

# Flavan-3-oler och endotel -dysfunktion

Flavan-3-ols and endothelial dysfunction

*Felicia Woll*



Institutionen för livsmedelsvetenskap

Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap- kandidatarbete, 15 hp, G2E

Agronomprogrammet - livsmedel

Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap, nr 389

Uppsala, 2014

## **Flavan-3-oler och endotel -dysfunktion**

Flavan-3-ols and endothelial dysfunction

*Felicia Woll*

**Handledare:** Rikard Landberg, Institutionen för livsmedelsvetenskap, SLU

**Examinator:** Lena Dimberg, Institutionen för livsmedelsvetenskap, SLU

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i livsmedelsvetenskap

**Kurskod:** EX0669

**Program/utbildning:** Agronom - Livsmedel

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2014

**Omslagsbild:** Felicia Woll

**Serietitel:** Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för livsmedelsvetenskap  
nr:389

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Endotel –dysfunktion, Flavan-3-oler, FMD, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap  
Institutionen för livsmedelsvetenskap



# 1 ABSTRACT

**Background:** Flavan-3-ols are polyphenolic phytochemicals belonging to the flavonoids. Flavan-3-ols are present in many higher plants and are particularly concentrated in e.g. *Camellia sinensis* (tea) and *Theobroma cacao* (cacao) and have got attention due to their antioxidative capacity. Many studies have been able to associate flavan-3-ol-rich foods to improved endothelial function. The aim of the present work is to review the scientific literature and evaluate the evidence for positive effects of flavan-3-ols on endothelial dysfunction in humans.

**Method:** Scientific articles describing intervention and observational studies about flavan-3-ols and endothelial dysfunction, were searched for on <http://www.pubmed.org>.

**Results:** Ten out of ten intervention studies show that green and black tea and cacao products affect typical biomarkers for endothelial dysfunction and improve the endothelial dependent vasodilatation and endothelial dysfunction, with acute and long term effects. Observational studies show that flavan-3-ol-rich are associated with a reduced risk for type 2 diabetes and a reduced risk for CVDs such as myocardial infarction after adjustment for established confounders.

**Conclusion:** Flavan-3-ol rich food appears to have a positive effect on endothelial dysfunction and the effects may be attributed to the flavan-3-ols per se.

**Keywords:** Flavan-3-ols, Endothelial dysfunction, FMD, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*.

# 2 SAMMANFATTNING

**Bakgrund:** Flavan-3-oler är polyfenoliska fytokemikalier tillhörandes flavonoiderna. Flavan-3-oler finns i de flesta högre växter och är särskilt koncentrerade i t.ex. *Camellia sinensis* (te) och *Theobroma cacao* (kaka) och har fått mycket uppmärksamhet p.g.a deras antioxidativa kapacitet. Ett flertal studier har pekat på ett samband mellan flava-3-olrika livsmedel och förbättrad endotel-funktion. Syftet med denna litteraturstudie är att sammanfatta vetenskapligt underlag och utvärdera bevis avseende flavan-3-olers positiva effekter på endotel -dysfunktion hos människor.

**Metod:** Vetenskapliga artiklar beskrivande interventions- och observationsstudier avseende flavan-3-oler och endotel -dysfunktion söktes på databasen <http://www.pubmed.org>.

**Resultat:** Tio av tio interventionsstudier visar att grönt och svart te och kakaoprodukter påverkar typiska biomarkörer för endotel -dysfunktion och förbättrar den endotelberoende vasodilateringen och endotel -dysfunktion, akut och på kort och lång sikt. Observationsstudier visar att flavan-3-olrika livsmedel kan kopplas till en reducerad risk för typ 2 diabetes och för CVDs så som hjärtinfarkt.

**Slutsats:** Flavan-3-olrika livsmedel har en positiv effekt på endotel -dysfunktion.

**Nyckelord:** Flavan-3-oler, Endotel -dysfunktion, FMD, *Camellia sinensis*, *Theobroma cacao*.

# 3 INNEHÅLL

1 ABSTRACT .....	1
2 SAMMANFATTNING .....	1
4 FÖRKORTNINGAR.....	3
5 SYFTE.....	3
6 AVGRÄNSNINGAR .....	3
7 METOD.....	3
8 BAKGRUND .....	4
8.1 FLAVAN-3-OLER.....	4
Kemisk struktur och funktion.....	4
Flavan-3-olrika livsmedel .....	5
Flavan-3-olers bioaktivitet .....	6
8.2 ENDOTEL –DYSFUNKTION .....	7
Oxidativ stress .....	7
Reducerad syrenivå p.g.a. NO och NADPH-oxidaser .....	7
Reducerad NO-nivå p.g.a. minskad produktion.....	7
Flow-mediated dilatation, FMD .....	8
Mätbara biomarkörer för endotel –dysfunktion .....	9
Följsjukdommar av endotel -dysfunktion .....	10
Kostens påverkan på endotel -dysfunktion .....	11
9 FLAVAN-3-OLER OCH ENDOTEL-DYSFUNKTION.....	11
9.1 INTERVENTIONER .....	11
Grönt te och endotel -dysfunktion.....	12
Svart te och endotel -dysfunktion.....	12
Kakao, choklad och endotel -dysfunktion.....	13
Kemiskt renat EGKG (kosttillskott) och endotel -dysfunktion.....	14
9.2 OBSERVATIONSSTUDIER.....	14
Flavan-3-oler och typ 2 diabetes .....	14
Te och hjärtinfarkt .....	15
Choklad och plötslig död i hjärtinfarkt .....	15
10 DISKUSSION .....	15
11 SLUTSATS .....	16
12 TACK!.....	16
13 REFERENSER.....	17
Elektroniska.....	18

## 4 FÖRKORTNINGAR

ASI	Arterial Stiffness Index
CAC	Circulating Angiogenic Cell
CAD	Coronary Artery Disease
CHD	Coronary Heart Disease
EPC	Endothelial Progenitor Cell
EK	Epikatekin
EGK	Epigallokatekin
EKG	Epikatekingallat
EGKG	Epigallokatekingallat
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
FMD	Flow-Mediated Dilatation
GTN	Glyceroltrinitrat
NO	Nitric Oxide
sNOX2-dp	Soluble NOX2 derived peptide
USDA	United States Department of Agriculture

## 5 SYFTE

Syftet med denna litteraturstudie är att undersöka om flavan-3-oler påverkar endotelfunktion hos människa.

## 6 AVGRÄNSNINGAR

Studien avgränsas till att behandla interventions- och observationsstudier på människa och, effekt respektive samband mellan flavan-3-oler/flavan-3-olrika livsmedel och endotel -dysfunktion behandlas. Antalet biomarkörer som studeras i interventionsstudierna begränsas till, FMD, ICAM-1, EPC, sNOX2-dp, CAC, IL, isoprostaner och ASI.

## 7 METOD

Material i form av vetenskapliga artiklar söktes på sökmotorn <http://www.pubmed.org>, med sökorden; endothelial dysfunction and flavan-3-ols, -and catechins, -and FMD, -and flow mediated dilatation, -and green tea, -and black tea, -and *Camellia sinensis*, -and *Theobroma cacao* and meta-analysis.

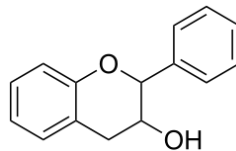
# 8 BAKGRUND

## 8.1 FLAVAN-3-OLER

Flavan-3-oler är polyfenoler tillhörandes klassen flavanoider, en relativt heterogen grupp med stor spridning i frukt och grönt (Ho, 2008). De flavanoida klasserna innefattar även flavoner, flavanoner, flavonoler, isoflavanoider och anthocyanidiner (Ho, 2008). Flavan-3-olerna består av katekinerna, katekin (K), gallokatekin (GK), epikatekin (EK), epigallokatekin (EGK), epikatekin-3-gallate (EKG), epigallokatekin-3-gallate (EGKG) samt polymerer av flavan-3-olor, s.k. proanthocyanidiner (USDA, 2011). Flavan-3-oler är inte något näringsämne men har en positiv påverkan på hälsa (t.ex. som antioxidanter) och kommer från växtriket, därav benämningen fytokemikalier, ibland även fytonäringsämne (USDA, 2005). United States Department of Agriculture, USDA har i databasen över flavanoidhalter i valda livsmedel valt att även placera procyanidiner (d.v.s. theaflaviner och thearubiginer) under flavan-3-oler, främst för deras rika förekomst i te (USDA, 2013). Procyanidiner bildas utifrån monomera flavan-3-oler, under enzymatisk oxidering (fermentering) (Ho, 2008). Mängden flavan-3-oler i växter och livsmedel varierar mellan olika sorters växter och mellan samma sorts växter i och med växtens ålder, agrara förutsättningar, eventuell lagring, transport och processning av växt (Ho 2008).

