,06	2,03 ± 0,06	2,02 ± 0,04
EU [kJ/d/Tier]	40,6 ± 1,1	38,9 ± 1,3	39,8 ± 1,2	39,5 ± 0,8
EU/MKM [kJ]	631,4 ± 15,0	623,3 ± 13,4	633,6 ± 16,4	617,8 ± 14,1
<i>postprandial</i>				
VO ₂ [l/d/Tier]	2,45 ± 0,04	2,26 ± 0,06	2,30 ± 0,05	2,23 ± 0,05
EU [kJ/d/Tier]	50,6 ± 0,8	46,6 ± 1,2	46,7 ± 1,0	44,9 ± 1,1
EU/MKM [kJ]	786,7 ± 11,9	747,6 ± 15,9	744,0 ± 12,0	702,0 ± 14,4

(postabsorptiv: 09:00 – 16:00 Uhr → Mäuse hatten kein Futterzugang; postprandial: 16:00 – 07:00 Uhr → Futterzugang)

Auch in diesem Versuch wurde bei der ITK-Messung den Tieren zunächst das Futter verwehrt. Mit Applikation des EGCG per Schlundsonde zwei Stunden vor Beginn der Dunkelheit (16:00 Uhr) bekamen die Mäuse das Futter.

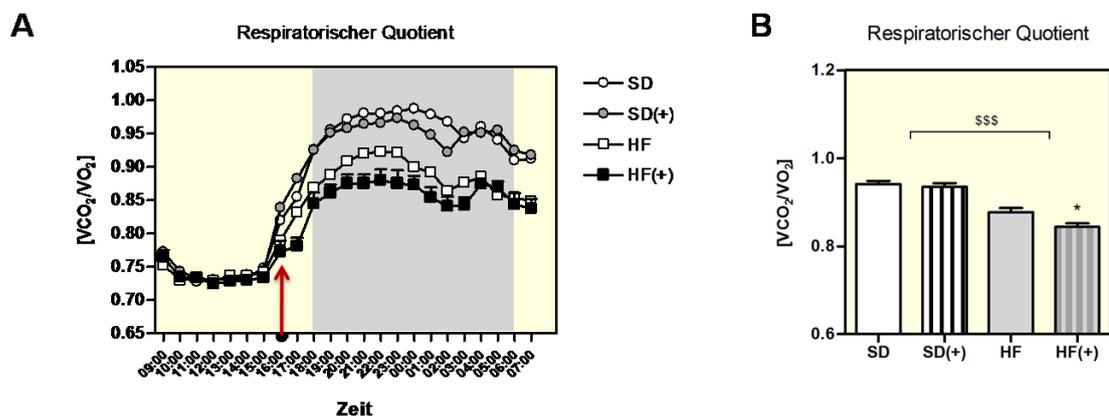


Abb. 3-35: Verlauf des Respiratorischen Quotienten (A) über den Zeitraum von 23 h und mittlerer RQ der Dunkelphase (B) bei Mäusen mit Fütterung einer Standard- bzw. Hochfettdiät am 3. Tag der oralen Applikation des Grünteeextraktes TEAVIGO® (Versuch 1B); (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 *** vs. Kontrolle; p<0,001 \$\$\$ vs. SD) (Pfeil indiziert die Futtergabe und Applikation des TEAVIGO® um 16:00 Uhr, graue Fläche stellt die Dunkelphase von 18:00 – 06:00 Uhr dar)

In der postabsorptiven Phase lag der respiratorische Quotient in allen Gruppen nahe 0,7 (Abb. 3-35). Erst die Futtergabe um 16:00 Uhr führte zu einem Anstieg des respiratorischen Quotienten. In der Aktivitätsphase zeigte der RQ einen höheren Anstieg bei Fütterung einer Standarddiät, was auf einen höheren Kohlenhydratanteil dieser Diät

beruhte. Somit unterschied sich der RQ signifikant zwischen der Standard- und der Hochfettdiät. Das EGCG reduzierte bei gleichzeitiger Fütterung einer Hochfettdiät signifikant den RQ in der Aktivitätsphase der Mäuse am 3. Tag der Applikation. Unter Standarddiät erfolgte keine Beeinflussung durch EGCG.

Die mittels ITK aufgezeigte akute Erhöhung der Fettoxidation bei den EGCG-behandelten Mäuse nach 3 Tagen Applikation konnte anhand der ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse nach Umstellung auf eine maiskeimöhlhaltige Diät bestätigt werden (Abb. 3-36).

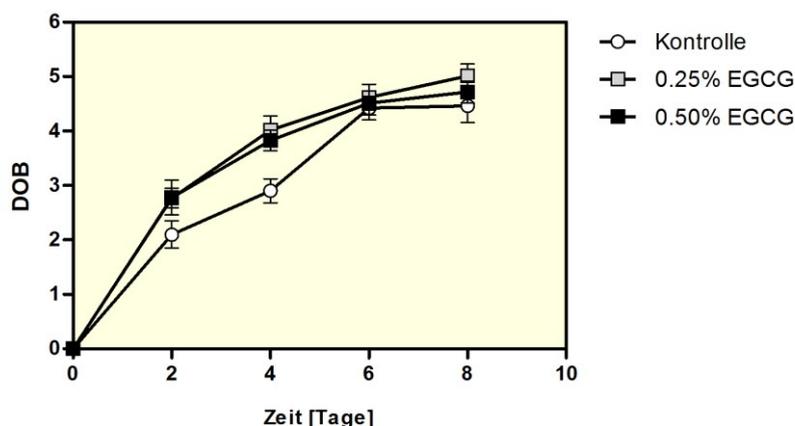


Abb. 3-36: ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse nach Umstellung einer Standarddiät auf eine maiskeimöhlhaltige Hochfettdiät (HDF) mit unterschiedlicher diätetischer EGCG-Supplementation (0.25 % und 0.50 %, Versuch 3); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Die Fütterung der Maisdiät führt zu einer stetigen Zunahme der ^{13}C -Anreicherung im Atemgas aller Mäuse und scheint am Versuchsende in ein Plateau überzugehen. Auffallend ist die signifikant erhöhte ^{13}C -Anreicherung im Atem der EGCG-Gruppen am 2. und 4. Tag nach der Diätumstellung. Diese Mäuse scheinen akut vermehrt exogene Lipide zu oxidieren.

In einem weiteren Versuch wurde die akut erhöhte Fettoxidation mit dem Palmitat-Atemtest nach 2 Tagen diätetischer EGCG-Supplementation untersucht (Abb. 3-37). Dazu wurde den Mäusen markiertes $[1-^{13}\text{C}]$ -Palmitat oral appliziert und die ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft über 5 Stunden hinweg mittels Massenspektrometrie bestimmt.

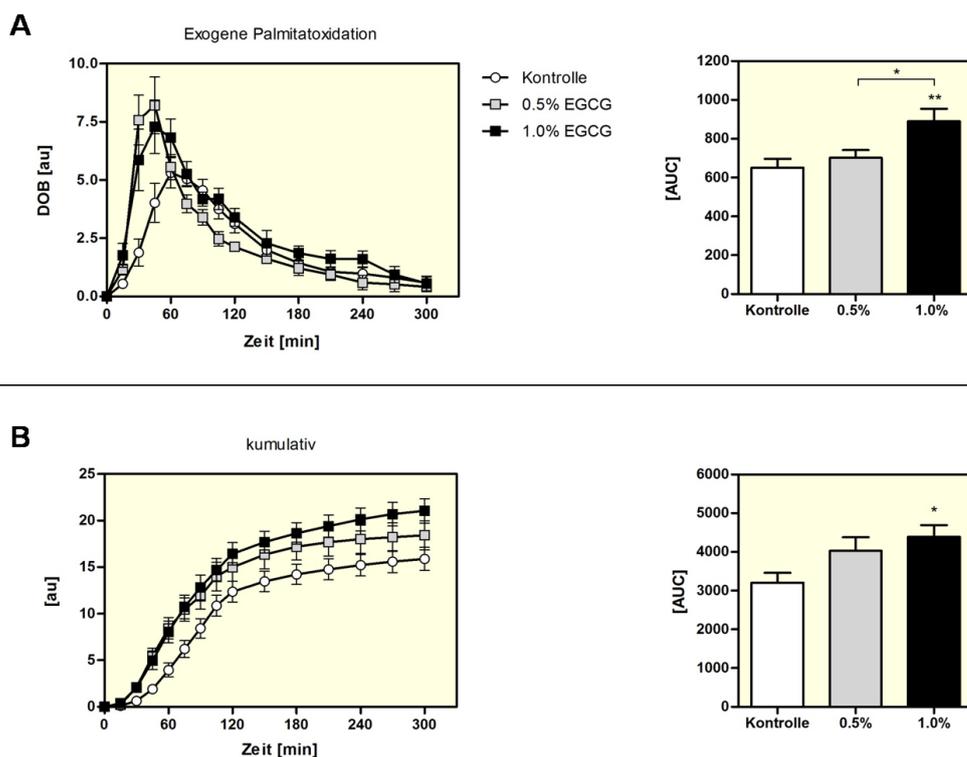


Abb. 3-37: ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse nach 2-tägiger EGCG-Applikation *via* Diät zur Bestimmung der exogenen Fettsäureoxidation mit Hilfe des oral verabreichten stabilisotop markierten Tracers $[1-^{13}\text{C}]$ -Palmitat (DOB = *Delta over baseline*, AUC = *Area under curve*); ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** vs. Kontrolle)

Der Verlauf der exogenen Substratoxidation zeigt, dass das EGCG in den ersten 60 Minuten nach Applikation des stabilen Isotops $[1-^{13}\text{C}]$ -Palmitat zu einer höheren ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse führte. Nach Kalkulation der AUC wird deutlich, dass sowohl die absolute als auch die kumulative ^{13}C -Anreicherung bei Mäusen mit 0.5 % EGCG in der Diät signifikant erhöht war. Diese Mäuse hatten, im Vergleich zur Kontrolle, eine signifikant erhöhte exogene Fettsäureoxidation.

4 Diskussion

Zahlreiche Studien an Mensch und Tier konnten eine günstige Beeinflussung der Körpermasse und verschiedener Stoffwechselfparameter nach grünem Teekonsum bzw. der Gabe eines Grünteeextraktes aufzeigen (Wolfram, 2007). Grüner Tee, insbesondere EGCG, kann direkt und/oder indirekt auf unterschiedliche biologische und zelluläre Prozesse einwirken. Demnach können verschiedene Ebenen des Substrat- und Energiestoffwechsels und damit die Körper- und Fettmasse positiv beeinflusst werden. Grüner Tee kann in Prozesse von Fettzellen, der Energieaufnahme und des Energieverbrauchs eingreifen (Kao et al., 2006; Boschmann & Thielecke, 2007). Viele Arbeitsgruppen haben in ihren Studien grünen Tee bzw. Grünteeextrakte verwendet, die neben den Catechinen auch Koffein enthielten. Die daraus resultierenden Veränderungen können auf eine Interaktion der Teekomponenten zurückgeführt werden.

Eine erniedrigte Körpergewichtszunahme und Fettakkumulation zeigten ICR-Mäuse nach Fütterung einer Standarddiät mit 2 % Grünteeextrakt (Zheng et al., 2004). Der hier verwendete Grünteeextrakt enthielt Koffein. Die Autoren schließen darauf, dass die suppressive Wirkung auf einer synergistischen Interaktion zwischen Catechinen und Koffein beruht. Catechine können die COMT inhibieren, die das freigesetzte Noradrenalin infolge einer sympathischen Aktivierung degradiert. Koffein inhibiert die Aktivität der Phosphodiesterasen, die für den durch Noradrenalin induzierten cAMP-Abbau verantwortlich sind. Das synergistische Wirken von Teecatechinen und Koffein erhöht die intrazellulären cAMP-Spiegel und führt zu einer Erhöhung der Thermogenese und Fettoxidation (Dulloo et al., 1999, 2000).

Welchen Einfluss einzelne Grüntee-Catechine haben, wurde bisher nur in wenigen Studien analysiert. In dieser Arbeit lag ein besonderes Interesse an der Untersuchung des vorwiegend im grünen Tee vorkommenden Catechins EGCG. Die synergistische Interaktion zwischen Catechinen und Koffein kann bei den hier dargestellten Ergebnissen vernachlässigt werden, da das verwendete TEAVIGO® kein Koffein enthält. EGCG ist darin in nahezu purer Form mit >94 % enthalten. Klaus et al. (2005) schließt die Aktivierung der Thermogenese als primären Mechanismus des EGCG aus, da es keine Auswirkung auf den Energieumsatz, die Körpertemperatur und die UCP1 (*uncoupling protein 1*)-Expression im braunen Fettgewebe von Mäusen hatte. Das Entkopplerprotein UCP1 ist im BAT an der Regulation der Körpertemperatur und des Körpergewichtes durch kalte- bzw. diätinduzierte Thermogenese in den Mitochondrien beteiligt (Rothwell & Stock, 1979). Es ist ein spezifisches Carrierprotein, das in der inneren Mitochondrienmembran des BAT lokalisiert ist. Seine Aktivierung hat eine gesteigerte β -Oxidation sowie die

Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zur Folge, wobei kein ATP, sondern Wärme gebildet wird. Bei kleinen Säugetieren ist die Entkopplung der Atmungskette im BAT mit einer erhöhten Wärmeproduktion verbunden, was schließlich zu einem schnellen Anstieg der Körpertemperatur führt (Rousset et al., 2004). Ein stimulierender Effekt auf die Fettoxidation durch EGCG kann jedoch in Bezug auf die Inhibierung der COMT nicht ausgeschlossen werden. Das wird durch Studien unterstützt, die eine Stimulierung des Lipidkatabolismus in der Leber durch EGCG beobachteten (Murase et al., 2002, 2009).

Vergleicht man die in der Literatur beschriebenen kurz- und langfristigen Auswirkungen von EGCG, so ergeben sich Unterschiede aufgrund der Applikationsdauer. Es ist nicht klar, ob die Veränderungen in Langzeitstudien auf physiologischer und molekularer Ebene direkt durch EGCG oder indirekt infolge der Fettreduktion hervorgerufen werden. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde deshalb eine kurze bzw. mittelfristige Dauer der Applikation ausgewählt, bei der sich Veränderungen in der Körperzusammensetzung noch nicht deutlich manifestierten.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, kurz- und mittelfristige Effekte einer EGCG-Applikation zu untersuchen, die zu einer Reduktion der Körpermasse und den damit verbundenen Veränderungen im Substrat- und Energiestoffwechsel bei Mäusen führen. In mehreren Versuchen wurde Mäusen eine Hochfettdiät mit und ohne Supplementation von TEAVIGO® in unterschiedlichen Dosierungen gefüttert. Es zeigte sich, dass die Applikationsform (oral, diätetisch) und ihre Dauer unterschiedliche Wirkungen hervorriefen. Nachfolgend die wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen:

- Die orale Applikation des EGCG per Schlundsonde über 3, 5 und 14 Tage (Versuch 1B, 2A, 2B) war, bei gleichzeitiger Fütterung einer Hochfettdiät, von makroskopischen und mikroskopischen degenerativen Veränderungen der Leber begleitet. Diese Effekte wurden nach diätetischer Supplementation der Hochfettdiät mit EGCG nicht beobachtet.
- Die diätetische Supplementation des TEAVIGO® führte zu einer Reduktion der Körpermasse, die mit einer verminderten Körperfettakkumulation einher ging. Die fettfreie Masse wurde durch EGCG nicht beeinflusst.
- Bei gefütterten Mäusen wurden die Lebertriglyceride durch EGCG, im Gegensatz zu gefasteten (12-18 h) Tieren, signifikant erniedrigt. Der Glycogengehalt der Leber war sowohl postabsorptiv als auch postprandial nach EGCG-Behandlung reduziert.

-
- EGCG reduzierte die Inkorporation exogener Lipide in diverse Organe und Gewebe – insbesondere Leber, viszerales und braunes Fettgewebe sowie Skelettmuskel.
 - Die erhöhte Faecesausscheidung bei EGCG-Applikation resultierte in einer signifikant erhöhten Energieausscheidung, wobei sich die Futter- und Energieaufnahme nicht veränderte. Die Darmpassage war durch EGCG nicht erhöht.
 - Die Applikation von EGCG hatte keinen Einfluss auf den Energieumsatz und die Thermogenese.
 - Die kurzfristige Applikation (3 Tage) von EGCG führte zu einer gesteigerten Fettoxidation, während nach mittelfristiger Applikation (3 Wochen) eine gesteigerte Kohlenhydratoxidation beobachtet wurde.

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die metabolischen Veränderungen einer kurz- und mittelfristigen EGCG-Applikation im untersuchten Mausmodell sehr vielfältig sind. Diverse Substratflüsse in verschiedenen Organen und Geweben können von dem Teepolyphenol EGCG beeinflusst werden.

4.1 Lebertoxische Effekte bei oraler Applikation von EGCG

Den Grüntee-Polyphenolen werden zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte (u. a. antioxidativ, antikanzerogen, antiadipogen) zugeschrieben. Das hat dazu geführt, dass grüner Tee bzw. seine Bestandteile als Nahrungsergänzungsmittel und Bestandteil diverser Pharmaka benutzt werden (Schmidt et al., 2005). In Spanien und Frankreich wurden nach dem Konsum des hydro-alkoholischen Grünteeextraktes *Exolise*[®] Fälle mit akutem Leberversagen bekannt (Sedik et al., 2001). Menschen, die eine geringe Aktivität der COMT aufweisen, könnten anfällig für Leberveränderungen sein (Lambert et al., 2007). Die orale Administration von TEAVIGO[®] oder Polyphenon E über 13 bzw. 9 Wochen hinweg resultierte bei Hunden in einer dosisabhängigen Toxizität und Todesfällen. Erbrechen und Diarrhö wurden über den gesamten Interventionszeitraum beobachtet (Isbrucker et al., 2006). Weiterhin ergab die intragstrische Administration von 2000 mg/kg TEAVIGO[®] eine 80 %ige Letalität bei Ratten. *In vitro* Versuche an isolierten Ratten-Hepatocyten wiesen eine geringe Cytotoxizität auf (Schmidt et al., 2005). Galati et al. (2006) beschreibt die cytotoxischen Mechanismen in Hepatocyten mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese Arbeitsgruppe konnte an Mäusen Leberschäden beobachten, die mit einer signifikanten Erhöhung der Alanin-Aminotransferase (ALAT) im

Plasma einher gingen. In verschiedenen Zellkultursystemen konnte EGCG in hohen Konzentrationen die Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) induzieren, wodurch es ein pro-oxidatives/cytotoxisches Potential besitzt (Weisburg et al., 2004; Lambert et al., 2007). Es wird vermutet, dass EGCG und seine Metabolite auch *in vivo* oxidativen Stress induzieren und in hohen Konzentrationen Hepatotoxizität verursachen können (Mazzanti et al., 2009). So führte die intraperitoneale Administration des EGCG zur Entstehung zweier Cystein-Konjugate (EGCG-2'-Cystein, EGCG-2''-Cystein). Diese wurden nur gebildet, wenn EGCG in toxischen Dosen (200 und 400 mg/kg *i.p.*) verabreicht wurde.

