

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

**S-Nitrosothiole als biochemische Marker
der endothelialen Dysfunktion**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Christian Heiß

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A.
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Malte Kelm
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

Liste der Abkürzungen und chemischen Formeln

Abb.	Abbildung
AD	Averaged Deviation (Mittlere Abweichung vom Mittelwert)
ADA	American Diabetes Association
AHA	American Heart Association
Cys-SNO	S-Nitrosocystein
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flow Mediated Dilation (Fluss-vermittelte Dilatation)
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTN	Glyzeroltrinitrat
HbO ₂	oxygeniertes Hämoglobin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
HO·	Hydroxylradikal
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
JNC	Joint National Committee
MOD	Magneto-optische Diskette
MW	Mittelwert
NADP ⁻	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute
NO·	Stickstoffmonoxid *
NO ⁺	Nitrosoniumion
NO ⁻	Nitrosylanion
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
O ₂ ⁻	Superoxidanion *
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PW-Doppler	Pulsed Wave-Doppler
RF	Risikofaktor
RSH	Thiol
RSNO	S-Nitrosothiole
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SE	Standard Error (Standardfehler)
SNO-Alb	S-Nitrosoalbumin
TIF	Tagged Image Format
Tab.	Tabelle
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Gefäßzelladhäsionsmolekül-1)
VVP	Venenverschußplethysmographie
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

(* Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1.	Metabolismus des Stickstoffmonoxids.....	5
1.2.	Beteiligung von NO an wesentlichen Funktionen des Gefäßendothels.....	8
1.3.	Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose.....	9
1.4.	Diagnostik der endothelialen Dysfunktion.....	10
2.	Material und Methoden.....	12
2.1.	Studienprotokoll.....	12
2.2.	Studienkollektiv.....	13
2.3.	Biochemische Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen im Plasma.....	15
2.3.1.	Blutentnahme.....	15
2.3.2.	Probenaufarbeitung.....	15
2.3.3.	Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma.....	17
2.3.4.	Bestimmung der S-Nitrosothiole im Plasma.....	18
2.3.5.	Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma.....	18
2.4.	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	19
2.4.1.	Untersuchungsprotokoll.....	20
2.4.2.	Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers.....	22
2.4.3.	Dopplersonographische Messung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis.....	25
2.5.	Statistik.....	25
3.	Ergebnisse.....	26
3.1.	Charakterisierung der Studienpopulation.....	26
3.2.	Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Diameters der Arteria brachialis.....	26
3.3.	Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite.....	27
3.4.	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	29
3.5.	Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation und Metaboliten des NO-Stoffwechsels.....	31

3.6.	Zirkulierende NO-Speicherformen als biochemische Marker der endothelialen Dysfunktion.....	32
4.	Diskussion.....	34
4.1.	Methodenkritik.....	35
4.1.1.	Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung	35
4.1.2.	Quantifizierung der zirkulierenden NO-Metabolite.....	40
4.2.	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Konzentration zirkulierender NO-Metabolite.....	43
4.3.	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel-abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien.....	45
4.4.	Endogene NO-Speicher und endotheliale Dysfunktion.....	47
4.5.	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	48
5.	Zusammenfassung.....	50
6.	Literaturverzeichnis.....	51
7.	Danksagung.....	62
8.	Lebenslauf.....	63

1. Einleitung

Herz-Kreislaufkrankheiten stellen die häufigste Todesursache in Europa, Nordamerika und Asien dar^{1,2}. Im Jahre 1999 sind in Deutschland 406122 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, 76961 davon allein an einem Herzinfarkt und 85755 an Erkrankungen der Hirngefäße verstorben (statistisches Bundesamt). Kardiovaskuläre Erkrankungen haben im Jahre 1994 insgesamt 42,6 Mrd. DM an direkten Kosten für stationäre und ambulante Behandlungen sowie für Gesundheitsgüter verursacht. Hinzu kamen durchschnittlich 29,9 Mrd. DM an indirekten Krankheitskosten durch Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und vorzeitigen Tod von Erwerbstätigen (Gesundheitsbericht für Deutschland 1998). Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen entstehen auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße, so sind bis zu 50% der kardiovaskulären Todesfälle Folge einer koronaren Herzkrankheit. Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen im Sinne einer endothelialen Dysfunktion scheint eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung, als auch dem Fortschreiten einer Arteriosklerose zuzukommen^{3,4}. Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine endotheliale Dysfunktion therapeutisch rückführbar sein kann⁵. Somit kommt der Früherkennung der Arteriosklerose eine enorme sozioökonomische Bedeutung zu. In diesem Zusammenhang haben zahlreiche Arbeiten die Bedeutung des L-Arginin-Stickstoffmonoxid(NO)-Stoffwechselweges für die Endothelfunktion nahegelegt. NO ist an der Regulation wesentlicher Endothelfunktionen beteiligt und beeinflusst direkt Schlüsselprozesse, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose wichtig sind³. Der Nachweis einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit von NO könnte somit zur Früherkennung der Arteriosklerose eingesetzt werden.

1.1. Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Im Jahre 1980 konnten Furchgott und Zawadzki⁶ zeigen, dass isolierte Gefäße auf Azetylcholin und Bradykinin nur in Anwesenheit eines intakten Gefäßendothels dilatieren. In den darauffolgenden Jahren wurde in zahlreichen Arbeiten belegt, dass Endothelzellen kontinuierlich und unter Stimulation mit vasoaktiven Mediatoren eine kurzlebige Substanz freisetzen, welche eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur, sowie eine Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten bewirken. Rein phänomenologisch wurde diese Substanz zunächst als "Endothelium-Derived-Relaxing-Faktor" (EDRF) bezeichnet⁷. In den Jahren 1987 und 1988 konnten Palmer et al.⁸, Ignarro et al.⁹ und andere Arbeitsgruppen¹⁰ den Nachweis erbringen, dass der von Endothelzellen unter basalen und stimulierten Bedingungen freigesetzte EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist. In den folgenden Jahren gelang es den Stoffwechselweg, welcher zur Bildung von NO führt, umfassend zu charakterisieren.

Im Gefäßendothel wird NO aus der Aminosäure L-Arginin mittels der endothelialen Isoform der NO-Synthase (eNOS) produziert^{11;12}. Als Kofaktoren sind unter anderem NADPH und O₂ an dieser Reaktion beteiligt und neben NO entstehen L-Citrullin und NADP⁺. Stickstoffmonoxid ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron. Aufgrund seiner Ladungsneutralität kann endothelial gebildetes NO frei über Zellmembranen hinweg in die Gefäßwand und in das Gefäßlumen diffundieren. In biologischen Medien ist es sehr labil und besitzt im Vollblut nur eine sehr kurze Halbwertszeit. Die primären oxidativen Abbauprodukte des NO im menschlichen Blut sind Nitrit und Nitrat, deren relatives Verhältnis von den vorherrschenden Redoxbedingungen abhängt. Nitrat stellt das stabile vasoinactive Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges dar und wird mit dem Urin ausgeschieden¹³. Der größte Teil des endothelial gebildeten NOs wird im Plasma in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff unmittelbar zu Nitrit oxidiert^{14;15}. Nitrit wird mit einem geringen zeitlichen Versatz intraerythrozytär in Gegenwart von oxygeniertem Hämoglobin (HbO₂) unter Methämoglobinbildung zu Nitrat kooxidiert¹⁶. Alternativ kann NO direkt in Erythrozyten diffundieren und dort ebenfalls mit HbO₂ zu Nitrat und Methämoglobin reagieren. Diesem direkten Abbauweg könnte vornehmlich in der Kapillarstrombahn eine Bedeutung zukommen¹³, da hier die Distanz zwischen Endothelzellen und Erythrozyten geringer ist als in Leitungsarterien. Unter pathologischen Bedingungen, die mit einer erhöhten Nitrit- oder NO-Belastung des Organismus einhergehen, kann es zu einer signifikanten Methämoglobinämie kommen.

Neben molekularem Sauerstoff können reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O₂⁻), Wasserstoffperoxyd (H₂O₂) oder das Hydroxylradikal (HO·) am Abbau von NO beteiligt sein¹⁷. Sowohl NO, als auch O₂⁻ werden von der eNOS synthetisiert. Das relative Verhältnis der Bildung beider Substanzen hängt von der Konzentration des Substrates L-Arginin und dem Redoxzustand der Kofaktoren ab. Unter Bedingungen mit einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) kommt diesem Abbauweg von NO eine zunehmend große Bedeutung zu, zumal die Reaktion von NO mit O₂⁻ zu Peroxynitrit beinahe ausschließlich durch die Diffusion limitiert wird. Das Peroxynitrit kann als starkes Oxidationsmittel über eine Veränderung von Biomolekülen zytotoxisch wirken¹⁸. In Gegenwart von Wasserstoffperoxyd kann Nitrit zu anderen, ebenfalls toxischen, Stickstoffspezies umgesetzt werden. Diese Reaktion scheint über Eisenperoxydasen, wie die Myeloperoxydase, katalysiert zu werden¹⁹. Neben direkt zytotoxischen Effekten können über eine gesteigerte Lipidperoxydation arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen begünstigt werden²⁰.

Bislang ist sehr wenig über den Transport und die biologische Aktivität von NO im menschlichen Kreislauf bekannt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit schien seine Wirkung auf die unmittelbare Umgebung seiner Bildung beschränkt zu sein. In den meisten Untersuchungen wurden deshalb die stabileren Metabolite Nitrit und Nitrat zur indirekten Quantifizierung der Aktivität der NOS bestimmt. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass NO in bioaktiver Form an Thiole gebunden, transportiert und systemisch wirksam werden kann^{15;21;22}.

Intermediate des NO können mit freien Thiolgruppen von plasmatischen und intraerythrozytären Proteinen und Peptiden (RSH) zu S-Nitrosothiolen (RSNO) reagieren²³. Auch das intraerythrozytäre Hämoglobin kann endothelial gebildetes NO als S-Nitroso- und Nitrosylhämoglobin binden²⁴⁻²⁷. S-Nitrosoalbumin stellt mit >80%²¹ den größten Anteil der S-Nitrosothiole im Plasma dar. In viel niedrigeren Konzentration liegen die niedermolekularen S-Nitrosothiole, das S-Nitrosoglutathion und das S-Nitrosocystein im Plasma vor. In ihrer Gesamtheit werden die S-Nitrosothiole im Plasma als RSNO bezeichnet. Sowohl zwischen hoch- und niedermolekularen²⁸, als auch zwischen plasmatischen und intraerythrozytären S-Nitrosothiolen²⁹ besteht ein Austausch von NO. Aus S-Nitrosothiolen kann bioaktives NO frei werden²². Die Halbwertszeit von S-Nitrosoalbumin im Plasma beträgt 15-40min^{16;18;21}. Die Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen kann durch Temperatur, Licht, Ascorbat oder Übergangsmetalle beschleunigt werden³⁰. Zahlreiche Untersuchungen legen nahe, dass S-Nitrosothiolen eine physiologische Bedeutung als Speicherform von bioaktivem NO zukommt. 1992 konnte Stamler et al.²¹ erstmalig zeigen, dass NO im Plasma gesunder Menschen in gebundener Form als S-Nitrosothiol zirkuliert. Gestützt wurde dies im wesentlichen durch drei Befunde: (1.) S-Nitrosothiole sind nitrosative Metabolite des NO, (2.) haben eine dem NO vergleichbare biologische Wirkung und (3.) haben eine längere Halbwertszeit als NO^{16;18;21;31}. Weiterhin konnte am Kaninchenmodell *in vivo* gezeigt werden, dass es nach systemischer Applikation von L-NMMA, einem Inhibitor der NOS zu einer Abnahme der Konzentration von S-Nitrosothiolen und zu einem Blutdruckanstieg kam. Später konnte dieser Befund auch am Menschen bestätigt werden³². In anderen Untersuchungen am Hundemodell führte die Infusion von S-Nitrosoalbumin zu systemischen Effekten wie einer Abnahme des arteriellen Blutdrucks und einer verminderten Blutgerinnung³³. Untersuchungen an albuminämischen Rattenmutanten belegen, dass ein wesentlicher Teil der NO-Wirkung durch langlebige S-Nitrosothiole als Speicherformen vermittelt wird. Im Vergleich zu Ratten vom Wildtyp führte die Injektion eines NO-Donators (NOC 7) bei albuminämischen Ratten zu einer um 50% verringerten hypotensiven Blutdruckantwort³⁴. In neueren Untersuchungen der

eigenen Arbeitsgruppe konnte erstmals der Nachweis am Menschen erbracht werden, dass bioaktives NO im Plasma in Form von RSNO transportiert werden kann und auf diesem Wege systemisch wirken kann²². Nach intravenöser Injektion einer wässrigen NO-Lösung mit einer Dosis von 36µmol in eine Vene des Handrückens zeigte sich eine langanhaltende (>30min) Dilatation sowohl der Leitungs- als auch Widerstandsgefäße und ein Anstieg der RSNO-Konzentration im venösen Blut des kontralateralen Arms.

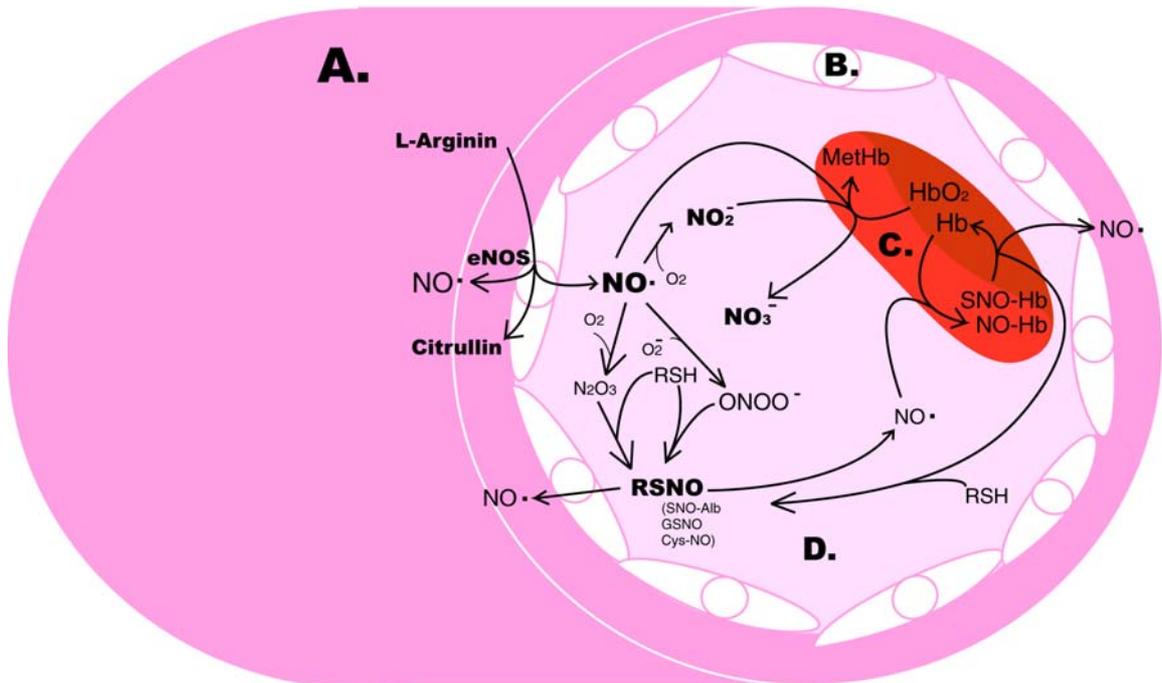


Abbildung 1.

Schematische Abbildung einiger Stoffwechselwege des NO-Metabolismus. (A=Gefäßwand; B=Endothelzelle; C=Erythrozyt; D=Plasma; eNOS=endotheliale NO-Synthase; NO₂⁻=Nitrit; NO₃⁻=Nitrat; GSNO=S-Nitrosoglutathion; Hb=Hämoglobin; HbO₂=oxygeniertes Hb; NO=Stickstoffmonoxid; N₂O₃=Distickstofftrioxid; ONOO⁻=Peroxynitrit; RSH=Thiol; RSNO=S-Nitrosothiole; SNO-Alb=S-Nitrosoalbumin; modifiziert aus¹³)

1.2. Beteiligung von NO an der Regulation wesentlicher Funktionen des Gefäßendothels

Die physiologischen Funktionen des Endothels umfassen die Modulation (I.) des aktuellen und bedarfsgerechten Gefäßtonus³⁵, (II.) der antithrombotischen³⁶ und (III.) antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, (IV.) der Architektur der Gefäßwand und (V.) der Gefäßpermeabilität. Die Regulation dieser wesentlichen Funktionen erfolgt über eine endotheliale Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren wie dem von Willebrand-Faktor, dem Endothelin, dem Plasminogen, dem Fibronectin und dem NO. NO kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da es an der Steuerung aller genannten Endothelfunktionen beteiligt zu sein scheint⁴. Störungen dieser wesentlichen Endothelfunktionen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst³⁷.

Im Endothel gebildetes NO diffundiert sowohl in die Gefäßwand, als auch in das Gefäßlumen. Luminal hemmt NO die Adhäsion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten an die Gefäßwand⁴. Dieser Effekt ist zumindest zum Teil durch eine NO induzierte Herunterregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder VCAM-1 vermittelt³⁸. Durch Hemmung der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors κ B kommt NO eine antiinflammatorische Wirkung zu³⁸. Zusätzlich führt eine Inhibition der NO Synthese zu einer gesteigerten endothelialen Permeabilität^{39;40}. In der Gefäßwand relaxiert NO die glatten Muskelzellen der Gefäßwand durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase als wesentliches Zielenzym⁷. Weiterhin scheint es sowohl die Proliferation und Migration, als auch die Produktion von Matrixproteinen der glatten Muskelzellen zu hemmen⁴¹. Somit kommt dem endothelial gebildeten NO eine essentielle Bedeutung für die Aufrechterhaltung sowohl der Gefäßfunktion, als auch Gefäßstruktur zu^{4;37}.

1.3. Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose

Eine Störung der endothelialen Funktion und damit der Integrität der Gefäßwand wird als frühes Schlüsselereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose angesehen³. Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung aller Arterien. Formalpathologisch handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltraten in der Gefäßintima³. Bereits im Kindesalter sind vereinzelt Makrophagenansammlungen mit intrazellulären Fettablagerungen in der Intima nachweisbar⁴². Im weiteren Verlauf entstehen zusätzlich extrazelluläre Fettablagerungen sowie regressive Veränderungen mit einem bindegewebigen Umbau und Verkalkungen, welche als fortgeschrittene Läsionen oder Plaques bezeichnet werden⁴³. Diese können entweder zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Einengung führen oder durch ein appositionelles Thrombuswachstum auf dem Boden eines rupturierten Plaque akute ischämische Ereignisse hervorrufen^{44;45}.

Die Ätiologie der Arteriosklerose war lange Zeit unklar. Mit ersten Ergebnissen der Framinghamstudie wurde 1961⁴⁶ das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert. Aufgrund empirisch erhobener Daten schien der arteriellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie, dem Rauchen und dem Diabetes mellitus eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, dem Herzinfarkt und dem Schlaganfall zuzukommen⁴⁷. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren, über die Induktion einer endothelialen Dysfunktion, die Entwicklung und Progression einer Arteriosklerose begünstigen^{3;44;45}. Der Begriff der endothelialen

Dysfunktion wird zur Beschreibung einer Vielzahl von pathologischen Situationen verwendet. Diese umfassen Störungen aller oben beschriebenen essentiellen Endothelfunktionen. In der Literatur wird der Ausdruck der endothelialen Dysfunktion häufig verwendet um eine Einschränkung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation zu beschreiben, welche in großen Teilen durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO bedingt zu sein scheint⁴⁸.

Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO kann durch eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS), einen Substrat- oder Kofaktoren-Mangel der eNOS, eine eingeschränkte Aktivierung der eNOS oder einen beschleunigten NO-Abbau verursacht sein⁴⁸. Unter anderem führen die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und der Nikotinabusus zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O_2^-)¹⁷, welche NO vorzeitig zu vasoinktiven Metaboliten wie Nitrat abbauen können. Neben der vorzeitigen Inaktivierung von NO kommt es zu einer gesteigerten Bildung von oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL) in der Gefäßwand. Bei der Reaktion von NO mit O_2^- entsteht unter anderem Peroxynitrit, welches Endothel-toxisch ist^{18;49;50} und zu einer Entkopplung der eNOS mit einer reduzierten NO-Synthese sowie einer gesteigerten O_2^- -Bildung führt⁵¹. Durch die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen kommt es zur Bildung von Schaumzellen und Ausschüttung von chemotaktischen Entzündungsmediatoren. Die verminderte Menge an bioverfügbarem NO begünstigt die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und die Adhäsion von Thrombozyten. Die proatherogene Wirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren scheint somit zumindest in Teilen durch eine chronische Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit durch vermehrten oxidativen Stress verursacht zu sein⁵².

1.4. Diagnostik der endothelialen Dysfunktion

Lange bevor hämodynamisch relevante Einengungen im arteriellen Gefäßsystem in Form von Plaques entstehen, sind Einschränkungen der basalen Endothel-abhängigen Vasorelaxation und nach Stimulation der NO-Synthese bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachweisbar⁵³. Bislang stellt die Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation die zentrale Säule in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dar³⁷. Zur Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation stehen eine Vielzahl von Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Als Goldstandard gilt in diesem Zusammenhang die durch intraarterielle Gabe von Azetylcholin induzierte Vasodilatation⁵⁴⁻⁵⁶. Ein etabliertes nicht-invasives Verfahren zur Früherkennung⁵⁷ einer endothelialen Dysfunktion und Risikostratifizierung bei Personen mit koronarer

Herzkrankheit⁵⁸ stellt die Quantifizierung der Fluß-abhängigen Dilatation (FMD=Flow-Dependent Dilation) der Arteria brachialis mittels hochauflösendem Ultraschall dar. Trotz des potentiell großen epidemiologischen Nutzens der Früherkennung einer endothelialen Dysfunktion wird bislang keines der genannten Verfahren in die Routinediagnostik eingesetzt. Als Gründe für die mangelnde Integrierung in den klinischen Alltag kommen vor allem der Zeitaufwand, die Notwendigkeit einer speziellen Ausbildung des Untersuchers, sowie eine teure Ausrüstung in Betracht. Ungleich einfacher durchzuführen wäre ein einfacher Bluttest, bei dem die Konzentration endothelialer Signalstoffe quantifiziert wird. Zur Zeit existiert kein biochemischer Marker mit gesicherter diagnostischer Wertigkeit als Parameter einer Störung der Endothelfunktion^{37;59}. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher einen direkten biochemischen Marker für die endotheliale Dysfunktion zu identifizieren. Mit dem Hintergrund, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führen und S-Nitrosothiole eine bioaktive NO-Speicherform zu sein scheinen, wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Eine Erniedrigung der S-Nitrosothiole im menschlichen Plasma kann als biochemischer Marker zur Diagnose einer endothelialen Dysfunktion beitragen

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde sowohl die Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma, als auch der Grad einer endothelialen Dysfunktion mit Hilfe eines etablierten nicht-invasiven Verfahrens (FMD) bei Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmt. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit galten daher der Klärung der folgenden drei Fragen:

- (1.) Ist die Konzentration von S-Nitrosothiolen im Plasma von Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zunehmend vermindert?
- (2.) Besteht eine reziproke Korrelation zwischen der Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma und dem Grad der funktionellen endothelialen Dysfunktion?
- (3.) Wie sensitiv und spezifisch ist die Konzentration S-Nitrosothiole im Plasma als Parameter einer endothelialen Dysfunktion?

2. Material und Methoden

2.1. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll (Abb. 2) der vorliegenden Untersuchung setzt sich aus drei Teilen zusammen: (1.) der Probandenrekrutierung, (2.) einer Blutentnahme und (3.) einer Ultraschalluntersuchung. Die Genehmigung des Studienprotokoll erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Votum Prof. Dr. med. M. Kelm). Die Probanden wurden zunächst im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Daran schloss sich eine Anamneseerhebung und eine körperliche Untersuchung an. Am Morgen der Untersuchung erfolgte zunächst die Blutentnahme. Hieraus wurde das Routinelabor, sowie das Nitrit, das Nitrat und die S-Nitrosothiole im Plasma bestimmt. Unmittelbar anschließend erfolgten die Ultraschalluntersuchungen der Arteria brachialis. Diese umfassten die Quantifizierung der Endothel-abhängigen (Fluß-vermittelte-Dilatation; FMD) und Endothel-unabhängigen Dilatation nach oraler Gabe von 400µg Glyzeroltrinitrat (GTN). Während der gesamten Zeit waren die Probanden nüchtern.

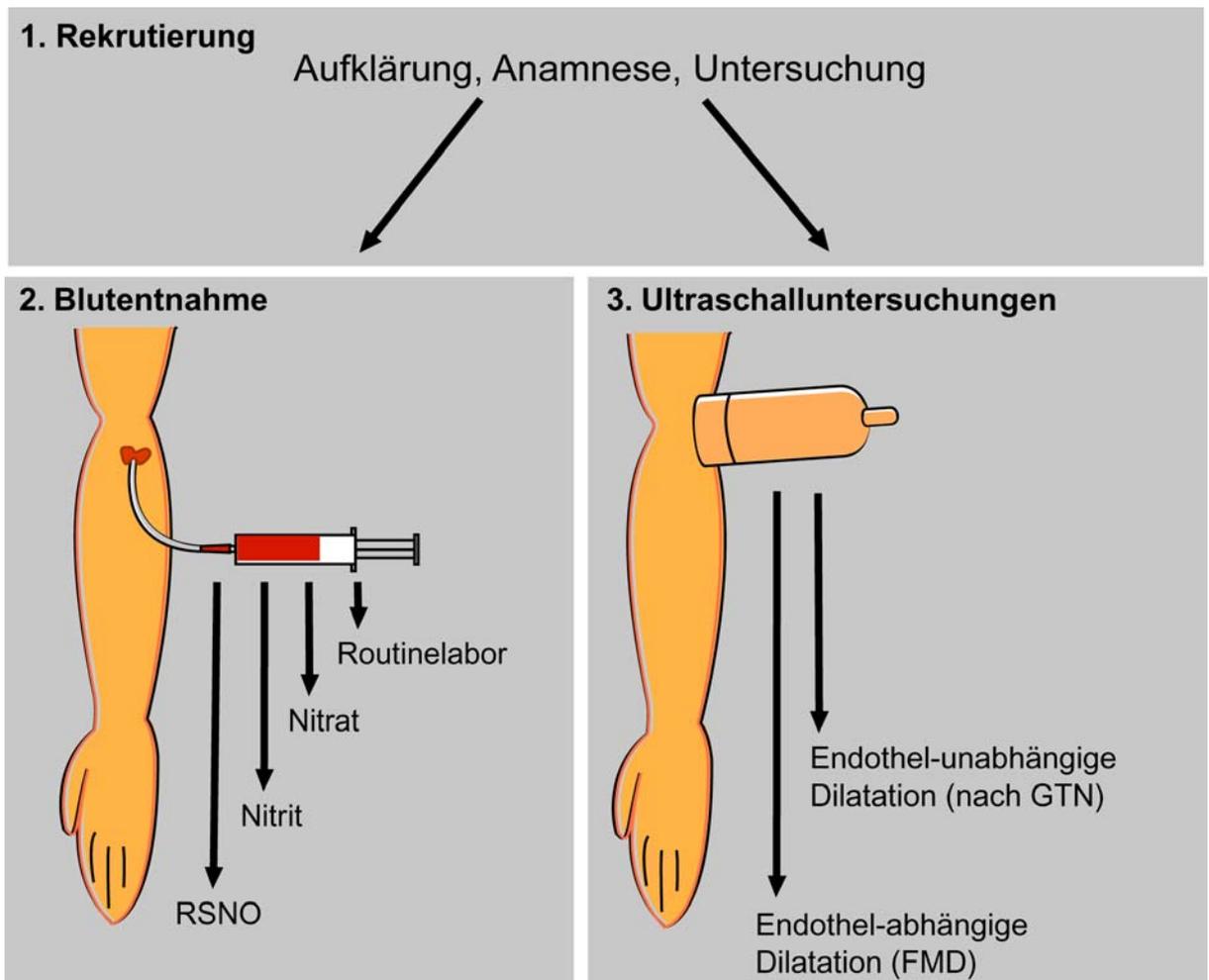


Abbildung 2.

Flussdiagramm des Studienprotokolls

2.2. Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Normalpersonen (n=8) und Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (n=43) untersucht. Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden sowohl anamnestische Angaben, als auch die klinische Untersuchung und laborchemische Parameter herangezogen. Bei jedem Probanden wurde daher nach der Anamneseerhebung eine internistische Untersuchung, ein Ruhe- und Belastungs-EKG, sowie eine Kontrolle des Routinelabors (Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Glukose) und drei nicht-invasive Blutdruckmessungen an 3 unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Sämtliche Studienteilnehmer wurden aus dem Patientengut der Kardiologie der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert.

Als Risikofaktoren erster Ordnung wurden die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus und eine Hypercholesterinämie gewertet. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien (JNCVI⁶⁰) bzw. der WHO-Richtlinien⁶¹ diagnostiziert, wenn arterielle Blutdrücke $>140/>90$ mmHg bei drei Messungen an 3 separaten Tagen gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der WHO⁶² und ADA⁶³ diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen die Plasmaglukosespiegel nüchtern >126 mg/dl gemessen wurde, ein oraler Glukosetoleranztest mit 2 Stunden-Werten von >200 mg/dl oder zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten von >200 mg/dl bestanden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. In Anlehnung an die Richtlinien der AHA und des NHLBI wurde eine Hypercholesterinämie definiert als Vorliegen eines Gesamtcholesterins >240 mg/dl, eines LDL-Cholesterins >160 mg/dl, eines HDL-Cholesterins <35 mg/dl (NCEP ATPIII⁶⁴) oder einer bestehender cholesterinsenkender Therapie. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die jemals täglich mindestens 20 Zigaretten über ≥ 1 Jahr (1 Packungsjahr) geraucht hatten⁶⁵.

Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 8 Normalpersonen (3 Frauen, 5 Männer) zusammen, bei denen die oben definierten kardiovaskulären Risikofaktoren ausgeschlossen werden konnten. Das mittlere Lebensalter war 52 ± 4 Jahre, die durchschnittliche Körpergröße war 168 ± 3 cm und das mittlere Gewicht betrug 71 ± 4 kg (Details siehe Ergebnisteil Tab. 1).

Die Gruppe der Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (n=43) wurde in 4 Untergruppen unterteilt. Die Einteilung erfolgte aufgrund der kumulativen Anzahl an Risikofaktoren. Die Untergruppe der Personen mit einem Risikofaktor (n=8) bestand aus 8 Männern im Alter von 56 ± 4 Jahre (Größe: 170 ± 2 cm; Gewicht: 74 ± 5 kg). Die Untergruppe mit zwei Risikofaktoren setzte sich aus 4 weiblichen und 11 männlichen Probanden zusammen (Alter 59 ± 3 Jahre; Größe: 169 ± 2 cm; Gewicht: 73 ± 2 kg). Die Untergruppe mit drei Risikofaktoren setzte sich aus 6 weiblichen und 9 männlichen Probanden zusammen (Alter 62 ± 2 Jahre; Größe: 172 ± 1 cm; Gewicht: 82 ± 4 kg). Die Untergruppe mit allen vier Risikofaktoren bestand aus 2 weiblichen und 3 männlichen Probanden (Alter 59 ± 3 Jahre; Größe: 169 ± 4 cm; Gewicht: 85 ± 5 kg).

Von den Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren waren 27 Hypertoniker, 33 Raucher, 10 Diabetiker und 34 Hypercholesterinämiker. Die antihypertensive Therapie bestand aus Calciumkanalantagonisten (26%), Diuretika (26%), Alpha-Rezeptorantagonisten (7%), Beta-Rezeptorantagonisten (63%) und Inhibitoren des Angiotensin-Konversionsenzym (33%). Bei 44% des Patientenkollektives lag eine Monotherapie vor, bei 33% bestand eine Kombinationstherapie aus 2 Substanzklassen und bei 15% aus 3 Substanzklassen. Von den Hypercholesterinämikern wurden 41% mit Cholesterin-Synthese-Hemmern behandelt. Bei allen Diabetikern handelte es sich ausschließlich um Typ 2 Diabetiker. Die Therapie bestand bei 4 von ihnen aus oralen Antidiabetika, bei 2 aus Insulin und die übrigen 4 wurden ausschließlich diätetisch behandelt.

2.3. Biochemische Quantifizierung Konzentrationen von Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen im Plasma

2.3.1. Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten beim nüchternen Patienten zwischen 7:00 und 8:00 Uhr morgens nach fünfminütiger Ruhe im Liegen aus einer Kubitalvene. Die Punktion wurde mit Einwegkanülen (W.I.N. 21G, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Entnahme von Blutproben in Vakuurröhrchen (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Großbritannien) zur Bestimmung des Routinelabors (Blutbild, Serumelektrolyte, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyzeride, Glukose). Anschließend wurde 1ml Blut zur Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat und 1ml Blut zur S-Nitrosothiol-Bestimmung entnommen. Die Entnahme erfolgte in 5ml Einwegspritzen (B.Braun Melsungen AG, Deutschland). Diese waren bereits mit 4ml eisgekühlter Citrat-Lösung (0,9% NaCl, 308mOsm/l, B. Braun Melsungen AG, Deutschland mit 3,8% Citrat, Tri-Natrium-Dihydrat, Merck, Deutschland) gefüllt und wurden mit Blut luftblasenfrei auf 5ml aufgezogen. Dann wurden die gefüllten Spritzen bis zur Aufarbeitung in Eis gelegt. Die Lagerungszeit betrug maximal 30min.

2.3.2. Probenaufarbeitung

Alle vorbereiteten Lösungen, die Spritzen und die Zentrifugen wurden während der gesamten Aufarbeitung auf 4°C gekühlt. Die Aufbereitungszeit betrug 1,5h von der Blutentnahme bis zur Analyse. Die nun 1:5 in Citrat-Lösung verdünnten Blutproben wurden zunächst 10min lang bei 1.000g zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile abzutrennen (Abb. 3). Der klare Überstand wurde anschließend in gekühlte Ultrafiltrationsröhrchen (Centrisart, cut-off 10.000 Dalton, Fa. Sartorius, Deutschland) überführt. Den zur Bestimmung von S-Nitrosothiolen vorgesehenen Ultrafiltrationsröhrchen wurde 100µl 5% Quecksilberlösung (HgCl₂)(Quecksilber(II)-chlorid pA, Merck, Deutschland) in HPLC-Wasser zugesetzt. Entsprechend dem ersten Teil der Saville-Reaktion⁶⁶ katalysieren Quecksilberionen die Freisetzung des zuvor gebundenen NO als Nitrosoniumionen (NO⁺). Aus diesem entsteht in wässriger Lösung unmittelbar Nitrit, welches später quantifiziert wird. Dann wurden alle Ultrafiltrationsröhrchen bei 4.000g über den Zeitraum von einer Stunde zentrifugiert. Ein Aliquot des Quecksilberfreien-Ultrafiltrats wurde für die spätere Nitrat-Bestimmung bei – 80°C eingefroren.

Probenaufarbeitung

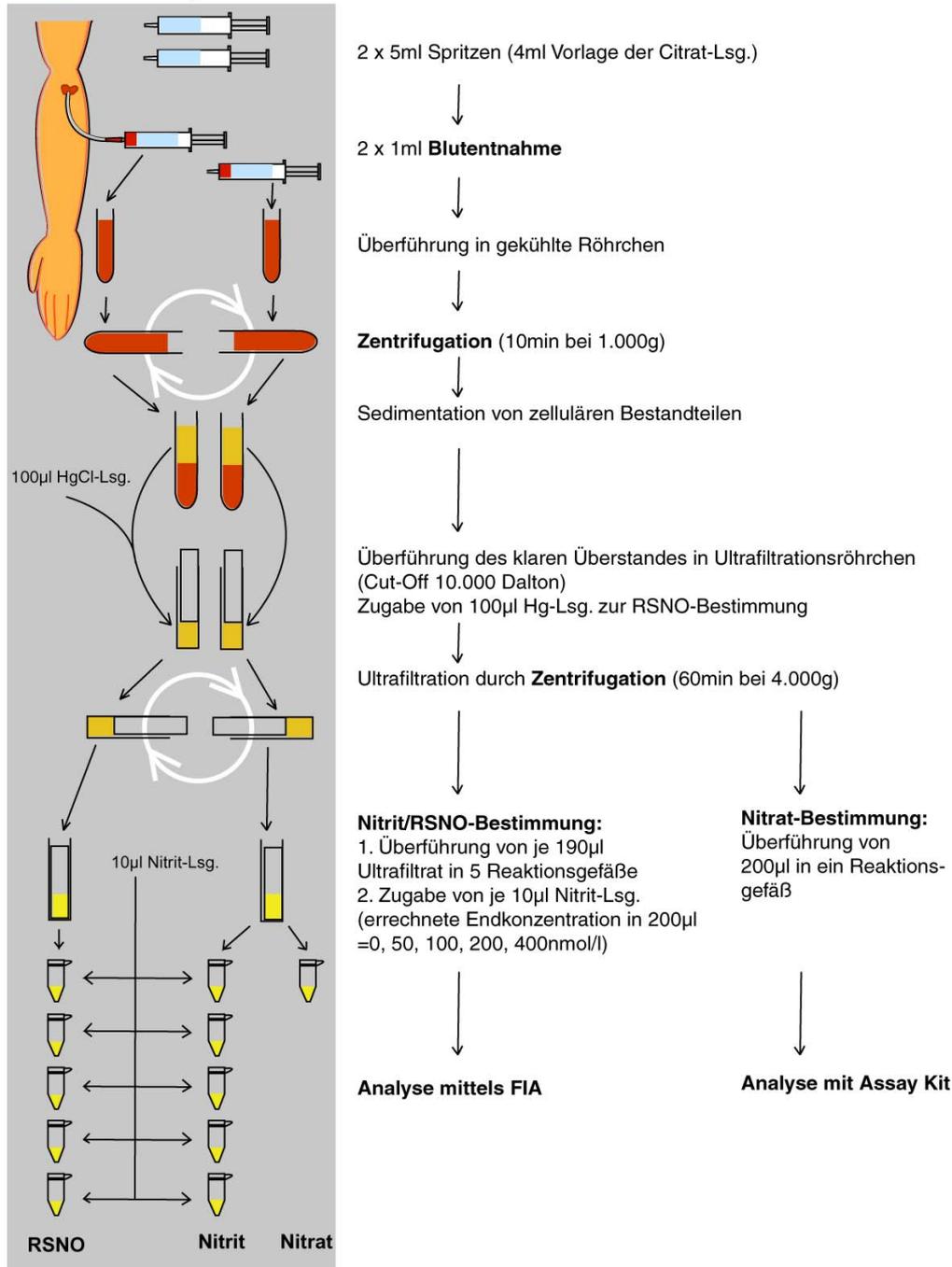


Abbildung 3.