### Kemisk struktur och funktion

Alla flavan-3-oler består så som alla flavonoider av ett och samma grundskelett, bestående av två aromatiska ringar med en enkelbindning till en tredje aromatisk ring **Figur 1**. Samtliga ringar är hydroxylerade till olika grad, beroende av enskild flavan-3-ol förening.



**Figur 1. Grundskelett.** Samtliga flavan-3-olers och flavonoiders gemensamma grundskelett.

Vissa flavan-3-oler har en eller flera esterbundna gallsyror (USDA 2011). Vid fermenteringsprocesser oxideras monomera flavan-3-oler och di- och trimerer men även oligomerer bildas, s.k. procyanidiner (USDA 2011). Växter syntetiserar flavan-3-oler som sekundära metaboliter då de skyddar växten mot fotosyntetisk stress (UV-strålning) och fungerar som ett försvar mot virus-, bakterie- eller insektsangrepp (Stalikas, 2010, p. 65). Flavan-3-oler har en adstringerande, kärv och torkande effekt på angripande djur och mikrober (Aron & Kennedy 2008). Flavan-3-oler har även förmågan att kela essentiella metaller, t.ex. järn och koppar, hos angripare (Ho 2008) och därmed orsaka mineralbrist och begränsad tillväxt för dessa bakterier (Aron & Kennedy 2008). I och med att flavan-3-oler (och procyanidiner) binder övergångsmetaller som fritt järn och koppar hindras dessa från att som de annars gör i biologiska system, generera fria radikaler, så som hydroxylradikaler (Aron & Kennedy 2008). Prolinrika proteiner i människans saliv tyder på att en viss anpassning till intag av de kärva flavan-3-olerna i livsmedel som exempelvis te skett (Aron & Kennedy 2008). Flavan-3-oler är antioxidanter, vars styrka beror av var och hur

hydroxylgrupperna är lokaliserade (Middleton *et al.* 2000), hur många de är till antalet (Sies 2012) och om det finns någon esterbunden gallsyra (Aron & Kennedy 2008). Den antioxidativa styrkan ökar från monomerer till trimerer och avtar från trimerer till tetramerer (Aron & Kennedy 2008) samt vid methoxylering och glykosylering (Aron & Kennedy 2008). Flavan-3-olerna vattenlösliga föreningar, främst p.g.a. dess hydroxylgrupper (Ho 2008). Procyanidiner har som flavan-3-olerna antioxidativ kapacitet, vilken varierar med antal och lokalisering av hydroxylgrupper (Sies 2012).

## Flavan-3-olrika livsmedel

Flavan-3-oler är sk. kostantioxidanter vilka enbart kan tillföras via kosten (Middleton *et al.*, 2000). **Tabell I** visar ett urval av livsmedel och deras flavan-3-olinnehåll. Kakao är ett relativt flavan-3-olrikt livsmedel (epikatekin: 196 mg/100g) i jämförelse med t.ex. päron, äpplen och pecan nöt, även om flavan-3-olhaltererna i kakao inte kommer upp i de höga koncentrationer som finns i te (USDA 2011), se **Tabell II**. I äpplen finns K och EK koncentrerade i dess skal jämfört med koncentrationen (USDA 2011). Generellt är mängden flavan-3-oler högre i färsk frukt än i torkad eller tillagad (Aron & Kennedy 2008). Processning och lagring av livsmedel leder ofta till epimerisering, degradering och de-polymerisering till de oligomera- och polymera formerna av flavan-3-oler (Aron & Kennedy 2008). Då Knaze *et al.*, (2011) estimerade intaget av flavan-3-oler i Europa delades populationen upp i grupper, varav "hälsomedvetna män" (453,5 mg/dag) och "kvinnor generellt" (377,6 mg/dag) i Storbritannien stod för det högsta intaget av flavan-3-oler i Europa, medan det lägsta intaget fanns i grupperna "män" (106,5 mg/dag) och "kvinnor" (124,8 milligram/dag) i Grekland. Den största källan till flavan-3-oler bland grupperna i Europa är enligt Knaze *et al.*, (2011) frukter som äpplen och päron (ej-citrusfrukter) medan det i Storbritannien enskilt är te. En studie från Malmö, Sverige visade att medelintaget där, i grupperna "män" och "kvinnor" var 242,3 mg/dag respektive 235,3 mg/dag (Knaze *et al.*, 2011).

**Tabell I.** Flavan-3-olmängden i valda livsmedel.

Flavonoid	Förening*	Cacao powder dry <i>Theobroma cacao</i> mg/100g	Choklad dryck med mjölk mg/100g	Päron <i>Pyrus communis</i> mg/100g	Äppel- skal mg/100g	Äpple Granny Smith. mg/100g	Nöt Pecan <i>Carya illinoensis</i> mg/100g	Rött bordsvin Cabernet Sauvignon mg/100g
Flavan-3-oler <sup>1</sup>	K	64.82 <sup>1</sup>	<b>0.82<sup>1</sup></b>	0.27 <sup>1</sup>	7.40 <sup>1</sup>	1.87 <sup>1</sup>	<b>7.24<sup>1</sup></b>	7.70 <sup>1</sup>
	GK			0.00 <sup>1</sup>		0.00 <sup>1</sup>	0.00 <sup>1</sup>	
	EK	<b>196.43<sup>1</sup></b>	0.26 <sup>1</sup>	<b>3.76<sup>1</sup></b>	<b>28.3<sup>1</sup></b>	<b>7.11<sup>1</sup></b>	0.82 <sup>1</sup>	<b>10.66<sup>1</sup></b>
	EGK			0.59 <sup>1</sup>		0.71 <sup>1</sup>	5.63 <sup>1</sup>	
	EKG			0.02 <sup>1</sup>		0.01 <sup>1</sup>	0.00 <sup>1</sup>	
	EGKG			0.17 <sup>1</sup>		0.24 <sup>1</sup>	2.30 <sup>1</sup>	

\*K =Katekin, GK =Gallokatekin, EK =Epikatekin, EGK =Epigallokatekin, EKG =Epikatekingallat, EGKG =Epigallokatekingallat.

<sup>1</sup>USDA, 2011

I kakao (*Theobroma cacao*) är de dominerande flavan-3-olerna EK och K (USDA, 2011) och vid processning epimeriseras de (Aron & Kennedy 2008). Mörk choklad kan innehålla 0,1-2,0 mg EK/g choklad (Seis 2012). I kakao finns teobromin, en purin som likt koffein har luftrörsvidgande, vasodilatorisk, urindrivande och muskelavslappnande effekter (NE 2012). Te (*Camellia sinensis*) är det livsmedel som har setts innehålla den högsta koncentrationen av flavan-3-oler och då speciellt katekiner och av dem finns mest EGKG (en mycket potent



antioxidant) då de förekommer i följande mängdordning i te EGKG > EKG > EK > EGK > K (Ho 2008). Grönt te processas nästan inte alls, då det inte fermenteras utan endast värms upp under en väldigt kort stund i syfte att avöda mikrober och avstanna enzymatiska reaktioner och därför innehåller grönt te störst mängd monomera katekiner, vilka är de som har högst antioxidativ potential (Cheng 2005). EGKG är tio gånger högre i grönt- än i svart te (Nagaya *et al.* 2004). Mineraller och vitaminer i grönt te kan vidare öka dess antioxidativa förmåga (Cabrera & Artacho & Giménez 2006), t.ex. kan grönt te innehålla små mängder (3.0 mg/dl) askorbinsyra (Nagaya *et al.*, 2004). Svart te genomgår en längre s.k. full fermentering och har endast kvar en mindre mängd av de potenta antioxidanterna, de monomera katekinerna, medan svart te istället innehåller en större mängd procyanidiner om theaflaviner och thearubiginer (Ho 2008). Proanthocyanidiner bidrar mycket till den svarta färgen på teet (Ho 2008). I **Tabell II** ses fördelningen av katekiner och procyanidiner i grönt- och svart te. En kopp svart te kan enligt Ho (2008) innehålla upp till 70 mg EGKG medan en kopp grönt te kan innehålla ca. 30-130 mg EGKG. Koffeinhalten i te är generellt sett lägre i grönt te än i svart te (Khokhar & Magnusdottir 2002).

**Tabell II.** Fördelning av flavan-3-oler och procyanidiner i te. Vid den längre fermenteringsprocessen som svart te genomgår, omvandlas monomera och dimera katekiner till oligomera procyanidiner.