In allen Versuchen, in denen EGCG oral appliziert wurde (Versuch 1A, 2A, 2B), fanden sich bei Hochfett-Fütterung bereits nach 3 Tagen auftretende makroskopische Veränderungen der Leber, die auch histologisch in Form von erhöhten Fetteinlagerungen, Vakuolisierungen und Nekrosen nachgewiesen werden konnten (Abb. 3-12, 3-13, 3-14). Nekrose ist eine Form des Zelluntergangs infolge einer Schädigung (physikalisch, chemisch, toxisch, infektiös), die akut oder über einen längeren Zeitraum erfolgen kann (Geier & Trauntwein, 2008). Morphologisch lässt sich zunächst eine Volumenzunahme (Ballonierung) der Zelle beobachten. Infolge dessen können einzelne Zellbestandteile, wie z. B. der Zellkern, fragmentiert und aufgelöst werden (Vakuolisierung). Die Leberzelle reagiert auf einen schädigenden Stimulus auch mit einer Fettleber. Eine zunehmende Verfettung war nach oraler EGCG-Applikation nach 5 und 14 Tagen sichtbar. Eine weitere Steigerung ist die toxische Hepatitis mit Degeneration der Hepatocyten, Entzündungsreaktionen, Cholestase, Pigmentspeicherung, mitotischen Formen und einer Schwellung von Kupffer-Zellen. Diese Anzeichen sind zum Teil reversibel und können zum nekrotischen Zelluntergang führen. Der nekrotische Zelltod zerstört letztendlich die Architektur der Blutzirkulation und des Stofftransportes (Geier & Trauntwein, 2008).

Ursache für die nekrotischen Leberveränderungen nach täglicher oraler Applikation könnte ein ausgeprägter *first-pass*-Effekt des EGCG sein. Darunter versteht man die Eigenschaft von Fremdstoffen bereits vor bzw. während ihrer ersten Passage durch die Leber durch biochemische Reaktionen abgebaut oder deaktiviert zu werden. Ziel dieser biochemischen Reaktionen ist die Inaktivierung von Fremdstoffen. Durch Steigerung der Polarität nimmt deren Wasserlöslichkeit zu, wodurch sich die biliäre und renale Ausscheidung verbessert (Mutschler et al., 2001). Für Teecatechine werden vielfältige Biotransformationen, insbesondere durch Phase-II-Enzyme, beschrieben (Feng 2006). Die Eliminierung des EGCG erfolgt über die Galle in den Darm (Kim et al., 2000; Cabrera et al., 2006). Die orale Applikation des TEAVIGO® erfolgte 16:00 Uhr, 2 Stunden vor Beginn der Dunkel- und Aktivitätsphase der Mäuse. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Tiere in ihrer Ruhephase, in der sie vermutlich wenig Nahrung aufgenommen hatten.

Das applizierte wässrige EGCG könnte unter diesen Bedingungen unverzüglich den Darm erreichen, denn Flüssigkeiten werden schneller als feste Nahrungsbestandteile aus dem Magen entleert (Rehner & Daniel, 2002). Das EGCG kann von den Enterozyten resorbiert werden und gelangt über die Portalvene zur Leber (Okushio et al., 1996). Sowohl Darm als auch Leber können, infolge ihrer enzymatischen Ausstattung mit Phase I- und Phase II-Enzymen, Fremdstoffe metabolisieren. Es wäre denkbar, dass durch schnelle und wiederholte „Anflutung“ des EGCG (tägliche orale Applikation) die Kapazität der Metabolisierung in beiden Organen überschritten war, und toxische Metabolite gebildet wurden. Es könnten auch alternative Biotransformationsreaktionen stattgefunden haben, da EGCG ein potenter Inhibitor der COMT ist (Chen et al., 2004, 2005). Möglicherweise hatte das die Bildung toxischer Metabolite zur Folge, die zur Leberzelldegeneration führten. Die wiederholte regelmäßige Aufnahme des EGCG über mehrere Tage hinweg könnte auch zu einer Induktion entsprechender metabolisierender Enzyme geführt haben. So könnte die Anhäufung eines konjugierten EGCG-Metaboliten als indirektes Hepatotoxin wirken und die Leber schädigen. Die Induktion würde eine erhöhte Ausscheidung des EGCG selbst oder seiner Metabolite bedeuten (Mutschler et al., 2001).

Die hier beobachteten hepatischen Veränderungen unter Hochfett-Fütterung können dem EGCG zugeschrieben werden. Die Bioverfügbarkeit des EGCG nach oraler Administration ist gering und wird von Lambert et al. (2003) mit 12,4 % beziffert. Sie kann unter spezifischen Bedingungen wie Fasten und wiederholter Aufnahme zu erhöhten Plasmaspiegeln führen. Infolge biochemischer Reaktionen können toxische Konjugate entstehen (Mutschler et al., 2001; Lambert et al., 2007). Das Risiko der Nebenwirkungen der Tee-Polyphenole erhöht sich bei der Verwendung pharmakologischer Dosen, die sich aus Situationen der Prävention, Therapie und Supplementation ergeben. Genetische Polymorphismen und Medikamenten- bzw. Diät-Interaktionen könnten die Bioverfügbarkeit der Polyphenole erhöhen (Lambert et al., 2007). Für humane Anwendungen scheint es somit unerlässlich zu sein, den Benutzern detaillierte Informationen zu den möglichen Risiken zukommen zu lassen.

Dagegen kommt es bei diätetischer Verabreichung von EGCG zu einer gleichmäßigeren, über den Tag verteilten Aufnahme und Absorption. Durch den komplexen Verbund des EGCG mit Nahrungsbestandteilen wird es portionsweise aus dem Magen entlassen, was eher zu einer verzögerten Metabolisierung im Darm und Leber führt. Die Supplementation der Hochfettdiät mit EGCG wurde von den Mäusen gut vertragen, jegliche Zellschädigung der Leber blieb aus (Abb. 3-15). Daher sind im Weiteren vorwiegend Ergebnisse nach diätetischer EGCG-Applikation diskutiert.

4.2 Physiologische Effekte von EGCG

4.2.1 Körpermasse und Körperzusammensetzung

Grüner Tee kann die Körper- und Fettmasse reduzieren (Moon et al., 2007; Wolfram, 2007). Viele Maus- und Rattenmodelle konnten unter langfristiger Fütterung einer Hochfettdiät und gleichzeitiger Verabreichung von grünem Tee bzw. eines Grünteeextraktes eine verminderte Körpermasse und Körperfettansammlung verzeichnen (Choo, 2003; Hasegawa et al., 2003; Murase et al., 2002; Klaus et al., 2005). Die orale Administration von grünem Tee und Koffein im Trinkwasser führte bei SHK-1-Mäusen nach 15-wöchiger Aufnahme zu einer erhöhten Muskelmasse und verminderter Fettmasse (Michna et al., 2003). Ein Einfluss auf die Muskelmasse der Mäuse blieb aus, wenn diese entkoffeinierten grünen Tee *via* Trinkwasser aufnahmen. Die fettreduzierende Wirkung der Teecatechine konnte auch in einer Humanstudie bestätigt werden. Die Einnahme eines Grünteeextraktes über 3 Monate hinweg resultierte in einer Verringerung der Körpermasse und des Taillenumfanges an moderat adipösen Patienten (Chantre & Lairon, 2002). Eine mögliche Erklärung wird in der thermogenen Wirkung des grünen Tees und einer damit verbundenen Erhöhung des Energieumsatzes gesehen (Dulloo et al., 1999; Murase et al., 2002; Wolfram et al., 2006a).

EGCG in nahezu reiner Form (TEAVIGO[®]) reduzierte die Körpermasse von Mäusen nach 4-wöchiger Supplementation einer Hochfettdiät (Klaus et al., 2005). Dies war ausschließlich auf eine Verminderung der Fettmasse zurückzuführen, während die fettfreie Masse von einer EGCG-Wirkung nicht beeinflusst wurde. Es wird vermutet, dass die Reduktion der Körper- und Fettmasse bei EGCG-Applikation durch eine reduzierte Lipogenese, erhöhte Lipolyse und verminderter Fettabsorption im Darm zustande kommt. Wolfram et al. (2005) zeigte an C57BL/6-Mäusen und Sprague-Dawley-Ratten, dass die diätetische Supplementation einer Hochfettdiät mit TEAVIGO[®] über 5 bzw. 4 Monate in beiden Tiermodellen eine diätinduzierte Adipositas unterbinden kann. Antiadipogene Effekte des EGCG waren bei Mäusen stärker ausgeprägt, was auf eine längere Fütterungsdauer und einer höheren Bioverfügbarkeit des EGCG bei Mäusen beruhen könnte (Wolfram et al., 2005; Kim et al., 2000).

Die in der Literatur beschriebene Verminderung der Körper- und Fettmasse wurde hauptsächlich nach langfristiger Applikation beobachtet. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zeigen, dass bereits eine kurz- und mittelfristige EGCG-Applikation eine Reduktion der Körpermasse zur Folge hatte. Sie ist ausschließlich auf eine Verringerung des Körperfettanteils zurückzuführen, während die fettfreie Masse durch EGCG unbeeinflusst blieb (Abb. 3-1, Tab. 3-1, 3-2). Besonders ausgeprägt war die Reduktion der Körper- und Fettmasse nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät, die einen hohen

Anteil gesättigter Fettsäuren aufwies. Mögliche Mechanismen der fettreduzierenden Eigenschaften des EGCG werden nachfolgend unter den Punkten 4.3 und 4.4 erläutert.

4.2.2 Lebertriglyceride und -glycogen

Diverse Langzeitversuche konnten zeigen, dass Teecatechine einen positiven Einfluss auf den Triglyceridgehalt der Leber haben. Der hepatische Glycogengehalt fand in den bisher veröffentlichten Studien wenig Beachtung.

In einem Langzeitversuch bei Mäusen resultierte die Supplementation einer Hochfettdiät mit Teecatechinen in einem verminderten Triglyceridgehalt der Leber, der Cholesterolgehalt war nicht beeinflusst (Murase et al., 2002). Diese Studie konnte eine erhöhte Aktivität der hepatischen β -Oxidation nachweisen. Die Entstehung einer hepatischen Steatose wurde nach 16-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät durch EGCG-Supplementation bei Mäusen abgewandt (Bose et al., 2008). Hepatocyten von EGCG-Mäusen wiesen nach histologischer und biochemischer Untersuchung weniger Triglyceride auf. Da eine hepatische Steatose bei Mensch und Nagern mit einer Insulinresistenz assoziiert ist, könnte die EGCG-Wirkung die hepatische Insulinsensitivität verbessern (Samuel et al., 2004; Bose et al., 2008).

Die in der Literatur beschriebene Verminderung der Lebertriglyceride konnte auch in den Versuchen dieser Arbeit nachgewiesen werden. Es sei hervorzuheben, dass bereits die kurzfristige Applikation des EGCG über 4 Tage die Lebertriglyceride bei gefütterten Mäusen verminderte (Abb. 3-17, 3-18). Dagegen wiesen Mäuse mit nächtlichem Futterentzug keine Unterschiede im Triglyceridgehalt der Leber auf (Abb. 3-17, 3-18). Der niedrige Triglyceridgehalt der Leber bei gefütterten Mäusen mit EGCG-Supplementation lässt eine verminderte intestinale Fettaufnahme bzw. einen erhöhten Lipidkatabolismus vermuten. Das wird auch durch erniedrigte Triglyceride im Plasma nach Futteraufnahme und EGCG-Applikation bekräftigt (siehe 4.2.3).

Gefütterte Mäuse wiesen, im Vergleich zu Mäusen mit nächtlichem Futterentzug, einen höheren Glycogengehalt in der Leber auf (Abb. 3-19). Nach Nährstoffzufuhr speichert die Leber den Energieträger Glucose in Form von Glycogen. Nahrungskarenz von 12-18 h führt dagegen zu einer Entleerung der Glycogenspeicher in der Leber. Die Glucose aus Leberglycogen wird für den gesamten Organismus bereitgestellt (Rehner & Daniel, 2002). Die biochemische Quantifizierung des Glycogengehaltes der Leber ergab bei Mäusen mit EGCG-Supplementation sowohl unter postabsorptiven (14-16 h) als auch unter postprandialen Bedingungen eine signifikante Verminderung (Abb. 3-19). Das bedeutet, dass EGCG die hepatische Glycogenspeicherung nicht nur postprandial reduziert.

4.2.3 Plasmaparameter

Viele Studien beschreiben eine Reduktion der Plasmalipide (Triglyceride, freie Fettsäuren, Cholesterol) nach Konsum von grünen Tee bzw. Grünteeextrakten (Raederstorff et al., 2003; Wolfram et al., 2006b; Lee et al., 2009). Erniedrigte Cholesterol- und LDL (*low density lipoprotein*)-Level im Plasma hatten Ratten mit 1,0 % EGCG nach 4-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät, die Triglyceride und HDL (*high density lipoprotein*)-Spiegel unterschieden sich nicht (Raederstorff et al., 2003). Eine Reduktion des postprandialen Anstiegs der Triglyceride im Blutplasma nach GTE-Applikation zeigten sowohl Tierversuchsstudien als auch klinische Studien (Suzuki et al., 2005; Ikeda et al., 2005; Unno et al., 2009). Es wird vermutet, dass mindestens zwei verschiedene Mechanismen für den Triglycerid-reduzierenden Effekt des EGCG verantwortlich sind – die intestinale Inhibierung der Lipidabsorption und eine Aktivierung des Triglycerid-Katabolismus in der Blutzirkulation (Suzuki et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass bereits eine kurz- und mittelfristige EGCG-Applikation Triglyceride und freie Fettsäuren im Plasma reduzierte. Eine Reduktion des Cholesterol im Blutplasma konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht gefunden werden (Tab. 3-3, 3-4). Die kurze Dauer der TEAVIGO®- Intervention (7 bzw. 4 Tage Fütterung) bzw. die verwendete, cholesterolfreie Diät (Versuch 3) könnte dazu geführt haben, dass keine Effekte auf den Cholesterolgehalt des Plasmas zu beobachten waren.

Die 7-tägige Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) ergab postabsorptiv (14-16 h Futterentzug) in der 0.5 % EGCG-Gruppe geringere freie Fettsäuren im Blutplasma, während keine Unterschiede im Gehalt der Triglyceride, Cholesterol und β -Hydroxybutyrat zu verzeichnen waren. Deutlich zeigte sich, dass die Fütterung einer Hochfettdiät, im Vergleich zu einer Standarddiät, zu einem Anstieg der Plasmalipide führte, was mit anderen Studien übereinstimmt (Ahrén et al. 1997). Im postabsorptiven Zustand ist die Nahrung komplett absorbiert. In dieser Zeit werden endogene Energiespeicher mobilisiert und zur Energiegewinnung genutzt. Albumingebundene freie Fettsäuren im Blut stammen im postabsorptiven Status vorwiegend aus der Lipolyse im Fettgewebe und können in diesem Zustand als Marker der Lipolyse angesehen werden (Lewis et al., 2002; Cahová et al., 2007). Die Steuerung der Lipolyse hängt eng mit der Regulation des Blutzuckerspiegels zusammen. Da den Mäusen nachts das Futter entzogen wurde, führte Glucagon zu einem Abbau von Glycogen und zur Freisetzung von Fettsäuren ins Blut. Bei Tieren mit 0.5 % EGCG in der Diät (Versuch 3) scheint die Lipolyse erniedrigt zu sein, da sie geringere freie Fettsäuren im Plasma aufwiesen. Unterstützt wird dies durch eine herabgesetzte Genexpression

lipolytischer Enzyme (HSL, ATGL) im Fettgewebe (siehe 4.4.3). Die EGCG-Mäuse hatten trotz Hochfettdiät am Ende des Versuchs weniger Fettmasse akkumuliert. Da die Fettoxidation im Organismus durch die Verfügbarkeit freier Fettsäuren gesteuert wird, könnte eine durch EGCG verminderte Körperfettmasse zu einer geringeren Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe geführt haben (Peters, 2003).

Die 4-tägige Fütterung einer Hochfettdiät mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren (Versuch 4) führte bei Mäusen mit EGCG-Supplementation (0.5 %, 1.0 %) sowohl postabsorptiv (14-16 h Futterentzug) als auch postprandial zu signifikant erniedrigten Triglyceriden im Blutplasma (Tab. 3-4). Der erniedrigte Triglyceridgehalt im Plasma nach Nahrungsaufnahme ist mit anderen Studien übereinstimmend (Ikeda et al., 2005; Suzuki et al., 2005; Unno et al., 2009; Lee et al., 2009).

Die Reduktion der freien Fettsäuren im Plasma war nach 4 Tagen EGCG-Applikation (Versuch 4) absolut größer als bei EGCG-Mäusen, denen eine Mais-Hochfettdiät (Versuch 3) gefüttert wurde. Da die Streuung der Daten innerhalb der Gruppen hoch war, ergab sich jedoch keine Signifikanz.

Nach Nahrungsaufnahme ließen sich erhöhte Plasmalipide in der Kontrollgruppe detektieren (Versuch 4, Tab. 3-4), da entsprechend der Hierarchie zunächst Glucose von den Zellen als Energiesubstrat genutzt und die Fettoxidation supprimiert wird. Die aufgenommenen Lipide verbleiben somit länger in der Zirkulation und werden schließlich im Fettgewebe gespeichert (Jequier, 2001).

Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät über 7 Tage (Versuch 3, Tab. 3-3) lieferte niedrigere Plasmalipid-Spiegel als die 4-tägige Fütterung einer Hochfettdiät, deren Fettquelle aus Palmkernfett, Distel- und Leinöl bestand. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fettquellen ergeben sich Unterschiede in der diätetischen Fettsäurezusammensetzung (Tab. 4-1).

Verschiedene Tierversuchsstudien resultierten in einer geringeren Fettakkumulation und niedrigeren Plasmalipiden, wenn die angebotene Diät viel ungesättigte Fettsäuren, im Vergleich zu gesättigten Fetten, enthielt (Shimomura et al., 1990; Dulloo et al., 1995; Flint et al., 2003).

Hervorzuheben ist, dass bereits die kurz- und mittelfristige Applikation von EGCG die Plasmalipide bei gleichzeitiger Fütterung einer Hochfettdiät verringerte. Die Fettsäurezusammensetzung der Diät hatte einen entscheidenden Einfluss bei der Reduktion der Plasmalipide durch EGCG. Bei einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren in der Diät war die Reduktion der Plasmalipide durch EGCG besonders stark ausgeprägt.

Tab. 4-1: Fettsäurezusammensetzung (Angaben in % der bestimmten Fettsäuren) der Hochfettdiäten nach 7- bzw. 4-tägiger Fütterung (Versuch 3 vs. Versuch4) mit und ohne EGCG-Applikation (DGF: Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaft)

Fettsäure	Versuch 3 Maiskeimöl [%] lt. DGF	Versuch 4 Palmkernfett, Lein- und Distelöl [%]
C8:0	n.n.	0,39
C10:0	n.n.	3,73
C12:0	n.n.	42,55
C14:0	n.n. – 0,3	19,61
C16:0	8,6 – 16,5	10,97
C16:1	n.n. – 0,5	0,04
C18:0	n.n. – 3,3	3,45
C18:1 cis	20,0 – 42,2	11,66
C18:1 trans		0,34
C18:2 cis	34,0 – 65,6	4,50
C18:2 trans		0,02
C18:3	n.n. – 2,0	2,18
C20:0	0,3 – 1,0	
C20:1	0,2 – 0,6	

n.n. : nicht nachweisbar

4.2.4 Lipid-Inkorporation in verschiedene Organe und Gewebe

Es ist bekannt, dass Teecatechine *in vivo* die viszerale Fettakkumulation (epididymale, retroperitoneale, perirenale Fettdepots) signifikant vermindern (Murase et al., 2002; Bose et al., 2008).