Ablaufschema der Probenaufarbeitung.

Das Ultrafiltrat wurde entsprechend der Methode des Standardadditionsverfahrens (Details unter 2.3.3. und ⁶⁷) in 5 Einzelproben zu je 190µl in Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Deutschland) aliquotiert und mit jeweils 10µl aufsteigenden Konzentrationen an NO₂⁻ (Natriumnitrit, Merck, Deutschland) (Endkonzentration = 0, 50, 100, 200, 400 nmol/l) versetzt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Fluss-Injektions-Analyse (FIA).

Parallel zu jeder Aufarbeitung wurden Leerwerte mitgeführt, um mögliche Kontaminationen während der Aufarbeitung zu erfassen.

2.3.3. Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma

Die Fluss-Injektions-Analyse (FIA; Abb. 4)⁶⁷ zur Nitritbestimmung im Plasma beruht auf der Griess-Reaktion⁶⁸. Hierbei wird der Farbstoff, der bei der Reaktion von Nitrit mit Naphthylethylendiamin und Sulfanilamid entsteht, photometrisch quantifiziert.

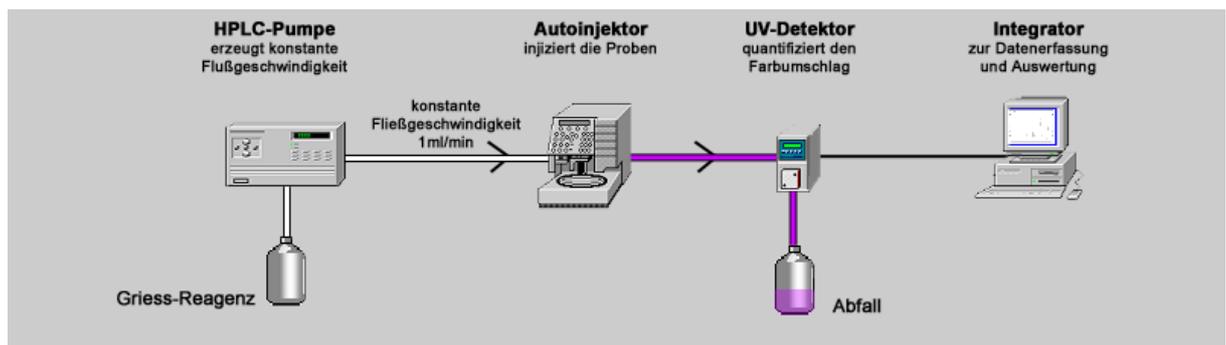


Abbildung 4.
Anordnung der Fluss-Injektions-Anlage

In der FIA Anlage wird das Farbreagenz mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mittels einer HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-6A, Japan) durch die Messzelle eines Photometers (Shimadzu SPD-6AV, Japan) gepumpt. Das als Laufmittel dienende Griess-Farbreagenz besteht aus gleichen Teilen Sulfanilamid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und in 1% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöstes N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die aufbereiteten Plasmaproben werden mit einem automatischen Probenaufnehmer (Spark Holland Triathlon, Niederlande) in das fließende Farbreagenz injiziert. Auf ihrem Weg zur Messzelle reagiert das, in den Proben enthaltene Nitrit, mit dem Farbreagenz und es kommt zu einem inkompletten Farbumschlag. Dieser wird im nachgeschalteten Photometer in einer Messzelle mit einem Messvolumen 8 µl bei einer Wellenlänge von 545 nm detektiert. An das Photometer war ein Integrator zur Datenaufnahme (Shimadzu C-R4AX Chromatopac, Japan) angeschlossen.

Die fünf im Integrator bestimmten Peakhöhen dienen als Grundlage für eine lineare Regression. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse ($y=0$) entspricht der in der Probe aufgegebenen Konzentration an NO_2^- . Nach mathematischer Korrektur der Verdünnungsfaktoren und Subtraktion der Leerwerte ergab sich die Ausgangskonzentration in der Probe (Abb. 5).

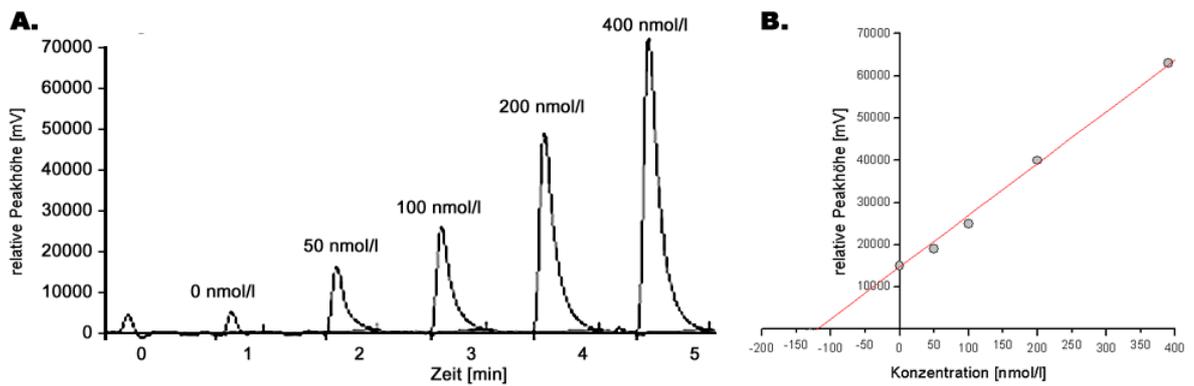


Abbildung 5.

A. Originalchromatogramm eines Probenlauf B. Die fünf im Integrator bestimmten Peakhöhen dienen als Grundlage einer Regressionsgeraden. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse ergibt die Nitrit-Konzentration.

2.3.4. Bestimmung der S-Nitrosothiole im Plasma

Den Hintergrund für die Bestimmung der S-Nitrosothiol Konzentration im Plasma bildet die Saville-Reaktion⁶⁶. Diese Reaktion besteht aus zwei Schritten. In einem ersten Schritt katalysieren Quecksilberionen die Freisetzung von Nitrosoniumionen (NO^+) aus S-nitrosierten Thiolen. In einem zweiten Schritt reagiert dieses mit Sulfanilamid. Das so entstandene Diazoniumsalz koppelt sich nun an N-(1-Naphthyl)-Ethyldiamin HCl, wodurch eine purpurne Verbindung entsteht. Der zweite Schritt entspricht der oben genannten Griess-Reaktion zur Quantifizierung der Nitrit-Konzentration⁶⁹. Aus diesem Grunde wurde die Bestimmung der S-Nitrosothiole, mit Ausnahme der Zugabe von Quecksilberionen, wie die Nitrit-Bestimmung mit Hilfe der FIA durchgeführt. Die S-Nitrosothiol-Konzentration wurde ebenfalls mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens und abschließender Subtraktion der parallel quantifizierten Nitrit-Konzentration errechnet.

2.3.5. Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma

Die Nitratkonzentration wurde mit einem Colorimetrischen Nitrat/ Nitrit Assay Kit (Cayman Chemical Company, USA) quantifiziert. Das Prinzip dieses Assay Kits beruht auf einer Umsetzung des in der Probe enthaltenen Nitrats mittels Nitratreduktase zu Nitrit, welches mit Hilfe der Griess-Reaktion quantifiziert wird. Somit entspricht die bestimmte Nitrit-Konzentration der NO_x -Konzentration, als Summe aus Nitrit und Nitrat. Da das bereits im Plasma vorhandene Nitrit bei den untersuchten Proben in einem Konzentrations-Bereich zwischen 100 und 600 nmol/l unterhalb der Nachweisgrenze ($>1 \mu\text{mol/l}$) und innerhalb der Streubreite (VK 5%) des Colorimetrischen Nitrat/ Nitrit

Assay Kit lag, wird die so bestimmte NO_x-Konzentration in der vorliegenden Arbeit als Nitratkonzentration bezeichnet.

2.4. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Parallel zu der Quantifizierung von Metaboliten des L-Arginin-NO-Stoffwechsels wurden funktionelle, duplexsonographische Untersuchungen der Endothel-abhängigen Dilatation durchgeführt. Das Prinzip dieses Untersuchungsverfahrens ist die Bestimmung der Diameterzunahme der Arteria brachialis nach einer physiologischen Stimulation der endothelialen NO-Synthese durch einen gesteigerten Blutvolumenfluss. (Fluss-vermittelte, Endothel-abhängige Dilatation; FMD)^{37;70-72}.

Hierzu wurde der Durchmesser der A. brachialis im Bereich der Ellenbeuge sowohl unter Ruhebedingungen, als auch im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebietes der Arterie bestimmt. Die Diametermessungen erfolgten nicht-invasiv mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschalls. Induziert wurde die reaktive Hyperämie durch 5minütige Insufflation einer am proximalen Unterarm platzierten Blutdruckmanschette (Abb. 11). Aus der ischämischen Vasodilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet resultiert eine Steigerung des Blutvolumenflusses im Bereich der Leitungsarterie, der Arteria brachialis. Diese Flussteigerung geht mit einer Steigerung der Schubspannung einher, welche über eine vermehrte Freisetzung endothelialen Stickstoffmonoxids zu einer Dilatation der Arteria brachialis führt. Diese Fluss-vermittelte Vasodilatation erreicht etwa 75s nach Beendigung der Ischämie ihr Maximum (Abb. 6).

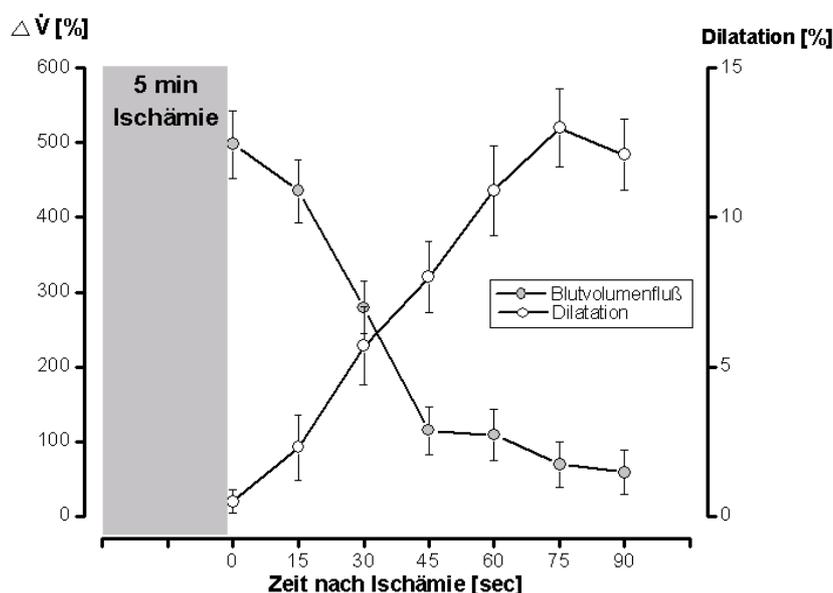


Abbildung 6. Zeitliche Abfolge der relativen Änderungen von Blutvolumenfluß ($\Delta\dot{V}$ linke Achse) und des Diameters der Arteria brachialis (Dilatation; rechte Achse) nach 5 minütigen Ischämie des Unterarms bei gesunden Normalprobanden. (eigene Voruntersuchungen; n=5; MW \pm SE)

Prinzipiell kann einer verminderten FMD, neben einer reduzierte NO-Synthese des Endothels, auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO-Abbau zu Grunde liegen. Deshalb wurde in einem zweiten Schritt die Endothel-unabhängige Dilatation nach sublingualer Gabe von 400µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als positiv-Kontrolle quantifiziert. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass GTN zu keiner signifikanten Steigerung des Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis führt und die Wirkung nicht Fluss-vermittelt ist. Die maximale Dilatation wurde nach 3,5min bestimmt⁷³(Abb. 7).

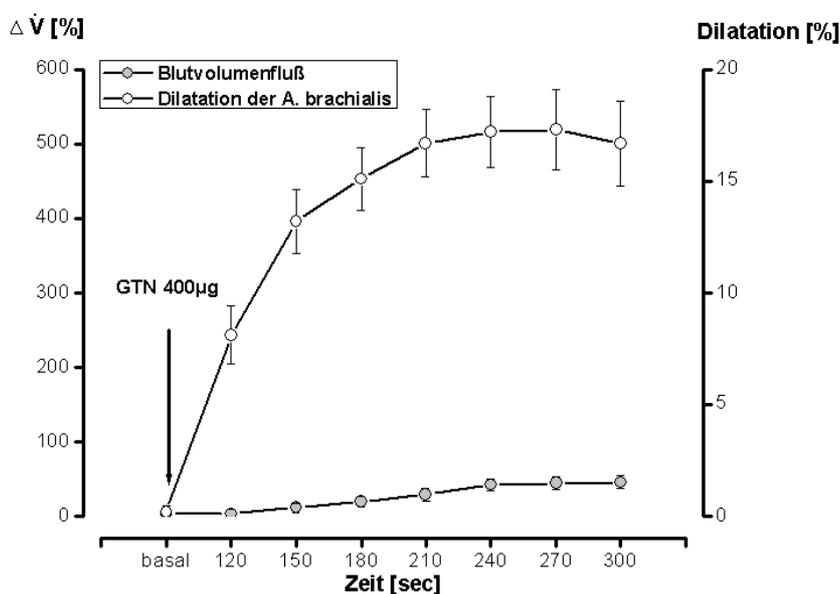


Abbildung 7.

Nach sublingualer Gabe von 400µg Glyzeroltrinitrat (GTN) kommt es zu einer Zunahme des Diameters (Dilatation; rechte Achse) der Arteria brachialis, aber nicht des Blutvolumenflusses (ΔV ; linke Achse). (eigene Voruntersuchungen; n=5; MW \pm SE)

Sowohl die Endothel-abhängige, als auch die Endothel-unabhängige Vasodilatation wurden als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter angegeben.

2.4.1. Untersuchungsprotokoll

Alle Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C zwischen 7:00 und 9:00Uhr morgens durchgeführt. Zuerst wurde die Arteria brachialis duplexsonographisch aufgesucht, dann im B-Mode längs dargestellt. Die Eindringtiefe des Ultraschalls wurde auf 3cm festgelegt. Der Diameter wurde dadurch identifiziert, dass man sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand klar vom Lumen abgrenzen konnte. Anschließend wurde der Bereich unmittelbar um das Gefäß mit der Zoomfunktion vergrößert. Der Kontrast zwischen Arterienlumen und Arterienwand wurde durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen optimiert. Nach

Markierung der Schallkopfposition am Arm, wurden weder der Schallkopf noch die Geräteeinstellungen während der gesamten Untersuchung verändert.

Nach einer 10 minütigen Ruhephase (Abb. 8) in liegender Position erfolgte die Messung des arteriellen Blutdrucks (nicht-invasiv nach Riva-Rocci), sowie des Ruhediameters. Parallel dazu wurde mittels PW-Doppler die Fließgeschwindigkeit unter Ruhebedingungen gemessen.

Anschließend wurde eine am proximalen Unterarm lokalisierte Blutdruckmanschette über 5min auf suprasystolische Werte insuffliert. Unmittelbar nach Lösung des Staus wurde dopplersonographisch die maximale Fließgeschwindigkeit während der reaktiven Hyperämie gemessen, 75s später wurde der Diameter bestimmt (FMD). Anschließend erfolgte eine weitere Registrierung der Fließgeschwindigkeit. Nach einer 10 minütigen Ruhephase wurde der Diameter und die Fließgeschwindigkeit bestimmt. Danach wurden 400µg Glyzeroltrinitrat (Nitrolingual, Pohl, Deutschland) als Zerbeißkapsel sublingual verabreicht. Vier Minuten später erfolgte die Quantifizierung des Diameters und der Fließgeschwindigkeit.

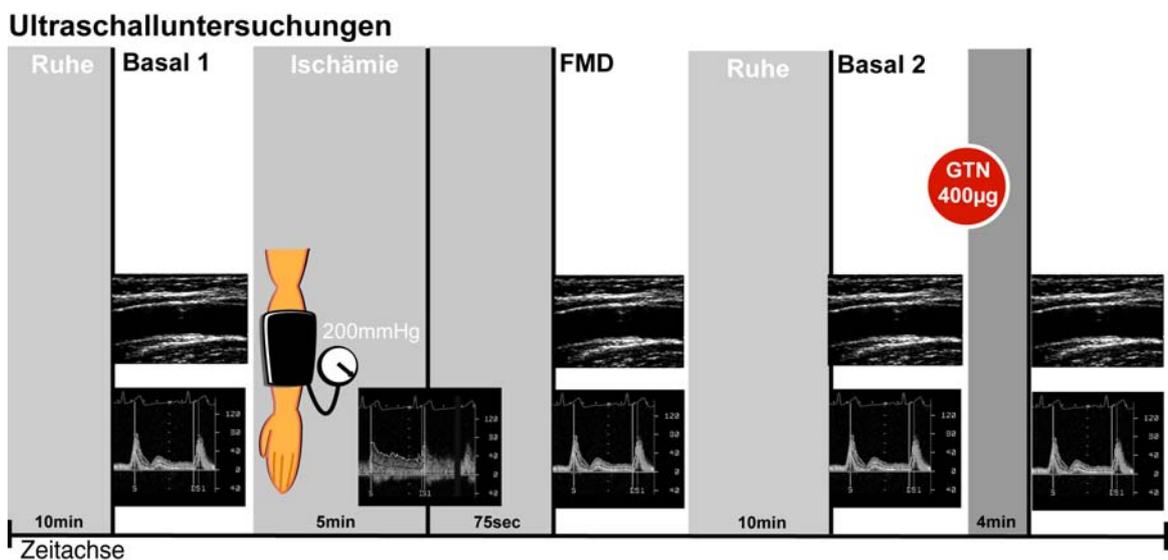


Abbildung 8.

Zeitliche Abfolge des Untersuchungsablaufs. Zu den jeweiligen Messzeitpunkten sind im unteren Teil exemplarische Originalaufnahmen eingefügt (Oben: Längsschnitt der A. brachialis; Unten Flussprofil).

2.4.2. Prinzip der sonographischen Quantifizierung des arteriellen Durchmessers

Die Bestimmung des Durchmessers der Arteria brachialis im Bereich der Ellenbeuge erfolgte anhand von Längsschnitten. Diese wurden mit Hilfe eines hochauflösenden 7,5MHz Linear Array Schallkopfes (Hewlett Packard, Sonos 2000, USA) aufgezeichnet. Die Vermessungen des Arterienradius erfolgten EKG gesteuert am Ende der Diastole (R-Zacke). Als Eckpunkte der Diametermessungen diente die M-Linie (Abb. 9). Diese echoarme M-Linie stellt den Übergang zwischen Adventitia und Media dar. Hierzu wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M-Linie bis zur schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt⁷⁴.