Aktivt ämne		Grönt te	Svart te	Teblad gröna	Teblad svarta
		bryggt	bryggt	torkade	torkade
		mg/100g	mg/100g	mg/100g	mg/100g
<b>Flavan-3-oler</b>	K	4,5 <sup>1</sup>	1.5 <sup>1</sup>	57,1 <sup>2</sup>	137,8 <sup>2</sup>
	GK	1.5 <sup>1</sup>	1.2 <sup>1</sup>	258,1 <sup>2</sup>	91,7 <sup>2</sup>
	EK	8.3 <sup>1</sup>	2.1 <sup>1</sup>	811,7 <sup>2</sup>	255,2 <sup>2</sup>
	EGK	29,2 <sup>1</sup>	7.9 <sup>1</sup>	2058,0 <sup>2</sup>	956,8 <sup>2</sup>
	EKG	17,9 <sup>1</sup>	5.9 <sup>1</sup>	1491,3 <sup>2</sup>	688,3 <sup>2</sup>
	<b>EGKG</b>	<b>70.2<sup>1</sup></b>	<b>9.4<sup>1</sup></b>	<b>7116,0<sup>2</sup></b>	<b>1122,0<sup>2</sup></b>
<b>Procyanidiner</b>	Theaflavin	0.1 <sup>1</sup>	1.6 <sup>1</sup>	1,6 <sup>2</sup>	159,2 <sup>2</sup>
	Theaflavin3-gallat	0.0 <sup>1</sup>	1.3 <sup>1</sup>	0,5 <sup>2</sup>	132,3 <sup>2</sup>
	Theaflavin 3'-gallate	0.0 <sup>1</sup>	1.5 <sup>1</sup>	0,4 <sup>2</sup>	155,8 <sup>2</sup>
	Theaflavin 3,3'-digallat	0.0 <sup>1</sup>	1.8 <sup>1</sup>	1.1 <sup>2</sup>	170,8 <sup>2</sup>
	<b>Thearubigins</b>	<b>1.1<sup>1</sup></b>	<b>81.3<sup>1</sup></b>	<b>131,9<sup>2</sup></b>	<b>5919,0<sup>2</sup></b>

<sup>1</sup> USDA, 2013; <sup>2</sup> USDA, 2007

## Flavan-3-olers bioaktivitet

I magtarmkanalen spjälkas flavan-3-oler i form av glykosider till respektive aglykoner och socker, och aglykonerna kan sedan absorberas i tunntarmen i varierande utsträckning (Middleton *et al.*, 2011). Adsorberade flavan-3-oler transporteras till levern via portavenen och bryts ner till metaboliter som inom några timmar når kroppens olika vävnader (Aron & Kennedy 2008). I plasma förekommer flavan-3-oler sedan som sulfatkonjugat eller glukuronsyrakonjugat vilka även kan vara metylerade av enzymet katekol-*O*-metyltransferas (COMT), s.k. *O*-metylering (Middleton *et al.*, 2011). COMT förekommer både i plasma och i endotelceller (Steffen *et al.* 2007) och dess aktivitet kan variera trefaldigt mellan- och inom individer och därmed varierar och beror flavan-3-olernas biotillgänglighet av COMTs aktivitet (Hodgson *et al.*, 2005). *O*-metylering, sulfat- och glucuronkonjugering har setts minska flavan-3-olernas antioxidativa förmåga (Steffen *et al.*, 2007). EK och dess plasmametaboliter har en större biotillgänglighet än K (Steffen *et al.*, 2007).

## 8.2 ENDOTEL –DYSFUNKTION

Det enkelskiktade cell-lagret som sitter ytterst i alla våra blodkärl och i hjärtat, där det står i direkt kontakt med blodet är endotelet (Ray & Shah, 2005). Blodkärl består av tre lager, innerst *intima*, ytterst *adventitia* och mellerst *media* (Harris *et al.*, 2010). Endotelcellerna (*intima*) känner av blodburna signaler, haemodynamiska krafter och det omgivande partiella syretrycket och reglerar därefter kroppens homeostas (Ray & Shah, 2005). Endotelcellerna reglerar blodkärlens glatta muskulatur via inducering av kontraktions- och dilaterings processer, reglerar blodets hemostas via inducering av koagulerings- och trombotiska processer samt reglerar blodkärlens neogenes (nybildning av blodkärl) via inducering av apoptotiska- och prolifererings processer (Ray & Shah, 2005). När någon av precis nämnda processer inte kan fungera normalt, uppstår obalans och endotel -dysfunktion som inbegriper en inflammatorisk reaktion (Ray & Shah, 2005). Ålderdom, rökning, övervikt, hypertoni och diabetes är typiska riskfaktorer som för endotel -dysfunktion (Brown & Hu, 2001). Den ökade risken uppkommer i och med långvarig och ihållande oxidativ stress (Brown & Hu 2001).

### Oxidativ stress

Oxidativ stress innebär att stora mängder reaktiva syreföreningar (reactive oxygen species, ROS), t.ex. superoxid, peroxyinitrit och hydroxyradikaler genereras i endotelcellerna i samband med ett långvarigt immunpåslaget (Brown & Hu, 2001; Cheng, 2005). Endotel -dysfunktion inbegriper inflammation som kan leda till cell- och vävnadsskada (Middleton *et al.*, 2000). Vävnadsskada kan också leda till endotel -dysfunktion eller annat inflammatoriskt sjukdomstillstånd (Middleton *et al.*, 2000). Antioxidativa försvarssystem, t.ex. enzymatiska superoxid-dismutas (SOD) och katalas samt icke-enzymatiska, mer ospecifika endogena- och kostantioxidanter har en skyddande och förebyggande effekt vid oxidativ stress (Middleton *et al.*, 2000). Ett sett att mäta den oxidativa stressen på är att analysera halten bioaktiva isoprostaner (mätbar både i blod- och urinprov) (Basu & Helmersson 2009). Ju mer isoprostaner i urinen desto mer oxidativ stress (Loffredo *et al.*, 2011). Främst är det 8-isoprostaglandiner som bildas, vilka har en vasokontraherande effekt och samtidigt aggregerar trombocyter (Basu & Helmersson 2009). De bioaktiva (F2) isoprostanerna bildas utifrån arakidonsyror (esterbundna till fosfolipider) på endotelcellernas yta (Basu & Helmersson 2009).

### Reducerad syrenivå p.g.a. NO och NADPH-oxidaser

Vid endotel -dysfunktion är syrenivån i endotelceller reducerad p.g.a. oxidativ stress. En förklaring till den reducerade syrenivån är de membranbundna NADPH-oxidaserna, vilka överför elektroner till syre och bildar syre-radikalen superoxid,  $O_2^-$  (Ray & Shah, 2005). En annan bidragande orsak till den reducerade syrenivån är den snabba metabolismen av syre, i och med dess reaktion med NO. Reaktionen mellan syre och NO inducerar ökad vasokontraktion och minskad vasodilatering och leder till bildandet av den potenta oxidanten peroxyinitrit,  $ONOO^-$  (structural isomer of nitrate  $NO_3^-$ ) (Ray & Shah, 2005).

### Reducerad NO-nivå p.g.a. minskad produktion

Vid endotel -dysfunktion är biotillgängligheten av NO i endotelcellerna reducerad, beroende av oxidativ stress, vilket innebär en ökad metabolisering av NO (ROS,  $O_2^{-5}$  reagerar direkt med NO och peroxyinitrit bildas) och dess biologiska aktivitet elimineras (Loffredo *et al.*, 2010). NO syntetiseras från L-arginin av endotelets isoform av NO-syntas (eNOS) och den förändrade redoxpotentialen i endotelcellerna i och med metaboliseringen av NO kan leda till

en reducerad eNOS-aktivitet (Shenouda & Vita, 2007). Både eNOS och endotel arginas använder L-arginin som substrat vid aktivitet och, vid en rådande obalans (för lite L-arginas) kan eNOS inhiberas av L-N<sup>G</sup>-mono-metyl-arginin (L-MMNA) till fördel för arginas (Schroeter *et al.* 2006). eNOS kan vid hög oxidativ stress genomgå en konfigurationsändring och börja producera superoxid istället för NO (Shenouda *et al.* 2007). Den färglösa gasen NO, motverkar aggregering av blodkroppar vid endotelcellerna samtidigt som NO är endotelcellernas mest potenta vasodilator (Loffredo *et al.*, 2010). Minskad biotillgänglighet av NO innebär minskad endotelberoende vasodilatering (Cheng, 2005). Acetylkolin, serotonin, trombin och angiotensin 2 är exempel på molekyler som direkt (inom några sekunder) kan stimulera en akut NO-produktion (Shenouda & Vita, 2007). Från endotelcellerna diffunderar NO till omgivande glatta muskelceller (som innehåller mycket cykliskt guanylylcycloas, cGMP), där NO aktiverar cGMP genom att binda till dess hemgrupp, vilket leder till vasodilatering (Hansson & Jörnvall & Lindahl 1998). En långvarigt försämrad vasodilatering kan leda till att blodkärlen blir stela, vilket kan mätas med 'arterial stiffness index' (ASI)(Cheng, 2005). Ökad arteriell förstelnig, vilket innebär en ökad risk för infektion och blodproppsbildning (Cheng, 2005). Arterial stiffness index används för att förändringar i endotelcellernas nivåer av biotillgängligt NO (Loffredo *et al.*, 2011). Förändringar i endotelets funktion kan mätas med flow-mediated dilatation (FMD) (Loffredo *et al.*, 2011).