Die Inkorporation natürlicher ^{13}C -markierter Nahrungslipide in Abhängigkeit einer EGCG-Applikation wurde *in vivo* bisher in keiner Studie untersucht. Grundgedanke dieses Versuchsansatzes lag darin, dass die diätetische Aufnahme ^{13}C -markierter Lipide die Fettgewebzusammensetzung und dadurch das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis verändert (Fernández-Quintela et al. 2007). Mit Hilfe einer maiskeimöhlhaltigen Diät wurde die Inkorporation diätetischer Lipide untersucht. Mais gehört zu den C4-Pflanzen, die vermehrt das schwerere Kohlenstoff-Isotop ^{13}C anreichern. Den Mäusen wurde eine Hochfettdiät gefüttert, die Maiskeimöl als einzige Fettquelle enthielt. Sie wies, im Gegensatz zur zuvor gefütterten Standarddiät (δ -Wert: -23,53 ‰), eine größere natürliche ^{13}C -Anreicherung (δ -Wert: -15,95 ‰) auf. Mittels IRMS konnte die ^{13}C -Anreicherung in verschiedenen Fettdepots (epididymales, viszerales, subkutanes, braunes Fettgewebe), Leber, Skelettmuskel und Blutplasma bestimmt werden. Des Weiteren wurde die Anreicherung des ^{13}C -Isotopes in den Atemgasen und Faeces der Mäuse ermittelt.

Letztere steht für die Ausscheidung diätetischer Lipide, während die Anreicherung im CO₂ der Atemgase die Oxidation exogener Lipide widerspiegelt.

In allen untersuchten Organen und Geweben sowie im Blutplasma konnte eine verminderte Inkorporation ¹³C-markierter Triglyceride aus Maiskeimöl nach TEAVIGO®-Supplementation festgestellt werden. Somit enthielten die untersuchten Organe/Gewebe weniger exogene Triglyceride. Insbesondere reduzierte EGCG die Inkorporation exogener Lipide in Leber, viszerales und braunes Fettgewebe, Skelettmuskel sowie Blutplasma (Abb. 3-3, 3-16, 3-25, 3-30). Die verminderte ¹³C-Anreicherung im Plasma der EGCG-Tiere bedeutet, dass weniger exogene Lipide darin zirkulierten. Bekräftigt wird das durch erniedrigte Triglyceride im Blutplasma der EGCG-Mäuse (siehe 4.2.3).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass deutliche physiologische Veränderungen bereits nach kurz- und mittelfristiger EGCG-Applikation auftraten. Trotz Fütterung einer Hochfettdiät zeigten EGCG-behandelte Tiere schon nach kurzer Intervention eine reduzierte Körperfettzunahme. Ein verminderter Triglycerid- und Glycogengehalt in der Leber von EGCG-behandelten Mäusen ließ sich insbesondere unter postprandialen Bedingungen verzeichnen. Auch die Plasmalipide konnten durch EGCG nach kurzer Zeit vermindert werden. Mit der Untersuchung der Lipid-Inkorporation konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass EGCG die Fettakkumulation der Mais-Lipide in diverse Fettdepots und Organe verminderte und damit zu einer geringeren Körperfettzunahme führte.

Betrachtet man die vielfältigen physiologischen Effekte einer EGCG-Applikation, stellt sich die Frage, welche Mechanismen daran beteiligt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des EGCG auf die Energiebilanz und molekularer Ebene untersucht, was nachfolgend diskutiert wird.

4.3 Effekte von EGCG auf die Energiebilanz

4.3.1 Futteraufnahme

Studien von Kao et al. (2000) zeigten, dass die intraperitoneale Injektion von EGCG den Appetit und die Futteraufnahme bei Ratten modulieren kann. Die Route der Administration (intraperitoneal vs. oral) war für diesen Effekt von entscheidender Bedeutung. So reduzierte *i.p.*-injiziertes EGCG die Futteraufnahme in einem größeren Ausmaß als diätetisches EGCG. Die Autoren führen diesen Effekt auf eine ineffiziente Absorption des EGCG zurück, die durch Interaktion mit Nahrungsbestandteilen oder durch eine EGCG-

Wirkung im Intestinaltrakt zustande kommt. Dagegen konnten Murase et al. (2002) und Klaus et al. (2005) keine Unterschiede in der Futter- und Energieaufnahme bei EGCG-Applikation verzeichnen.

In keinem Versuch dieser Arbeit ließen sich Unterschiede in der Futter- und Energieaufnahme zwischen den Kontrolltieren und den EGCG-Mäusen feststellen (Tab. 3-5, 3-6), was sich mit den zuvor genannten Studien deckt (Murase et al., 2002; Klaus et al., 2005).

4.3.2 Energieumsatz und Substratoxidation

Humane und Tierversuchsstudien konnten eine Erhöhung des Energieumsatzes durch koffeinhaltigen grünen Tee bzw. Grünteeextrakte feststellen (Dulloo et al., 1999; Choo, 2003). Einen um 4 % erhöhten Energieumsatz und niedrigeren RQ sah Dulloo et al. (2000) nach Verabreichung eines GTE bei jungen Männern. Koffein allein konnte keinen dieser Effekte bewirken, so dass Teecatechine zur thermogenen Wirkung beitragen. Energieumsatz und Fettoxidation stehen unter der Kontrolle des sympathischen Nervensystems. Seine Aktivierung hat die Ausschüttung des Neurotransmitters Noradrenalin zur Folge, der an β -adrenerge Rezeptoren der Plasmamembran von Muskel- und Fettzellen bindet. Die Bindung an Fettzellen setzt eine Signalkaskade in Gang, die intrazellulär zur Bildung von cAMP führt. Dieser „*second messenger*“ aktiviert eine Proteinkinase, die wiederum HSL stimuliert. Folglich können Fettsäuren aus Triglyceriden freigesetzt und in die Blutzirkulation entlassen werden. EGCG und Koffein haben unterschiedliche zelluläre Angriffspunkte. Sie können synergistisch die intrazellulären cAMP-Spiegel erhöhen und die thermogene Wirkung vermitteln (Dulloo et al., 2000; Wolfram et al., 2006a).

Es existieren nur wenige humane Studien, die einen GTE ohne Koffein getestet haben. Effekte des koffeinfreien Grünteeextraktes TEAVIGO[®], der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, untersuchten Boschmann & Thielecke (2007) auf den Ruhestoffwechsel und die postprandiale Thermogenese beim Menschen. Der Extrakt wurde stark übergewichtigen Probanden in Kapselform (300 mg TEAVIGO[®]) mit einer definierten Mahlzeit verabreicht. Obwohl keine Effekte auf den Energieumsatz ermittelt wurden, war der postprandiale RQ nach TEAVIGO[®]-Gabe vermindert und ergab eine erhöhte Fettoxidation nach Verzehr der Mahlzeit. Somit scheint für den thermogenen Effekt des GTE eine Kombination von Teecatechinen und Koffein notwendig zu sein, während EGCG für die Steigerung der Fettoxidation verantwortlich ist.

Die orale TEAVIGO®-Applikation (500 mg/kg KM) über 3 Tage resultierte bei NZB-Mäusen in einem verminderten RQ in der Dunkel- und Aktivitätsphase, was auf eine erhöhte Fettoxidation hindeutet (Klaus et al., 2005). Der Energieumsatz war in dieser Studie nach akuter Applikation von EGCG nicht beeinflusst. Murase et al. (2009) konnte ebenfalls akut eine Erhöhung der Fettoxidation nach oraler EGCG-Administration (200 mg/kg KM) ermitteln.

Choo (2003) beschrieb einen erhöhten Energieumsatz bei Ratten, denen eine Hochfettdiät mit GTE über 14 Tage gefüttert wurde. Zudem fand er eine erhöhte Thermogenese im BAT und eine leicht verringerte Nahrungsverdaulichkeit. Letztere wurde auch in den hier durchgeführten Versuchen ermittelt (siehe 4.3.3). Die langfristige GTE-Supplementation führte bei Mäusen zu einer erhöhten Fettoxidation (Shimotoyodome et al., 2005). Die Kombination aus GTE und körperlicher Aktivität erhöhte diesen Effekt. Eine andere Studie konnte nach 10-wöchiger Fütterung von Mäusen mit GTE einen niedrigeren RQ und damit eine höhere Fettoxidation feststellen (Murase et al., 2005).

Der Einfluss des Grünteeextraktes TEAVIGO® auf den Energieumsatz und die Substratoxidation wurde mit Hilfe indirekter Tierkalorimetrie und stabiler Isotopentechnik bestimmt. Es wurden Wirkungen einer kurz- und mittelfristigen EGCG-Applikation untersucht, die nachfolgend getrennt diskutiert werden.

Kurzfristige EGCG-Applikation

Kurzfristige Effekte von EGCG wurden am 3. Tag der oralen Applikation (Versuch 1B) auf den Energieumsatz und die Substratoxidation mittels ITK bestimmt. Zu Beginn der ITK-Messung wurde den Tieren das Futter entzogen. Mit Applikation des EGCG (500 mg/kg KM) per Schlundsonde um 16:00 Uhr wurde den Mäusen das Futter bis zum Ende der ITK-Messung am nächsten Tag angeboten. Das ließ eine Unterscheidung der ITK-Parameter in postabsorptiv und postprandial zu. In beiden metabolischen Zuständen unterschieden sich Energieumsatz und O₂-Verbrauch nicht zwischen den Gruppen (Tab. 3-12). Postabsorptiv lag der RQ in allen Gruppen nahe 0,7 (Abb. 3-35), was sich mit den Daten nach mittelfristiger EGCG-Applikation deckt und auf eine erhöhte Fettoxidation in der Ruhephase schließen lässt. Die Futtergabe um 16:00 Uhr führte in allen untersuchten Gruppen zu einem Anstieg des RQ, da sich der Energieverbrauch durch Nahrungsaufnahme erhöht und einen Anstieg der Wärmebildung zu Folge hat. Ein deutlicher Unterschied ergab sich für den RQ zwischen Standard- und Hochfettdiät. Die Fütterung einer Hochfettdiät resultierte in der Dunkel- und Aktivitätsphase in einem

niedrigeren RQ, da der Kohlenhydratanteil dieser Diät, im Vergleich zur Standarddiät, geringer ist. Unter Standarddiät blieb der RQ durch EGCG unbeeinflusst. Demgegenüber konnte die kurzfristige EGCG-Applikation bei Hochfett-Fütterung den RQ in der Aktivitätsphase reduzieren, was auf eine gesteigerte Fettoxidation hindeutet. Dieser EGCG-Effekt ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen, die an anderen Mausmodellen (NZB-Mäusen, BALB/c-Mäuse) nach akuter Applikation gewonnen wurden (Klaus et al., 2005; Murase et al., 2009).

Die eben beschriebene ITK-Messung erfolgte an Mäusen, denen die Testsubstanz oral appliziert (500 mg/kg KM) wurde (Versuch 1B). Da die EGCG-Applikation z. T. makroskopische und mikroskopische degenerative Veränderungen der Leber zur Folge hatte (siehe 4.1), wurde der Einfluss auf die Fettoxidation zusätzlich nach kurzfristiger diätetischer EGCG-Gabe anhand der ^{13}C -Anreicherung der Atemgase bestimmt.

Die kurzfristige EGCG-Applikation *via* Diät konnte ebenfalls die Fettoxidation erhöhen. Das wurde durch eine erhöhte ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse nach Umstellung einer Standard- auf eine maiskeimöhlhaltige Diät bestätigt (Abb. 3-32, Versuch 3). Der Verlauf der ^{13}C -Anreicherung im Atemgas der Mäuse über den Versuchszeitraum von 7 Tagen ließ einen stetigen Anstieg des schwereren ^{13}C -Isotopes nach Diätumstellung erkennen, der am Versuchsende in ein Plateau überging. Am 2. und 4. Tag der Mais-Hochfettdiät hatten EGCG-Mäuse eine höhere ^{13}C -Anreicherung im Atem als die Kontrolltiere. Folglich oxidierten diese Mäuse akut mehr exogene ^{13}C -markierte Triglyceride aus Maiskeimöl.

Die akute Erhöhung der exogenen Fettoxidation nach diätetischer EGCG-Gabe konnte weiterhin mit dem [1- ^{13}C]-Palmitat-Atemtest verifiziert werden (Abb. 3-33, Versuch 4). Der Atemtest war bei EGCG-Mäusen nach 2 Tagen Fütterung mit einer höheren ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft verbunden, was eine Erhöhung der exogenen Fettsäureoxidation bedeutet.

Mittelfristige EGCG-Applikation

Die mittelfristige Wirkung des EGCG wurde auch auf postabsorptive und postprandiale ITK-Parameter untersucht. Nach 3-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät mit (0.5 %, 1.0 %) und ohne diätetischer EGCG-Supplementation (Versuch 1A) unterschieden sich postabsorptiver und postprandialer O_2 -Verbrauch und Energieumsatz der Mäuse nicht voneinander (Tab. 3-12). Nach Futtergabe (16:00 Uhr) ließ sich auch nach mittelfristiger EGCG-Administration ein Anstieg des Energieumsatzes und RQ in allen Gruppen verzeichnen. Bei Mäusen mit EGCG-Applikation war der RQ in der Dunkelphase nach 3-

wöchiger Fütterung dosiabhängig erhöht (Abb. 3-34), was auf eine gesteigerte Oxidation von Kohlenhydraten schließen lässt.

Mit Hilfe stabiler Isotope wurde die Oxidation verschiedener Nährstoffe nach 2- bzw. 3-wöchiger Hochfett-Fütterung in Abhängigkeit der EGCG-Applikation bestimmt. Die exogene Glucose-, Leucin- und Palmitatoxidation konnte durch Messung der ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der Mäuse gemessen werden. Die Supplementation von EGCG hatte auf die Oxidation der U- ^{13}C -Glucose und U- ^{13}C -Leucin keinen Einfluss (Abb. 3-35, 3-36). Die exogene Oxidation des [1- ^{13}C]-Palmitat resultierte in einer höheren ^{13}C -Anreicherung in der Atemluft der EGCG-Mäuse (Abb. 3-37) und deutet auf eine erhöhte Fettsäureoxidation hin.

Damit sind die Ergebnisse der exogenen Substratoxidation konträr zu den Daten, die mit Hilfe der ITK ermittelt wurden. Die ITK ergab einen signifikant erhöhten RQ in den EGCG-Gruppen, der eine erhöhte Kohlenhydratoxidation widerspiegelt. Dieser Effekt konnte jedoch nicht anhand einer erhöhten exogenen Glucose- und erniedrigten Palmitatoxidation nachgewiesen werden. Während der RQ die Substratoxidation des gesamten Organismus widerspiegelt, wurde bei den Atemtests jeweils die Oxidation einer einzelnen Fettsäure (Palmitat), Aminosäure (Leucin) bzw. eines Monosaccharids (Glucose) betrachtet. Eine Aussage über die Oxidation komplexer Nährstoffe (Lipide, Kohlenhydrate, Proteine) kann dadurch nicht gemacht werden. Ein Vergleich der exogenen Glucose- und Leucinoxidation mit ITK-Daten ist nicht möglich, da beide Tracer intraperitoneal appliziert wurden. Die intestinale Route wurde damit umgangen. Die Ergebnisse des [1- ^{13}C]-Palmitat-Atemtests nach 3-wöchiger Fütterung stimmen mit den Ergebnissen nach kurzfristiger EGCG-Applikation überein. Hier wiesen die EGCG-Tiere auch eine erhöhte Fettsäureoxidation auf. Dagegen zeigte die Kontrollgruppe eine verzögerte Palmitatoxidation. Es scheint, dass sowohl die kurz- als auch mittelfristige EGCG-Gabe die Oxidation exogener Fettsäuren erhöht. Der Palmitat-Atemtest ist demzufolge nicht zur Beurteilung der Gesamt-Fettoxidation im Organismus geeignet. Vielmehr kann mit Hilfe des Atemtests die Oxidation eines Fettsäure-Bolus bzw. einer Testmahlzeit eingeschätzt werden. Im Hinblick auf die vielfältigen intestinalen Effekte des EGCG wäre es besser, die Substratoxidation, bei Anwendung der Stabilisotopentechnik, mit komplexen Nährstoffen (z. B. ^{13}C -Triolein/ ^{13}C -gemischt Triglyceride, ^{13}C -Protein und ^{13}C -Stärke) zu untersuchen.

Die hier gezeigte Erhöhung der Kohlenhydratoxidation (ITK) nach mittelfristiger EGCG-Applikation deckt sich nicht mit den in der Literatur beschriebenen Studien. Diese haben Grünteeextrakte verwendet, die ein Gemisch verschiedener Teekomponenten enthielten. Somit könnte das synergistische Wirken von Teecatechinen und Koffein die Fettoxidation erhöht haben (Dulloo et al., 1999, 2000). Die von Murase et al. (2005) beschriebene

Erhöhung der Fettoxidation wurde auch mit Hilfe der ITK bestimmt, die sich jedoch stark von der hier angewandten Messung unterschied. Den Tieren wurde zunächst für 12 h das Futter entzogen, danach erhielten sie für 1 h Zugang zum Futter, woran sich die ITK-Messung über 5 h anschloss. Bei der hier angewandten ITK-Messung war die Futteraufnahme nicht begrenzt. Die Mäuse hatten in ihrer gesamten Aktivitätsphase Zugang zum Futter.

Mögliche Ursache der erhöhten Kohlenhydratoxidation nach 3-wöchiger EGCG-Applikation könnte eine verminderte basale und exogene Fettoxidation sein, die sich aus der reduzierten Körperfettmasse ergibt.

4.3.3 Energieassimilation

Da EGCG eine geringe Bioverfügbarkeit besitzt, kann es in hohen Konzentrationen im Darmlumen vorliegen und intestinale Prozesse, die an der Verdauung und Absorption beteiligt sind, beeinflussen (Lambert & Yang, 2003; Wang et al., 2006; Koo & Noh, 2007). Als Ursache für die Volumenzunahme der Faeces nach Aufnahme von Catechinen vermuten Hara & Honda (1990) eine Inhibierung Kohlenhydrat-spaltender Enzyme. Catechine konnten zu einer Reduktion der Glucoseaufnahme im Intestinaltrakt von Ratten führen. Durch Inhibierung der α -Amylase- und α -Glucosidase-Aktivität ließen sich erniedrigte Glucose- und Insulinspiegel im Blut nachweisen (Tadera et al., 2006; Shimizu et al., 2000; Matsumoto et al., 1993). Die Inhibierung glycolytischer Enzyme im Intestinaltrakt könnte die Hydrolyse der Kohlenhydrate einschränken, so dass diese vermehrt ausgeschieden werden. Die kürzlich erschienene Studie von Unno et al. (2009) konnte zeigen, dass der faecale Energieverlust bei Fütterung einer Teecatechin-Diät an Ratten hauptsächlich durch einen Verlust an Kohlenhydraten zustande kommt. In den Faeces der Kontrollgruppe wurden nur 0,1 % der aufgenommenen Stärke nachgewiesen, während Ratten mit Teecatechin-Diät 4,8 % der diätetischen Stärke *via* Faeces ausschieden. Die Autoren vermuten, dass die akute Kohlenhydrat-Malabsorption zu einer erhöhten und schnelleren Oxidation aufgenommener Lipide führen könnte, und Glucose für die Energieausnutzung in geringerer Menge zur Verfügung steht.

Eine humane Studie von Zhong et al. (2006) untersuchte die Maldigestion von Kohlenhydraten mittels H_2 -Atemtest nach Konsum einer kohlenhydrathaltigen Testmahlzeit und eines Extraktes aus schwarzem und grünen Tee sowie Maulbeeren. Anhand des erhöhten H_2 in der Atemluft ließ sich nach Aufnahme des Extraktes eine Kohlenhydrat-Malabsorption feststellen. Nicht resorbierte Kohlenhydrate gelangen in den

Dickdarm. Sie sind Substrate der dort angesiedelten Mikroorganismen und werden zu Acetat, Propionat, Butyrat, Lactat, H₂, CO₂ und CH₄ abgebaut (Caspary, 1992).