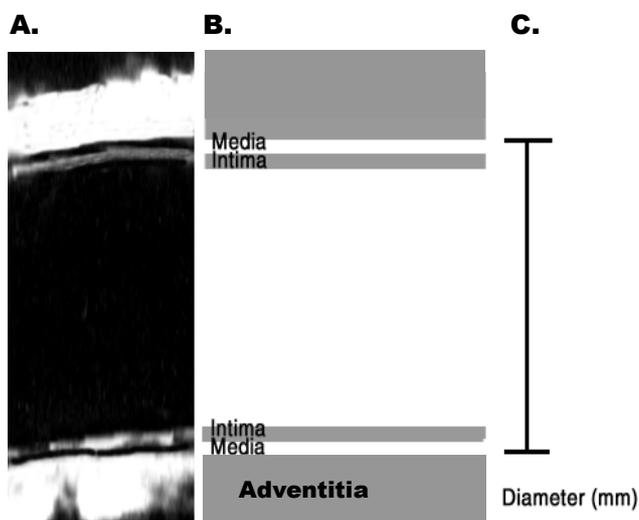


Abbildung 9.

Schematische Gegenüberstellung des Ultraschallechos der A. brachialis und des anatomischen Korrelates der wandbildenden Strukturen (Modifiziert nach Wendelhag⁷⁴).

A: Sonographische Darstellung der Arteria brachialis. Die M-Linie stellt sich echoarm dar.

B: Anatomisches Korrelat der echo-bildenden Strukturen.

C: Den Diametermessungen wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie zu Grunde gelegt.

Nach der herkömmlichen Methode war die Vermessung des Arterienradius anhand von Einzelbildern erfolgt (Abb. 10). Im Standbild wurden manuell jeweils 4 Einzelpunkt-messungen durchgeführt, welche anschließend gemittelt wurden.

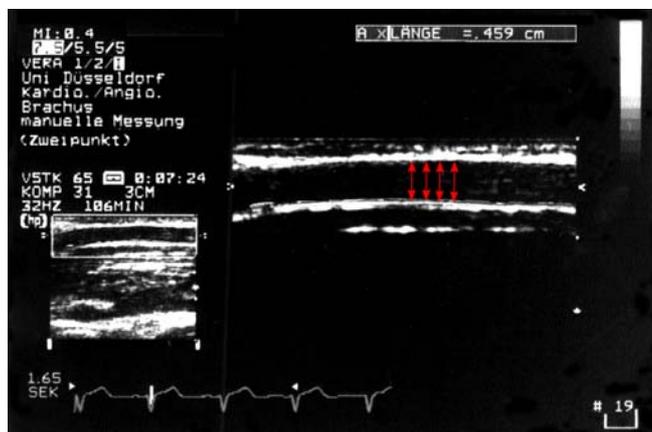


Abbildung 10.

Manuelle Zweipunktmessung des Gefäßdiameters der Arteria brachialis im Standbild. Die Aufzeichnung der Untersuchung erfolgte auf S-VHS Band. Die manuelle Diametermessung wurde später direkt am Ultraschallgerät im Standbild des S-VHS Signals durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 4 Zweipunktmessungen gemittelt (Exemplarische Originalabbildung)

Der Einsatz dieser konventionellen Methode in der klinischen Routine, einerseits zum individuellen Screening auf eine endotheliale Dysfunktion und andererseits zur Therapiekontrolle, wurde bislang durch gravierende Nachteile erschwert. Die Nachteile dieser Messmethode waren der hohe Zeitaufwand von 35 min und die hohe Tag-zu-Tag Variabilität von 3-4% bei einer Gesamtdiameteränderung von 0-12%^{74;75}. Auf Grund der hohen Streuung waren große Studienpopulationen notwendig, um statistisch signifikante Veränderungen nachweisen zu können. Mit dem Ziel (1.) den Zeitaufwand und (2.) die Variabilität zu reduzieren wurde deshalb eine PC-gestützte Methode zur Datenanalyse in Zusammenarbeit mit Prof. M. Sonka (Iowa City, The University of Iowa, Dept. of Electrical and Computer Engineering, IA, USA) entwickelt.

Bei dieser neuen Methode wurde jeweils eine Bildschleife aufgenommen und digital gespeichert. Jede Bildschleife setzte sich aus ca. 60 Einzelbildern zusammen und umfasste dadurch 3-4 Herzzyklen. Das kontinuierlich mitlaufende EKG wurde immer mit aufgezeichnet, um die R-Zacken getriggerte Vermessung des Arterien-diameters zu ermöglichen.

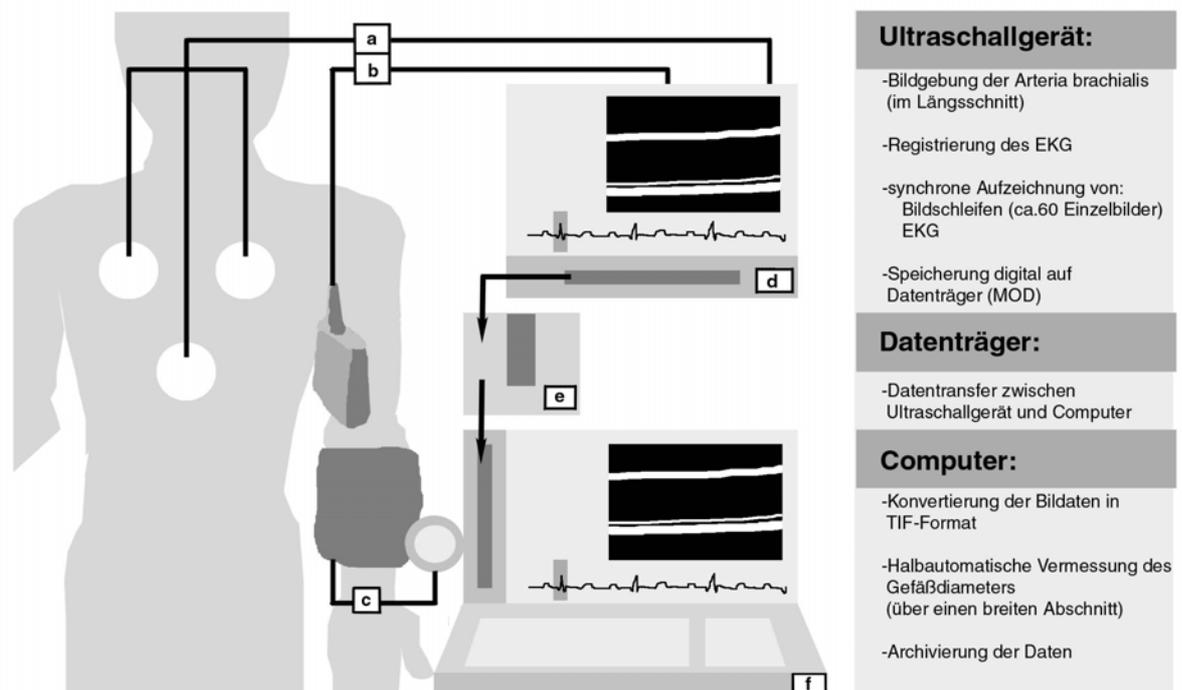


Abbildung 11.

Schematische Anordnung des Messplatzes zur duplexsonographischen Quantifizierung der endothelialen Funktion. (a=EKG, b=Schallkopf, c=Blutdruckmanschette zur Stauung des Unterarms, d=Ultraschallgerät, e=Datenträger, f=Computer)

Der Transfer des Bildmaterials vom Ultraschallgerät auf den Computer erfolgte mit Hilfe eines Wechseldatenträgers (MOD). Am PC wurden die Bilder mit einer speziell dafür

entwickelten Software in ein Standard-Bildformat (TIF-Format) konvertiert (Brachial Converter, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA). Die so konvertierten Bildschleifen konnten nachfolgend in die zur Diametermessung verwendete Software (Brachial Analyse, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) importiert werden (Abb. 12).



Abbildung 12.

PC-gestützte Vermessung des Diameters der A. brachialis. Die Bestimmung des Diameters erfolgte durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten in einem zu definierenden Messabschnitt.

Nachdem das Bildmaterial in die zur Diametermessung verwendete Software importiert war, wurde der zu vermessende Gefäßabschnitt manuell markiert. Dann wurde das Programm anhand von mitgespeicherten Eichmarken kalibriert. Anschließend wurden die Gefäßwände automatisch detektiert und farbig angezeigt. Die farbig markierten Begrenzungen der Gefäßwand wurden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild überprüft. Die Bestimmung des Diameters erfolgt R-Zacken synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt.

Mit dem Ziel der Validierung dieses PC-gestützten Analysesystems wurden vergleichende Untersuchungen zwischen dem neuen und dem herkömmlichen manuellen Messverfahren durchgeführt. Für beide Verfahren wurde sowohl die Intra-, als auch die Interobserverdifferenz, der Variationskoeffizient und der benötigte Zeitaufwand bestimmt. Hierzu wurden 8 gesunde Probanden an zwei unterschiedlichen Tagen vom gleichen Untersucher geschallt⁷⁶ (Tab. 1). Die Vermessung der Untersuchungsdaten erfolgte durch zwei unterschiedliche Personen, an zwei separaten Tagen sowohl auf die herkömmliche Art manuell vom Videoband, als auch digital am Computer mit Hilfe der Software. Die Ermittlung des Variationskoeffizienten beider Verfahren erfolgte durch 32malige Diametermessung an derselben Gefäßdarstellung, welche unter Ruhebedingungen aufgezeichnet worden war.

2.4.3. Dopplersonographische Messung der Blutvolumenflusses in der Arteria brachialis

Die Messung der Fließgeschwindigkeiten erfolgten im PW-Doppler Mode. Das Messvolumen wurde hierzu in die Gefäßmitte der Arteria brachialis gelegt. In die Berechnung der Fließgeschwindigkeit mit Hilfe der Doppler-Gleichung geht der Kosinus des Einstrahlungswinkels im Nenner ein. Mit steigendem Winkel von 0° auf 90° wächst deshalb der Messfehler und macht die Messung bei 90° unmöglich ($\cos 90^\circ=0$). Grundsätzlich erfolgten alle Messungen bei einem Doppler-Winkel von $<60^\circ$, da dies als äußerste Grenze für quantitative Flussmessungen erachtet wird. Durch manuelle Anpassung einer Hilfslinie parallel dem Arterienverlauf wurde der Winkel zwischen Gefäßachse und Dopplerstrahl bestimmt. Aus der Doppler-Registrierung wurde die maximale, minimale und durchschnittliche Fließgeschwindigkeit ermittelt.

Aus Fließgeschwindigkeit und Diameter wurde der Volumenfluss nach der folgenden Formel berechnet⁷⁷:

Volumenfluss [ml/min]

$$= \pi * (\text{Diameter [mm]} / 2)^2 * \text{Fließgeschwindigkeit [cm/sec]} * 0.6$$

Der Blutvolumenfluss wurde sowohl unter Ruhebedingungen, als auch bei der reaktiven Hyperämie bestimmt. Zur Berechnung der arteriellen Blutflussreserve, als maximale Volumenflusssteigerung, wurde der maximale Volumenfluss bei der reaktiven Hyperämie in Relation zum Volumenfluss unter Ruhebedingungen gesetzt und in Prozent angegeben. Dabei wurde der Blutvolumenfluss unter Ruhebedingungen als 100% gesetzt.

2.5. Statistik

Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm SE angegeben. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde auf Normalverteilung geprüft. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Im konsekutiven Post-Hoc Test (Bonferroni) erfolgte der Einzelgruppenvergleich. Lineare Korrelationen wurden zweiseitig nach Pearson berechnet. Zur Varianzaufklärung wurde die schrittweise lineare Regression berechnet. Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSS-Paketes (Statistical package for analysis in social sciences, release 10, SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Es bestanden keine signifikanten Altersunterschiede zwischen dem Normalkollektiv und den Gruppen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Tab. 1). Auch bezüglich der Körpergröße und des Gewichts waren alle untersuchten Gruppen vergleichbar. Die Natrium-, Kalium- und Harnsäurekonzentrationen im Plasma, sowie der Hämatokrit und der arterielle Mitteldruck des Kontrollkollektivs unterschied sich nicht signifikant von den Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren.

Mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigt sich eine Zunahme des LDL/HDL-Quotienten ($p < 0,05$), der Triglyzeride ($p < 0,05$), der Packungsjahre ($p < 0,01$) und der Hypertoniedauer ($p < 0,05$). Das HDL-Cholesterin war zunehmend vermindert ($p < 0,05$). (Details Tab. 1)

Tabelle 1.

Charakterisierung der Normalpersonen und der Patienten mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren (RF). (MW \pm SE) Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) sind durch * gekennzeichnet. In Klammern sind die Gruppen angegeben, gegenüber denen der signifikante Unterschied besteht (z.B. *(0 RF) = $p < 0,01$ gegenüber Normalpersonen).

Parameter	Einheit	0 RF	1 RF	2 RF	3 RF	4 RF	Signifikanz
n		8	8	15	15	5	
Geschlecht	[w/m]	3/5	0/8	4/11	6/9	2/3	
Alter	[Jahre]	52 \pm 4	56 \pm 4	59 \pm 3	62 \pm 2	59 \pm 3	n.s.
Körpergröße	[cm]	168 \pm 3	170 \pm 2	169 \pm 2	172 \pm 1	169 \pm 4	n.s.
Gewicht	[kg]	71 \pm 4	74 \pm 5	73 \pm 2	82 \pm 4	85 \pm 5	n.s.
Natrium	[mmol/l]	140 \pm 1	140 \pm 1	141 \pm 1	141 \pm 1	139 \pm 1	n.s.
Kalium	[mmol/l]	4,4 \pm 0,1	4,5 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	4,4 \pm 0,1	4,7 \pm 0,1	n.s.
Hämatokrit	[%]	43 \pm 1	44 \pm 1	44 \pm 1	43 \pm 1	44 \pm 1	n.s.
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	198 \pm 12	217 \pm 10	220 \pm 10	233 \pm 13	234 \pm 24	n.s.
LDL	[mg/dl]	125 \pm 10	152 \pm 9	158 \pm 7	166 \pm 12	173 \pm 24	n.s.
HDL	[mg/dl]	54 \pm 5	49 \pm 2	43 \pm 3	52 \pm 3	36 \pm 3	*(3 RF) $p < 0,05$
LDL/HDL		2,5 \pm 0,3	3,2 \pm 0,3	3,8 \pm 0,2	3,4 \pm 0,2	5,1 \pm 1,2	$p < 0,05$
Triglyceride	[mg/dl]	112 \pm 19	164 \pm 25	175 \pm 20	158 \pm 21	250 \pm 33	$p < 0,05$
Glucose	[mg/dl]	92 \pm 3	105 \pm 7	125 \pm 17	125 \pm 22	177 \pm 17	n.s.
Hba1c	[%]	5,4 \pm 0,7	5,8 \pm 2,5	6,7 \pm 1,5	7,9 \pm 1,0	9,3 \pm 1,8	n.s.
Harnsäure	[mg/dl]	5,2 \pm 0,4	6,8 \pm 0,7	6,3 \pm 0,4	7,4 \pm 0,8	6,3 \pm 1,3	n.s.
Pack years	[n]	0	*(2,3,4 RF) 16 \pm 7	26 \pm 5	35 \pm 6	42 \pm 9	$p < 0,01$
arterieller Mitteldruck	[mmHg]	91 \pm 6	95 \pm 10	91 \pm 7	97 \pm 8	92 \pm 13	n.s.
Hypertoniedauer	[Jahre]	0	*(3, 4 RF) 2 \pm 3	2 \pm 5	10 \pm 5	*(0,1,2 RF) 9 \pm 7	$p < 0,01$

3.2. Methodische Validierung der automatischen Vermessung des Diameters der Arteria brachialis

Die automatisch detektierten absoluten Ruhediameter stimmten mit denen, von einem erfahrenen Untersucher manuell gemessenen Werten, überein ($r = 0,89$; $p < 0,01$; Abb. 13A). Der Variationskoeffizient des PC-gestützten Analyseverfahrens war geringer: 1,35% vs. 0,78%. Weiterhin konnte durch dieses neue Verfahren die Intraobserver- und Interobserverdifferenz der FMD Messungen signifikant reduziert werden: von 2,5% auf

0,8% bzw. von 2,0% auf 0,8%. Auch die Tag-zu-Tag Differenz der FMD Messungen war bei den automatischen Messungen signifikant kleiner: 2,1% vs. 1,3%. Im Vergleich zum konventionellen, manuellen Auswerteverfahren konnte mit Hilfe des PC-Systems eine 4-fache Reduktion des zeitlichen Aufwandes erreicht werden: 35min vs. 9min (Abb. 13B).

Tabelle 2.

Gegenüberstellung der manuellen und der PC-assistierte Vermessung des Arterienradius unter Ruhebedingungen bzw. der FMD. (n=8; MW±SE)

Parameter	Einheit	Manuelle Vermessungen	Computergestützte Messungen
Ruhediameter	[mm]	3,62±0,2	3,63±0,1
FMD	[mm]	3,98±0,2	3,96±0,1
FMD	[%]	10,6±0,8	10,5±0,4
Intra-Observer Differenz der FMD	[%]	2,0±0,3	0,8±0,2
Inter-Observer Differenz der FMD	[%]	2,5±0,8	0,8±0,1
Tag-zu-Tag Differenz der FMD	[%]	2,1±0,5	1,3±0,3
Variationskoeffizient		1,34	0,78
Vermessungszeit	[min]	35±1,1	9,0±0,4

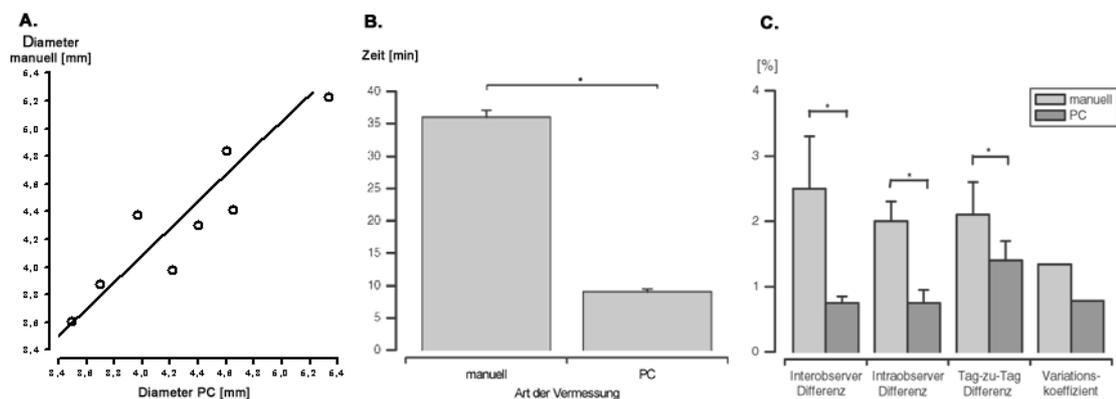


Abbildung 13.

A. Lineare Korrelation zwischen den manuell gemessenen Durchmessern und den mit der PC-gestützten Auswertung bestimmten Durchmessern ($r = 0.89$; $p < 0.01$);

B. Vergleich des zeitlichen Aufwandes für die Vermessung der Gefäßdiameter. Das PC-gestützte Analysesystem ermöglicht eine mehr als 75% ige Reduktion des Zeitaufwandes von 35 auf durchschnittlich 9 Minuten. (n=8; MW±SE)

C. Graphische Darstellung der Untersucher-seitigen und Tag-zu-Tag-Variabilität, sowie des VK der manuellen und PC-gestützten Analyse der Gefäßdiameter. (n=8; MW±SE)

3.3. Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite

Die mittlere Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma betrug im Kontrollkollektiv $682 \pm 109 \text{ nmol/l}$ (Tab. 3). Mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren war die Konzentration vermindert: $453 \pm 76 \text{ nmol/l}$ (1 RF) > $404 \pm 41 \text{ nmol/l}$ (2 RF) > $368 \pm 79 \text{ nmol/l}$ (3 RF) > $140 \pm 50 \text{ nmol/l}$ (4 RF); ($p < 0,01$). Im Post-hoc Test zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen mit 3 und 4 Risikofaktoren.