## **Flow-mediated dilatation, FMD**

Det finns ett flertal olika biomarkörer som kan användas för att studera och mäta endotel - dysfunktion, varav flow-mediated dilatation (FMD) idag är den främsta (Harris *et al.*, 210). FMD är en konventionell och icke-invasiv metod, där mätresultatet uttrycks i procent och är direkt beroende av mängden NO som frisätts från endotelcellerna d.v.s. mängden biotillgängligt NO (Loffredo *et al.*, 2011). I samband med en FMD-mätning är det möjligt att kombinera teknik för mätning av andra värden, t.ex. blodets flödes hastighet, diameter respektive tjocklek på en artär (Harris *et al.*, 2010). Resultat som uppmäts på branchialisartären (lokaliserad på överarmens framsida) korrelerar väl med resultat på hjärtats endoteletter och används ofta vid FMD-mätningar (Harris *et al.*, 2010).

### *Utrustning*

För att utföra en FMD-mätning krävs en ultraljudsmätare med duplex mode, vilket innebär att ett dopplerultraljud mäter blodets hastighet samtidigt som ett b-modeultraljud ger en tvådimensionell bild av artären (Harris *et al.*, 2010). En svårighet är ofta att få till den s.k. insoneringsvinkeln, d.v.s. den vinkel som uppstår mellan dopplerstrålen och ultraljudsstrålen och rekommenderas till 60°, vilket är näst intill omöjligt att ställa in. På grund av svårigheten utförs många mätningar vid 70° och det har kommit att i litteraturen. Även ett elektrogram bör vara kopplat till utrustningen, för att mäta antalet blodcirkulationscykler.

### *Förberedelser*

Inför mätningarna ska försökspersoner vara välinformerade och väl förberedda för att undvika det flertal faktorer som annars kan störa mätresultaten (Harris *et al.*, 2010). Exempelvis bör försökspersonerna, 72 timmar innan studien helt ha avstått vitamintillskott, avbrutit eventuell medicinering, avstått tobak och koffein och motion 12 timmar innan studien, kvinnor bör befinna sig i dag 1-7 i menstruationscykeln och alla bör vara utvilade och ha fastat. Vid vila mäts för varje försöksperson ett basalt blodtryck, en basal blodhastighet och en basal artärdiameter för senare beräkningar av ett slutgiltigt FMD-värde. Minst 10 blodcirkulationscykler rekommenderas för att beräkna baslinjerna. För att hitta

branchialisartären krävs en frekvens på 10-14 MHz, där frekvensen är invert mot bildjupet. För mätning av artärdiameter gäller avståndet *intima-intima*.

### *Reaktiv hyperemi*

Ett tryck minst 25-50 mm Hg över subjektets normala blodtryck, appliceras på artären under en femminutersperiod och på så sätt skapas den reaktiva hyperemi som sedan mäts och som då är övervägande endotel- och NO-beroende (Harris *et al.*, 2010). Utrustningen med vilket trycket ges bör vara av en storlek som passar kärlet. Mätningarna av blodkärlsdiametern och av blodets hastighet bör påbörjas senast 10 sekunder före trycket på artären släpps, och därefter fortgå i minst två minuter. Maximal blodhastighet kan väntas ca 15 sekunder efter släppet och största dilateringen kan väntas ca. 45-80 sekunder efter släppet. Insamlade värden analyseras enligt rekommendation med hjälp datorprogrammet Edge Detection, med vilken t.ex. både samlad stimulering och skapad hyperemi beräknas. Kärlets maxdiameter efter släppet och baslinjen används på följande sätt för att uttrycka dilateringskillnaden procentuellt:

$$\text{FMD \%} = ((\text{maxdiameter efter släpp på trycket} - \text{baslinjediametern}) / \text{baslinjediametern}) \cdot 100$$

FMD-värdet antas vara proportionellt mot storleken av den stimulering kärlet utsattes för, varför det rekommenderas att dividera FMD-värdet med slutgiltig stimuleringsgrad (arean under kurvan) och redovisa detta, för att få ett normaliserat värde. Alternativa sätt för normalisering av värdet kan finnas, t.ex. att räkna med den tid det tar för kärlet att nå maxdilatering efter stimuleringen (Harris *et al.*, 2010). I jämförelse kan det också vara intressant att mäta hur den endotel-oberoende vasodilateringen påverkas vid olika interventioner, varav ett sätt är att mäta FMD efter applicering av glyceroltrinitrat (GTN).

## **Mätbara biomarkörer för endotel -dysfunktion**

Ett flertal inflammatoriska ämnen frisätts till blod och urin vid endotel -dysfunktion, s.k. biomarkörer vilka gör tillståndet mätbart (Kim *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2009; Loffredo *et al.*, 2011). Den vanligaste metoden för diagnostisering av endotel -dysfunktion är flow-mediated dilatation (FMD) (Harris *et al.*, 2010). I **Tabell III** ses vanliga biomarkörer för endotel -dysfunktion.

**Tabell III.** Typiska biomarkörer för endotel -dysfunktion som ofta analyseras i studier tillsammans med FMD.

---

ASI	Arterial stiffness index (ASI) är ett mått på artärernas elasticitet (Grassi <i>et al.</i> , 2009).
EPC/CAC	Endothelial progenitor cells (EPC) skyddar endotelceller genom att vid skada reparera denna genom att bilda nya blodkärl från gamla och har även förmågan att bilda helt nya blodkärl, neogenes (Kim <i>et al.</i> , 2006). I ett tidigt skede kallas EPC för circulating angiogenic cell (CAC) och båda är en sorts stamceller från benmärgen (Kim <i>et al.</i> , 2006). Vid mobiliseringen av CAC från benmärgen till aktuellt område, antas eNOS ha en betydande roll (Kim <i>et al.</i> , 2006). EPC påverkas av rökning och antalet cigaretter per dag har visat sig ha ett invert förhållande (signifikant korrelation) till antalet cirkulerande EPC (Kim <i>et al.</i> , 2006).
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) är en <i>inflammatorisk</i>

adhesionsmolekyl som frisätts av endotelceller vid inflammation (Grassi *et al.*, 2009).

IL	Interleukiner (IL) är <i>inflammatoriska</i> cytokiner (idag känner vi till mer än 15 olika IL) med olika, ofta förstärkande funktioner inom immunförsvaret (NE, 2013).
Isoprostaner	En grupp biomarkörer som frisätts vid <i>inflammation</i> och är mätbar i både blod- och urinprov, varav den vanligaste isoprostanen är PGF <sub>2a</sub> -III har både vasokontraherande och trombocyt aggregerande effekt (Loffredo <i>et al.</i> , 2011; Basu & Helmersson 2009).
sNOX2-dp	Soluble NOX2 derived peptide (sNOX2-dp) är en peptid som då dess koncentration minskar leder till minskad NADPH-aktivitet (Loffredo <i>et al.</i> , 2011).

---

Den totala antioxidativa kapaciteten/statusen i plasma går att mäta via exempelvis oxygen-radical absorbance capacity of plasma (ORAC), ett mått på protein-oberoende antioxidant aktivitet eller via ferric-reducing ability of plasma (FRAP) som är ett kvantitativt mått på förmågan att donera elektroner i plasma (Duffy *et al.*, 2001).