Weiterhin wurde eine Verringerung der Verdaulichkeit bei Ratten und Mäusen nach Fütterung einer Hochfettdiät mit Grünteeextrakt bzw. EGCG beobachtet (Choo, 2003; Klaus et al., 2005). Begleitet wird das von einer erhöhten Gesamtfett- und Cholesterolausscheidung, Proteinausscheidung und bereits erwähnter Kohlenhydratausscheidung (Koo & Noh, 2007; Raederstorff et al., 2003; Ohnishi et al., 2005; Unno et al., 2009).

Ursache einer erhöhten Gesamtfett- und Cholesterolausscheidung in den Faeces nach Teecatechin-Applikation sehen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien in der Inhibierung der intestinalen Absorption diätetischer Lipide (Koo & Noh, 2007; Raederstorff et al., 2003; Nakamura et al., 2002). Dass Teecatechine die Aktivität der gastrischen und pankreatischen Lipase hemmen können, wurde erstmals in einer *in vitro* Studie von Juhel et al. (2000) gezeigt. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss eines Grünteeextraktes auf die Aktivität der gastrischen und pankreatischen Lipase. Die Zugabe des Grünteeextraktes verminderte die Aktivität beider Lipasen und hemmte die Emulgierung der Lipide. Auch Ikeda et al. (2005) demonstrierte, dass EGCG und ECG dosisabhängig die pankreatische Lipase *in vitro* inhibieren. Der Effekt der Teecatechine auf den Prozess der Lipidemulgierung wurde von Shishikura et al. (2006) anhand einer Modell-Emulsion (Olivenöl, Phosphatidylcholin, Gallensäuren) bestimmt. Besonders EGCG veränderte die physikochemischen Eigenschaften der Lipidemulsion durch Erhöhung der Teilchengröße und Reduzierung der Oberfläche. Solche Veränderungen könnten die Hydrolyserate der Lipide verlangsamen, da die Aktivität der pankreatischen Lipase mit steigender Tropfengröße der Emulsion und Reduzierung der Oberfläche abnimmt (Armand et al., 1999; Koo & Noh, 2007).

Ohnishi et al. (2005) und Unno et al. (2009) konnten mit ihren Studien zeigen, dass eine Supplementation der Diät mit Teecatechinen in einer erhöhten faecalen Proteinausscheidung resultiert. Die verminderte Proteinverdauung im Dünndarm konnte die Aktivität der Mikrobiota im Caecum von Ratten reduzieren (Ohnishi et al., 2005). Bekannt ist, dass Polyphenole mit Proteinen interagieren können, was zur Entstehung von löslichen und unlöslichen Protein-Polyphenol-Komplexen führen kann (Papadopoulou & Frazier, 2004).

Konsistent über alle hier durchgeführten Versuchsansätze hinweg konnte ein Einfluss des EGCG auf den Intestinaltrakt festgestellt werden. Sowohl beide Applikationsformen (oral, diätetisch) als auch die kurz- und mittelfristige Dauer einer TEAVIGO®-Intervention resultierten bei C57BL/6-Mäusen in einer dosisabhängigen Erhöhung der Faeces-

ausscheidung (Abb.3-4). Die Faeces der behandelten Tiere waren, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, stets dunkel/schwarz gefärbt. Nakamura et al. (2002) beschrieben ebenfalls eine Schwarzfärbung der Faeces bei Ratten, denen 0,5 oder 1,0 g/kg Polyphenon-100 (Grüntee-Polyphenole) täglich oral über 23 Tage appliziert wurde. Die Dunkelfärbung der Faeces könnte durch nicht absorbiertes EGCG erklärt werden. Aber auch Produkte, die bei der Eliminierung des EGCG im Organismus gebildet werden und über die Galle in den Darm gelangen bzw. mikrobielle Metabolite könnten für die Färbung verantwortlich sein.

Die Energiedichte der Faeces unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Jedoch ergab sich aufgrund der erhöhten Faecesausscheidung für die EGCG-behandelten Mäuse eine signifikant erhöhte Gesamtenergieausscheidung (Abb. 3-4). Die Futtermittelaufnahme war zwar in allen Gruppen annähernd gleich (Tab. 3-5), allerdings führte die EGCG-Applikation durch die erhöhte Energieausscheidung zu einer verminderten Verdaulichkeit der Nahrung (Abb. 3-5), was mit anderen Studien übereinstimmt (Choo, 2003; Klaus et al., 2005).

Die Analyse der Faeces bei Fütterung einer maiskeimöhlhaltige Hochfettdiät ergab eine erhöhte Gesamtfettausscheidung, aber eine erniedrigte Cholesterolausscheidung bei Mäusen mit EGCG-Supplementation (Tab. 3-6). Die hier beobachtete erhöhte Gesamtfettausscheidung wird durch eine erhöhte ¹³C-Anreicherung in den Faeces, die die Ausscheidung diätetischer Lipide reflektiert, bestätigt (Abb. 3-6). Die erhöhte faecale Fettausscheidung kam vermutlich durch die Inhibierung der pankreatischen Lipase zustande (Juhel et al., 2000) und führte zu einem geringeren postprandialen Anstieg der Triglyceride im Plasma der EGCG-Tiere (siehe 4.2.3). Die faecale Cholesterolausscheidung kann jedoch nicht mit bisher veröffentlichten Studien verglichen werden, da das hier eingesetzte Maiskeimöl kein Cholesterol enthielt (BLS, BfEL Karlsruhe). Dagegen wurden Studien, die eine Inhibierung der Cholesterolabsorption beschreiben, mit Diäten durchgeführt, die einen hohen Cholesterol- und Fettanteil hatten (Raederstorff et al., 2003; Nakamura et al., 2002). Die diätetische Zufuhr von Cholesterol ist für den Organismus nicht essentiell, da es in der Leber und den Enterozyten synthetisiert werden kann. Der Hauptanteil des Cholesterols wird in Form von Gallensäuren eliminiert, denen eine wichtige Rolle bei der Emulgierung der Lipide im Darm zukommt. Freies Cholesterol kann auch in geringen Mengen über die Galle in den Darm ausgeschieden werden (Rehner & Daniel, 2002). Faecal ausgeschiedenes Cholesterol bei Fütterung der maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät widerspiegelt somit endogen synthetisiertes Cholesterol. Die erniedrigte Cholesterolausscheidung in den Faeces nach EGCG-Supplementation könnte dadurch erklärt werden, dass nicht absorbiertes EGCG mit dem in freier Form

ausgeschiedenen endogenen Cholesterol unlösliche Komplexe bildet (Ikeda et al., 1992, 2003; Lambert & Yang, 2003; Wang et al., 2006). So wäre es möglich, dass der hier angewandte Assay zur Bestimmung des Cholesterols die unlöslichen Präzipitate nicht detektieren konnte und dadurch bei den EGCG-Gruppen zu erniedrigten Werten führte.

Eine vorangegangene Studie unsere Arbeitsgruppe konnte nach Fütterung einer cholesterolhaltigen Hochfettdiät bei EGCG-behandelten Mäusen eine Inhibierung der Cholesterolabsorption und damit eine erhöhte faecale Cholesterolausscheidung nachweisen (Diplomarbeit: C. Sporbert, 2008). Eine signifikant verminderte Absorption von Cholesterol durch EGCG und eine moderat reduzierte Fettabsorption bei hohen EGCG-Dosen beschrieben Raederstorff et al. (2003). Es wird vermutet, dass mit Gallussäure veresterte Teecatechine (EGCG, ECG) wirksamer in der Reduzierung der Cholesterolabsorption sind (Ikeda et al., 1992). In einer *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass Cholesterol, das in gemischten Gallensalz-Mizellen vorlag, nach Zugabe von EGCG präzipitiert wurde. Wahrscheinlich können so unlösliche Cholesterol-Präzipitate gebildet werden, die nicht im Darm resorbiert werden (Ikeda et al., 1992, 2005). EGCG beeinträchtigt wahrscheinlich die intestinale Hydrolyse der Lipide und die Löslichkeit der Mizellen in Abhängigkeit der Lipidart.

Weiterhin ergab die Analyse der Faeces eine erhöhte Stickstoffausscheidung bei EGCG-behandelten Tieren (Abb. 3-7). Normalerweise ist die Stickstoffausscheidung über die Faeces sehr gering. Eine Erhöhung der faecalen Stickstoffausscheidung lässt vermuten, dass die Hydrolyse der Proteine im Intestinaltrakt gehemmt war. Da bekannt ist, dass Polyphenole mit Proteinen interagieren können, wären solche Interaktionen auch mit diätetischen Proteinen denkbar, was eine erhöhte faecale Stickstoff- und Proteinausscheidung zur Folge haben würde (Papadopoulou & Frazier, 2004). Leider gibt es in der Literatur nur wenige Informationen darüber, in welchem Ausmaß diese Interaktionen erfolgen und welchen Einfluss das auf die Funktionalität verschiedener Enzyme und die Bioverfügbarkeit der Polyphenole hat. Bekannt ist, dass diverse pankreatische Enzyme durch Teepolyphenole, insbesondere EGCG, inhibiert werden können (Tadera et al., 2006; Shimizu et al., 2000; Juhel et al., 2000). Die erhöhte intestinale Proteinausscheidung durch Teecatechine könnte somit durch EGCG-Protein-Interaktionen zustande kommen, die sowohl von einer unzureichenden Hydrolyse diätetischer Proteine als auch durch Komplexbildungen des EGCG mit Verdauungsenzymen hervor gehen.

Die Stickstoffausscheidung im Harn von Mäusen mit diätetischer TEAVIGO®-Supplementation (Versuch 1A) war nach 3-wöchiger Fütterung einer Hochfettdiät signifikant erhöht (Abb. 3.7). Das deutet auf eine erhöhte endogene Proteinausscheidung

bei EGCG-Applikation hin. Die Arbeitsgruppe um Shahkhalili et al. (1990) ermittelte mit Hilfe der ^{15}N -Glycin-Methode eine erhöhte faecale Ausscheidung endogener Proteine nach Aufnahme von grünem Tee. Es wäre denkbar, dass absorbiertes EGCG und seine vielfältigen Metabolite auch Wechselwirkungen mit endogenen Proteinen eingehen könnten, die dann infolge eines Verlustes ihrer Funktionalität vermehrt über die Nieren ausgeschieden werden.

Da Mäuse mit EGCG-Applikation vermehrt Faeces ausschieden, lag die Vermutung nahe, dass EGCG die Darmpassage beschleunigen könnte. Der Darmtransit wurde mit Hilfe einer Aktivkohlesuspension bestimmt (Puig & Pol, 1998; Capasso et al., 2005). Entgegen der eingangs beschriebenen Hypothese war der Darmtransit mit dieser Methode bei den EGCG-Tieren nicht erhöht, sondern tendenziell erniedrigt (Abb. 3-8).

Eine mögliche Erklärung der leicht verminderten Darmpassage nach EGCG-Applikation könnte die Folge einer Inhibierung der gastrischen und pankreatischen Lipase sein (Armand et al., 1999; Juhel et al., 2000). Die Hemmung der Fettverdauung erhöht die Menge an Lipiden im Magen, wodurch Magenentleerung und Darmtransport verzögert sein könnten (Caspary, 1992). Es wird vermutet, dass EGCG die Motilität des Jejunums durch direkte Bindung an glatte Muskelzellen inhibieren kann (Ceregrzyn & Kuwahara, 2003). Der Einfluss des EGCG auf die intestinale Motilität wurde in dieser Studie am isolierten Mausdarm untersucht. Dosisabhängig verminderte EGCG die Spontanaktivität des Jejunums und reduzierte die Amplitude und Frequenz der jejunalen Kontraktionen. Kim et al. (2008) zeigten an Schrittmacher-Zellen des Darms (ICC – *interstitial cells of Cajal*), die die spontane Motilität des Gastrointestinaltraktes steuern, dass EGCG deren Aktivität inhibiert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration vermindert. Infolge dessen könnte EGCG eine Hemmung der intestinalen Motilität bewirken.

4.4 Molekulare Mechanismen einer EGCG-Wirkung

Bei den Untersuchungen zur Genexpression wurden die Versuche 3 und 4 berücksichtigt. Ein Vergleich beider im Hinblick auf die Expressionsdaten gestaltet sich schwierig. Hier sei noch einmal auf die Unterschiede in der Fettquelle (Maiskeimöl vs. Palmkernfett, Tab. 4-1), den metabolischen Zustand der Mäuse bei der Tötung (postabsorptiv: 14-16 h Futterentzug, postprandial: Zugang zum Futter über Nacht) und die Dauer der EGCG-Intervention hingewiesen. Diese Merkmale können einen Einfluss auf die Expression von Genen haben (van den Bosch et al., 2007; Nakamura et al., 2004). Die Enterocyten sind in der Lage, je nach Substratangebot die Expression von Genen und Proteinen zu verändern (Chen et al., 2001).

Da im Versuch 3 die Inkorporation natürlicher diätetischer Lipide im Vordergrund stand, wurde hier Maiskeimöl als einzige Fettquelle verwendet. Es besitzt, im Vergleich zur Hochfettdiät des Versuchs 4, eine hochwertige Fettsäurezusammensetzung (Tab. 4-1). Somit unterscheiden sich die Genexpressionsdaten deutlich von den Ergebnissen, die nach Fütterung einer Hochfettdiät mit hohem Anteil gesättigter Fettsäuren (Versuch 4) beobachtet wurden. Da die Hochfettdiät mit hohem Anteil gesättigter Fettsäuren eher die Fettaufnahme widerspiegelt, die übergewichtige Menschen konsumieren, wurde die Diskussion molekularer Mechanismen einer kurzfristigen EGCG-Wirkung vorwiegend auf den Versuch 4 fokussiert.

4.4.1 Genexpression im Intestinaltrakt

Da die EGCG-Applikation in dieser Arbeit konsistent in einer erhöhten Energie- und Fettausscheidung resultierte, wurde die Expression verschiedener Fettsäure- und Glucosetransporter in der Darmmucosa untersucht.

Fettsäuretransporter und Angptl4/FiAF

Die Aufnahme von Lipiden aus dem Darmlumen in die Enterozyten erfolgt sowohl durch passive Diffusion als auch durch spezifische Transporter, die in der Bürstensaummembran lokalisiert sind. Zur Expression verschiedener Fettsäuretransporter in der Darmmucosa in Abhängigkeit einer kurzfristigen EGCG-Applikation gibt es in der Literatur keine Angaben.

CD36/FAT ist ein Membranprotein, das am Transport langkettiger Fettsäuren beteiligt ist (Poirier et al., 1996; Chen et al., 2001; Abumrad et al., 1999). Die Fütterung einer Hochfettdiät führte bei Ratten nach 3 Tagen zu erhöhten CD36/FAT mRNA-Spiegeln im Darm (Poirier et al., 1996). Im Gegensatz dazu verminderte eine intraduodenale Oleat-Infusion bei Ratten die mRNA- und Proteinlevel des CD36/FAT (Chen et al., 2001). Eine mögliche Erklärung sehen die Autoren darin, dass mit der Infusion eine sehr große Menge langkettiger Fettsäuren im Darm vorliegt, deren Aufnahme durch spezifische Mechanismen herunter reguliert wurde (Chen et al., 2001).

Ein weiteres Protein, welches am Transport von Fettsäuren und anderer lipophiler Substanzen beteiligt ist, ist das Fabp2 (Abumrad et al., 1999).

Das FATP4 wurde auch als Fettsäure-Transporter im Darm postuliert, denn seine Überexpression führte zu einer gesteigerten Aufnahme langkettiger Fettsäuren (Abumrad et al., 1999; Stahl et al., 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass FATP4 eine Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität besitzt und langkettige Fettsäuren aktiviert. Damit ist die zuvor beschriebene Transporterfunktion umstritten (Hall et al., 2003, 2005). Milger et al. (2006)

zeigten anhand fluoreszenzmikroskopischer Studien, dass FATP4 im endoplasmatischen Retikulum (ER) und nicht in der apikalen Plasmamembran von Darmzellen lokalisiert ist. Die Autoren postulieren somit ein anderes Modell der Regulation der Fettsäureaufnahme: maßgeblich ist nicht der Transport, sondern die Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität, welche den Stoffwechselzustand der Zelle reflektiert (Milger et al., 2006).

Des Weiteren wurde die Expression von Angptl4/FiAF in der Darmmucosa bestimmt. Es ist ein sezerniertes Protein, das vom Darm, der Leber und dem Fettgewebe gebildet wird. Durch Inhibierung der Lipoproteinlipase (LPL) ist es an der Regulation des Triglyceridmetabolismus beteiligt (Köster et al., 2005; Dutton & Trayhurn, 2008). LPL reguliert die Freisetzung von Fettsäuren aus triglyceridreichen Lipoproteinen und ist für die Energieversorgung von entscheidender Bedeutung (Köster et al., 2005). Studien von Bäckhed et al. (2004, 2007) ergaben, dass konventionell gehaltene Mäuse, im Gegensatz zu keimfreien, bei Fütterung einer Hoch-Kohlenhydrat-Hoch-Fett-Diät eine Adipositas entwickeln. Intestinale Mikroorganismen supprimierten die Expression von Angptl4/FiAF in der Darmmucosa. Das führte zu einer erhöhten LPL-Aktivität, wodurch vermehrt Fettsäuren aus Triglyceriden freigesetzt und im Fettgewebe und der Leber gespeichert werden konnten. Dagegen scheinen keimfreie Mäuse durch erhöhte Angptl4/FiAF-Expression in der Darmmucosa vor diätinduzierter Adipositas geschützt zu sein. Da EGCG sowohl antibakterielle als auch fettreduzierende Eigenschaften besitzt, sollte gezeigt werden, ob letztere durch Erhöhung der Angptl4/FiAF-Expression erklärt werden kann.

Veränderungen in der Genexpression der untersuchten Fettsäuretransporter waren nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit EGCG-Supplementation (Versuch 4) besonders unter postprandialen Bedingungen zu beobachten. EGCG-Mäuse mit nächtlichem Futterzugang zeigten eine verminderte Expression des Fabp2 und FATP4 in der Darmmucosa (Tab. 3-7). Das könnte die Fettaufnahme in die Enterocyten vermindert haben und würde den postprandial erniedrigten Triglyceridgehalt in der Leber und im Blutplasma erklären. Die Hemmung der Lipaseaktivität und Beeinträchtigung der Lipid-Digestion (Tadera et al., 2006; Juhel et al., 2000; Nakai et al., 2005) könnte dazu geführt haben, dass im Darmlumen nur geringe Konzentrationen an Fettsäuren vorliegen. Fettsäuren sind Liganden der PPARs (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), die an spezifische DNA-Sequenzen binden und die Genexpression intestinaler Fettsäuretransporter beeinflussen können (Poirier et al., 2001; Motojima et al., 1998). Die geringe Fettsäure-Konzentration im Darm bei EGCG-Applikation könnte die Expression der PPARs verringern, was wiederum die Expression der Fettsäure-Transporter reduzieren würde.

Die 7-tägige Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) ergab keine Unterschiede in der Expression der hier untersuchten Fettsäuretransporter. Diese Mäuse befanden sich 14-16 h im postabsorptiven Zustand. Vermutlich ist der Einfluss einer EGCG-Wirkung hauptsächlich im postprandialen Zustand zu erkennen, da es die Verdauung der Lipide beeinträchtigt (Tadera et al., 2006; Juhel et al., 2000; Nakai et al., 2005). Mit diesem Versuch (Versuch 3) konnte gezeigt werden, dass die Fütterung einer Hochfettdiät, im Vergleich zur Standarddiät, zu einer erhöhten Expression des CD36/FAT führt (Abb. 3-9). Das deckt sich mit den Ergebnissen von Poirier et al. (1996).