Die durchschnittliche Nitritkonzentration der Normalpersonen betrug $268 \pm 52 \text{ nmol/l}$. Im Gegensatz zum RSNO zeigten sich keine Unterschiede in der Nitritkonzentration in Abhängigkeit von der Anzahl der Risikofaktoren: $265 \pm 85 \text{ nmol/l}$ (1 RF), $216 \pm 35 \text{ nmol/l}$ (2 RF), $258 \pm 54 \text{ nmol/l}$ (3 RF), $225 \pm 48 \text{ nmol/l}$ (4 RF); ($p = \text{n.s.}$).

Die mittlere Nitratkonzentration im Kontrollkollektiv wurde mit $33 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ bestimmt. Auch diese zeigte keine signifikanten Einschränkung mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren: $32 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ (1 RF), $40 \pm 8 \mu\text{mol/l}$ (2 RF), $38 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ (3 RF), $37 \pm 8 \mu\text{mol/l}$ (4 RF); ($p = \text{n.s.}$).

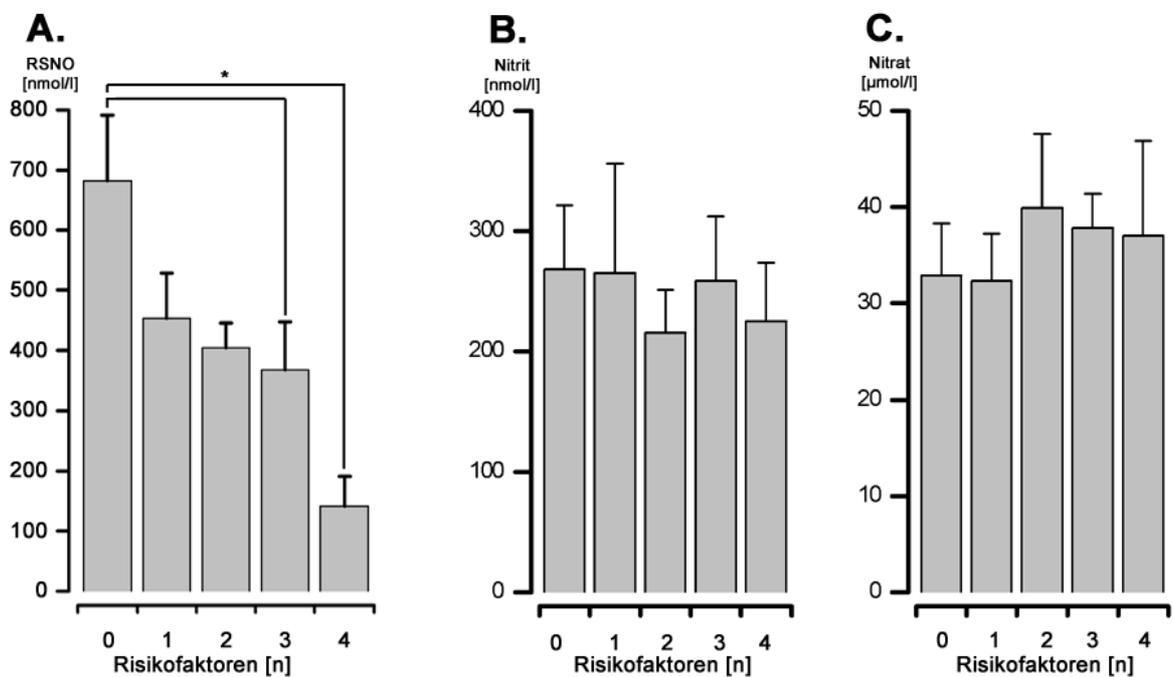


Abbildung 16.

S-Nitrosothiol- (RSNO; A.), Nitrit- (B.) und Nitrat-Konzentrationen (C.) gegen die kumulative Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren aufgetragen (0 Risikofaktoren = Normalkollektiv). Mit steigender Anzahl an Risikofaktoren ist die RSNO-Konzentration reduziert, nicht hingegen die Nitrit- und Nitrat-Konzentration. ($* = p < 0,01$; Fehlerbalken = SE)

Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen RSNO, Nitrit bzw. Nitrat und dem Alter, dem Geschlecht, dem Gesamtcholesterin, dem LDL-Cholesterin, dem HDL-Cholesterin, dem LDL/HDL-Quotient, den Triglyzeriden, der Glukose, der Hypertoniedauer, den Packungsjahre, dem systolischen und diastolischen Blutdruck.

Tabelle 3.

Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse in den einzelnen Gruppen mit unterschiedlicher kumulativer Anzahl an Risikofaktoren (Mittelwert \pm SE). Signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) sind durch * gekennzeichnet. In Klammern sind die Gruppen angegeben, gegenüber denen der signifikante Unterschied besteht (z.B. *(0 RF) = $p < 0,01$ gegenüber Normalpersonen).

Parameter	Einheit	0 RF	1 RF	2 RF	3 RF	4 RF	Signifikanz
RSNO	[nmol/l]	682 \pm 109 *(3, 4 RF)	453 \pm 76	404 \pm 41	368 \pm 79	141 \pm 50	$p < 0,01$
Nitrit	[nmol/l]	268 \pm 52	265 \pm 85	216 \pm 35	258 \pm 54	225 \pm 48	n.s.
Nitrat	[μ mol/l]	33 \pm 5	32 \pm 5	40 \pm 8	38 \pm 3	37 \pm 8	n.s.
Ruhediameter	[mm]	4,2 \pm 0,2	4,8 \pm 0,2	4,5 \pm 0,2	4,8 \pm 0,3	4,9 \pm 0,4	n.s.
FMD	[%]	11,4 \pm 0,9 *(1,2,3,4 RF)	5,5 \pm 1,3	3,0 \pm 0,6	2,8 \pm 0,6	2,2 \pm 0,5	$p < 0,01$
GTN	[%]	19,0 \pm 2,0 *(2,3,4 RF)	14,5 \pm 3,1 *(3,4 RF)	9,9 \pm 1,2	6,6 \pm 1,0	5,2 \pm 1,4	$p < 0,01$
FMD/GTN		64 \pm 7	41 \pm 10	34 \pm 7	47 \pm 8	42 \pm 6	n.s.
Ruhevolumenfluß	[ml/min]	140 \pm 27	157 \pm 26	154 \pm 14	194 \pm 26	148 \pm 33	n.s.
Volumenfluß max	[ml/min]	476 \pm 73	646 \pm 105	681 \pm 65	660 \pm 80	502 \pm 93	n.s.
arterielle Flußreserve	[%]	364 \pm 39	427 \pm 49	543 \pm 115	367 \pm 43	367 \pm 60	n.s.

3.4. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Der Durchmesser der Arteria brachialis im Kontrollkollektiv wurde mit durchschnittlich 4,2 \pm 0,2mm bestimmt. In den Gruppen mit kardiovaskulären Risikofaktoren betrug der Diameter 4,8 \pm 0,2mm (1 RF), 4,5 \pm 0,2mm (2 RF), 4,8 \pm 0,3mm (3 RF) bzw. 4,9 \pm 0,4mm (4 RF); ($p = n.s.$ vs. Kontrollgruppe).

Es zeigte sich eine zunehmende Reduktion der FMD in Abhängigkeit von der Anzahl der Risikofaktoren: 11,4 \pm 0,9% (Kontrollkollektiv) > 5,5 \pm 1,3% (1 RF) > 3,0 \pm 0,6% (2 RF) > 2,8 \pm 0,6% (3 RF) > 2,2 \pm 0,5% (4 RF); ($p < 0,01$). Der Post-hoc Test ergab, dass die FMD im Kontrollkollektiv signifikant größer war als in allen anderen Gruppen.

Auch die Endothel-unabhängige Dilatation war mit steigender Anzahl kardiovaskulärer RF zunehmend eingeschränkt. Im Kontrollkollektiv betrug sie 19,0 \pm 2,0%, in den Gruppen mit RF: 14,5 \pm 3,1% (1 RF) > 9,9 \pm 1,2% (2 RF) > 6,6 \pm 1,0% (3 RF) > 5,2 \pm 1,4% (4 RF); ($p < 0,01$). Im Post-hoc Test unterschied sich die Kontrollgruppe signifikant von den Gruppen mit 2, 3 und 4 RF. Zusätzlich bestanden signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit einem RF und den Gruppen mit 3 und 4 RF ($p < 0,01$).

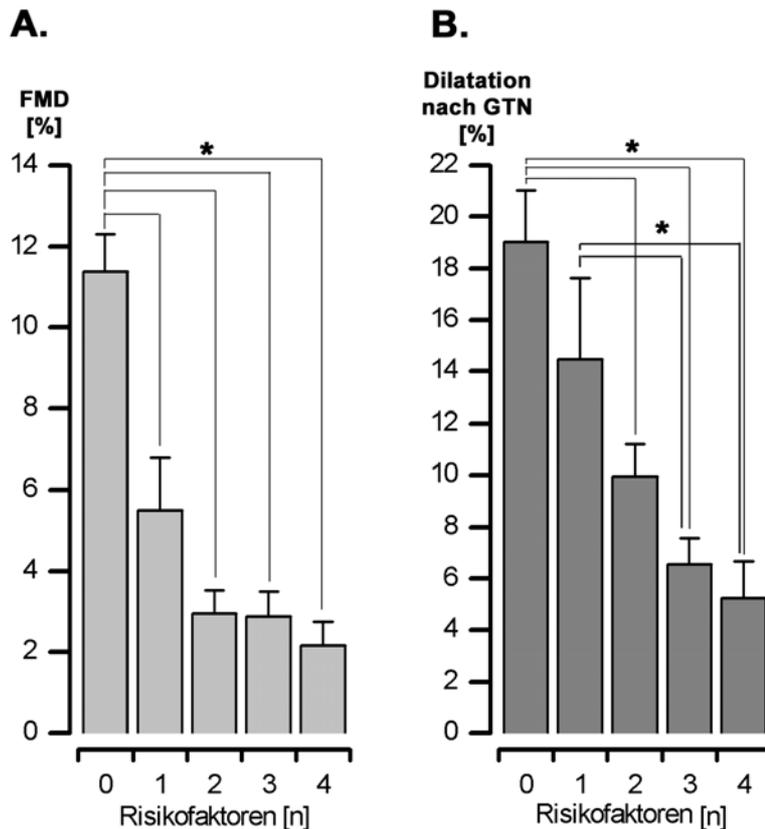


Abbildung 17.

Mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigt sich eine Reduktion sowohl für die Endothel-abhängige (A.; FMD), als auch die Endothel-unabhängige Dilatation (B.; nach GTN) der Arteria brachialis. (*= $p < 0,01$; Fehlerbalken=SE)

Zur Bestimmung des quantitativen Ausmaßes der jeweiligen Komponente wurde, im eigenen Kollektiv, die Ratio aus Endothel-abhängiger- und Endothel-unabhängiger Dilatation (FMD/GTN), in Prozent ausgedrückt, gebildet. In der Kontrollgruppe betrug diese $64 \pm 7\%$. Im Gegensatz hierzu betrug das Verhältnis von FMD zur GTN induzierten Vasodilatation bei RF $41 \pm 10\%$ (1 RF), $34 \pm 7\%$ (2 RF), $47 \pm 8\%$ (3 RF) bzw. $42 \pm 6\%$ (4 RF); ($p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe). Somit war bei den Personen mit kardiovaskulären RF die FMD nicht nur absolut, sondern ebenfalls in Relation zur Endothel-unabhängigen Dilatation eingeschränkt.

Der Blutvolumenfluss betrug unter Ruhebedingungen 140 ± 27 ml/min im Kontrollkollektiv und 157 ± 26 ml/min (1 RF), 154 ± 14 ml/min (2 RF), 194 ± 26 ml/min (3 RF) bzw. 148 ± 33 ml/min (4 RF) in den Patientengruppen mit RF ($p = n.s.$). Der maximale Blutvolumenfluss im Normkollektiv während der reaktiven Hyperämie war 476 ± 73 ml/min, dies entspricht einer Flusssteigerung (arteriellen Durchblutungsreserve) um $364 \pm 39\%$. In den Gruppen mit kardiovaskulären RF betrug die Flussreserve $427 \pm 49\%$ (1 RF), $543 \pm 115\%$ (2 RF), $367 \pm 43\%$ (3 RF) bzw. $367 \pm 60\%$ (4 RF) ($p = n.s.$). Weder der Blutvolumenfluss unter Ruhebedingungen, noch der maximale Volumenfluss bzw. arterielle Durchblutungsreserve korrelierten mit der FMD bzw. der Endothel-unabhängigen Dilatation.

Es zeigten sich inverse univariante Korrelationen zwischen der FMD und dem Alter (n=51; r=-0,34; p<0,05), dem Ruhediameter (n=51; r=-0,31; p<0,05), den Triglyzeriden (n=50; r=-0,28; p<0,05), dem Gesamtcholesterin (n=51; r=-0,33; p<0,05), dem LDL-Cholesterin (n=51; r=-0,4; p<0,01), dem HDL/LDL-Quotienten (n=51; r=-0,29; p<0,05) und den Packungsjahren (n=51; r=-0,31; p<0,05). Weiterhin bestanden inverse Korrelationen zwischen der Endothel-unabhängige Dilatation und dem Ruhediameter (n=51; r=-0,43; p<0,01), den Triglyzeriden (n=50; r=-0,44; p<0,01), der Glukose (n=37; r=-0,35; p<0,05), der Hypertoniedauer (n=48; r=-0,35; p<0,05) und den Packungsjahren (n=51; r=-0,43; p<0,01).

3.5. Korrelation zwischen Endothel-abhängiger Dilatation und Metaboliten des NO-Stoffwechsels

Da sowohl die Konzentration der S-Nitrosothiole (RSNO), als auch die Endothel-abhängige Dilatation mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren eingeschränkt waren, wurden beide auf Korrelation überprüft (Abb. 19). Dabei korrelierte die Konzentration von RSNO sowohl mit der FMD (n=51; r=0,42; p<0,01) als auch der Endothel-unabhängigen Dilatation (n=51; r=0,36; p<0,01). Im Gegensatz hierzu bestand keine Korrelation zu Nitrit oder Nitrat (p=n.s.).

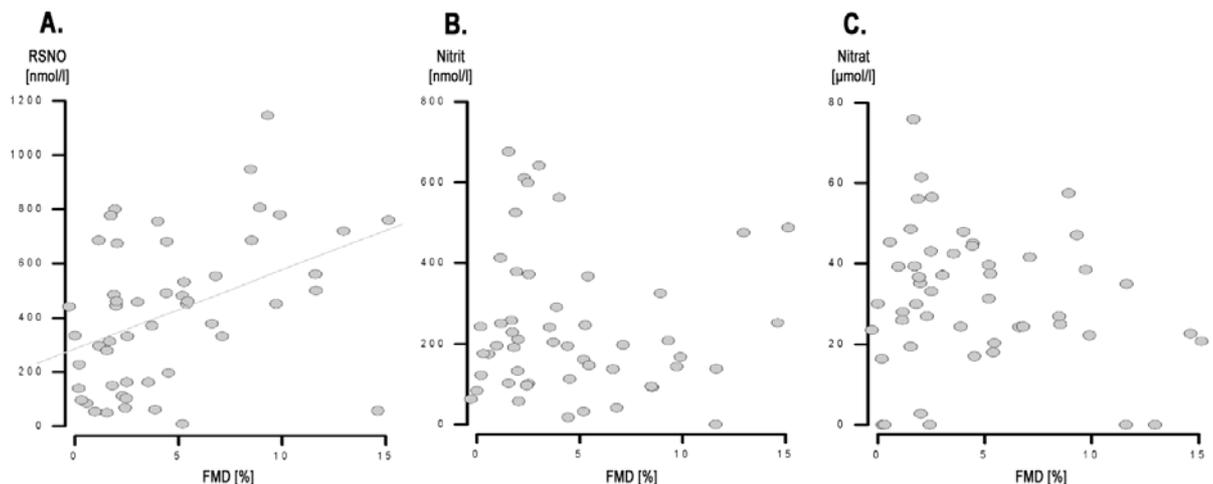


Abbildung 19.

A. Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation (FMD) der A. brachialis und der Konzentration der S-Nitrosothiole (RSNO). (r=0,42; p<0,01)
 B. u. C. Es besteht keine Korrelation zwischen der FMD und der Nitrit- und Nitrat-Konzentration (p=n.s.).

Zur Bestimmung der Größe des Einflusses sowohl der zirkulierenden NO-Speicher, als auch von Parametern des Schweregrades des kardiovaskulären Risikoprofils

(bestehende KHK, mittlerer arterieller Blutdruck, Dauer der Hypertonie, HDL/LDL-Quotient, Dauer der Hypercholesterinämie, Packungsjahre, Glukose und Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren) auf die Endothel-abhängige Dilatation der Arteria brachialis wurde eine schrittweise, lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Konzentration der S-Nitrosothiole, die kumulative Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren und bestehende KHK erreichten hierbei ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,54, d.h. sie konnten 54% der Gesamtvarianz der FMD in dieser Studie erklären. Die weitere Aufnahme der übrigen Parameter des Schweregrades des kardiovaskulären Risikoprofils erbrachten keine signifikante Änderung in R^2 und wurden deshalb aus dem Modell ausgeschlossen.

Tabelle 4.

Schrittweise, lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der Nitrosothiole und Parametern für den Schweregrad eines kardiovaskulären Risikoprofils auf die Fluss-abhängige Dilatation der A. brachialis.

	R	R^2	Veränderung von R^2	Veränderung in F	P
RSNO (1)	0,42	0,18	0,18	10,74	0,02
(1)+Anzahl der Risikofaktoren (2)	0,69	0,48	0,3	27,24	0,001
(1)+(2)+KHK (3)	0,74	0,54	0,07	6,8	0,12

3.6. Zirkulierende NO-Speicherformen als biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion

Zur Quantifizierung der diagnostischen Wertigkeit der S-Nitrosothiol-Konzentration als direkten biochemischen Marker der endothelialen Dysfunktion wurde die Sensitivität und Spezifität im Vier-Felder-Test ermittelt. Die Sensitivität ist definiert als relativer Anteil aller als "krank" erkannten Personen, bezogen auf alle "Kranken". Die Spezifität ist definiert als der relative Anteil aller als "gesund" erkannten, bezogen auf alle "Gesunden". Die Diagnose einer endothelialen Dysfunktion wurde gestellt, wenn die Endothel-abhängige Dilatation kleiner als 8% war. Für die RSNO-Konzentration wurde ein Trennwert von 600nmol/l festgelegt. Daraus ergab sich im untersuchten Kollektiv eine diagnostische Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%.

Tabelle 6.