### **Riskfaktorer till- och eventuella mekanismer till endotel -dysfunktion.**

Fetma med associerad bildning av cytokin-lik molekyler kallade adipokiner) utgör en riskfaktor för ateroskleros och CVD och leder även till försämrad endotel funktion (Ray & Shah, 2005). Fetma är även en predikator för negativa tillstånd inom metabola syndrom så som hypertoni, insulinresistens, onormalt nerumlipider och inflammation (Ray & Shah, 2005). Exakt hur fetma inducerar endotel -dysfunktion är ännu inte klart (Ray & Shah, 2005). De mest övertygande mekanismerna involverar inflammation och insulinresistens och/eller förhöjda leptin-nivåer (Ray & Shah, 2005). Endotel -dysfunktion och stela blodkärl kan upptäckas redan under de tio första levnadsåren (Ray & Shah, 2005). En låg födelsevikt och en snabb tillväxt tidigt i barndomen har avgörande effekter för blodkärlens struktur och funktion (Ray & Shah, 2005). Viktminskning i samband med fetma har visats innebära en reducerad endotel -dysfunktion och minskad blodkärlsstelhet (Ray & Shah, 2005). Men det finns även en studie som visar att endotel -dysfunktion inte alltid reduceras trots en måttlig viktminskning under en tremånaders period (Ray & Shah, 2005). Hypertoni ensamt inducerar endotel -dysfunktion och tvärtom (Cheng *et al.*, 2005). Medicinering av diabetes medför nedsatt endotelfunktion och typ II diabetiker har även påvisat förhöjda nivåer av CRP (Balzer *et al.*, 2008). Kronisk rökning innebär ihållande och ökad oxidativ stress, lägre nivåer av cirkulerande EPC, ökat antal isoprostaner (Kim *et al.*, 2006), lägre FMD och lägre nivå av biotillgängligt NO (Loffredo *et al.*, 2010). Att sluta röka innebär ofta en tillbakagång till ett fullt fungerande endotel (Kim *et al.*, 2006). Med åldern ökar den oxidativa stressen i blodkärlen p.g.a. en ökad produktion av reaktiva syren i kombination med ett svagare antioxidativt försvar och därav är ålderdom en typisk riskfaktor för endotel -dysfunktion (Seals & Jablonski & Donatu, 2011).

### **Följsjukdommar av endotel -dysfunktion**

Endotel -dysfunktion kan i längden leda till hjärt- och kärlsjukdom, en av vår tids största folksjukdommar (Brown & Hu, 2001). Ateroskleros är en kärlsjukdom som kännetecknas av endotel -dysfunktion och graden av endotel -dysfunktion fungerar här som en markör för

framskridandet av ateroskleros (Loffredo *et al.*, 2011). En ökad kunskap om mekanismerna bakom endotel -dysfunktion skulle kunna leda fram till en utveckling av nya mediciner mot ateroskleros och andra kärlsjukdommar (Loffredo *et al.*, 2011).

### **Kostens påverkan på endotel -dysfunktion**

Kosten är en faktor som kan ha stor påverkan på kärhälsa och CVD (Schroeter *et al.*, 2006). Livsmedel rika på flavan-3-oler innehåller därmed flavan-3-ola föreningar med potentiell antioxidativ effekt, anti-inflammatorisk effekt, potentiellt kelerande effekt och kan minska aggregering, minska trombbildning, öka biotillgängligheten av NO och därmed öka den endotelberoende vasodilateringen (Ho, 2009). Ett livsmedel är dock mycket komplext, eftersom det består av en unik livsmedelsmatris som innehåller både makro och mikroämnena och övriga föreningar som har unika kombinationseffekter (Jacobs & Tapsell, 2007). Sammansättningen av livsmedel kan också variera i och med olika agrara förhållanden. När det gäller kostens betydelse för hälsan kan den därför inte enbart förklaras av enskilda näringsämnen (Jacobs & Tapsell, 2007).

## **9 FLAVAN-3-OLER OCH ENDOTEL-DYSFUNKTION**

Av totalt tio granskade studier så visar tio interventionsstudier och tre observationsstudier effekter och samband mellan flavan-3-olrika livsmedel och endotel -dysfunktion respektive riskgrupper för endotel dysfunktion.

### **9.1 INTERVENTIONER**

I detta stycke presenteras tio interventionsstudier och en meta-analys avseende te och kakaoprodukters effekt på valda biomarkörer för endotel-dysfunktion. Resultaten från de tio interventionsstudierna summeras i **Tabell IV**. Studier visar att K och EK tas upp i blodet (Heiss *et al.*, 2010; Schroeter *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001) och att svart och grönt te och kakao alla förbättrar den endotelberoende vasodilateringen (Alexopoulos *et al.* 2007; Kim *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2009; Monahan *et al.*, 2011; Schroeter *et al.*, 2006; Balzer *et al.*, 2008; Heiss *et al.*, 2010). Grönt te visas även förhöja mängden cirkulerande EPC (Kim *et al.*, 2006) och inte påverka CRP och IL (Alexopoulos *et al.*, 2007), medan svart te visas sänka ASI (Grassi *et al.*, 2009) och kakaoprodukter visas öka mängden sNOX<sub>2</sub>-dp (reducerad NADPH-aktivitet), reducera mängden isoprostaner (Loffredo *et al.*, 2011) och öka mängden EPC (Heiss *et al.*, 2010). EGKG i kemiskt renad form visade inte någon någon effekt på EPC eller ICAM-1 (Wiedlansky *et al.*, 2007). En studie visar även att flavan-3-olernas bioaktivitet minskar NADPHs aktivitet (Loffredo *et al.*, 2011).

**Tabell IV.** Flavan-3-olrika livsmedels effekt påvalda biomarkörer för endotel-dysfunktion. Ett + betyder att mängden har ökat, ett – betyder att mängden har minskat och ett X betyder ingen förändring.

		Biomarkörer							
Effekt**		FMD (%)	CRP	IL	EPC/CAC	sNOX2 -dp	ICAM-1	Isoprostaner	ASI
Grönt te	Akut <sup>1</sup>	+ 3,7 <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>	X <sup>1</sup>					
	Korttids <sup>2</sup>	+ 2,1 <sup>2</sup>				+ <sup>2</sup>			
Svart te	Akut <sup>3</sup>	+ 3,7 <sup>3</sup>							
	Långtids <sup>3</sup>	+ 4,8 <sup>3</sup>	X <sup>4</sup>				X <sup>4</sup>		
	Korttids <sup>4</sup>	+ 1,2-2,5 <sup>4</sup>	X <sup>4</sup>				X <sup>4</sup>		- <sup>4</sup>
Kakao, Choklad	Akut <sup>5</sup>	+ 0,8-1,6 <sup>5</sup>							
	Akut <sup>6</sup>	+ * <sup>6</sup>							
	Akut <sup>7</sup>	+ 1,7 <sup>7</sup>							
	Långtids <sup>7</sup>	+ 1,0 <sup>7</sup>							
	Långtids <sup>8</sup>	+ 3,8 <sup>8</sup>				+ <sup>8</sup>			
	Akut <sup>9</sup>	+ * <sup>9</sup>					+ <sup>10</sup>		- <sup>9</sup>
EGKG	Akut <sup>10</sup>	+ 1,5 <sup>10</sup>			X <sup>10</sup>		X <sup>10</sup>		
	Korttids <sup>10</sup>	x <sup>10</sup>			X <sup>10</sup>		X <sup>10</sup>		

<sup>1</sup> Alexopoulos *et al.*, (2007), <sup>2</sup> Kim *et al.*, (2006), <sup>3</sup> Duffy *et al.*, (2001), <sup>4</sup> Grassi *et al.*, (2009), <sup>5</sup> Monahan *et al.*, (2011), <sup>6</sup> Schroeter *et al.*, (2006), <sup>7</sup> Balzer *et al.*, (2008), <sup>8</sup> Heiss *et al.*, (2010), <sup>9</sup> Loffredo *et al.*, (2011), <sup>10</sup> Widlansky *et al.*, (2007).

\*Värdet anges inte i artikeln.

\*\*Effekter: Akut= 1-24 timmar, Korttids=1-7 dagar, Långtids=1-4 veckor.

## Grönt te och endotel -dysfunktion

Grönt te har i många studier visat förbättrad endotelberoende vasodilatering, i och med signifikanta förbättringar av bl.a. FMD (Alexopoulos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006). Grönt te innehåller många gånger även koffein som också har en muskelavslappande och vasodilatorisk effekt (NE 2012).

Alexopoulos *et al.*, (2007) gav 14 friska individer 6 g grönt te och mätte 30 minuter senare en korttidseffekt som visade signifikant ( $p < 0,02$ ) förhöjt FMD i och med tebehandlingen. För att studera effekten av koffeinmängden i det specifika teet, mätte Alexopoulos *et al.*, (2007) även korttidseffekten 30 minuter efter intag av 126 mg koffein. För koffein ensamt fanns ingen signifikant ( $P = NS$ ) förändring av FMD och inte heller IL eller CRP visade någon signifikant effekt i samband med te (Alexopoulos *et al.*, 2007).

Kim *et al.*, (2006) gav 20 unga friska rökare 8 g grönt te/ dag och mätte två veckor senare signifikant ( $p < 0,001$ ) förhöjt FMD. Odlade cellkulturer behandlades dagligen med 8 g grönt te i två veckor och visade en signifikant ( $p < 0,001$ ) förhöjning av antalet EPC, vilken signifikant ( $p = 0,013$ ) korrelerade med förhöjningen av FMD (Kim *et al.*, 2006).