Eine vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe (Diplomarbeit: C. Sporbert, 2008) ergab eine signifikante Reduktion der intestinalen Fettsäure-Transporter CD36/FAT, Fabp2 und FATP4 nach EGCG-Applikation (Abb. 4-1). Den Mäusen wurde über 2 Wochen hinweg eine Hochfettdiät mit (0.125 %, 0.25 %, 0.50 %) und ohne diätetischer TEAVIGO®-Supplementation gefüttert. Weiterhin hatten die Tiere freien Zugang zu einem Laufrad. Die Genexpression der Fettsäure-Transporter wurde unter postprandialen Bedingungen am Ende des Tierversuchs ermittelt.

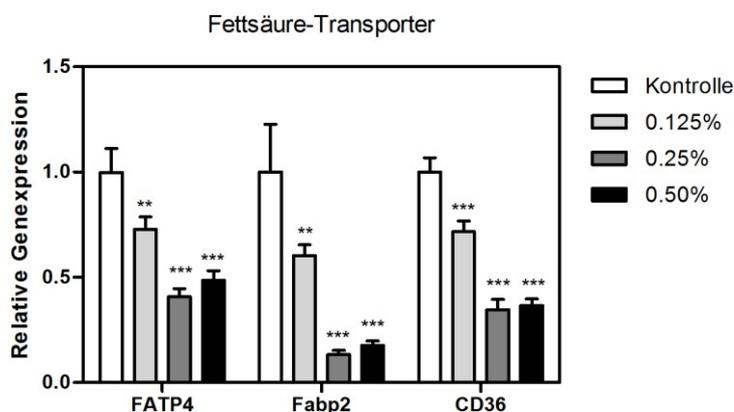


Abb. 4-1: Relative Genexpression intestinaler Fettsäure-Transporter nach 2-wöchiger Fütterung einer semisynthetischen HCHF-Diät mit (0.125 %, 0.25 %, 0.50 %) und ohne diätetischer EGCG-Applikation (Diplomarbeit: C. Sporbert 2008, signifikante Unterschiede: $p < 0,5$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ * vs. Kontrolle)**

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene verminderte Expression der Fettsäuretransporter unter postprandialen Bedingungen (Versuch 4) ist mit den Expressiondaten der Diplomarbeit (C. Sporbert, 2008) übereinstimmend. Beide Versuche sind in ihrer Diätzusammensetzung gleich, unterscheiden sich aber in der Fütterungsdauer (4 vs. 14 Tage) und Fettquelle. Die Diplomarbeit-Studie enthielt Schweineschmalz, Palmkernfett, Distel- und Leinöl. Ersteres war im Versuch 4 nicht enthalten. Unterschiede in der diätetischen Fettsäurezusammensetzung und Fütterungsdauer sowie die

körperliche Aktivität könnten dazu geführt haben, dass die Reduktion der Fettsäure-Transporter in der Diplomarbeit-Studie stärker ausgeprägt war. In der Diplomarbeit war die Fettabsorption im Dünndarm durch EGCG reduziert, was auch mit den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt.

Die Expression des LPL-Inhibitors Angptl4/FiAF in der Darmmucosa war durch EGCG-Applikation und Hochfett-Fütterung nicht beeinflusst (Tab. 3-7, Abb. 3-10). Im Vergleich zur Standarddiät, konnte unter Hochfettdiät eine verminderte Expression des Angptl4/FiAF festgestellt werden (Abb. 3-10). Der Proteingehalt von Angptl4/FiAF im Plasma wäre für eine Deutung der Ergebnisse bei EGCG-Supplementation aussagekräftiger.

Glucosetransporter

Die intestinale Aufnahme von Monosacchariden, insbesondere Glucose, in die Enterocyten wird über spezifische Transportmechanismen vermittelt. Auf der apikalen Seite erfolgt die Aufnahme von Glucose mit Hilfe des Na⁺/Glucose-Cotransporters SGLT1 (Wright et al., 1998). Absorbierte Glucose wird dann entlang ihres Konzentrationsgradienten über das Glut2 Transportprotein durch die basolaterale Membran in die Blutzirkulation entlassen (Rhoads et al., 1998).

Kobayashi et al. (2000) konnten zeigen, dass Grüntee-Polyphenole, insbesondere ECG und EGCG, die intestinale Glucoseaufnahme durch Inhibierung des SGLT1 in intestinale Epithelzellen hemmen. An Bürstensaummembranvesikeln reduzierten hauptsächlich Teepolyphenole, die mit Gallussäure verestert waren, die Glucoseaufnahme. Die Autoren vermuten, dass Teecatechine als Antagonist-ähnliche Moleküle am Glucosetransporter binden und diesen kompetitiv hemmen. Unter Verwendung humaner intestinaler Caco-2 Zellen konnte Shimizu et al. (2000) eine verminderte SGLT1-Expression feststellen, was durch Anwesenheit der Galloylestergruppe der Polyphenole bedingt war.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Erhöhung der SGLT1- und Glut2-Expression nach Fütterung eine Hochfettdiät (Versuch 3 und 4) bei EGCG-Applikation festgestellt werden (Tab. 3-7, Abb. 3-9). Das deutet auf eine gesteigerte Aufnahme von Glucose in die Enterocyten und die Blutzirkulation bei EGCG-Gabe hin. Jedoch unterschieden sich die Blutglucosespiegel der EGCG-behandelten Gruppen nicht von dem der Kontrolltiere (Tab. 3-4). Der verminderte Glycogengehalt in der Leber bei EGCG-Applikation (postabsorptiv und postprandial) deutet darauf hin, dass weniger Glucose die Leber erreicht hat bzw. vermehrt verstoffwechselt wurde.

Die Erhöhung der SGLT1-Expression steht im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Effekten der Teecatechine. EGCG könnte einen ähnlichen Effekt auf die SGLT1-mRNA-Expression hervorgerufen haben wie fermentierbare Ballaststoffe. Ein diätetisch hoher Anteil fermentierbarer Ballaststoffe (Oligofruktose) führte bei Ratten und Hunden zu einer erhöhten SGLT1-vermittelten Glucoseaufnahme, was auf einen Anstieg der intestinalen Masse beruhte (Reimer et al., 1997; Buddington et al., 1999; Ferraris, 2001). In allen hier dargestellten Versuchen schieden Mäuse mit EGCG-Applikation, im Vergleich zu den Kontrolltieren, vermehrt Faeces aus (Abb. 3-4).

4.4.2 Genexpression der Leber

Glycolyse und oxidative Decarboxylierung

Nach erfolgter Absorption der Glucose gelangt sie zunächst in die Leber. Die Glycolyse ist der wichtigste Abbauweg der Glucose im Stoffwechsel, der im Cytoplasma jeder Zelle stattfindet. Der erste Schritt ist die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat (G6P). In der Leber wird diese Reaktion durch die Glucokinase (GK) katalysiert. Das G6P kann entweder im weiteren Verlauf der Glycolyse zur Energiegewinnung herangezogen werden oder ist Ausgangsprodukt der Glycogensynthese. Ein weiteres Enzym der Glycolyse ist die Pyruvatkinase (PK). Sie katalysiert die irreversible Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat, wobei ATP gebildet wird. Die oxidative Decarboxylierung des Pyruvat am Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (PDHx) ergibt Acetyl-CoA, welches schließlich im Citratzyklus vollständig zu CO₂ abgebaut werden kann. PDHx kontrolliert mit diesem Schritt den Eintritt von Glucose in den Citratzyklus (Rehner & Daniel, 2002). Effekte einer EGCG-Applikation in Hinblick auf Enzyme der Glycolyse und oxidativer Decarboxylierung sind in der Literatur nicht beschrieben.

Die Expression der glycolytischen Enzyme und des PDHx nach 4-tägiger Hochfett-Fütterung (Versuch 4) ergab keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Tab. 3-9). Der Glucoseabbau *via* Glycolyse in der Leber scheint damit nicht durch EGCG beeinflusst zu werden.

Die Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) über 7 Tage verminderte, im Gegensatz zur Standarddiät, die Expression der GK (Abb. 3-20). Der geringere Kohlenhydratanteil der Hochfettdiät könnte durch eine geringere Insulin-Ausschüttung für diese Verminderung verantwortlich sein. Jedoch ließ sich dieses Expressionsmuster nicht für die PK beobachten. Mäuse mit 0.5 % EGCG im Futter wiesen hier eine erniedrigte PDHx-Expression auf (Abb. 3-20). Das könnte auf eine geringere Generation von Acetyl-CoA hindeuten.

Gluconeogenese

Die Gluconeogenese ist die Neusynthese von Glucose aus organischen Nicht-Kohlenhydrat-Vorstufen (Pyruvat, Oxalacetat) und ist besonders in Hungerperioden für die Bereitstellung der Glucose verantwortlich. Schlüsselenzyme sind PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxylase) und G6Pase (Glucose-6-phosphatase).

Es konnte gezeigt werden, dass EGCG die hepatische Gluconeogenese unterdrückt (Waltner-Law et al., 2002; Collins et al., 2007). Die verminderte Glucoseproduktion war *in vitro* mit einer herabgesetzten Expression der PEPCK und G6Pase verbunden. Ferner aktivierte EGCG dieselben Kinasen wie Insulin und begünstigte die Phosphorylierung von Insulin-Signal-Proteinen, wie IRS-1 und IR- β (Waltner-Law et al., 2002). Collins et al. (2007) konnte die Aktivierung der AMPK als neuen Mechanismus aufzeigen, über den EGCG Enzyme der Gluconeogenese hemmte. AMPK-Aktivierung und nachfolgende Hemmung der hepatischen Gluconeogenese waren von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch EGCG abhängig.

Im Rahmen dieser Arbeit ergab die Fütterung einer Hochfettdiät über 4 Tage (Versuch 4) keine deutlichen Unterschiede zwischen den EGCG-behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe (Tab. 3-9). Tendenziell war die G6Pase-Expression bei gefütterten Mäusen erniedrigt, was auf eine verminderte Gluconeogenese hindeuten könnte.

Nach 7-tägiger Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) konnte in den EGCG-Gruppen eine verminderte G6Pase-Expressionen verzeichnet werden, PEPCK wurde durch EGCG nicht verändert (Abb. 3-20). Diätetische EGCG-Applikation deutet demnach auf eine verminderte Gluconeogenese hin und deckt sich mit veröffentlichten Studien (Waltner-Law et al., 2002; Collins et al., 2007).

Fett- und Cholesterollowerstoffwechsel

Murase et al. (2002) konnte nach Fütterung einer Hochfettdiät mit Teecatechinen über 4 Wochen eine erhöhte Acyl-CoA-Oxidase (peroxisomale β -Oxidation) und MCAD (*medium chain acyl-CoA dehydrogenase*, mitochondriale β -Oxidation) mRNA-Expression in der Leber sowie eine Aktivierung der β -Oxidation nachweisen. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe induzierte EGCG eine Erhöhung der AMPK α -Phosphorylierung und deren Aktivität in der Leber, was in einer Inhibierung lipogener Enzyme (ACC, FAS, PPAR γ) resultierte (Murase et al., 2009). Die Autoren vermuten, dass die beobachtete AMPK-Aktivierung zusammen mit einer erhöhten Fettoxidation ein Mechanismus sein könnte, der die antiadipogene Wirkung des EGCG erklärt.

Eine verminderte Expression lipogener Enzyme der Leber konnte auch in den hier durchgeführten Studien beobachtet werden. Nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit einem hohen Anteil gesättigter Fettsäuren (Versuch 4) war die Expression der ACC, FAS und SCD1 besonders unter postprandialen Bedingungen durch EGCG reduziert (Tab. 3-9). Postabsorptiv war bei EGCG-behandelten Mäusen nur eine verringerte SCD1-Expression in der Leber zu erkennen. Somit scheint die Fettsäure-Biosynthese bei Mäusen mit Grünteeextrakt unter postprandialen Bedingungen verringert zu sein. Diese Beobachtung könnte den verminderten Lebertriglyceridgehalt erklären (siehe 4.2.2).

Im Vergleich zur Standarddiät, war eine verringerte Expression der SCD1 bei Hochfettdiät-gefütterten Mäusen zu beobachten. SCD1 katalysiert die Synthese einfach ungesättigter Fettsäuren. Da Maiskeimöl bereits einen hohen Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren enthält, könnte das dazu geführt haben, dass deren Synthese durch SCD1 in der Leber, im Vergleich zur Standarddiät, vermindert wurde.

Kein einheitliches Expressionsmuster lipogener Enzyme in der Leber ließ sich dagegen nach Fütterung der maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät und EGCG-Applikation erkennen (Abb. 3-21). Lediglich die FAS-Expression war, im Vergleich zur Kontrolle, bei Mäusen mit 0.5 % EGCG in der Diät erniedrigt.

Beide Versuche (Versuch 3 und 4) unterschieden sich in ihrer Fettquelle (Tab. 4-1). Ein hoher Anteil gesättigter Fettsäuren in der angebotenen Diät ist mit einer größeren Körpermasse- und Körperfettzunahme verbunden. Eine erhöhte SCD1-Aktivität ist mit einer Vielzahl metabolischer Störungen impliziert, wie z. B. Diabetes, Atherosklerose, Adipositas. SCD1-Knock-Out-Mäuse akkumulieren wenig Körperfett, haben eine verminderte Lipidsynthese und eine erhöhte Fettoxidation in der Leber (Ntambi et al., 2002; Dobrzyn & Ntambi, 2004). Die herabgesetzte SCD1-Genexpression bei EGCG-Supplementation könnte demnach eine Ursache für die fettreduzierende Wirkung des Teeextraktes sein. Das konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (Klaus et al., 2005; Murase et al., 2002).

Das Schlüsselenzym der *De-novo*-Synthese von Cholesterin ist die HMG-CoA-Reduktase. Vorwiegend erfolgt die Synthese in der Leber. Der Abbau des Cholesterins wird durch die Cholesterin-7 α -Hydroxylase katalysiert (Rehner & Daniel, 2002).

Die Expression der HMG-CoA-Reduktase war nach 4 Tagen Hochfett-Fütterung (Versuch 4) durch EGCG bei gefütterten und gefasteten Mäusen unbeeinflusst (Tab. 3-9). Der Abbau des Cholesterins zu Gallensäuren scheint durch eine erhöhte Cyp7a1-Expression bei EGCG behandelten Tieren gesteigert zu sein. Die Gallensäuren sind für die Emulgierung der Lipide im Darm vonnöten. Da EGCG die Cholesterin- und Fettverdauung

beeinträchtigt, könnte eine vermehrte Gallensäure-Synthese die verminderte Lipid-Absorption kompensieren.

Fütterung einer maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) führte, im Vergleich zur Standarddiät, zu einer erhöhten Cyp7a1-Expression (Abb. 3-21). Folglich könnte daraus auf einen erhöhten Cholesterolkatabolismus bei Hochfett-Fütterung geschlossen werden. Die Supplementation der Diät mit EGCG reduzierte die Cyp7a1-Expression bei Mäusen mit 0.5 % EGCG in der Diät (Abb. 3-21). Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Ergebnis nach Fütterung einer Hochfettdiät mit hohem Anteil gesättigter Fettsäuren. Cholesterold würde demnach in geringeren Mengen zu Gallensäuren abgebaut werden, was die Fettemulgierung im Darm beeinflussen könnte. Mäuse mit EGCG-Applikation hatten eine erhöhte Fettsäureausscheidung, die sich u. a. durch Beeinträchtigung der Fettverdauung infolge geringer Gallensäureausscheidung ergeben könnte. Um eine genauere Aussage darüber zu erhalten, könnte die Bestimmung der Gallensäuren im Plasma und den Faeces erfolgen.

Angptl4/FiAF ist am Energiemetabolismus durch Inhibierung der Lipoproteinlipase-Aktivität beteiligt (Kersten et al., 2000; Dutton & Trayhurn, 2008). Es wird durch Fasten im weißen Fettgewebe und in der Leber hochreguliert.

Unter postprandialen Bedingungen ließ sich eine verminderte Expression des Angptl4/FiAF in der Leber feststellen (Tab. 3-9) Dadurch könnte die LPL-Aktivität erhöht sein, wodurch vermehrt Fettsäuren freigesetzt werden. Diese könnten bei EGCG-behandelten Mäusen vermehrt der β -Oxidation in der Leber zugeführt und abgebaut werden (Murase et al., 2000, 2009). Postprandial waren auch die Lebertriglyceride erniedrigt, was nach kurzfristiger EGCG-Gabe zu einer verminderten Fettabsorption und einer erhöhten Fettoxidation führte.

4.4.3 Genexpression in peripheren Geweben

Epididymales Fettgewebe

Die Abnahme der hier beobachteten Fettgewebssmasse involviert die Mobilisierung der Lipide durch Lipolyse oder den Untergang ausgereifter Fettzellen durch Apoptose (Rayalam et al., 2008). Die Vorstadien der Adipocyten (Präadipocyten) entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen. Präadipocyten besitzen keine Triglyceridspeicher. Erst spezifische mitogene und adipogene Signale steuern die Entwicklung zu reifen Fettzellen, die zur Synthese und Speicherung von Triglyceriden sowie zur Mobilisierung und Oxidation der Lipide befähigt sind (Rehner & Daniel, 2002; Rayalam et al., 2008). EGCG induzierte Apoptose sowohl in Präadipocyten als auch reifen Fettzellen und konnte die

Lipidakkumulation in reifenden Präadipocyten inhibieren (Lin et al., 2005; Rayalam et al., 2008). Bei humanen Präadipocyten inhibierte ein weißer Teeextrakt, der im Vergleich zu grünem Tee einen höheren Anteil an Teecatechinen aufweist, die Adipogenese und stimulierte die Aktivität der Lipolyse (Söhle et al., 2009). Auch in anderen *in vitro* Versuchen reduzierte EGCG die Fettakkumulation in Adipocyten durch Erhöhung der Lipolyse (Lee et al., 2009; Sakurai et al., 2009; Wolfram et al., 2005). Außerdem induzierte EGCG die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit Insulinsensitivität (z. B. Fabp4, Cd36, LPL, Acox1, Ucp2) und Adipocytendifferenzierung (z. B. Pparg1, Pparg2, Cebps, Ppargc1a) stehen (Sakurai et al., 2009). Dadurch könnte EGCG unterschiedliche Phasen des Adipocyten-Zellzyklus modulieren und eine Hemmung des Adipocytenwachstums zustande kommen.

Bose et al. (2008) führt die Verminderung des mesenterialen, epididymalen und retroperitonealen Fettgewebes auf eine Inhibierung der Fettabsorption und/oder eine Erhöhung der Fettoxidation zurück. Ein weiterer Grund für die verminderte Fettakkumulation nach EGCG-Supplementation könnten geringe SCD1-mRNA-Level in WAT und Leber sein, wodurch die Entwicklung einer diätinduzierten Adipositas durch EGCG unterbunden wird (Klaus et al., 2005; Wolfram et al., 2005). Die 8-wöchige Fütterung einer Hochfettdiät mit EGCG-Supplementation verminderte einerseits die mRNA-Spiegel diverser adipogener Enzyme (PPAR α , C/EBP- α , SREBP-1c, aP2, LPL, FAS), andererseits war die Expression lipolytischer Enzyme (HSL, ATGL, CPT-1) im WAT erhöht (Lee et al., 2009). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass EGCG die Lipogenese und Lipolyse in Adipocyten modulieren kann und damit zu einer Fettverminderung führt. Es wird vermutet, dass auch ein direkter Effekt des EGCG auf die Adipocytendifferenzierung das Fettgewebe für die anitadipogene Wirkung des EGCG verantwortlich sein könnte (Wolfram et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bereits die kurz- und mittelfristige EGCG-Applikation die Körperfettmasse reduzierte (Abb. 3-22, 3-23) und die Inkorporation exogener Lipide ins Fettgewebe verminderte (Abb. 3-25).