Vier-Felder-Test zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität von RSNO in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion

		FMD	
		< 8,0%	> 8,0%
RSNO	<600nmol/l	34	4
	>600nmol/l	6	7
Gesamt		40	11
		Sensitivität: 85%	Spezifität: 64%

4. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- (1.) Die Konzentration der S-Nitrosothiole ist im Plasma von Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren in Abhängigkeit von der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren vermindert.
- (2.) Die Konzentration S-Nitrosothiole im Plasma korreliert mit der Höhe der Fluß-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.
- (3.) Bei einem Grenzwert von 600nmol/l ergab sich im Vier-Felder-Test für die Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma als diagnostischer Marker einer endothelialen Dysfunktion eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines biochemischen Markers für die Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion. Hierzu wurde der Grad einer endothelialen Dysfunktion mit Hilfe eines etablierten Verfahrens (FMD) bestimmt und mit der Konzentration der oxidativen Abbauprodukte des NO, Nitrit und Nitrat, sowie der S-Nitrosothiole im Plasma korreliert. Als wesentliche Grundvoraussetzung hierfür wurde die Messung der Fluß-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis (FMD) verbessert. Durch die Einführung eines automatischen, PC-assistierten Auswertungssystem zur Bestimmung des Diameters der Arteria brachialis konnte die Variabilität des Verfahrens halbiert und der zur Auswertung benötigte Zeitaufwand auf ein Viertel reduziert werden.

- (1.) Mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich eine Reduktion sowohl der FMD, als auch der Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma nicht jedoch der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma.
- (2.) Die Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma korrelierte mit der Höhe der FMD. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der FMD und den Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma.
- (3.) Bei einem Grenzwert von 600nmol/l ergab sich im Vier-Felder-Test für die Konzentration der S-Nitrosothiole im Plasma als diagnostischer Marker einer endothelialen Dysfunktion eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%.

Daraus kann geschlossen werden, dass S-Nitrosothiole im Plasma als potentielle biochemischen Marker bei der Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion hilfreich sein können. Vor dem Einsatz in der klinischen Routine sind jedoch Untersuchungen an größeren Fallzahlen zur Etablierung von Referenzwerten und der Identifizierung möglicher Einflussfaktoren notwendig.

Im Folgenden soll zunächst auf die Bestimmung der Endothelfunktion mittels Ultraschall (4.1.1.) und die biochemischen Quantifizierungsmethoden (4.1.2.) eingegangen werden.

Danach soll der Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die endogene NO-Synthese (4.2.) und die Endothelfunktion peripherer Leitungsarterien (4.3.) diskutiert werden. Anschließend wird auf die Beziehung zwischen der Endothelfunktion und endogenen NO-Speichern (4.4.) eingegangen. Im letzten Abschnitt soll die klinische Bedeutung und der Ausblick (4.5.) erörtert werden.

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mit Hilfe der FMD-Messung

Bei den meisten Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung einer endothelialen Dysfunktion wird die dilatatorische Antwort von Widerstands- und Leitungsarterien auf physikalische Stimuli oder vasoaktive Substanzen untersucht, welche an Endothelzellen zu einer gesteigerten NO-Ausschüttung führen^{72;78}. Die resultierende Vasodilatation kann an Leitungsgefäßen direkt angiographisch oder sonographisch dargestellt werden, an den Widerstandsgefäßen zum Beispiel indirekt venenverschlußplethysmographisch über einen gesteigerten Blutfluss. Die pharmakologische Stimulation der NO-Synthese, zum Beispiel durch Azetylcholin oder Bradykinin, wird über endotheliale Membranrezeptoren und eine intrazelluläre, G-Protein-vermittelte Signalkaskade vermittelt, welche eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirkt. In Abhängigkeit von Calmodulin führt dies zu einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase^{79;80}. Physikalische Stimuli, wie Änderungen der Schubspannung, führen über Konformationsänderungen des endothelialen Zytoskeletts zu einer Phosphorylierung der eNOS, welche eine Steigerung der Ca^{2+} -Sensitivität verursacht⁸¹. So erreicht die eNOS schon bei subphysiologischen intrazellulären Kalziumkonzentrationen eine maximale Aktivität⁸².

Untersuchungsprotokolle, die eine pharmakologische Stimulation der endothelialen NO-Bildung voraussetzen, sind nur begrenzt routinemäßig einsetzbar, da die entsprechenden vasoaktiven Substanzen intraarteriell appliziert werden. Im Gegensatz dazu wurde die Endothel-abhängige Dilatation in der vorliegenden Arbeit nicht-invasiv durch einen physikalischen Stimulus induziert. Durch Insufflation einer Blutdruckmanschette am Unterarm wurde das Versorgungsgebiet der Arteria brachialis über einen Zeitraum von 5 Minuten vom Blutfluss und damit der Sauerstoffversorgung abgeschnitten. Nach Deflation der Manschette führt dies, über eine ischämische Dilatation der Widerstandsgefäße, zu einem gesteigerten Blutfluss im zuführenden Leitungsgefäß. Mit der resultierenden Steigerung der auf die Endothelzellen einwirkenden Schubspannung, kommt es zu einer vermehrten NO-Synthese und

Dilatation der Arteria brachialis, welche nicht-invasiv sonographisch quantifiziert wird. Eine Änderung der Schubspannung scheint zumindest einen äquipotenten Reiz zur NO-Ausschüttung darzustellen wie pharmakologische Agonisten, deren Wirkmechanismus eine Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration beinhaltet⁸². Der Nachweis, dass die Messung der FMD peripherer Leitungsgefäße als funktioneller Surrogatparameter für die NO-Synthese und Freisetzung dienen kann, wurde durch Untersuchungen erbracht, in denen durch die intraarterielle Gabe von L-NMMA, einem kompetitiven Inhibitor der NO-Synthase, die FMD vollkommen unterdrückt werden konnte⁸³.

Die Bestimmung der FMD stellt seit Jahren ein etabliertes Verfahren zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion dar. Celermajer konnte bei Kindern und Erwachsenen mit kardiovaskulären Risikofaktoren 1992 erstmals eine Reduktion der Fluss-vermittelten Dilatation an der Arteria femoralis und brachialis nachweisen⁵⁷. Bei Kindern mit familiärer Hypercholesterinämie zeigte sich eine signifikant geringere FMD als bei normalen Kindern. Bei erwachsenen Rauchern und Personen mit bekannter koronarer Herzkrankheit war die Fluss-vermittelte Dilatation ebenfalls signifikant vermindert. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass nahezu alle bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren⁴⁷ und deren Anzahl⁵³ mit einer Reduktion der FMD einhergehen: Hypercholesterinämie⁵³, Hypertonie, Diabetes mellitus^{84;85}, Zigarettenrauchen⁵⁷, höheres Lebensalter⁸⁶, männliches Geschlecht^{87;88}, positive Familienanamnese^{53;89} und bekannte koronare Herzkrankheit^{57;77;90}. Bei Männern setzt die altersabhängige Abnahme der FMD früher ein als bei Frauen⁸⁸. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen sind inverse Korrelationen der FMD mit dem Ausprägungsgrad von Parametern durch die die einzelnen Risikofaktoren definiert sind, wie der Cholesterinkonzentration⁵³, dem Glukosespiegel⁸⁵, dem systolischen Blutdruck⁵³, den Packungsjahren⁶⁵, dem Lebensalter⁵³ sowie der Schwere und dem Ausmaß einer koronaren Herzkrankheit^{90;91} bekannt. Als wesentlicher Mechanismus, über den kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer endothelialen Dysfunktion führen können, wird eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Gefäßwand diskutiert⁹². Eine besondere Bedeutung scheint hierbei den Superoxidanionen zuzukommen, welche NO unter Peroxynitritbildung deaktivieren können. Peroxynitrit wiederum kann die NO-Synthase inhibieren und zu einer Einschränkung der NO-Bildung führen⁵¹. Weiterhin scheint der Bildung von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem endogenen Inhibitor der NO-Synthase, eine Bedeutung in der endothelialen Dysfunktion zuzukommen^{93;94}. Als weiterer Faktor wird ein Mangel an L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, diskutiert⁹⁵. Mit Hilfe der FMD ist es möglich eine

Einschränkung der Endothelfunktion nachzuweisen. Eine Differenzierung zwischen potentiellen Pathomechanismen ist aber nicht möglich.

Neben kardiovaskulären Risikofaktoren einschließlich des Alters sind weitere biologische Einflussfaktoren der Vasomotion bekannt, die die Höhe der FMD beeinflussen können. So besteht eine negative Korrelation zwischen dem Ruhediameter der Arteria brachialis und der FMD^{57;96}. Weiterhin ist eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum am späten Nachmittag⁹⁷ und eine Abhängigkeit von der Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron im Menstruationszyklus⁸⁷ bekannt. Außerdem kann die Nahrungsaufnahme die FMD beeinflussen. So kommt es bei akuter Hyperglykämie⁸⁵ und nach fettreicher Nahrung⁹⁸ zu einer signifikanten Reduktion. Akuter psychischer Stress⁹⁹ und akutes Zigarettenrauchen¹⁰⁰ führen ebenfalls zu einer akuten Verminderung der FMD. Um den Einfluss dieser Faktoren auf die FMD möglichst konstant zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zur gleichen Tageszeit zwischen 7:00 und 9:00Uhr an nüchternen Probanden durchgeführt. Außerdem erfolgten alle Untersuchungen in einem, vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 10minütigen Ruhephase. Die Herzfrequenz und der Blutdruck, als Parameter einer sympathoadrenergen Stimulation, unterschieden sich nicht signifikant vor und nach der Untersuchung. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Altersunterschiede. Als Einschränkungen der Untersuchung sind die inhomogene Geschlechterverteilung und die fehlende Zyklusanamnese zu nennen. Bei einem mittleren Alter der weiblichen Probanden von 60 Jahren kann jedoch zumeist ein postmenopausaler Hormonstatus angenommen werden.

Neben den biologischen Einflussfaktoren der FMD kommen folgende Faktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht: (1.) die Größe des ischämischen Gebietes, (2.) die Ischämiezeit, (3.) die der Diametermessung zugrunde gelegten Eckpunkte, (4.) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie und (5.) innerhalb des Herzzyklus. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Blutdruckmanschette zur Erzeugung der Ischämie distal der Ellenbeuge angelegt, die Ischämiezeit betrug 5min und die FMD wurde 75s nach Lösung der Stauung gemessen. (1.) In vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Position der Blutdruckmanschette und somit der Größe des ischämischen Bereichs, zeigte sich in manchen Untersuchungen eine größere FMD, wenn die Blutdruckmanschette proximal der Ellenbeuge am Oberarm angelegt wurde^{101;102}. In einer anderen Untersuchung war die FMD bei Unterarmokklusion größer⁷⁷. Momentan herrscht kein Konsens darüber, welche Methode besser und zu

bevorzugen ist^{102;103}. Um die potentiellen Einflüsse einer direkten Kompression und Ischämie auf den untersuchten Bereich der Arteria brachialis zu vermeiden, wurde die Manschette in den eigenen Untersuchungen distal angelegt. (2.) Die Höhe der FMD hängt weiterhin von der Dauer der Ischämie ab. Erst eine 4,5minütige Ischämie führt zu einer maximalen Dilatation, welche auch durch längere Ischämiezeiten nicht signifikant gesteigert werden kann^{71;103}. Aus diesem Grunde wurde die besser tolerierbare Dauer von 5 Minuten gewählt. (3.) Entsprechend den meisten anderen Arbeitsgruppen^{70;74;103;104}, wurden die Diametermessungen von der schallkopfnahen zur schallkopffernen m-Linie, welche dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang entspricht¹⁰⁵, durchgeführt. (4.) Auf der Basis eigener Voruntersuchungen wurde eine maximale Dilatation der Arteria brachialis 75s nach Beendigung der Ischämie bestimmt. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Zeitpunkt an dem die maximale Dilatation erreicht wird, sowohl bei Kindern¹⁰⁶, als auch bei Erwachsenen¹⁰⁴ individuell erheblich voneinander abweichen kann. Da die Messungen nur zu einem einzigen Zeitpunkt durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, dass in einigen Fällen die gemessene FMD den wahren maximalen Wert unterschätzt. (5.) Da der Diameter der Arteria brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatilen Veränderungen unterworfen ist, wurden alle Messungen EKG getriggert enddiastolisch durchgeführt. Zusammenfassend entsprach das verwendete Untersuchungsprotokoll den in den aktuellen Leitlinien¹⁰³ empfohlenen Standards.

Drei Variablen repräsentieren die Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität von Ultraschalluntersuchungen: (1.) die technische Ausrüstung, (2.) der Untersucher und (3.) die Auswertung. Sowohl die Ausrüstung, als auch die Erfahrung des Untersuchers¹⁰⁷ am Ultraschallgerät sind wichtige Determinanten der Genauigkeit von sonographischen Vermessungen von Gefäßen. (1.) Als technische Voraussetzung für nicht-invasive Untersuchungen der Endothelfunktion galten zum Zeitpunkt der Untersuchungen lineare Schallköpfe mit Ultraschallfrequenzen von 7,5MHz mit einer axialen Auflösung von 0,1mm als gegenwärtiger Standard⁷⁴. (2.) Nur ein gut geschulter Untersucher¹⁰⁷ ist in der Lage Diameteränderungen von 0,1mm zu erkennen und damit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Da die technische Auflösung sehr nahe an dem zu bestimmenden biologischen Bereich ist, hängt die Qualität von duplexsonographischen Untersuchungen der Gefäßfunktion um so stärker von der Erfahrung des Untersuchers ab. Die Diameteränderungen der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation einer Arterie, mit einem Ruhediameter von 3,8mm, liegen im Bereich von 0,1 - 0,6mm (2,7%-16,7%). Sorensen et al.⁷⁰ haben die Genauigkeit von Ultraschallmessungen an Hand von "Phantomarterien" mit bekanntem Diameter

bestimmt. Diese "Phantomarterien" bestanden aus in Agar gegossenen Metallzylindern. Dabei konnte gezeigt werden, dass Durchmesseränderungen von 0,1-0,2mm korrekt bestimmt werden können. "Wahre" Unterschiede von 0,2mm konnten zu 67% und Unterschiede von 0,1mm zu 52% korrekt bestimmt werden. Keine der Abweichung vom bekannten Phantomdiameter war größer als 0,1mm. (3.) Neben der Genauigkeit des Ultraschallgerätes und der Untersuchung selbst, hängt die Variabilität der Bestimmung von peripheren Gefäßdiametern weiterhin von der Art der Bilddatenanalyse ab. Diese setzt sich zusammen aus den Unterschieden, die vom Auswerter ausgehen (Intra-Observer-Differenz), die bei Auswertung durch zwei unterschiedliche Personen (Inter-Observer-Differenz) und bei Untersuchungen an unterschiedlichen Tagen (Tag-zu-Tag-Differenz) entstehen. Die Tag-zu-Tag-Differenz hängt wiederum von der biologischen Variation der Gefäßfunktion und der Observer-seitigen Variabilität ab. In den meisten publizierten Studien^{53;65;77} ist der Variationskoeffizient für die Messung der FMD zwischen 1 und 3% für die Intra- und Interobservervariabilität angegeben. Neuere methodische Untersuchungen von Enderle et al.¹⁰⁸ zeigen Intra-Observer Variabilitäten von 1,9 bis 2,6%. Die erfahrenen Untersucher dieser Studie berichten, dass die Diameter, die von zwei unterschiedlichen Personen gemessen wurden, in 95% der Fälle nicht größer als 0,2mm waren.

Bislang wurden die meisten Untersuchungen der FMD an großen Kollektiven durchgeführt um signifikante Gruppenunterschiede feststellen zu können. Voraussetzung für den Einsatz der FMD als Untersuchungsverfahren zum Individualscreening in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion ist eine hohe diagnostische Trennschärfe. Bei Gesunden findet sich in der Literatur eine Endothel-abhängige Vasodilatation im Bereich von 8-10%, bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren oder mit manifester Arteriosklerose Werte von <8%^{53;65;109;110}. In der vorliegenden Untersuchung war die FMD in der Kontrollgruppe 11,4% (8,5% - 15,1%). Um die methodische und untersucherseitige Variabilität zu reduzieren und damit die diagnostische Trennschärfe zu verbessern wurde ein neues PC-assistiertes Analysesystem zur Diametervermessung entwickelt⁷⁶. In eigenen methodischen Voruntersuchungen wurde dieses dann mit der herkömmlichen, manuellen Meßmethode verglichen. Mit Hilfe des automatisierten Analysesystems war es möglich den Variationskoeffizienten für die Messung des Durchmessers der Arteria brachialis von 1,34%, bei manueller Messung, auf 0,78% zu reduzieren. Sowohl die Intra- als auch die Inter-Observer Differenzen konnten mit diesem Verfahren auf durchschnittlich 0,8% halbiert werden. Weiterhin konnte der benötigte Zeitaufwand wesentlich verringert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung legen nahe, dass nun eine Verbesserung

der FMD von 2,6% (die doppelte Tag-zu-Tag-Differenz) auch bei einzelnen Personen mit statistischer Sicherheit nachgewiesen werden kann. Mit dem Nachweis dieser niedrigeren Intra- und Interobservervariabilität wurde eine wesentliche Voraussetzung für die Anwendung der Methode auch an kleineren Gruppen bzw. zum Individualscreening geschaffen.

4.1.2. Quantifizierung der zirkulierenden NO Metabolite

Die meisten klinischen Studien legen nahe, dass Störungen des endothelialen Stoffwechsels einen wesentlichen Aspekt der endothelialen Dysfunktion darstellen³⁷. Die diagnostische Wertigkeit der Bestimmung der zirkulierenden Plasmaspiegel von endothelialen Signalstoffen bzw. Stoffwechselprodukten, wie dem asymmetrischen Dimethylarginin, dem Endothelin-1, dem von Willebrand-Faktor, dem tissue-type Plasminogen Aktivator sowie von Adhäsionsmolekülen als Surrogatparameter einer Störung der Endothelfunktion ist derzeit nicht gesichert^{37;72}. Mit dem Hintergrund, dass eine Beeinträchtigung wesentlicher homöostatischer Endothelfunktionen mit einer Einschränkung der endothelialen NO-Synthese bzw. der Bioverfügbarkeit von NO einhergeht und die Entwicklung einer Arteriosklerose begünstigen kann, wurden Metabolite des NO-Stoffwechselweges quantifiziert. So wurden sowohl die direkten oxidativen Abbauprodukte des NO, (1.) das Nitrit und (2.) das Nitrat, als auch (3.) die S-Nitrosothiole als potentielle Speicherformen von bioaktivem NO bestimmt.

(1.) Im menschlichen Plasma wird NO primär nahezu vollständig zu Nitrit umgesetzt. In Gegenwart von Erythrozyten reagiert Nitrit mit einer Halbwertszeit von 110s weiter zu Nitrat^{16;111}. Durch eine spezielle Probenaufarbeitung wurde versucht, diesen Abbau zu verlangsamen. So wurden die venösen Blutproben direkt in eine 4°C kalte Citratlösung abgenommen und dadurch 1:5 verdünnt. Außerdem wurden die Proben unmittelbar nach der Entnahme durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen, insbesondere Erythrozyten, befreit. Die Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma erfolgte mit Hilfe der Fluss Injektions Analyse (FIA) in Kombination mit der Griess Reaktion⁶⁷. Die Sensitivität dieser Methode beträgt 8nmol/l in Plasmaproben und ist geeignet für die Messung von Nitritkonzentrationen in einem Bereich von 0,008-5µmol/l. Die Tag-zu-Tag-Variabilität bei identischen Proben hat einen Variationskoeffizienten von 0,8%. Diese Methode ist damit genauso sensitiv wie die Oxyhämoglobin Methode und 7mal sensitiver als HPLC-Verfahren⁶⁷. Verglichen mit der traditionellen Griess Methode ist dieses Verfahren um den Faktor 500 sensitiver. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten plasmatischen Nitritkonzentrationen sind mit durchschnittlich 269nmol/l in Einklang mit dem in der Literatur angegebenen Bereich (100-600nmol/l)^{14;16;112;113}.