## Svart te och endotel -dysfunktion

Duffy *et al.* (2001) gav 50 CAD-patienter, 450 ml svart te och mätte korttidseffekten efter två timmar, varpå försökspersonerna dagligen, i fyra veckor gavs de sedan även 900 ml svart te, för att mäta en långtidseffekt. I sin studie fann Duffy *et al.*, (2001) både en kort- och en långtidseffekt vilka båda två signifikant förbättrat FMD jämfört med vatten ( $p = 0,001$ ). För att studera korttidseffekten den koffeinmängd som funnits i det specifika teet, utförde Duffy *et al.*

(2011) även mätningar två timmar efter intaget 200 mg koffein och fann då, ingen signifikant förbättring av FMD ( $p=0,86$ ). Blodprover togs även vid båda mätningarna, vilka visade att det även fanns kort- och långtids effekter för plasmakoncentrationen av K, vilka vid båda tillfällen signifikant ( $p=0,05$ ) förhöjdes (Duffy *et al.*, 2011). Den antioxidativa kapaciteten i plasma visade tendens att öka ( $P=0,09$ ), då den mättes som ORAC och FRAP (Duffy *et al.*, 2001).

Grassi *et al.* (2009) gav dagligen 19 friska individer, 100 mg (mindre än en kopp te), 200 mg, 400 mg och 800 mg svart te, varpå effekten mättes efter en vecka, då signifikanta (100 mg:  $p=0,0113$ , 800 mg:  $p<0,0001$ ) förhöjningar av FMD fanns, vilka även visades vara dosberoende, då signifikanta skillnader även fanns mellan förbättringen vid 800 mg jämfört med den vid 100 mg ( $p=0,0121$ ) såväl som mellan 100 mg jämfört 200 mg ( $p=0,0275$ ) (Grassi *et al.*, 2009). Även ASI visades signifikant ( $P=0,0519$ ) minska (Grassi *et al.*, 2009).

## **Kakao, choklad och endotel -dysfunktion**

Kakaodryck har i ett flertal studier visats förbättra den endotelberoende vasodilatoreringen (Monahan *et al.*, 2011; Balzer *et al.*, 2008; Heiss *et al.*, 2010; Monahan *et al.*, 2011; Schroeter *et al.*, 2006). Men kakao innehåller som känt även den muskelavslappande och vasodilatoriska föreningen, theobromin (NE, 2012)

Monahan *et al.*, (2011) gav 23 friska äldre vuxna kakaodryck innehållandes 0 g, 2 g, 5 g, 13 g och 26 g kakao, varpå korttidseffekten mättes efter 1 och efter 2 timmar. Drycker innehållandes 5 g, 13 g och 26 g kakao visades signifikant ( $p<0,05$ ) förhöjt FMD och dosberoende, varav den största förbättringen sågs två timmar efter intaget dryck med 26 g kakao (Monahan *et al.*, 2011). Blodprov visade att den totala mängden EK i plasma ökade och att ökningarna korrelerade signifikant ( $p<0,05$ ) med mängden kakao i respektive dryck (Monahan *et al.*, 2011).

Schroeter *et al.* (2006) mätte på 10 friska, vuxna män korttids-effekten av en lågflavanolhaltig- och en högflavanolhaltig dryck, bestående av vatten och chokladpulver innehållandes 37 mg respektive 917 mg flavanoler. FMD mättes en gång i timmen under fyra timmar, varpå Schroeter *et al.* (2006) visade att den högflavanolhaltiga drycken gav maximalt och signifikant ( $p<0,05$ ) förhöjt FMD efter två timmar. Koncentrationen av EK i blodet var signifikant ( $P<0,01$ ) förhöjd under den tredje timmen. Kemiskt renat EK studerades också av Schroeter *et al.* (2006) och 2 mg kemiskt renat EK per kilo vatten visade också signifikant ( $P<0,05$ ) förhöjt FMD. På tre av försökspersonerna upprepades försöket med den högflavanolhaltiga drycken, men denna gång tillfördes även LMMNA, varpå ett signifikant ( $P<0,01$ ) reducerat FMD-värde erhöles efter de två timmarna (Schroeter *et al.*, 2006), vilket visar att den tidigare positiva effekten beror av mängden NO och att effekten då eNOS inhiberas av L-MMNA (Schroeter *et al.*, 2006).

Balzer *et al.* (2008) studerade på 10 medicinerade diabetiker, både akut effekt och långtidseffekt av kakaodryck. Den akuta effekten ingick i en genomförbarhetsstudie och mättes två timmar efter ett intag av kakaodryck, innehållandes 963 mg flavanoler respektive 25 mg flavanoler, kontrolldrycken. I genomförbarhetsstudien hade försökspersonerna ombetts att exkludera typiska flavanolrika livsmedel ur kosten, en tid innan studien, i syfte att bl.a. kontrollera studiens säkerhet (Balzer *et al.*, 2008). Den akuta effekten av kakaodrycken med 963 mg flavanoler gav en signifikant ( $P<0,001$ ) förhöjd FMD, medan kontrolldrycken inte gav någon signifikant ( $P=NS$ ) förändring (Balzer *et al.*, 2008). Långtidseffekten däremot, ingick i en effektivitetsstudie där försökspersonerna ombetts att fortsätta med sin vanliga kost, inklusive typiska flavanolrika livsmedel, i syfte att mäta den totala effekten (Balzer *et al.*, 2008). Långtidseffekten mätte Balzer *et al.*, (2008) 30 dagar efter dagligt intag av kakaodryck



innehållandes 963 mg flavanoler, tre gånger om dagen och, efter samma mönster för kontroldrycken med 25 mg flavanoler. Långtidseffekten gav signifikant ( $P < 0,0001$ ) förhöjt FMD, medan kontrollen inte gav någon signifikant förhöjning, jämfört med före interventionen (Balzer *et al.*, 2008). Den endotel-oberoende vasodilateringen mättes efter applicering av 400 µg GTN och visade ingen signifikant ( $P = \text{NS}$ ) förändring av FMD, varken mellan dagarna eller mellan de olika interventionerna (75 mg: 8,4%; 371 mg: 8,3%; 963 mg: 8,1%) (flavanolkoncentrationerna) (Balzer *et al.*, 2008).

Heiss *et al.* (2010) gav 16 CAD-patienter två gånger om dagen i 30 dagar, en högflavanolhaltig kakaodryck (hfk) med 375 mg flavanoler, varav EK 59 mg och K 6 mg (dimers 53 mg, trimers-decamers 258 mg) och en lågflavanolkakaodryck (lfk) med 9 mg flavanoler, varav EK 1 mg och K 2 mg (dimers 2 mg, trimers-decamers 3 mg) i syfte att studera dess långtidseffekt. Både lfk och hfk visade efter 30 dagar signifikant ( $P < 0,001$ ) förhöjd FMD jämfört med innan interventionen, en ökning som sammanföll med en signifikant ( $P < 0,001$ ) ökning av antalet cirkulerande CACs (Heiss *et al.*, 2010).

Loffredo *et al.* 2011 studerade 20 rökare och 20 friska icke-rökare och den akuta effekten (två timmar) av 40 gram mörk choklad (>85% kakao), respektive 40 gram mjölkchoklad ( $\leq 35\%$  kakao). 40 g mörk choklad resulterade i signifikant förhöjd FMD och signifikant reducerad NADPH-aktivitet (i.o.m. reducerad mängd soluble NOX2 derived peptide, sNOX2-dp) och isoprostaner hos de 20 rökarna, medan hos de friska, icke-rökarna ingen signifikant förändring kunde ses, varken vad gäller, FMD, isoprostaner eller sNOX2-dp (Loffredo *et al.*, 2011). Ingen av nämnda biomarkörer visade någon förändring av 40 g mjölkchoklad (Loffredo *et al.*, 2011). FMD visades ha en invers korrelation med sNOX2-dp, vilket betyder att ju högre den endotelberoende vasodilateringen är ju lägre är NADPH-aktiviteten (Loffredo *et al.* 2011). Redan före studien hade rökarna lägre FMD, högre NADPH-aktivitet och högre utsöndring av isoprostaner (Loffredo *et al.*, 2011).

## **Kemiskt renat EGKG (kosttillskott) och endotel -dysfunktion**

Widlansky *et al.* (2007) gav 42 CAD-patienter en kapsel á 300 mg kemiskt renat EGKG, framtaget som ett kosttillskott och studerade dess akuta effekt (två timmar), varpå även korttidseffekten av två kapslar á 150 mg per dag, under två veckor studerades. Den akuta effekten innebar ett signifikant ( $P = 0,01$ ) förhöjt FMD, medan korttidseffekten inte gav någon signifikant ( $P = 0,12$ ) effekt (Widlansky *et al.*, 2007). CRP, CAC och ICAM-1 visade inte några signifikanta förändringar varken akut eller på kort sikt (Widlansky *et al.*, 2007).