Postabsorptiv zeigten Mäuse mit EGCG-Applikation bereits nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät eine geringere Expression lipogener Enzyme (FAS, SCD1, GPAT) im Fettgewebe (Tab. 3-10, Versuch 4). Das ist in Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Daten, die nach langfristiger EGCG-Supplementation beobachtet wurden (Klaus et al., 2005; Wolfram et al., 2005). Somit scheint es, dass EGCG die Lipogenese im Fettgewebe schon nach kurzfristiger Applikation vermindern kann.

Lipide werden in cytosolischen Fetttropfen gespeichert, die von einem oder mehreren Strukturproteinen der Perilipin-Familie (Perilipin, Adipophilin, TIP47, S3-12,

OXPAT/MLDP) umhüllt sein können. Die Lipidtropfen der Adipocyten sind vorwiegend von Perilipin (Plin) umgeben. Es schützt die Fettvakuolen vor dem enzymatischen Abbau durch lipolytische Enzyme (Ducharme & Bickel, 2008; Brasaemle, 2007). Eine dosisabhängige verminderte Plin-Expression war im gefasteten Zustand (14-16 h Futterentzug) bei Mäusen mit EGCG-Supplementation zu beobachten (Tab. 3-10, Versuch 4). Unter diesen Bedingungen waren Lipidtropfen der Adipocyten für die HSL zugänglich, die folglich Fettsäuren und Glycerol freisetzt. Die Expression der HSL war durch EGCG erhöht, was auf eine gesteigerte Lipolyse nach kurzfristiger EGCG-Applikation hindeutet.

Neben der Speicherfunktion weist das Fettgewebe auch eine endokrine Funktion auf und ist an der Bildung diverser Hormone und Adipokine beteiligt (Rasouli & Kern, 2008). Leptin ist das Produkt des *ob*-Gens und wird während Phasen aktiver Lipogenese gebildet. Die Leptinsynthese und –sekretion werden durch Größe bzw. Triglyceridgehalt der Adipocyten gesteuert. EGCG-Mäuse zeigten hier eine geringere Leptin-mRNA-Expression im WAT (Tab. 3-10, Versuch 4). Da die Leptin-Expression gut mit der Fettmasse korreliert (Friedman & Halaas, 1998), könnte diese Verminderung eine Konsequenz der reduzierten Fettmasse sein. Dies deckt sich mit bisher veröffentlichten Ergebnissen, die nach langfristiger EGCG-Gabe ermittelt wurden (Klaus et al., 2005; Wolfram et al., 2005).

Mäuse unter Hochfett-Fütterung haben eine höhere Lipolyserate (Abb. 3-26, Bederman & Previs, 2008). Einerseits erfolgt das durch Erhöhung der Anzahl der Fettzellen, andererseits durch einen Defekt im *Insulin-Signaling* der Adipocyten. Große Adipocyten haben, im Vergleich zu kleinen, eine 2-fach erhöhte basale Lipolyse und erhöhte ATGL- und HSL-Expressionen (Wueest et al., 2009). Nach 7-tägiger Fütterung der maiskeimöhlhaltigen Hochfettdiät (Versuch 3) supprimierte EGCG, im Vergleich zur Kontrolle, die Expression der HSL und ATGL (Abb. 3-26). Eine erniedrigte Lipolyse durch EGCG-Behandlung wird durch geringere freie Fettsäuren im Plasma bestätigt (siehe 4.2.3). Außerdem hatten Mäuse mit EGCG-Applikation trotz Hochfettdiät am Ende des Versuchs weniger Fettmasse akkumuliert. Das könnte zu einer geringeren Freisetzung freier Fettsäuren aus dem Fettgewebe geführt haben (Peters, 2003). Möglich wäre auch, dass die Hemmung des Adipocytenwachstums durch EGCG kleinere Adipocyten im Fettgewebe zur Folge hatte, deren basale Lipolyse reduziert war (Wolfram et al., 2005; Wueest et al., 2009).

Skelettmuskel

Tierversuchsstudien konnten nach Aufnahme von Teecatechinen eine erhöhte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel zeigen, was durch eine erhöhte Glut4-Translokation erklärt wurde (Ashida et al., 2004; Ueda et al., 2008). Cao et al. (2007) konnte eine Erhöhung der Glut4-Expression nach Fütterung einer Hochfructose-Diät und EGCG-Applikation nachweisen. Die basale Glut1-Expression war durch EGCG postprandial nicht beeinflusst.

Die β -Oxidation im Skelettmuskel war nach Aufnahme von Grüntee-Catechinen in Kombination mit körperlicher Aktivität erhöht. Das bedeutet, dass in den Muskelzellen vermehrt Fettsäuren zur Energiegewinnung oxidiert werden. Die Supplementation der Diät mit Teecatechinen führte zusammen mit körperlichem Training zu einer Verbesserung der Ausdauerleistungsfähigkeit bei Mäusen (Shimotoyodome et al., 2005; Murase et al., 2005).

Nach 4-tägiger Fütterung einer Hochfettdiät mit EGCG-Applikation konnte eine erniedrigte Expression der Glucosetransporter und lipogener Enzyme unter postabsorptiven und postprandialen Bedingungen im Skelettmuskel ermittelt werden (Tab. 3-11, Versuch 4). Damit scheint die Glucoseaufnahme in die Muskelzellen sowie die Lipogenese bei EGCG-Mäusen vermindert zu sein. Das steht im Gegensatz zu bisherigen Studien und könnte durch die hier gewählte kurze Fütterungsdauer zustande kommen. Verminderte Kohlenhydrataufnahme nach EGCG-Applikation könnte akut zu einer erhöhten und schnelleren Oxidation von Fettsäuren geführt haben (Zhong et al., 2006), was der reduzierte RQ nach akuter EGCG-Gabe widerspiegelt (siehe 4.3.2). Postabsorptiv unterschied sich die Expression des CD36/FAT, der an der Aufnahme von Fettsäuren in die Muskelzelle beteiligt ist, jedoch nicht zwischen den Gruppen. In diesem metabolischen Zustand ließ sich eine verminderte CPT1b-Expression bei EGCG-Applikation nachweisen, was auf eine geringere mitochondriale β -Oxidation hindeutet. Dagegen wiesen gefütterte EGCG-Mäuse eine erhöhte CD36/FAT-Expression auf, wodurch vermutlich vermehrt Fettsäuren in die Muskelzellen aufgenommen wurden. Aufgenommene Fettsäuren scheinen bei EGCG-Tieren nicht vermehrt als Triglyceride im Skelettmuskel gespeichert zu werden, da die GPAT-Expression verringert war. Auch die Expression weiterer lipogener Enzyme war bei EGCG-Supplementation reduziert. Denkbar wäre, dass EGCG auch einen Einfluss auf Entkopplerproteine und die peroxisomale β -Oxidation hat.

4.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die kurz- und mittelfristige Applikation von EGCG bei Mäusen durch vielfältige Veränderungen im Energie- und Substratstoffwechsel in diversen Organen und Geweben begleitet war, die letztendlich in einer Verminderung der Körperfettmasse resultierten (Abb. 4-2).

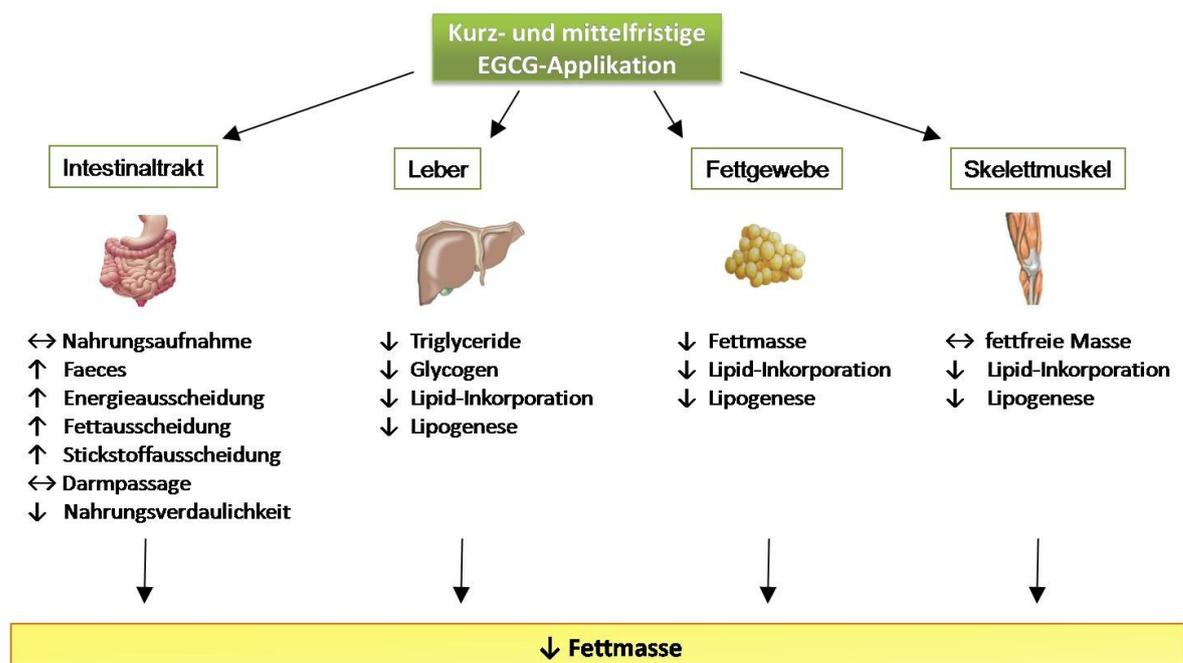


Abb. 4-2: Mögliche Wirkmechanismen, wie EGCG den Energie- und Substratstoffwechsel positiv beeinflussen und einer Adipositas-Entwicklung entgegen wirken kann

Maßgeblich für diese Wirkung ist die Reduktion der Energieassimilation im Darm. Eine erhöhte Energieausscheidung bei EGCG-Supplementation hatte eine verminderte Nahrungsverdaulichkeit zur Folge. Das hatte Auswirkungen auf den Substratstoffwechsel im gesamten Organismus. Die reduzierte Makronährstoffabsorption verminderte die Plasmalipide sowie den Triglycerid- und Glycogengehalt der Leber. Infolgedessen führte die EGCG-Applikation zu einer verminderten Inkorporation diätetischer Lipide in verschiedene Organe und Gewebe. Der intestinale Energieverlust hat somit entscheidend dazu beigetragen, dass EGCG die Körperfettmasse verringert.

Es muss klar zwischen kurz- und mittelfristigen Effekten unterschieden werden. Die Fettoxidation war nach kurzfristiger EGCG-Applikation erhöht. Eine verminderte Kohlenhydrataufnahme nach EGCG-Applikation könnte akut zu einer erhöhten und schnelleren Oxidation von Fettsäuren geführt haben. Im weiteren Verlauf der Applikation

wird durch EGCG der Körperfettgehalt reduziert, wodurch die basale und exogene Fettoxidation vermindert und bevorzugt Kohlenhydrate oxidiert werden.

Durch EGCG induzierte akute Veränderungen auf physiologischer und metabolischer Ebene sind auf intestinale Effekte des EGCG zurückzuführen. Die Energieversorgung des Organismus wird dem reduzierten Substratangebot angepasst. Bei chronischer Aufnahme werden die vielfältigen Veränderungen sowohl direkt durch EGCG als auch indirekt infolge der Körperfettreduktion hervorgerufen.

Da das Krankheitsbild der Adipositas von einer exzessiven Körperfettansammlung geprägt ist und mit erhöhten Plasmalipiden einher geht, könnte die Supplementation mit EGCG dazu beitragen, dass die im Verlaufe einer Adipositas hinzukommenden Komorbiditäten wie Hyperlipidämien, Atherosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen verringert werden könnten.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit vorgelegte Ergebnisse zeigen Hinweise darauf, dass bereits die kurz- und mittelfristige EGCG-Applikation zu verschiedenen metabolischen und molekularen Veränderungen führt. Zur Präzisierung dieser am Mausmodell gewonnenen Ergebnisse sind jedoch weitere Versuche nötig.

Da EGCG die Lipid-Inkorporation in diverse Organe und Gewebe verminderte, könnte in Tierversuchsstudien geklärt werden, ob EGCG auch die Kohlenhydrataufnahme nach kurzfristiger Applikation reduzieren kann. Mit Hilfe stabiler Isotope könnte der Substratfluss und die Oxidation der Kohlenhydrate detaillierter untersucht werden - entweder mit Hilfe eines ^{13}C -Stärke-Atemtests und/oder in Anlehnung an den hier beschriebenen Inkorporationsversuch. Als Kohlenhydratquelle der Diät könnte Maisstärke verwendet werden, und die ^{13}C -Anreicherung im Atem und diverser Organe/Gewebe bestimmt werden.

Da der erhöhte Energieverlust nach EGCG-Applikation in einer erhöhten Proteinausscheidung in den Faeces und im Harn resultierte, wäre es interessant, den Proteinstoffwechsel detailliert zu untersuchen. Absorbiertes EGCG und seine vielfältigen Metabolite könnten neben den Interaktionen mit diätetischen Proteinen auch Wechselwirkungen mit endogenen Proteinen eingehen, die dann infolge eines Verlustes ihrer Funktionalität vermehrt über die Nieren ausgeschieden werden. Ob sich langfristig gesehen eine erhöhte endogene Proteinausscheidung durch EGCG und eine verminderte

intestinale Proteinabsorption negativ auf die Proteinbilanz im Organismus auswirken, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Wegen der beschriebenen Inhibierung unterschiedlicher digestiver Enzyme und einer leicht verminderten Darmassage wäre es interessant, wesentliche gastrointestinale Hormone und Peptide, die die intestinale Motilität, Sekretion und Durchblutung des Darms steuern und koordinieren, in Abhängigkeit einer EGCG-Applikation zu untersuchen. Studien zur Magenentleerung und Darmassage in Abhängigkeit einer EGCG-Applikation ließen sich gut in einer Humanstudie mittels stabiler Isotope untersuchen.

Akut konnte EGCG in einer Humanstudie die Fettoxidation erhöhen (Boschmann & Thielecke, 2007), was auch im hier untersuchten Mausmodell gezeigt werden konnte. Die mittelfristige Applikation des Teepolyphenols war mit einer verminderten Fettoxidation verbunden, die sich durch Reduktion der Körperfettmasse erklären lässt. Dadurch wurden vermehrt Kohlenhydrate oxidiert. Ob die längerfristige Supplementation der Diät mit EGCG auch beim Menschen die basale und exogene Oxidation von Fetten vermindert und die der Kohlenhydrate begünstigt, wäre auch ein interessanter Untersuchungsansatz.

5 Zusammenfassung

Die gesundheitsfördernden Eigenschaften von grünem Tee sind weitgehend akzeptiert. Den Teecatechinen, insbesondere dem Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), werden zahlreiche positive Effekte zugesprochen (z. B. antioxidativ, antikanzerogen, antiinflammatorisch, Blutdruck und Cholesterinspiegel senkend). Die Mechanismen, die zu einer Reduktion der in Tierversuchen beschriebenen Körper- und Fettmasse führen, sind nicht ausreichend geklärt. Ziel dieser Arbeit bestand darin, die kurz- und mittelfristigen Wirkungen einer TEAVIGO®-Applikation (mind. 94 % EGCG) am Mausmodell im Hinblick auf den Energie- und Fettstoffwechsel sowie die Expression daran beteiligter Gene in wichtigen Organen und Geweben zu untersuchen.

In verschiedenen Tierversuchen wurde männlichen C57BL/6-Mäusen eine Hochfettdiät (HFD) mit und ohne Supplementation (oral, diätetisch) des entkoffeinierten Grüntee-Extraktes TEAVIGO® in unterschiedlichen Dosierungen gefüttert. Es wurden sowohl kurz- als auch mittelfristige Wirkungen des EGCG auf die Energiebilanz (u. a. indirekte Tierkalorimetrie) und Körperzusammensetzung (NMR) sowie die exogene Substratoxidation (Stabilisotopentechnik: Atemtests, Inkorporation natürlicher ¹³C-angereicherter Triglyceride aus Maiskeimöl in diverse Organe/Gewebe) und Genexpression (quantitative *real-time* PCR) untersucht.

Die Applikationsform und ihre Dauer riefen unterschiedliche Wirkungen hervor. Mäuse mit diätetischer Supplementation zeigten bereits nach kurzer Zeit eine verminderte Körperfettmasse, die bei weiterer Verabreichung auch zu einer Reduktion der Körpermasse führte. Beide Applikationsformen resultieren, unabhängig von der Dauer der Intervention, in einer erhöhten Energieausscheidung, während die Futter- und Energieaufnahme durch EGCG nicht beeinflusst wurden. Der Energieverlust war von einer erhöhten Fett- und Stickstoffausscheidung begleitet, deren Ursache die in der Literatur beschriebene Interaktion und Hemmung digestiver Enzyme sein könnte. Besonders unter postprandialen Bedingungen wiesen EGCG-Mäuse erniedrigte Triglycerid- und Glycogengehalte in der Leber auf, was auf eine eingeschränkte intestinale Absorption der Nährstoffe hindeutet. Transkriptanalysen ergaben im Darm eine verminderte Expression von Fettsäuretransportern, während die Expression von Glucosetransportern durch EGCG erhöht wurde. Weiterhin reduzierte EGCG, nach Umstellung von Standard- auf eine maiskeimöhlaltige Hochfettdiät, die Inkorporation natürlicher ¹³C-angereicherter Triglyceride in diverse Organe und Gewebe – insbesondere Leber, viszerales und braunes Fettgewebe sowie Skelettmuskel. Die Analyse der ¹³C-

Anreicherung im Atem der Mäuse und die Energieumsatzmessungen ergaben nach kurzer Applikation eine erhöhte Fettoxidation, die im weiteren Verlauf der Intervention auf eine erhöhte Kohlenhydratoxidation umgeschaltet wurde.

Weiterhin war die orale Applikation von EGCG bei gleichzeitiger Fütterung einer Hochfettdiät von makroskopischen und mikroskopischen degenerativen Veränderungen der Leber begleitet. Diese Effekte wurden nach diätetischer Supplementation der Hochfettdiät mit EGCG nicht beobachtet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Körpergewichts- und Fettgewebsabnahme durch diätetisches EGCG sich durch eine herabgesetzte Verdaulichkeit der Nahrung erklären lässt. Dies führte zu verschiedenen kurz- und mittelfristigen Veränderungen in der Fettverteilung und im Fettmetabolismus.

6 Summary

The health-promoting properties of green tea are widely accepted. Tea catechins, particularly epigallocatechin-3-gallate (EGCG), are attributed to many positive effects (anti-oxidative, anti-cancerogen, anti-inflammatory, blood pressure and cholesterol lowering). Mechanisms leading to a reduction of body mass and fat mass in animal experiments are not fully elucidated. The aim of this study was to examine multiple effects of TEAVIGO® application (at least 94% EGCG) in a mouse model in terms of energy and fat metabolism. Expressions of genes involved in these processes were also determined in different organs and tissues.

In several animal studies, male C57BL/6 mice were fed a high fat diet supplemented with decaffeinated TEAVIGO® (oral, dietetic) at different dosages. Short- and medium-term effects of EGCG were investigated on energy balance (indirect animal calorimetry), body composition (NMR), exogenous substrate oxidation (stable isotopes: breath tests, incorporation of naturally ¹³C-enriched triglycerides from corn oil into various organs/tissues), and gene expression (quantitative real-time PCR).

Type of application and its duration elicited different effects. Supplemented mice already showed a reduced body fat mass after short- and medium-term treatment. Further administration lead to a reduction of body weight. Regardless of the duration of intervention, both types of application resulted in an increased energy excretion, while food and energy intake was not affected by EGCG. Fecal energy loss was accompanied by an increased fat and nitrogen excretion, which was probably due to an inhibition of

digestive enzymes. Fed mice displayed a decreased triglyceride and glycogen content in liver suggesting a reduced absorption of nutrients in the intestine. This was supported by a decreased expression of intestinal fatty acid transporters. However, expression of glucose transporters was increased after short- and medium term application. Furthermore, EGCG attenuated incorporation of naturally ^{13}C -enriched triglycerides into various organs and tissues – particularly liver, visceral and brown adipose tissue, and skeletal muscle. Analysis of ^{13}C -enrichment in breath and measurement of energy expenditure revealed an initial increased fat oxidation, which was switched to an increased carbohydrate oxidation over time.