(2.) Nitrat stellt das stabile Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechsels dar. Die Nitrat Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Colorimetrischen Assay Kits. Dieses basiert auf der traditionellen Griess Reaktion. Diese Methode wurde trotz seiner geringen Sensitivität von $1\mu\text{mol/l}$ verwendet, weil aufgrund von Voruntersuchungen und der Literatur Werte im mikromolaren Bereich ($19\text{--}60\mu\text{mol/l}$)^{14;16;113} erwartet wurden. Diese hätten damit oberhalb des reproduzierbaren Bereichs von sensitiveren Verfahren wie der FIA gelegen. Die bestimmten Nitratkonzentrationen sind in Einklang mit den erwähnten Werten aus der Literatur.

(3.) NO kann mit freien Thiolgruppen von Plasmaproteinen zu langlebigen Intermediaten reagieren, deren biologische Aktivität der von NO entspricht. S-Nitrosoalbumin stellt den größten Anteil der im Plasma enthaltenen S-Nitrosothiole. Die nitrosativen Metabolite des NO wurden in der vorliegenden Arbeit in Analogie zur Nitritbestimmung mit Hilfe der FIA bestimmt. Hierbei wurde gebundenes NO zunächst mit Quecksilberionen aus seine Schwefelbindung gelöst und dann mit der FIA quantifiziert. Anschließend erfolgte die Korrektur um die basale Nitritkonzentration. Derzeit existieren keine allgemein akzeptierten Referenzkonzentrationen von S-Nitrosothiolen bei jungen, gesunden Erwachsenen. Zur S-Nitrosothiolbestimmung in biologischen Proben wird derzeit eine weites Spektrum an Techniken verwendet, von denen keine frei von Artefakten ist¹¹⁴. Die Angaben zur RSNO-Konzentration in der Literatur weichen erheblich voneinander ab^{21;24;69;115-117}. Das Spektrum reicht von $7,2\mu\text{mol/l}$ ²¹, über 200nmol/l ¹¹⁵, bis zu 28nmol/l ⁶⁹. Bislang ist ungeklärt, mit welcher Methode die "wahren" Konzentrationen bestimmt werden können, obschon sich eine deutliche Tendenz zum unteren nanomolaren Bereich abzuzeichnen scheint¹¹⁴. Wenngleich für die vorliegende Arbeit die relativen Veränderungen und nicht die Absolutwerte von entscheidender Bedeutung sind, soll im folgenden auf das Prinzip einzelner gängiger Bestimmungsverfahren eingegangen werden.

Gemeinsames Prinzip aller Verfahren zur RSNO Bestimmung ist die initiale Abspaltung von dem an Schwefel gebundenen NO. Zur Spaltung der S-NO Bindung stehen unter anderem UV-Licht, Quecksilberionen und Jod/Jodid zur Verfügung, wobei die Spaltung mehr oder weniger spezifisch zu sein scheint. Bei Stamler et al.²¹ wird eine Plasmakonzentration von $7,2\mu\text{mol/l}$ bei Normalprobanden angegeben. Hier erfolgte die Abspaltung des NO durch Photolyse mit einer 200W Quecksilberdampf Lampe. In einem zweiten Schritt wurde dann das freigewordene NO mit einem auf Chemilumineszenz beruhenden Verfahren quantifiziert. Ein Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass

UV-Licht nicht spezifisch nur die S-Nitrosothiole spaltet, sondern auch NO aus Nitrit¹¹⁸, Nitrosaminen und Nitosyl-Eisen-Komplexen freisetzen kann^{69;119}. Daraus könnten sich die im Vergleich mit den eigenen Befunden extrem hohen RSNO-Werte erklären. Bei Ewing et al.¹¹⁶ und Goldman et al.¹¹⁵ finden sich mit 320nmol/l bzw. 220nmol/l Konzentrationen in einer zumindest vergleichbaren Größenordnung wie in der vorliegenden Untersuchung (Kontrolle: 682nmol/l). Auch bei ihnen erfolgte die S-NO Spaltung mit Hg²⁺. In Analogie zur vorliegenden Arbeit wurde bei Goldman et al. nicht das freigesetzte NO selbst bestimmt, sondern das unmittelbar entstehende oxidative Abbauprodukt, das Nitrit. Die Quantifizierung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Griess-Reaktion spektrophotometrisch, aber mit einer HPLC-Anlage. Bei Ewing et al. wurde das Nitrit durch Zugabe von Vanadium(III) wieder zu NO umgesetzt und anschließend mit einem auf der Chemilumineszenz beruhenden Verfahren bestimmt. Bei diesen Verfahren, zu denen auch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren zu rechnen ist, müssen die gemessenen Werten um die basale Nitrit-Konzentration korrigiert werden. Dies ist insofern kritisch zu bewerten, als dass die im Plasma vorhandene Hintergrundkonzentration an Nitrit eine starke intra- und interindividueller Variabilität aufweist und bezogen auf die aus dem RSNO freigesetzten Nitrit vergleichsweise hoch ist⁶⁹. Viel niedrigere Werte sind bei Marley et al.⁶⁹ mit 28nmol/l und Gladwin et al. mit 50nmol/l beschrieben. Hier erfolgte die Spaltung der S-NO Bindung mit einem Gemisch aus Kupfer(I), Jod und Jodid, die NO Bestimmung mit der Chemilumineszenz. Das Prinzip der Chemilumineszenz beruht auf der Tatsache, dass Ozon mit Stickstoffmonoxid eine angeregte Form des Nitrits bildet. Wenn diese angeregte Form spontan in ihre nicht-angeregte Form übergeht, gibt sie elektromagnetische Strahlung einer bestimmten Frequenz ab, die zur Quantifizierung dienen kann. Eine mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung von NO mit der Chemilumineszenzmethode ist die Tatsache, dass NO nicht in Lösung bestimmt wird. Die Reaktion mit Ozon findet in der Gasphase über der Flüssigkeit statt. Gerade bei niedrigen NO Konzentrationen kann die Überführung von NO in die Gasphase schwierig und nicht reproduzierbar sein¹²⁰. Daraus ergibt sich ein möglicher Erklärungsansatz für die im Vergleich mit den eigenen Untersuchungen sehr niedrigen RSNO-Konzentrationen. Bei der Etablierung der Chemilumineszenzmethode zur Bestimmung von plasmatischen NO-Addukten in der eigenen Arbeitsgruppe konnte jedoch eine 100%ige Wiederfindungsrate für Nitrit und S-Nitrosothiole bei einer Detektionsgrenze von 5nmol/l gezeigt werden¹²¹. In unveröffentlichten Untersuchungen bei denen die Nitritkonzentration im Wässrigen sowohl mit Hilfe der Fluss-Injektions-Analyse, als auch der Chemilumineszenzmethode bestimmt wurde, zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation der Messwerte beider Verfahren.

4.2. Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Konzentration zirkulierender NO-Metabolite

Mit dem Ziel einen biochemischen Marker zur individuellen Diagnostik der endothelialen Dysfunktion und Risikostratifizierung zu entwickeln, wurden in der eigenen Untersuchung die Nitrit-, Nitrat- und RSNO-Konzentrationen bei Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht. Aus folgenden Gründen wurde NO nicht selbst quantifiziert. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit gestaltet sich die Untersuchung von NO im menschlichen Blut als sehr schwierig¹⁴. In wässriger Lösung ist für NO eine Konzentrations-abhängige Halbwertszeit von 9-900s beschrieben¹⁶. Im Vollblut wird die Halbwertszeit auf 0,05-1,8ms geschätzt³⁵, einige gehen von einer Halbwertszeit von 1 μ s aus¹²². Die viel kürzere Halbwertszeit erklärt sich aus der hohen Reaktivität des NO mit oxygeniertem Hämoglobin. Bestätigt wurde dies in Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe²². Bei Zugabe von 5 μ mol/l NO zu Plasma wurde eine Halbwertszeit von 68s bestimmt. Im Vollblut erfolgte der Abbau so schnell, dass mit der verwendeten NO-Elektrode kein NO messbar war. Somit schied NO selbst als biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion aus, da es aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit noch während einer Blutentnahme vollständig abgebaut wird.

Bislang wurden die direkten Abbauprodukte des NO, Nitrit und Nitrat bzw. NO_x als Summe aus beiden, zur Abschätzung der NO-Synthese *in vivo* verwendet. Den Hintergrund dafür bilden Untersuchungen, die belegen, dass das im Lumen von Blutgefäßen bestimmte Nitrit und Nitrat einen konstanten Anteil der endothelialen NO Synthese darstellt³⁵. Weiterhin zeigte sich bei Untersuchungen an transgenen Mäusen (eNOS-Knock-out) eine um 50% verminderte NO_x-Plasmakonzentration. Im Überstand von Endothelzellkulturen aus Aorten derselben Tiere waren nur Hintergrundkonzentrationen nachzuweisen¹²³. Nitrit und Nitrat unterscheiden sich beträchtlich hinsichtlich ihrer Halbwertszeit und ihres Verteilungsvolumens. Daraus ergeben sich große Unterschiede hinsichtlich ihrer Fähigkeit die endotheliale NO-Synthese wiederzuspiegeln¹⁶.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen plasmatischen Nitratkonzentrationen bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Auch bestand keine Korrelation zur FMD. Im wesentlichen schränken zwei Gründe die Aussagekraft der Nitratkonzentration im Plasma bezüglich der endogenen NO-Synthese ein. Im Gegensatz zu Nitrit ist die Nitrat-Konzentration nicht überwiegend von der endogenen NO-Synthese abhängig. Sie wird durch eine

Reihe eNOS-unabhängiger Faktoren beeinflusst, wie z.B. der Speichelbildung, der Nitratbildung durch Darmbakterien, der Aufnahme von Stickoxiden aus der Umgebungsluft und der Nahrungsaufnahme¹⁶. Die Einfluss der Nahrungsaufnahme verdeutlichen Untersuchungen, bei denen es nach einer 12 stündigen Fastenperiode zu einer Reduktion der Nitrat-Konzentration um 54% kam¹¹³. Die Aussagekraft wird zusätzlich dadurch eingeschränkt, dass Nitrat in sehr hohen Hintergrundkonzentrationen (mikromolarer Bereich) vorliegt und ein Verteilungsvolumen einnimmt, das ca. fünfmal größer als das Plasmavolumen ist und damit dem Extrazellulärvolumen entspricht¹²⁴. Die exakte Bestimmung von Änderungen, die auf die endogene NO-Bildung (nanomolarer Bereich) zurückzuführen sind, ist deshalb nur eingeschränkt möglich. Aus diesen Gründen kann die Nitratkonzentration nur eine grobe Abschätzung der endogenen NO-Bildung erlauben. Zusammenfassend ergibt sich daraus die Schlussfolgerung, dass Nitrat nicht als biochemischer Marker einer eingeschränkten NO-Bioverfügbarkeit und damit endothelialen Dysfunktion geeignet ist.

Im Einklang mit anderen Untersuchungen¹²⁵ zeigte sich in den Untersuchungsergebnissen der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen der Nitritkonzentration im Plasma und der Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren. Weiterhin bestand keine Korrelation zwischen der Nitritkonzentration und dem funktionellen Grad einer endothelialen Dysfunktion (FMD). Experimentelle Untersuchungen, bei denen nüchternen Freiwilligen ¹⁵N markiertes L-Arginin infundiert wurde, haben gezeigt, dass 90% des im Blut zirkulierenden Nitrits aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel stammt¹¹³. Aufgrund des stöchiometrischen Abbaus von NO zu Nitrit, spiegeln sich akute Änderungen der Aktivität der NO-Synthase direkt in der Nitritkonzentration wieder. Untersuchungen von Kelm et al.¹¹² und Lauer et al.¹²⁶ am Gefäßbett des Unterarms belegen die Spezifität von Nitrit als einen Indikator für die lokale basale endotheliale NO-Synthase und nach Stimulation. Nitrit besitzt im menschlichen Blut aber nur eine kurze Halbwertszeit von 110s und kann damit nur kurzfristige und lokale Änderungen der Aktivität der NOS widerspiegeln¹⁶. Die Nitritkonzentration im Plasma erscheint deshalb nicht als langfristiger Parameter der NO-Bioverfügbarkeit geeignet.

Im Gegensatz zur Nitrit- und Nitratkonzentration im Plasma zeigte sich im eigenen Kollektiv eine zunehmende Abnahme der plasmatischen S-Nitrosothiol-Konzentration bei Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren. Weiterhin bestand eine Korrelation mit der Fluss-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis. Mit dem Hintergrund, dass S-Nitrosothiole eine bioaktive Speicherform des NO darstellen,

stehen diese Befunde in Einklang mit der Hypothese, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit von NO führen. Plasmatische S-Nitrosothiole könnten somit als biochemische Marker einer endothelialen Dysfunktion dienen. Bislang existieren nur wenige Arbeiten, die Veränderungen der Konzentrationen von S-Nitrosothiolen im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen untersucht haben¹¹⁴. So scheinen Frauen mit Präeklampsie im Vergleich zu gesunden Schwangeren erhöhte S-Nitrosoalbuminspiegel aufzuweisen¹²⁷. In einer anderen Studie zeigten sich bei Personen mit Hypercholesterinämie ohne weitere kardiovaskuläre Risikofaktor signifikant höhere S-Nitrosothiolkonzentrationen als im Kontrollkollektiv¹²⁵. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Nur einer der untersuchten Probanden wies eine Hypercholesterinämie als einzigen Risikofaktor auf. Bei dieser Person wurde eine S-Nitrosothiolkonzentration von 140nmol/l im Plasma bestimmt und liegt damit deutlich unterhalb des Mittelwertes im Kontrollkollektiv.

4.3. Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel-abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien

Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung der Arterien. Von größtem klinischem Interesse ist die Arteriosklerose der Koronararterien und der Karotiden. Doch sind strukturelle und funktionelle Veränderungen in fast allen Arterien des Organismus nachzuweisen. Bei Sorensen et al.¹²⁸ zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem histologischen Schweregrad einer Arteriosklerose in den Koronararterien bzw. der Arteria carotis und der Arteria brachialis. In anderen Untersuchungen konnte eine enge Beziehung zwischen der Endothelfunktion der Koronararterien und der Arteria brachialis nachgewiesen werden^{90;91}. So wird die Messung der FMD der Arteria brachialis aufgrund seiner einfachen und nicht-invasiven Durchführbarkeit seit Jahren als Surrogatparameter einer endothelialen Dysfunktion verwendet. Im Einklang damit zeigte sich die FMD auch im eigenen Studienkollektiv mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren als zunehmend eingeschränkt. Zudem bestanden inverse Korrelationen zu Parametern durch die kardiovaskuläre Risikofaktoren definiert sind, wie dem Alter, dem Gesamtcholesterin, dem LDL-Cholesterin, der HDL/LDL-Ratio, den Triglyzeriden und den gerauchten Packungsjahren. Unter der Prämisse, dass die FMD zum größten Teil NO vermittelt ist⁸³, folgt aus diesen Befunden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren entweder zu einer Einschränkung der Freisetzung von bioaktivem NO führen oder freigesetztes NO seine Wirkung nicht entfalten kann.

Zahlreiche Untersuchungen sprechen dafür, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über eine gesteigerte Radikalbildung zu einem beschleunigten Abbau von NO führen⁴⁸. Noch bevor NO als EDRF identifiziert wurde, war bekannt, dass die Halbwertszeit von EDRF durch Zugabe der Superoxiddismutase verlängert werden konnte. Am Rattenmodell des Streptozotocin-induzierten Diabetes ist die Endothel-abhängige Dilatation ebenfalls eingeschränkt¹²⁹. In Gefäßen dieser Tiere wurde eine Überexpression einer dysfunktionalen NO-Synthase nachgewiesen, welche eine reduzierte NO-Produktion und eine auf das 3-fache gesteigerte Superoxidanionenproduktion aufwies. Weiterhin war die Aktivität der NADPH-Oxidase signifikant gesteigert, was ebenfalls eine gesteigerte Superoxidanionenproduktion zur Folge hat. In einer Untersuchung von Arcaro et al.⁸⁴ wurde gesunden Probanden Insulin und Glukose parallel infundiert. Dies führte zu einer signifikanten Verringerung der FMD im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Wurde hingegen Vitamin C als Antioxidans parallel infundiert, kam es zu keiner Einschränkung. Bei Personen mit Hypercholesterinämie zeigt sich nach Infusion von Vitamin C ebenfalls eine Verbesserung der verminderten Endothel-abhängigen Dilatation¹³⁰. Bei experimentellen Untersuchungen an menschlichen Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC) führt die Inkubation mit oxidiertem LDL-Cholesterin zu einer Steigerung der NADPH-Oxidase Expression mit gesteigerter Superoxidanionen-Produktion¹³¹. Am Rattenmodell der Angiotensin-II-induzierten arteriellen Hypertonie konnte ebenfalls eine gesteigerte Superoxidanionen-Produktion nachgewiesen werden. Durch die Infusion von Superoxiddismutase konnte die verminderte Endothel-abhängige Dilatation und der erhöhte arterielle Blutdruck normalisiert werden¹³². Die für eine essentielle Hypertonie charakteristische verstärkte kontraktile Wirkung von Noradrenalin auf die Gefäßwand konnte durch Antioxidantien verhindert werden¹³³. Nach Applikation von Vitamin C zeigten Hypertoniker eine mit Normotonikern vergleichbare Kontraktion der Widerstandsgefäße durch Noradrenalin. Bei Rauchern kann durch eine Vitamin E Gabe die FMD akut gesteigert werden¹³⁴. Neben der Deaktivierung von NO scheint oxidativer Stress auch zu einer Hemmung der NO-Synthese beizutragen. Für alle klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wurde der Nachweis erbracht, dass sie zu einer Verminderung von bioaktivem NO führen. Zusammengefasst sprechen alle oben genannten Befunde für die Beteiligung eines beschleunigten NO-Abbau durch freie Radikale in der Pathophysiologie aller kardiovaskulären Risikofaktoren. Weiterhin belegen neuere Befunde, dass die NO-Deaktivierung durch Superoxidanionen ebenfalls zu einer verringerten NO-Synthese führen kann. Das durch die Interaktion von Superoxidanionen und Stickstoffmonoxid entstehende Peroxynitrit kann über die Interaktion mit Tetrahydrobiopterin zu einer Entkopplung der eNOS führen⁵¹. Eine so

entkoppelte eNOS synthetisiert an Stelle von NO vermehrt Superoxidanionen. Dies könnte ein Erklärungsansatz für die Befunde sein, die nach Inkubation von HUVECs mit dem Serum von Rauchern erhoben wurden. In dieser Untersuchung wurde eine gesteigerten Expression der eNOS bei verminderter NO-Produktion nachgewiesen¹³⁵.