## **9.2 OBSERVATIONSSTUDIER**

Observationsstudier avseende samband mellan flavan-3-oler och endotel-dysfunktion specifikt, är svårfunna, däremot finns det studier avseende samband mellan flavan-3-olrika livsmedel och riskfaktorer för endotel dysfunktion, så som diabetes och hjärt och kärlsjukdom (Jacques *et al.*, 2013; Sesso *et al.*, 1999; Janszky *et al.*, 2009).

### **Flavan-3-oler och typ 2 diabetes**

Diabetes innebär också ofta endotel -dysfunktion (Balzer *et al.*, 2008). Jacques *et al.* (2013) studerade i en kohortstudie samband mellan intag av olika flavonoida klasser och risk för typ 2 diabetes (t2d). Under en uppföljningstid på i snitt 11,9 utvecklade 2915 deltagare i Farmingham Offspring kohorten t2d (Jacques *et al.*, 2013). De var vid rekrytering mellan 1991-2008 fria från t2d (Jacques *et al.*, 2013). Harvard's semikvantitativa frågeformulär (en lista med livsmedel och deras standardserverings-portionsstorlek samt med nio frekvenskategorier bestående av, aldrig eller <1 till  $\geq 6$  serveringar per dag) användes för att

samla in uppgifter om deltagarnas kostvanor (Jacques *et al.*, 2013). USDAs databas användes sedan för att räkna ut flavanoidinnehållet i kosten (Jacques *et al.*, 2013). Efter multivariabla justeringar av data och tidsberoende analys fann Jacques *et al.* (2013) att flavan-3-oler kunde kopplas till en lägre risk för t2d, d.v.s. ett 2,5-faldigt högre intag av flavan-3-oler kunde (marginellt) kopplas en 11% lägre förekomst av t2d (P-trend=0,06) och ett 2,5-faldigt högre intag av flavonoler kunde kopplas till 26% lägre förekomst av t2d (P-trend=0,003), medan övriga flavanoid-klasser inte visade något samband till t2d.

## **Te och hjärtinfarkt**

Hjärt- och kärlsjukdommar såsom hjärtinfarkt föregås ofta av endotel-dysfunktion (Brown & Hu, 2001). Sambandet mellan tedrickande och risk för hjärtinfarkt studerades av Sesso *et al.* (1999) i en fall-kontrollstudie, vilken utgick 340 fall (från Boston Area Health Study) vilka varit med om sin första diagnostiserade hjärtinfarkt (för varje fall användes en kontroll, fri från hjärtinfarkt och kärlkramp). Frekvensformulär avseende kostintag för det senaste året och information om typiska riskfaktorer för hjärtinfarkt, t.ex. rökning och kolesterolnivå samlades in (Sesso *et al.*, 1999). Fall och kontroller delades upp i fyra kategorier av tedrickande d.v.s. icke-tedrickare, 1-3 koppar per månad, 1-6 koppar per vecka och  $\geq 1$  kopp per dag (Sesso *et al.*, 1999). Det visades sig att det var äldre och de som rökte mindre som drack mest te (P<0,05 för båda) och hade bättre kolesterolvärden (P=0,059), d.v.s. högre HDL-nivåer jämfört med de som drack minst te (Sesso *et al.*, 1999). Risken för hjärtinfarkt var signifikant (P=0,012) lägre hos tedrickare som drack >1kopp/dag (24,9% av fallen och hos 32,0% av kontrollerna) jämfört med icke-tedrickare, då jämförelsen gjordes oberoende av kända riskfaktorer för hjärtinfarkt och lipidnivåer (Sesso *et al.*, 1999).

## **Choklad och plötslig död i hjärtinfarkt**

Janszky *et al.* 2009 studerade samband mellan chokladintag och dödlighet till följd av hjärtinfarkt, i en befolkningsbaserad (Stockholm Heart Epidemiology Programme) kohortstudie där man följde 1051 icke-diabetiker vilka under åren 1992-1994 besökt sjukhus i Stockholms län, Sverige i samband med att de överlevt sin första bekräftade hjärtinfarkt. Information om deltagare samlades in via ett standardiserat frågeformulär avseende det senaste årets kostvanor och, hälsokontroll utfördes i syfte att kartlägga specifika riskfaktorer för hjärtinfarkter (Janszky *et al.*, 2009). Prevalensen bland deltagarna avseende -hypertoni, stillasittande livsstil och låg utbildning visades vara lägre vid högre chokladintag (Janszky *et al.*, 2009). Ett invert, dosberoende samband mellan chokladintag och hjärtinfarktsdödlighet fanns både då data justerats avseende ålder och kön (P=0,02) och då data justerats för andra karaktäristiska variabler (P=0,96), medan det inte fanns något samband mellan andra sötsaker och risk för hjärtinfarkt (Janszky *et al.*, 2009). I slutet av sin rapport nämner Janszky *et al.* (2009) i sin diskussion att sambandet mellan chokladintag och hjärtinfarktsdödlighet eventuellt skulle kunna bero av antingen de stearinsyror eller av de flavanoida antioxidanter som finns i chokladen.

# **10 DISKUSSION**

Att göra jämförelser mellan studier avseende flavan-3-oler och endotel -dysfunktion kan upplevas spretigt och svårt i och med att det inte finns någon standardiserad metod för utförandet av dessa studier och karaktärer av olika livsmedel, därför skiljer sig livsmedel som används vid varje enskild studie åt, bl.a. avseende agrara förhållanden, process och lagerförhållanden, därmed också på halterna av bioaktiva flavanoider. Metodiken skiljer sig

mellan studierna avseende val och av och antal av både försökspersoner och kontroller och vilken typ av och information samlas in från dessa och, bearbetningen av data med t.ex. val av olika signifikansnivåer. Effekter av samtliga ingredienser i livsmedlets matris bör vägas in och särskilt av t.ex. koffein/thein, theobromin och alkohol, vilket flertalet studier försökt göra, men även för detta saknas ett gemensamt utförande. En mer standardiserad modell för tillvägagångssätt vid mätningar av flavan-3-oler i livsmedel och val av passande metodik skulle göra jämförelser mellan studier enklare, samt skulle slutsatserna av dessa jämförelser få högre kvalitet. USDAs databas över flavanoidhalter i valda livsmedel har bidragit till att det idag är betydligt enklare att beräkna innehållet av de olika flavanoiderna, deras subgrupper och specifika föreningar i olika livsmedel. Databasen har också bidragit med säkrare värden, då varje medelvärde baseras på flera studier. Den ökade säkerheten har lett till att Hertogs förslag (1994) om att det dagliga intaget per person på 1 gram flavanoider per dag, idag alltmer anses vara ett alldeles för högt värde. I den här studien nämns och jämförs p.g.a. nödvändiga avgränsningar endast ett antal biomarkörer för endotel -dysfunktion, men flertalet studier har även testat flera biomarkörer för endotel -dysfunktion, som t.ex. diastoliskt och systoliskt blodtryck och artärdiameter. Framtida studier kommer förhoppningsvis att kunna ge en klarare bild av hur och om personer med endotel dysfunktion, t.ex. CAD-patienter kan tänkas rekommenderas att komplettera sin medicinering med eventuella kostråd gällande flavan-3-olrika livsmedel och även att kunna ge en klarare bild av vilka effekter flavan-3-olerna har och om det går att komma fram till något rekommenderat dagligt intag.

## 11 SLUTSATS

Utifrån studierna som den här rapporten baserar sig på går det att dra slutsatsen att flavan-3-olrika livsmedel verka ha en positiv effekt på endotelet och att flavan-3-oler per se kan ligga bakom reducerad endotel -dysfunktion (Alexopoulos *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2006; Duffy *et al.*, 2001; Grassi *et al.*, 2009; Monahan *et al.*, 2011; Shcroeter *et al.*, 2006; Balzer *et al.*, 2008; Heiss *et al.* 2010). Vissa flavan-3-olrika livsmedel har även på ett positivt sätt visats påverka de inflammatoriska biomarkörerna EPC/CAC (Kim *et al.*, 2006; Heiss *et al.*, 2010), sNOX2-dp (Wiedlansky *et al.*, 2010), isoprostaner (Loffredo *et al.*, 2011) och ASI (Grassi *et al.*, 2009), medans CRP, IL och ICAM visats opåverkade. Dosberoende förbättringar (för FMD) har setts vid konsumering av (procyanidinrikt d.v.s. oligomera flavan-3-oler) svart te (Grassi *et al.*, 2009), kakaodryck (Monahan *et al.*, 2007)

Observationsstudier visar att intag av flavan-3-olrika livsmedel och beräknat intag av flavan-3-oler kunde kopplas till en lägre risk för typ 2 diabetes (Jacques *et al.*, 2013), signifikant lägre risk för hjärtinfarkt (Sesso *et al.*, 1999; Janszky *et al.*, 2009).