Besides, a combination of oral administration of EGCG and high fat feeding was accompanied by macroscopic and microscopic deleterious changes in liver. These effects were not observed after dietary supplementation of EGCG.

Altogether, reduction in body mass and fat mass by EGCG can be explained by a decreased food digestibility leading to various short- and medium-term changes in fat distribution and lipid metabolism.

7 Literaturverzeichnis

- Abumrad, N., Coburn, C., Ibrahimi, A. (1999). "Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm." *Biochim Biophys Acta* 1441: 4-13.
- Ahrén, B., Simonsson, E., Scheurink, A. J., Mulder, H., Myrsen, U., Sundler, F. (1997). "Dissociated insulinotropic sensitivity to glucose and carbachol in high-fat diet-induced insulin resistance in C57BL/6J mice." *Metabolism* 46(1): 97-106.
- Armand, M., Pasquier, B., Andre, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., Portugal, H., Jaussan, V., Lairon, D. (1999). "Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract." *Am J Clin Nutr* 70(6): 1096-106.
- Ashida, H., Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Bessho, H., Sakakibara, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K. (2004). "Anti-obesity actions of green tea: possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors." *Biofactors* 22(1-4): 135-40.
- Astrup, A., Breum, L., Toubro, S., Hein, P., Quaade, F. (1992). "The effect and safety of an ephedrine/caffeine compound compared to ephedrine, caffeine and placebo in obese subjects on an energy restricted diet. A double blind trial." *Int J Obes Relat Metab Disord* 16(4): 269-77.
- Astrup, A., Buemann, B., Christensen, N. J., Toubro, S., Thorbek, G., Victor, O. J., Quaade, F. (1992). "The effect of ephedrine/caffeine mixture on energy expenditure and body composition in obese women." *Metabolism* 41(7): 686-8.
- Badman, M. K., Flier, J. S. (2005). "The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars." *Science* 307(5717): 1909-14.
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., Gordon, J. I. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44): 15718-23.
- Bäckhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., Gordon, J. I. (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 979-84.
- Bederman, I. R., Previs, S. F. (2008). "Hormonal regulation of intracellular lipolysis in C57BL/6J mice: effect of diet-induced adiposity and data normalization." *Metabolism* 57(10): 1405-13.
- Belza, A., Jessen, A. B. (2005). "Bioactive food stimulants of sympathetic activity: effect on 24-h energy expenditure and fat oxidation." *Eur J Clin Nutr* 59(6): 733-41.
- Bonen, A., Tandon, N. N., Glatz, J. F., Luiken, J. J., Heigenhauser, G. J. (2006). "The fatty acid transporter FAT/CD36 is upregulated in subcutaneous and visceral adipose tissues in human obesity and type 2 diabetes." *Int J Obes (Lond)* 30(6): 877-83.
- Boschmann, M., Thielecke, F. (2007). "The effects of epigallocatechin-3-gallate on thermogenesis and fat oxidation in obese men: a pilot study." *J Am Coll Nutr* 26(4): 389S-395S.
- Bose, M., Lambert, J. D., Ju, J., Reuhl, K. R., Shapses, S. A., Yang, C. S. (2008). "The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice." *J Nutr* 138(9): 1677-83.
- Brasaemle, D. L. (2007). "Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis." *J Lipid Res* 48(12): 2547-59.

- Brown, M. S., Goldstein, J. L. (1998). "Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): controllers of lipid synthesis and cellular uptake." *Nutr Rev* 56(2 Pt 2): S1-3; discussion S54-75.
- Buddington, R. K., Buddington, K. K., Sunvold, G. D. (1999). "Influence of fermentable fiber on small intestinal dimensions and transport of glucose and proline in dogs." *Am J Vet Res* 60(3): 354-8.
- Bundeslebensmittelschlüssel (aufgerufen: 12/2009). Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. Karlsruhe.
- Cabrera, C., Artacho, R., Gimenez, R. (2006). "Beneficial effects of green tea--a review." *J Am Coll Nutr* 25(2): 79-99.
- Cahova, M., Vavrinkova, H., Kazdova, L. (2007). "Glucose-fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance." *Physiol Res* 56(1): 1-15.
- Cai, Y., Anavy, N. D., Chow, H. H. (2002). "Contribution of presystemic hepatic extraction to the low oral bioavailability of green tea catechins in rats." *Drug Metab Dispos* 30(11): 1246-9.
- Cao, H., Hininger-Favier, I., Kelly, M. A., Benaraba, R., Dawson, H. D., Coves, S., Roussel, A. M., Anderson, R. A. (2007). "Green tea polyphenol extract regulates the expression of genes involved in glucose uptake and insulin signaling in rats fed a high fructose diet." *J Agric Food Chem* 55(15): 6372-8.
- Capasso, R., Matias, I., Lutz, B., Borrelli, F., Capasso, F., Marsicano, G., Mascolo, N., Petrosino, S., Monory, K., Valenti, M., Di Marzo, V., Izzo, A. A. (2005). "Fatty acid amide hydrolase controls mouse intestinal motility in vivo." *Gastroenterology* 129(3): 941-51.
- Caspary, W. F. (1992). "Physiology and pathophysiology of intestinal absorption." *Am J Clin Nutr* 55(1 Suppl): 299S-308S.
- Ceregrzyn, M., Kuwahara, A. (2003). "The effect of epigallocatechin gallate on intestinal motility in mice." *Environ Health Prev Med* 8(2): 47-51.
- Chantre, P., Lairon, D. (2002). "Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of obesity." *Phytomedicine* 9(1): 3-8.
- Chen, L., Lee, M. J., Li, H., Yang, C. S. (1997). "Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats." *Drug Metab Dispos* 25(9): 1045-50.
- Chen, M., Yang, Y., Braunstein, E., Georgeson, K. E., Harmon, C. M. (2001). "Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(5): E916-23.
- Chen, J. H., Tipoe, G. L., Liong, E. C., So, H. S., Leung, K. M., Tom, W. M., Fung, P. C., Nanji, A. A. (2004). "Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants." *Am J Clin Nutr* 80(3): 742-51.
- Chen, D., Wang, C. Y., Lambert, J. D., Ai, N., Welsh, W. J., Yang, C. S. (2005). "Inhibition of human liver catechol-O-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: structure-activity relationship and molecular-modeling studies." *Biochem Pharmacol* 69(10): 1523-31.
- Chen, D., Milacic, V., Chen, M. S., Wan, S. B., Lam, W. H., Huo, C., Landis-Piwowar, K. R., Cui, Q. C., Wali, A., Chan, T. H., Dou, Q. P. (2008). "Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets." *Histol Histopathol* 23(4): 487-96.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* 162(1): 156-9.

- Choo, J. J. (2003). "Green tea reduces body fat accretion caused by high-fat diet in rats through beta-adrenoceptor activation of thermogenesis in brown adipose tissue." *J Nutr Biochem* 14(11): 671-6.
- Collins, Q. F., Liu, H. Y., Pi, J., Liu, Z., Quon, M. J., Cao, W. (2007). "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a green tea polyphenol, suppresses hepatic gluconeogenesis through 5'-AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem* 282(41): 30143-9.
- Crespy, V., Williamson, G. (2004). "A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models." *J Nutr* 134(12 Suppl): 3431S-3440S.
- Cutler, R. G. (2005). "Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health." *Ann N Y Acad Sci* 1055: 93-135.
- DAG Nationaler Aktionsplan gegen Übergewicht, Deutsche Adipositas Gesellschaft.
- Deutscher-Teeverband (2009). Tee als Wirtschaftsfaktor 2009.
- Diepvens, K., Westerterp, K. R., Westerterp-Plantenga, M. S. (2007). "Obesity and thermogenesis related to the consumption of caffeine, ephedrine, capsaicin, and green tea." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(1): R77-85.
- Dobrzyn, A., Ntambi, J. M. (2005). "Stearoyl-CoA desaturase as a new drug target for obesity treatment." *Obes Rev* 6(2): 169-74.
- Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2001). "Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats." *J Nutr* 131(6): 1753-7.
- Ducharme, N. A., Bickel, P. E. (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis." *Endocrinology* 149(3): 942-9.
- Dulloo, A. G., Mensi, N., Seydoux, J., Girardier, L. (1995). "Differential effects of high-fat diets varying in fatty acid composition on the efficiency of lean and fat tissue deposition during weight recovery after low food intake." *Metabolism* 44: 273-279.
- Dulloo, A. G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., Vandermander, J. (1999). "Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans." *Am J Clin Nutr* 70(6): 1040-5.
- Dulloo, A. G., Seydoux, J., Girardier, L., Chantre, P., Vandermander, J. (2000). "Green tea and thermogenesis: interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity." *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(2): 252-8.
- Dutton, S., Trayhurn, P. (2008). "Regulation of angiopoietin-like protein 4/fasting-induced adipose factor (Angptl4/FIAF) expression in mouse white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes." *Br J Nutr* 100(1): 18-26.
- Ellis, K. J. (2000). "Human body composition: in vivo methods." *Physiol Rev* 80(2): 649-80.
- Feng, W. Y. (2006). "Metabolism of green tea catechins: an overview." *Curr Drug Metab* 7(7): 755-809.
- Fernandez-Quintela, A., Churruga, I., Portillo, M. P. (2007). "The role of dietary fat in adipose tissue metabolism." *Public Health Nutr* 10(10A): 1126-31.
- Ferraris, R. P. (2001). "Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport." *Biochem J* 360(Pt 2): 265-76.
- Flint, A., Helt, B., Raben, A., Toubro, S., Astrup, A. (2003). "Effects of different dietary fat types on postprandial appetite and energy expenditure." *Obes Res* 11(12): 1449-55.

- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Franzke (1996). *Allgemeines Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Behrs Verlag.
- Freese, R., Basu, S., Hietanen, E., Nair, J., Nakachi, K., Bartsch, H., Mutanen, M. (1999). "Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females." *Eur J Nutr* 38(3): 149-57.
- Frenz, U. (1995). *Bestimmung der Energie- und Makronährstoffverwertung bei Ratten unter Diäten mit leicht unterschiedlichen Aminosäuregehalten: neue optimierte Methoden der indirekten Kalorimetrie*, Berlin: Verlag Dr. Köster.
- Frenz, U. (1999). *Whole Body Calorimetry*. Amsterdam Lausanne New York Oxford Shannon Singapore Tokyo, Elsevier Science.
- Friedman, J. M., Halaas, J. L. (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-70.
- Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K., Ashida, H. (2004). "Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells." *Biosci Biotechnol Biochem* 68(11): 2353-9.
- Galati, G., Lin, A., Sultan, A. M., O'Brien, P. J. (2006). "Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins." *Free Radic Biol Med* 40(4): 570-80.
- Geier, A., Trautwein, C. (2008). *Leberzelluntergang und -regeneration*, Georg Thieme Verlag KG.
- Grote, J. (2000). *Gewebeatmung. Physiologie des Menschen*. R. F. Schmidt, Thews, G., Lang, F. (Hrsg.), Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag: S. 624-637.
- Guerciolini, R. (1997). "Mode of action of orlistat." *Int J Obes Relat Metab Disord* 21 Suppl 3: S12-23.
- Gupta, S. (2001). "Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis." *Life Sci* 69(25-26): 2957-64.
- Hall, A. M., Smith, A. J. and Bernlohr, D. A. (2003). "Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1." *J Biol Chem* 278: 43008-43013.
- Hall, A. M., Wiczler, B. M., Herrmann, T., Stremmel, W. and Bernlohr, D. A. (2005). "Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of Acyl CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice." *J Biol Chem* 280: 11948-11954.
- Hara, Y., Honda, M. (1990). "Inhibition of alpha-Amylase by Tea Polyphenols." *Agric Biol Chem* 54(8): 1939-1945.
- Hase, T., Komine, Y., Meguro, S., Takeda, Y., Takahashi, H., Matsui, Y., Inaoka, S., Katsuragi, Y., Tokimitsu, I., Shimasaki, H., Itakura, H. (2001). "Anti-obesity effects of tea catechins in humans." *J Oleo Sci* 50: 599-605.
- Hasegawa, N., Yamda, N., Mori, M. (2003). "Powdered green tea has antilipogenic effect on Zucker rats fed a high-fat diet." *Phytother Res* 17(5): 477-80.
- Hauer, H., Buchholz, G., Hamann, A., Husemann, B., Koletzko, B., Liebermeister, H., Wabitsch, M., Westenhöfer, J., Wirth, A., Wolfram, G. (2007). *Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas*, Deutsche Adipositas-Gesellschaft, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin.

- Henry, C. J., Emery, B. (1986). "Effect of spiced food on metabolic rate." *Hum Nutr Clin Nutr* 40(2): 165-8.
- Higdon, J. V., Frei, B. (2003). "Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions." *Crit Rev Food Sci Nutr* 43(1): 89-143.
- Hong, J., Lambert, J. D., Lee, S. H., Sinko, P. J., Yang, C. S. (2003). "Involvement of multidrug resistance-associated proteins in regulating cellular levels of (-)-epigallocatechin-3-gallate and its methyl metabolites." *Biochem Biophys Res Commun* 310(1): 222-7.
- Hsu, C. L., Yen, G. C. (2007). "Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells." *J Agric Food Chem* 55(5): 1730-6.
- Igal, R. A., Wang, S., Gonzalez-Baro, M., Coleman, R. A. (2001). "Mitochondrial glycerol phosphate acyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol." *J Biol Chem* 276(45): 42205-12.
- Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, E., Nakayama, M., Nagao, H., Takeo, T., Yayabe, F., Sugano, M. (1992). "Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats." *Biochim Biophys Acta* 1127(2): 141-6.
- Ikeda, I., Tsuda, K., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Unno, T., Tomoyori, H., Goto, H., Kawata, Y., Imaizumi, K., Nozawa, A., Kakuda, T. (2005). "Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats." *J Nutr* 135(2): 155-9.
- Imai, K., Suga, K., Nakachi, K. (1997). "Cancer-preventive effects of drinking green tea among a Japanese population." *Prev Med* 26(6): 769-75.
- Isbrucker, R. A., Bausch, J., Edwards, J. A., Wolz, E. (2006). "Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 1: genotoxicity." *Food Chem Toxicol* 44(5): 626-35.
- Isbrucker, R. A., Edwards, J. A., Wolz, E., Davidovich, A., Bausch, J. (2006). "Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies." *Food Chem Toxicol* 44(5): 636-50.
- Jequier, E., Felber, J. P. (1987). "Indirect calorimetry." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1(4): 911-35.
- Jequier, E. (2001). "Is fat intake a risk factor for fat gain in children?" *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 980-3.
- Juhel, C., Armand, M., Pafumi, Y., Rosier, C., Vandermander, J., Lairon, D. (2000). "Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro." *J Nutr Biochem* 11(1): 45-51.
- Kallweit, E., Baulain, U., Henning, M., Kohn, G. (1997). "In vivo investigations of stress susceptibility in pigs by means of magnetic resonance spectroscopy." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 104(9): 380-3.
- Kao, Y. H., Hiipakka, R. A., Liao, S. (2000). "Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate." *Endocrinology* 141(3): 980-7.
- Kao, Y. H., Chang, H. H., Lee, M. J., Chen, C. L. (2006). "Tea, obesity, and diabetes." *Mol Nutr Food Res* 50(2): 188-210.
- Kersten, S., S. Mandard, et al. (2000). "Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene." *J Biol Chem* 275(37): 28488-93.
- Khan, N., Mukhtar, H. (2007). "Tea polyphenols for health promotion." *Life Sci* 81(7): 519-33.

- Khokhar, S., Magnúsdóttir, S. G. (2002). "Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom." *J Agric Food Chem* 50(3): 565-70.
- Kim, S., Lee, M. J., Hong, J., Li, C., Smith, T. J., Yang, G. Y., Seril, D. N., Yang, C. S. (2000). "Plasma and tissue levels of tea catechins in rats and mice during chronic consumption of green tea polyphenols." *Nutr Cancer* 37(1): 41-8.
- Kim, K. Y., Choi, S.J., Jang, H.J., Zuo, D.C., Shahi, P.K., Parajuli, S.P., Yeum, C.H., Yoon, P.J., Choi, S., Jun, J.Y. (2008). "(-)-Epigallocatechin Gallate Inhibits the Pacemaker Activity of Interstitial Cells of Cajal of Mouse Small Intestine." *Korean J Physiol Pharmacol* 12: 111-115.
- Klaus, S., Pütlz, S., Thone-Reineke, C., Wolfram, S. (2005). "Epigallocatechin gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation." *Int J Obes (Lond)* 29(6): 615-23.
- Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Arai, S., Hara, Y., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Shimizu, M. (2000). "Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism." *J Agric Food Chem* 48(11): 5618-23.
- Kobayashi, M., Unno, T., Suzuki, Y., Nozawa, A., Sagesaka, Y., Kakuda, T., Ikeda, I. (2005). "Heat-epimerized tea catechins have the same cholesterol-lowering activity as green tea catechins in cholesterol-fed rats." *Biosci Biotechnol Biochem* 69(12): 2455-8.
- Kohri, T., N. Matsumoto, et al. (2001). "Metabolic fate of (-)-[4-(3)H]epigallocatechin gallate in rats after oral administration." *J Agric Food Chem* 49(8): 4102-12.
- Kohri, T., Nanjo, F., Suzuki, M., Seto, R., Matsumoto, N., Yamakawa, M., Hojo, H., Hara, Y., Desai, D., Amin, S., Conaway, C. C., Chung, F. L. (2001). "Synthesis of (-)-[4-(3)H]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration." *J Agric Food Chem* 49(2): 1042-8.
- Koletzko, B., Girardet, J.P., Klish, W., Tabacco, O. (2002). "Obesity in children and adolescents worldwide: current views and future directions." *J Ped Gastroenterol Nutr* 35: S205-212.
- Koo, S. I., Noh, S. K. (2007). "Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect." *J Nutr Biochem* 18(3): 179-83.
- Kovacs, E. M., Lejeune, M. P., Nijs, I., Westerterp-Plantenga, M. S. (2004). "Effects of green tea on weight maintenance after body-weight loss." *Br J Nutr* 91(3): 431-7.
- Köster, A., Chao, Y. B., Mosior, M., Ford, A., Gonzalez-DeWhitt, P. A., Hale, J. E., Li, D., Qiu, Y., Fraser, C. C., Yang, D. D., Heuer, J. G., Jaskunas, S. R., Eacho, P. (2005). "Transgenic angiotensin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism." *Endocrinology* 146(11): 4943-50.
- Lambert, J. D., Yang, C. S. (2003). "Mechanisms of cancer prevention by tea constituents." *J Nutr* 133(10): 3262S-3267S.
- Lambert, J. D., Lee, M. J., Diamond, L., Ju, J., Hong, J., Bose, M., Newmark, H. L., Yang, C. S. (2006). "Dose-dependent levels of epigallocatechin-3-gallate in human colon cancer cells and mouse plasma and tissues." *Drug Metab Dispos* 34(1): 8-11.
- Lambert, J. D., Sang, S., Yang, C. S. (2007). "Possible controversy over dietary polyphenols: benefits vs risks." *Chem Res Toxicol* 20(4): 583-5.
- Langin, D., Holm, C., Lafontan, M. (1996). "Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism." *Proc Nutr Soc* 55(1B): 93-109.