## 12 TACK!

Ett stort tack till min handledare, Rikard Landberg för all hjälp under arbetets gång!

## 13 REFERENSER

- Alexopolus, N. & Vlachopoulos, C. & Aznaouridis, K. & Baou, K. & Vasiliadou, C. & Pietri, P. et al.** (2008) The acute effect of green tea consumption on endothelial function in healthy individuals. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 15:3, 300-305
- Aron P. M. & Kennedy J. A.** (2008) Flavan-3-ols; Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research* 52:1, 79-104
- Balzer et al.** (2008) Sustained Benefits in Vascular Function Through Flavanol-Containing Cocoa in Medicated Diabetic Patients. *Journal of the American College of Cardiology* 51, 2141-9
- Basu, S. & Helmersson, J.** (2009) Bioaktiva isoprostaner. *Läkartidningen* 5
- Brown, A. A. & Hu, F. B.** (2001) Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease<sup>1-3</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73:673-86
- Cabrera, C. & Artacho, R. & Giménez, R.** (2006) Beneficial effects of green tea –A review. *Journal of the American collection of nutrition* 22:5, 79-99
- Cheng, T. O.** (2005) All teas are not created equal The Chinese green tea and cardiovascular health. *International Journal of Cardiology* 108, 301-308
- Duffy, S. J. & Keaney, J. F. Jr. & Holbrook, M. & Gokce, N. & Swerdloff, P. L. & Frei, B. et al.** (2004) Short- and Long-Term Black Tea Consumption Reverses Endothelial Dysfunction in Patient With Coronary Artery Disease. *Journal of the American Heart Association* 104, 151-156
- Grassi, D. & Mulder, T.P.J. & Draijer, R. & Desideri, G. & Molhuizen, H.O.F. & Ferri, C.** (2009) Black tea consumption dose-dependently improves flow-mediated dilatation in healthy males. *Journal of Hypertension* 27, 774-781
- Hansson G.K. & Jörnvall H. & Lindahl S.G.E** (1998) Kväveoxid som signalmolekyl i hjärt-kärlsystemet. *Läkartidningen* 95:43, 4703-4708
- Harris, R. A. & Nishiyama, S. K. & Wray, D. W. & Richardson R. S.** (2011) Ultrasound assessment of flow-mediated-dilatation: a tutorial. *Hypertension* 55:5, 1075-1085.
- Heiss C. & Keen C.L. & Kelm M.** (2010) Flavanols and cardiovascular disease prevention. *European Heart Journal* 31, 2583-2592
- Heiss, C. et al.** (2010) Improvement of Endothelial Function With Dietary Flavanols Is Associated With Mobilization of Circulating Angiogenic Cells in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 56:3, 218–224
- Hertog, M. G. L.** (1994) Flavonols and Flavones in Foods and their Relation with Cancer and Coronary Heart Disease Risk. Diss. Agricultural University Wageningen, Netherlands
- Harris, R. A. & Nishiyama, S. K. & Wray, D. W. & Richardson, R. S.** (2011) Ultrasound assessment of flow-mediated-dilatation: a tutorial. *Hypertension* 55:5, 1075-1085.
- Ho, C-T, & Rafi, M. M. & Ghai, G.** (2008) Fennema's Food Chemistry Fourth ed. CRC Press, 751-779
- Hodgson, J. M., Puddey I. B., Burke V., Croft K. D.** (2005) Is reversal of endothelial dysfunction by tea related to flavonoid metabolism? *British Journal of Nutrition* 95, 14-17
- Jacobs, D. R. & Tapsell, L. C.** (2007) Foods, Not Nutrients, Is the Fundamental Unit in Nutrition. *Nutrition Reviews* 65:10, 439-450
- Janszky, I., & Mukamal, K. J., & Ljung, R., & Ahnve, S. & Ahlblom, A., & Hallqvist, J.** (2009) Chocolate consumption and mortality following a first acute myocardial infarction: the Stockholm Heart Epidemiology Program. *Journal of Internal Medicine* 266:3, 248-257
- Kim, W. & Jeong, M. H. & Cho, S. H. & Yun, J. H. & Chae, H. J. et al.** (2006) Effect of Green Tea Consumption on Endothelial Function and Circulating Endothelial Progenitor Cells in Chronic Smokers. *Circulation Journal* 70, 1052-1057
- Knaze, V. & Zamora-Ros, R. & Luján-Barroso, L. & Romieu, I. & Scalbert, A. & Slimani, N. et al.** (2011) Intake estimation of total and individual flavan-3-ols, proanthocyanids and theaflavins, their food sources and determinants in European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *British Journal of Nutrition* Doi:10.1017/S0007114511006386
- Loffredo et al.** (2011) NOX2-mediated arterial dysfunction in smokers: acute effect of dark chocolate. *Heart* 97, 1776-1781
- Middleton, E. JR. & Kandaswami, C. & Theoharides, TC.** (2000) The effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673-751

- Monahan, KD & Feehan, RP & Kunselman, AR & Preston, AG & Miller, DL & Lott, MEJ** (2011) Dose-dependent increases in flow-mediated dilatation following acute cocoa ingestion in healthy older adults. *Journal of Applied Physiology* 111, 1568-1574
- Nagaya, N. & Yamamoto, H. & Uematsu, M. & Itoh, T. & Nakagawa, K & Miyazawa, T. et al.** (2004) Green tea reverses endothelial dysfunction in healthy smokers. *Scientific Letter, Heart* 90, 1485-1486
- Petersson, G.** (2009) FLAVONOIDER som antioxidanter i frukt och grönt och i andra njutningsmedel Rapport till Cancer- och Allergifonden inom projektet Biokemisk granskning av konsumentprodukter, Kemi- och Bioteknik, Chalmers
- Ras, R. T. & Zock, P. L. & Draijer, R.** (2011) Tea consumption enhances endothelial-dependent dilatation; a meta-analysis. *PLoS One* 6:3: e16974. doi:10.1371/journal.pone.0016974
- Ray, R. & Shah, M. A.** (2005) NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science* 109, 217-226
- Schroeter, H. & Heiss, C. & Spencer, J. P. E. & Keen, C. L. & Lupton, J. R. & Schmitz, H. H.** (2010) Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. *Molecular aspects of medicine* 31:6, 546-557
- Schroeter, H. & Heiss, C. & Balzer, J. & Kleinbongard, P. & Keen, C. L. & Hollenberg, N. K.** (2006) (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4, 1024-1029
- Seals, D. R. & Jablonsi, K. L. & Donato, A. J.** (2011) Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical Science (London)* 120:9, 357-375
- Shenouda, M. S. & Vita, J. A.** (2007) Effects of flavonoid-containing beverages and EGCG on endothelial function. *Journal of American College of Nutrition* 26: 4, 366S-372S
- Stalikas, C. D.** (2010) Phenolic Acids and Flavonoids: Occurance and Analytical Models. I *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLT, Methods and Protocols, 610, 65-90
- Steffen, Y. & Gruber, C. & Schewe, T. & Sies, H.** (2008) Mono-*O*-methylated flavanols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469, 209-219
- Widlansky, M. E. & Hamburg, N. M. & Anter, M. D. & Holbrook, M. & Kahn, D. F. & Elliot, J. G.** (2007) Acute EGCG Supplementation Reverse Endothelial Dysfunction in Patients with Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Nutrition* 26:2, 95-102

## Elektroniska

- USDA** (2005-08-04) *Phytonutrients FAQs*. <http://www.ars.usda.gov/aboutus/docs.htm?docid=4142> [2012-11-22]
- USDA** (2007) *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 2.1*. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/Flav/Flav02-1.pdf> [2012-04-22]
- USDA** (2011) *Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3*. [http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav\\_R03.pdf](http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf) [2012-11-22]
- USDA** (2013) *Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3.1* <http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav3-1.pdf>, [2013-06-22]
- Kakao** (2012) *Nationalencyklopedin, NE*. <http://www.ne.se/lang/kakao>, [2012-04-20]
- Hans Wigzell** (2012) Interleukiner. *Nationalencyklopedin, NE*. <http://www.ne.se/lang/interleukiner> [2013-11-22]
- Koffein** (2012) *Nationalencyklopedin, NE*. <http://www.ne.se/lang/koffein> [2012-04-22]