- Lean, M. E., Han, T. S., Morrison, C. E. (1995). "Waist circumference as a measure for indicating need for weight management." *Bmj* 311(6998): 158-61.
- Lee, M. S., Kim, C. T., Kim, Y. (2009). "Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate reduces body weight with regulation of multiple genes expression in adipose tissue of diet-induced obese mice." *Ann Nutr Metab* 54(2): 151-7.
- Lee, M. S., Kim, C. T., Kim, I. H., Kim, Y. (2009). "Inhibitory effects of green tea catechin on the lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes." *Phytother Res* 23(8): 1088-91.
- Leenen, R., Roodenburg, A. J., Tijburg, L. B., Wiseman, S. A. (2000). "A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans." *Eur J Clin Nutr* 54(1): 87-92.
- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., Giacca, A. (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." *Endocr Rev* 23(2): 201-29.
- Li, C., Lee, M. J., Sheng, S., Meng, X., Prabhu, S., Winnik, B., Huang, B., Chung, J. Y., Yan, S., Ho, C. T., Yang, C. S. (2000). "Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion." *Chem Res Toxicol* 13(3): 177-84.
- Liao, S. (2001). "The medicinal action of androgens and green tea epigallocatechin gallate." *Hong Kong Med J* 7(4): 369-74.
- Lin, J., Della-Fera, M. A., Baile, C. A. (2005). "Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes." *Obes Res* 13(6): 982-90.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method." *Methods* 25(4): 402-8.
- Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H., Hara, Y. (1993). "Reduction of Blood Glucose Levels by Tea Catechin." *Biosci Biotechnol Biochem* 57(4): 525-527.
- Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P. A., Cassetti, F., Raschetti, R., Santuccio, C., Mastrangelo, S. (2009). "Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases." *Eur J Clin Pharmacol* 65(4): 331-41.
- Mensink, G., Lampert, T., Bergmann, E. (2005). *Übergewicht und Adipositas in Deutschland 1984-2003*. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 48: 1348-1356.
- Metges, C. C., Petzke, K. J. (1997). "Measurement of 15N/14N isotopic composition in individual plasma free amino acids of human adults at natural abundance by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry." *Anal Biochem* 247(1): 158-64.
- Michna, L., Lu, Y. P., Lou, Y. R., Wagner, G. C., Conney, A. H. (2003). "Stimulatory effect of oral administration of green tea and caffeine on locomotor activity in SKH-1 mice." *Life Sci* 73(11): 1383-92.
- Milger, K., Herrmann, T., Becker, C., Gotthardt, D., Zickwolf, J., Eehalt, R., Watkins, P. A., Stremmel, W., Fullekrug, J. (2006). "Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4." *J Cell Sci* 119(Pt 22): 4678-88.
- Moon, H. S., Chung, C. S., Lee, H. G., Kim, T. G., Choi, Y. J., Cho, C. S. (2007). "Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells." *Obesity (Silver Spring)* 15(11): 2571-82.
- Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Latruffe, N. (1998). "Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner." *J Biol Chem* 273(27): 16710-4.

- Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T., Tokimitsu, I. (2002). "Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver." *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(11): 1459-64.
- Murase, T., Haramizu, S., Shimotoyodome, A., Nagasawa, A., Tokimitsu, I. (2005). "Green tea extract improves endurance capacity and increases muscle lipid oxidation in mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3): R708-15.
- Murase, T., Haramizu, S., Shimotoyodome, A., Tokimitsu, I., Hase, T. (2006). "Green tea extract improves running endurance in mice by stimulating lipid utilization during exercise." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(6): R1550-6.
- Murase, T., Misawa, K., Haramizu, S., Hase, T. (2009). "Catechin-induced activation of the LKB1/AMP-activated protein kinase pathway." *Biochem Pharmacol* 78(1): 78-84.
- Mutschler E., G. G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting M. (2001). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S., Juneja, L. R. (2002). "Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage." *J Agric Food Chem* 50(8): 2418-22.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., Kiso, Y. (2005). "Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro." *J Agric Food Chem* 53(11): 4593-8.
- Nakamura, Y., Kaihara, A., Yoshii, K., Tsumura, Y., Ishimitsu, S., Tonogai, Y. (2002). "Effects of the Oral Administration of Green Tea Polyphenol and Tannic Acid on Serum and Hepatic Lipid Contents and Fecal Steroid Excretion in Rats." *J Health Sci* 47(2): 107-117.
- Nakamura, M. T., Cheon, Y., Li, Y., Nara, T. Y. (2004). "Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids." *Lipids* 39(11): 1077-83.
- Neyrinck, A. M., Bindels, L. B., De Backer, F., Pachikian, B. D., Cani, P. D., Delzenne, N. M. (2009). "Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action." *Int Immunopharmacol* 9(6): 767-73.
- Noack, R. (1995). *Energiehaushalt. Ernährungsmedizin*. H.-K. Bisalski, Stuttgart New York: Thieme Verlag: S. 19-29.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendziorski, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., Attie, A. D. (2002). "Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11482-6.
- Ohnishi, R., Iga, K., Kiriya, S. (2005). "Green tea polyphenols reduce protein digestibility and suppress cecal fermentation in rats." *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 58: 199-208.
- Okushio, K., Matsumoto, N., Kohri, T., Suzuki, M., Nanjo, F., Hara, Y. (1996). "Absorption of tea catechins into rat portal vein." *Biol Pharm Bull* 19(2): 326-9.
- Papadopoulou, A., Frazier, R.A. (2004). "Characterization of protein-polyphenol interactions." *Trends in Food Science & Technology* 15: 186-190.
- Peters, J. C. (2003). "Dietary fat and body weight control." *Lipids* 38(2): 123-7.
- Petzke, K. J., Boeing, H., Klaus, S., Metges, C. C. (2005). "Carbon and nitrogen stable isotopic composition of hair protein and amino acids can be used as biomarkers for animal-derived dietary protein intake in humans." *J Nutr* 135(6): 1515-20.

- Poirier, H., Degrace, P., Niot, I., Bernard, A., Besnard, P. (1996). "Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP)." *Eur J Biochem* 238(2): 368-73.
- Poirier, H., Niot, I., Monnot, M. C., Braissant, O., Meunier-Durmort, C., Costet, P., Pineau, T., Wahli, W., Willson, T. M., Besnard, P. (2001). "Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine." *Biochem J* 355(Pt 2): 481-8.
- Puig, M. M., Pol, O. (1998). "Peripheral effects of opioids in a model of chronic intestinal inflammation in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 287(3): 1068-75.
- Raederstorff, D. G., Schlachter, M. F., Elste, V., Weber, P. (2003). "Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats." *J Nutr Biochem* 14(6): 326-32.
- Rasouli, N., Kern, P. A. (2008). "Adipocytokines and the metabolic complications of obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 93(11 Suppl 1): S64-73.
- Rayalam, S., Della-Fera, M. A., Baile, C. A. (2008). "Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle." *J Nutr Biochem* 19(11): 717-26.
- Rehner, G., Daniel, H. (2002). *Biochemie der Ernährung*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Reimer, R. A., Field, C. J. and McBurney, M. I. (1997). "Ontogenic changes in proglucagon mRNA in BB diabetes-prone and normal rats weaned onto a chow diet." *Diabetologia* 40: 871-878.
- Rhoads, D. B., Rosenbaum, D.H., Unsal, H., Isselbacher, K.J., Levitsky, L.L. (1998). "Circadian Periodicity of Intestinal Na¹/Glucose Cotransporter 1 mRNA Levels Is Transcriptionally Regulated." *J Biol Chem* 273(16): 9510-9516.
- Rosenbaum, M., Leibel, R. L., Hirsch, J. (1997). "Obesity." *N Engl J Med* 337(6): 396-407.
- Rothwell, N. J., Stock, M. J. (1979). "A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis." *Nature* 281(5726): 31-5.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M. C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A. M., Bouillaud, F., Ricquier, D. (2004). "The biology of mitochondrial uncoupling proteins." *Diabetes* 53 Suppl 1: S130-5.
- Sakurai, N., Mochizuki, K., Kameji, H., Shimada, M., Goda, T. (2009). "(-)-Epigallocatechin gallate enhances the expression of genes related to insulin sensitivity and adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes at an early stage of differentiation." *Nutrition* 25(10): 1047-56.
- Samuel, V. T., Liu, Z. X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A. J., Shulman, G. I. (2004). "Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease." *J Biol Chem* 279(31): 32345-53.
- Schmidt, M., Schmitz, H. J., Baumgart, A., Guedon, D., Netsch, M. I., Kreuter, M. H., Schmidlin, C. B., Schrenk, D. (2005). "Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture." *Food Chem Toxicol* 43(2): 307-14.
- Schulz, C., Lehnert, H. (1999). *Grundlagen der Ernährung, Regulation der Nahrungsaufnahme. Ernährungsmedizin*. H. K. Biesalski, Fürst, P., Kasper, H., Kluthe, R., Pöler, W., Puchstein, and S. Ch., H.B. (Hrsg.). Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2. Auflage.
- Schutz, Y. (1995). "The basis of direct and indirect calorimetry and their potentials." *Diabetes Metab Rev* 11(4): 383-408.

- Seddik, M., Lucidarme, D., Creusy, C., Filoche, B. (2001). "Is Exolise hepatotoxic?" *Gastroenterol Clin Biol* 25(8-9): 834-5.
- Seidell, J. C., Verschuren, W. M., van Leer, E. M., Kromhout, D. (1996). "Overweight, underweight, and mortality. A prospective study of 48,287 men and women." *Arch Intern Med* 156(9): 958-63.
- Shahkhalili, Y., Finot, P. A., Hurrell, R., Fern, E. (1990). "Effects of foods rich in polyphenols on nitrogen excretion in rats." *J Nutr* 120(4): 346-52.
- Shimizu, M., Kobayashi, Y., Suzuki, M., Satsu, H., Miyamoto, Y. (2000). "Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins." *Biofactors* 13(1-4): 61-5.
- Shimizu, M., Weinstein, I. B. (2005). "Modulation of signal transduction by tea catechins and related phytochemicals." *Mutat Res* 591(1-2): 147-60.
- Shimomura, Y., Tamura, T., Suzuki, M. (1990). "Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet." *J Nutr* 120(11): 1291-6.
- Shimotoyodome, A., Haramizu, S., Inaba, M., Murase, T., Tokimitsu, I. (2005). "Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice." *Med Sci Sports Exerc* 37(11): 1884-92.
- Shishikura, Y., Khokhar, S., Murray, B. S. (2006). "Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system." *J Agric Food Chem* 54(5): 1906-13.
- Söhle, J., Knott, A., Holtzmann, U., Siegner, R., Gronniger, E., Schepky, A., Gallinat, S., Wenck, H., Stab, F., Winnefeld, M. (2009). "White Tea extract induces lipolytic activity and inhibits adipogenesis in human subcutaneous (pre)-adipocytes." *Nutr Metab (Lond)* 6: 20.
- Spencer, J. P. (2003). "Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract." *J Nutr* 133(10): 3255S-3261S.
- Stahl, A., Hirsch, D. J., Gimeno, R. E., Punreddy, S. and P. Ge, Watson, N., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L. A., Lodish, H. F. (1999). "Identification of the major intestinal fatty acid transport protein." *Mol Cell* 4(3): 299-308.
- Stangl, V., Lorenz, M., Stangl, K. (2006). "The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health." *Mol Nutr Food Res* 50(2): 218-28.
- Stunkard, A. J., Sorensen, T. I., Hanis, C., Teasdale, T. W., Chakraborty, R., Schull, W. J., Schulsinger, F. (1986). "An adoption study of human obesity." *N Engl J Med* 314(4): 193-8.
- Stunkard, A. J., Harris, J. R., Pedersen, N. L., McClearn, G. E. (1990). "The body-mass index of twins who have been reared apart." *N Engl J Med* 322(21): 1483-7.
- Suzuki, Y., Unno, T., Kobayashi, M., Nozawa, A., Sagesaka, Y., Kakuda, T. (2005). "Dose-dependent suppression of tea catechins with a galloyl moiety on postprandial hypertriglyceridemia in rats." *Biosci Biotechnol Biochem* 69(7): 1288-91.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. (2006). "Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 52(2): 149-153.
- Taipalensuu, J., Tornblom, H., Lindberg, G., Einarsson, C., Sjoqvist, F., Melhus, H., Garberg, P., Sjostrom, B., Lundgren, B., Artursson, P. (2001). "Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers." *J Pharmacol Exp Ther* 299(1): 164-70.
- Trayhurn, P., Beattie, J. H. (2001). "Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ." *Proc Nutr Soc* 60(3): 329-39.

- Tsuchida, T., Itakura, H., Nakamura, H. (2002). "Reduction of Body Fat in Humans by Long-term Ingestion of Catechins." *Prog. Med.* 22: 2189-2203.
- Ueda, M., Nishiumi, S., Nagayasu, H., Fukuda, I., Yoshida, K., Ashida, H. (2008). "Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 377(1): 286-90.
- Unno, T., Osada, C., Motoo, Y., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Nozawa, A. (2009). "Dietary tea catechins increase fecal energy in rats." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 55(5): 447-51.
- Vaerman, J. L., Saussoy, P., Ingargiola, I. (2004). "Evaluation of real-time PCR data." *J Biol Regul Homeost Agents* 18(2): 212-4.
- van den Bosch, H. M., Bungler, M., de Groot, P. J., van der Meijde, J., Hooiveld, G. J., Muller, M. (2007). "Gene expression of transporters and phase I/II metabolic enzymes in murine small intestine during fasting." *BMC Genomics* 8: 267.
- Waltner-Law, M. E., Wang, X. L., Law, B. K., Hall, R. K., Nawano, M., Granner, D. K. (2002). "Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production." *J Biol Chem* 277(38): 34933-40.
- Wang, S., Noh, S. K., Koo, S. I. (2006). "Epigallocatechin gallate and caffeine differentially inhibit the intestinal absorption of cholesterol and fat in ovariectomized rats." *J Nutr* 136(11): 2791-6.
- Wang, S., Noh, S. K., Koo, S. I. (2006). "Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A(2) and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats." *J Nutr Biochem* 17(7): 492-8.
- Weber, K., Bolander, M. E., Sarkar, G. (1998). "PIG-B: a homemade monophasic cocktail for the extraction of RNA." *Mol Biotechnol* 9(1): 73-7.
- Weisburg, J. H., Weissman, D. B., Sedaghat, T., Babich, H. (2004). "In vitro cytotoxicity of epigallocatechin gallate and tea extracts to cancerous and normal cells from the human oral cavity." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(4): 191-200.
- Weisburger, J. H. (1997). "Tea and health: a historical perspective." *Cancer Lett* 114(1-2): 315-7.
- Westerterp-Plantenga, M. S., Lejeune, M. P., Kovacs, E. M. (2005). "Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation." *Obes Res* 13(7): 1195-204.
- WHO (2000). *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. WHO Technical Report Series 894, Genf, WHO.
- WHO (2005). *WHO Mortality Database*.
- WHO (aufgerufen: Oktober 2009). *Food and Health in Europe: a new basis for action*, WHO Regional Publications European Series No. 96, <http://www.euro.who.int/document/E82161.pdf>.
- Wolf, A., Bray, G. A., Popkin, B. M. (2008). "A short history of beverages and how our body treats them." *Obes Rev* 9(2): 151-64.
- Wolfram, S., Raederstorff, D., Wang, Y., Teixeira, S. R., Elste, V., Weber, P. (2005). "TEAVIGO (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass." *Ann Nutr Metab* 49(1): 54-63.
- Wolfram, S., Wang, Y., Thielecke, F. (2006a). "Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench." *Mol Nutr Food Res* 50(2): 176-87.

- Wolfram, S., Raederstorff, D., Preller, M. and Y. Wang, Teixeira, S. R., Riegger, C., Weber, P. (2006b). "Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents." *J Nutr* 136(10): 2512-8.
- Wolfram, S. (2007). "Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health." *J Am Coll Nutr* 26(4): 373S-388S.
- Wright, E. M., Loo, D.D.F., Panayatova-Heiermann, M., Hirayama, B.A., Turk, E., Eskandari, S., Lam, J. (1998). "Structure and function of the Na⁺/glucose cotransporter." *Acta Physiol Scand* 163(Suppl. 643): 257-264.
- Wu, C. H., Lu, F. H., Chang, C. S., Chang, T. C., Wang, R. H., Chang, C. J. (2003). "Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution." *Obes Res* 11(9): 1088-95.
- Wueest, S., Rapold, R. A., Rytka, J. M., Schoenle, E. J., Konrad, D. (2009). "Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice." *Diabetologia* 52(3): 541-6.
- Yamamoto, T., Hsu, S., Lewis, J., Wataha, J., Dickinson, D., Singh, B., Bollag, W. B., Lockwood, P., Ueta, E., Osaki, T., Schuster, G. (2003). "Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells." *J Pharmacol Exp Ther* 307(1): 230-6.
- Yang, C. S., Chen, L., Lee, M. J., Balentine, D., Kuo, M. C., Schantz, S. P. (1998). "Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7(4): 351-4.
- Yang, C. S., Landau, J. M. (2000). "Effects of tea consumption on nutrition and health." *J Nutr* 130(10): 2409-12.
- Yu, H. N., Shen, S. R., Xiong, Y. K. (2005). "Cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate to LNCaP cells in the presence of Cu²⁺." *J Zhejiang Univ Sci B* 6(2): 125-31.
- Zheng, G., Sayama, K., Okubo, T., Juneja, L. R., Oguni, I. (2004). "Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice." *In Vivo* 18(1): 55-62.
- Zhong, L., Furne, J. K., Levitt, M. D. (2006). "An extract of black, green, and mulberry teas causes malabsorption of carbohydrate but not of triacylglycerol in healthy volunteers." *Am J Clin Nutr* 84(3): 551-5.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." *Science* 306(5700): 1383-6.

Danksagung

Ohne die freundliche und tatkräftige Unterstützung vieler Kollegen und Freunde wäre die Bearbeitung und Durchführung dieser Dissertation viel schwieriger verlaufen. An dieser Stelle möchte ich mich für die Hilfe und den Rat aller bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich:

- Frau Prof. Dr. Susanne Klaus für die Überlassung des Themas, ihre kontinuierliche Betreuung und wertvolle Hilfestellung bei der Planung der Versuche und bei der Erstellung des Manuskripts. Sie stand mir jederzeit für Fragen und Diskussionen zur Arbeit sowie bei Problemen zur Seite und ließ mir genügend Freiraum und Selbständigkeit.
- Frau Dr. Yvonne Katterle und Frau Dr. Inka Gotthardt danke ich für ihre zahlreichen Ratschläge und Diskussionen bei der Etablierung verschiedener Labormethoden sowie für die vielen netten Gespräche weitab des Laboralltages.
- Herrn Dr. K.J. Petzke und Frau Petra Albrecht danke ich für die Vorbereitung und massenspektrometrische Bestimmung der Atemgase und Organproben.
- Frau Dr. Felicitas Taugner und Frau Dr. Simone Florian möchte ich für ihre Hilfe bei der Auswertung und Beurteilung der histologischen Schnitte danken.
- Frau Antje Sylvester und Frau Karin Schaller danke ich für ihre geduldige und tatkräftige Unterstützung bei den Analysen, den vielen Fragen sowie für viele nette und aufmunternde Gespräche, die den Laboralltag versüßten.
- Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Physiologie des Energiestoffwechsels möchte ich für ihre unermüdliche Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit danken.
- Allen Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums möchte ich für die zuverlässige Betreuung der Tiere und die Hilfe bei den Applikationen und Operationen danken. Besonders Elisabeth Mayer danke ich für die Durchführung der histologischen Färbungen.
- Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des DIfE, insbesondere dem Personalreferat, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Familie und meinen Freunden, die mir stets ihren Optimismus entgegen brachten, mich motivierten, mich immer wieder aufmunterten und einfach nur da waren. Vielen Dank!