Als Ursache für die beobachtete Einschränkung der FMD mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren kommt neben einer verminderten NO-Synthese bzw. Menge an bioaktivem NO, eine verminderte NO-Wirkung in Betracht⁹⁶. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Untersuchung neben der FMD, auch die Endothel-unabhängige Dilatation nach oraler Gabe von Glyceroltrinitrat quantifiziert. In Einklang mit anderen Untersuchungen zeigte sich mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren eine verminderte Endothel-unabhängige Dilatation als Hinweis auf einen zunehmenden Umbauprozess innerhalb der Gefäßwand^{57;96}. Der relative Anteil der FMD, bezogen auf die durch GTN-induzierte Dilatation, war bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren signifikant kleiner als im Kontrollkollektiv. Daraus wurde abgeleitet, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer eigenständigen Störung der Endothel-abhängigen Komponente der Vasorelaxation führen und die gefundene Reduktion der FMD bei einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren nicht allein durch eine eingeschränkte NO-Sensitivität erklärt werden kann.

4.4. Endogene NO-Speicher und endotheliale Dysfunktion

Aus früheren Untersuchungen wurde gefolgert, dass NO ausschließlich parakrine Wirkungen in der Gefäßwand entfalten kann. Neuere Untersuchungen belegen jedoch, dass NO über die Bildung langlebiger Intermediate im menschlichen Kreislauf wirksam sein kann. NO kann mit den Thiolgruppen von im Plasma zirkulierendem Albumin, Glutathion und Cystein zu S-Nitrosothiolen (RSNO) reagieren²¹. Andere Untersuchungen belegen, dass die gebildete RSNO-Menge von endogen gebildetem oder exogen zugeführtem NO abhängig ist und eine physiologische Relevanz bei der Blutdruck- und Gerinnungskontrolle hat^{15;22;33;34;136-138}. RSNO scheint eine systemisch wirksame Speicherform des NO darzustellen^{15;21}. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der Nachweis erbracht werden, dass der direkte Nachweis einer reduzierten Konzentration von bioaktivem NO als Marker einer endothelialen Dysfunktion dienen kann.

Diese Ergebnisse bestätigen Untersuchungen, bei denen der Einfluss von NO auf den Ruhetonus von Arterien untersucht wurde. Untersuchungen an nicht arteriosklerotisch veränderten Arterien haben gezeigt, dass sowohl der systemische, als auch der

koronare Widerstand von der basalen NO-Freisetzung mitreguliert wird^{139;140}. In systemischen und koronaren Leitungs- und Widerstandarterien von Normalpersonen führt die selektive Blockade der eNOS durch L-NMMA zu einer Kontraktion^{139;141}. Bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren ist dieser Effekt vermindert^{141;142}, was für eine geringere Beteiligung von NO am basalen Gefäßwiderstand bzw. eine Verminderung bioaktiven NOs unter basalen Bedingungen spricht. Dies ist im Einklang mit den gemessenen niedrigeren RSNO-Konzentrationen von Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich zum Kontrollkollektiv.

Dieselben Mechanismen, die zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO unter basalen Bedingungen führen, reduzieren auch die NO-Freisetzung nach Stimulation¹⁴². Wie in vielen anderen Arbeiten, konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine zunehmenden Reduktion der FMD mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren gezeigt werden. Zum ersten Mal konnte eine positive Korrelation zwischen der Konzentration von plasmatischen S-Nitrosothiolen und dem Grad der endothelialen Dysfunktion, welche mit Hilfe der FMD quantifiziert wurde, nachgewiesen werden. Zusammenfassend bedeutet dies, dass RSNO als direkter biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion dienen kann. So ergab sich im untersuchten Kollektiv eine diagnostische Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%. Hierzu wurde eine FMD von <8% als endotheliale Dysfunktion und eine RSNO Konzentration von 600nmol/l als diagnostischer Grenzwert definiert.

4.5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Erst in den letzten Jahren konnte der Nachweis erbracht werden, dass ein Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion und der Prognose einer koronaren Herzkrankheit besteht. Schächinger et al.⁵⁵ und Al Suwaidi et al.⁵⁶ konnten in prospektiven Studien den prognostischen Einfluss einer reduzierten Endothel-abhängigen Dilatation der Koronararterien auf die Rate an kardialen Ereignissen bei Personen mit koronarer Herzkrankheit nachweisen. Bei Heitzer et al.¹⁴³ zeigte sich, dass auch Personen, die eine reduzierte Endothel-abhängige Dilatation der Widerstandsgefäße des Unterarms aufweisen, ein erhöhtes Risiko haben ein kardiales Ereignisse zu erleiden. Um den Einfluss von oxidativem Stress zu untersuchen, wurde an einem Subkollektiv dieser Studie parallel Vitamin C infundiert. Dabei wurde angenommen, dass Vitamin C umso mehr die Endothel-abhängige Dilatation steigern kann, je ausgeprägter der oxidative Stress ist. Es zeigte sich, dass Personen, die von Vitamin C stärker profitierten, signifikant häufiger kardiale Ereignisse erlitten. In einer weiteren Arbeit konnte auch für die FMD eine prognostische Wertigkeit für Patienten mit

koronarer Herzkrankheit etabliert werden⁵⁸. In der individuellen Risikostratifizierung muss somit der endothelialen Dysfunktion eine besondere Beachtung geschenkt werden, zumal einige klinische Studien darauf hinweisen, dass eine endotheliale Dysfunktion zumindest in Teilen rückführbar sein kann^{5;144-147}.

Die Therapie der Arteriosklerose basiert zu großen Teilen auf einer Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren. Bei einigen Therapieansätzen hat sich gezeigt, dass sie neben ihren ursprünglich bekannten Wirkungen auch die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen können und dadurch direkten Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion nehmen. Ein Teil der schon seit längerem bekannten prognostisch günstigen Eigenschaften von ACE- und CSE-Hemmern kann einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von NO zugeschrieben werden^{146;148;149}. Schon 1993 konnten Celermajer et al.⁶⁵ zeigen, dass Rauchen zu einer dosisabhängigen Reduktion der FMD führt, welche zumindest in Teilen nach Nikotinkarenz reversibel ist. Auch körperliches Training geht mit einer Steigerung der FMD einher¹⁴⁴. Diese Befunde sprechen dafür, dass die endotheliale Dysfunktion das kausale Bindeglied und somit eine therapeutische Zielgröße in der Prophylaxe und Therapie einer Arteriosklerose darstellt^{37;59}. Durch die Bestimmung der S-Nitrosothiole könnte es nun möglich sein, die endotheliale Dysfunktion in die individualspezifische Risikostratifizierung mit einzubeziehen. Zudem könnten Behandlungserfolge nun durch einen einfachen Bluttest objektiviert werden. Vor dem Einsatz in der klinischen Routine müssen allerdings physiologische und weiter methodische Einflussgrößen identifiziert und Normalwerte in einem größeren Kollektiv etabliert werden. Auch die prognostische Wertigkeit muss noch im Längsschnitt nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen scheinen eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung, als auch dem Fortschreiten einer Arteriosklerose zuzukommen. In diesem Zusammenhang haben zahlreiche Arbeiten die Bedeutung des L-Arginin-Stickstoffmonoxid(NO)-Stoffwechselweges für die Endothelfunktion nahegelegt. NO ist an der Regulation wesentlicher Endothelfunktionen beteiligt und beeinflusst direkt Schlüsselprozesse, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose wichtig sind. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und der Nikotinabusus sind mit einer Störung der Endothelfunktion assoziiert und scheinen hierüber ihre proatherogene Wirkung zu vermitteln. Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine endotheliale Dysfunktion therapeutisch rückführbar sein kann. Obwohl der Früherkennung der Arteriosklerose eine enorme sozioökonomische Bedeutung zukommt, existiert derzeit noch kein einfaches Verfahren zur Früherkennung einer Arteriosklerose, welches in der klinischen Routine eingesetzt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher einen biochemischen Marker zur Diagnose der endothelialen Dysfunktion zu identifizieren.

Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass NO in gebundener Form als S-Nitrosothiole im Kreislauf transportiert und systemisch wirksam werden kann. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die plasmatische Konzentration von S-Nitrosothiolen als direkter biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion dienen kann. Deshalb wurde sowohl die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole, als auch die Fluß-abhängige Dilatation der Arteria brachialis als etablierter nicht-invasiver Parameter einer endothelialen Dysfunktion bei Normalpersonen und Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1.) Die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole ist bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren in Abhängigkeit von der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren zunehmend eingeschränkt.
- (2.) Die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole korreliert mit der Höhe der Fluß-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.
- (3.) Bei einem Grenzwert von 600nmol/l ergab sich im Vier-Felder-Test für die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole als diagnostischer Marker einer endothelialen Dysfunktion eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%.

Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass die Bestimmung der Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole als biochemischer Marker für die Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dienen kann.

6. Literaturverzeichnis

1. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
2. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997;3:600-601.
3. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
4. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:295-314.
5. Celermajer DS. Endothelial Dysfunction: Does It Matter? Is It Reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(2):325-333.
6. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-376.
7. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3:2007-2018.
8. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
9. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res.* 1987;61:866-879.
10. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;154:236-244.
11. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988;333:664-666.
12. Schmidt HH, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher KE, Klein MM, Niroomand F, Bohme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol.* 1988;154:213-216.
13. Kelm M, Yoshida K. Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. In: *Methods in nitric oxide research.* Feelisch M, Stamler J, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
14. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *PNAS.* 2001.
15. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Hei C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002;109:1241-1248.
16. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.

17. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991;91:31S-38S.
18. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.
19. van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide- dependent toxicity. *J Biol Chem.* 1997;272:7617-7625.
20. Schmitt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu W, Salomon RG, Chen Y, Chisolm GM, Hazen SL. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry.* 1999;38:16904-16915.
21. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:7674-7677.
22. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Experimental and Clinical Studies on the Decomposition and Transport of Authentic NO in Plasma: Evidence for Systemic Effects on Conduit and Resistance Arteries in the Human Circulation. *Circ Res.* 2002;91:470-477.
23. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992;258:1898-1902.
24. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *PNAS.* 2000;97:11482-11487.
25. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997;276:2034-2037.
26. Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature.* 2001;391:169-173.
27. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996;380:221-226.
28. Scharfstein JS, Keaney JF, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS. In Vivo Transfer of Nitric Oxide between a Plasma Protein-bound Reservoir and Low Molecular Weight Thiols. *J Clin Invest.* 1994;94:1432-1439.
29. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature.* 2001;409:622-626.
30. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-gluthatione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:633-642.
31. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and

- characterization of biological active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:444-448.
32. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation*. 1994;89:2035-2044.
 33. Keaney JF, Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Scharfstein JS, Vita J, Loscalzo J. NO Forms an Adduct with Serum Albumin that Has Endothelium-derived Relaxing Factor-like Properties. *J Clin Invest*. 1993;91:1582-1589.
 34. Minamiyama Y, Takemura S, Inoue M. Albumin Is an Important Vascular Tonus Regulator as a Reservoir of Nitric Oxide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;225:112-115.
 35. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66:1561-1575.
 36. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80 (Suppl. 5):3-6.
 37. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion; Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist*. 1999;40:1300-1307.
 38. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96:60-68.
 39. He P, Zeng M, Curry FE. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell $[Ca^{2+}]_i$. *Am J Physiol*. 1997;273:H747-H755.
 40. Jung U, Ramos CL, Bullard DC, Ley K. Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. *Am J Physiol*. 1998;274:H1785-H1791.
 41. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation*. 1998;97:1274-1281.
 42. Stary HC, Bleakley Chandler A, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A Definition of Initial, Fatty Streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89:2462-2478.
 43. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.
 44. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med*. 1992;326:242-250.

45. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992;326:310-318.
46. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of Risk in the Development of Coronary Heart Disease -Six-Year Follow-up Experience-The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
47. Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson PA, Reed J, Washington R, Smith SC. Primary Prevention of Coronary Heart Disease: Guidance From Framingham. *Circulation*. 1998;97:1876-1887.
48. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844.
49. Arteel GE, Schroeder P, Sies H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr*. 2000;130:2100S-2104S.
50. Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V. Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death and Differentiation*. 2001;8:515-527.
51. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288.
52. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*. 1997;337:408-416.
53. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-Dependent Dilation in the Systemic Arteries of Asymptomatic Subjects Relates to Coronary Risk Factors and Their Interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24 (No. 6):1468-1474.
54. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
55. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long- term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
56. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes jr DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
57. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-1115.
58. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wolf G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *Am J Cardiol*. 2000;86:207-210.

59. Stehouwer CDA. Is measurement of endothelial dysfunction clinically useful? *Eur J Clin Invest.* 1999;29:459-461.
60. Joint National Committee on Detection EaToHBP. Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med.* 1997;157:2413-2446.
61. Chalmers J et al. WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 World Health Organization -International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:151-185.
62. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications -Report of a WHO Consultation -Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO Offset Publ.* 1999.
63. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183-1197.
64. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). 01-3670. 2001. National Institutes of Health.
65. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette Smoking Is Associated With Dose-Related and Potentially Reversible Impairment of Endothelium-Dependent Dilation in Healthy Young Adults. *Circulation.* 1993;88 (part 1):2149-2155.
66. Saville B. A Scheme for the Colorimetric Determination of Microgram amounts of Thiols. *Analyst.* 1958;83:670-672.
67. Schulz K, Kerber S, Kelm M. Reevaluation of the Griess Method for Determining NO/NO₂- in Aqueous and Protein-Containing Samples. *Nitric Oxide.* 1999;3:225-234.
68. Griess JP. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ber Deutsch Chem Ges.* 1876;12:426-428.
69. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A Chemiluminescence-based Assay for S-Nitrosoalbumin and Other Plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Biol Med.* 2000;32:1-9.
70. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelthaler DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J.* 1995;74:247-253.
71. Leeson P, Thorne S, Donald AE, Mullen M, Clarkson P, Deanfield JE. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart.* 1997;78:22-27.
72. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med.* 2000;32:293-304.
73. Levenson JA, Personneau PA, Simon A, Safar ME. Pulsed Doppler: determination of diameter, blood flow velocity, and volumic flow of brachial artery in man. *Cardiovasc Res.* 1981;15:164-170.

74. Celermajer DS. Testing Endothelial Function Using Ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
75. Hardie KL, Kinlay S, Hardy DB, Wlodarczyk J, Silberberg JS, Fletcher PJ. Reproducibility of brachial ultrasonography and flow-mediated dilatation (FMD) for assessing endothelial function. *Aust N Z J Med.* 1997;27:649-652.
76. Preik M, Lauer T, Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated Ultrasonic Measurement of Human Arteries for the Determination of Endothelial Function. *Ultraschall Med.* 2000;21:195-198.
77. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical Aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol.* 1995.
78. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001;104:191-196.
79. Busse R, Fleming A, Heckler M. Signal transduction in endothelium-dependent vasodilatation. *Eur Heart J.* 1993;14:12-19.
80. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:682-685.
81. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996;79:984-991.
82. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399:601-605.
83. Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, Lüscher TF. Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries in Vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-1319.
84. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. *Circulation.* 2002;105:576-582.
85. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:146-154.
86. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. The Effects of Age and Gender on Brachial Artery Endothelium-Dependent Vasoactivity Are Stimulus-Dependent. *Clin Cardiol.* 2000;18:471-476.
87. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation.* 1995;92:3431-3435.
88. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men

- years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:471-476.
89. Clarkson P, Celermajer DS, Powe AJ, Donald AE, Henry RMA, Deanfield JE. Endothelium-Dependent Is Impaired in Young Healthy Subjects With a Family History of Premature Coronary Disease. *Circulation*. 1997;96:3378-3383.
 90. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129:111-118.
 91. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delegrange D, Lieberman EH, Ganz P, Creager A, Yeung AC, Selwyn AP. Close Relation of Endothelial Function in the Human Coronary and Peripheral Circulation. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26(5):1235-1241.
 92. Landmesser U, Harrison DG. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot. *Circulation*. 2001;104:2638-2640.
 93. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999;99:1141-1146.
 94. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998;98:1842-1847.
 95. Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, Tsao PS, Cooke JP. Regression of atherosclerosis: role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*. 1999;99:1236-1241.
 96. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth Muscle Dysfunction Occurs Independently of Impaired Endothelium-Dependent Dilation in Adults at Risk of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:123-127.
 97. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, Kurita A, Ohsuzu F. Morning Attenuation of Endothelium-Dependent, Flow-Mediated Dilation in Healthy Young Men: Possible Connection to Morning Peak of Cardiac Events? *Clin Cardiol*. 1999;22:417-421.
 98. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997;79:350-354.
 99. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;102:2473-2478.
 100. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatiopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of Acute Cigarette Smoking on Endothelium-Dependent Brachial Artery Dilatation in Healthy Individuals. *Am J Cardiol*. 1997;79:529-531.

101. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. A Comparison of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation Using Upper and Lower Arm Arterial Occlusion in Subjects with and without Coronary Risk Factors. *Clin Cardiol.* 2000;23:571-575.
102. Berry KL, Skyrme-Jones RA, Meredith IT. Occlusion cuff position is an important determinant of the time course and magnitude of human brachial artery flow-mediated dilation. *Clin Sci (Lond).* 2000;99:261-267.
103. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
104. Bressler B, Chan S, Mancini GB. Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol.* 2000;85:396-400, A10.
105. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurküla M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wallthickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol.* 1991;11:565-577.
106. Jarvisalo MJ, Ronnema T, Volanen I, Kaitosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, Irjala K, Viikari JS, Simell O, Raitakari OT. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H87-H92.
107. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M, Dietz K, Haring HU. [Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound]. *Ultraschall Med.* 2001;22:231-235.
108. Enderle MD, Balletshofer BM, Schmülling RM, Häring HU, Pfohl M. Early detection of atherosclerosis in type 2 diabetic patients using high resolution ultrasound. *Ultraschall Med.* 1998;19:16-21.
109. Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, Deanfield JE. Passiv Smoking And Impaired Endothelium-Dependent Arterial Dilatation In Healthy Young Adults. *N Engl J Med.* 1996;334:150-154.
110. Schröder S, Enderle MD, Meisner C, Baumbach A, Herdeg C, Oberhoff M, Ossen R, Pfohl M, Karsch KR. Ultraschallmessung der Endothelfunktion der Arteria brachialis bei Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999;124:886-890.
111. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects. Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
112. Preik-Steinhoff H, Kelm M. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with highperformance anion-exchange chromatography and electrochemical determination. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;685:348-352.
113. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:590-596.

114. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Di Simplicio P. Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res*. 2001;89:E47.
115. Goldman RK, Vlessies AA, Trunkey DD. Nitrosothiol quantification in human plasma. *Anal Biochem*. 1998;259:98-103.
116. Ewing JF, Janero DR. Specific S-Nitrosothiol (Thionitrite) Quantification as Solution Nitrite after Vanadium (III) Reduction and Ozone-Chemiluminescent Detection. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:621-628.
117. Jourd'Heuil D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic State Of S-Nitrosothiols In Human Plasma And Whole Blood. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:409-417.
118. Matsunaga K, Furchgott RF. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989;248:687-695.
119. Alpert C, Ramdev N, George D, Loscalzo J. Detection of S-Nitrosothiols and Other Nitric Oxide Derivatives by Photolysis-Chemiluminescence Spectrometry. *Anal Biochem*. 1997;245:1-7.
120. Butler AR, Rhodes P. Chemistry, Analysis, and Biological Roles of S-Nitrosothiols. *Anal Biochem*. 1997;249:1-9.
121. Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N. S., Jourd'heuil, D., and Kelm, M. Concomitant S-, N- and Heme-Nitros(yl)ation in Biological Tissues and Fluids: Implications for the Fate of NO in vivo. 2002.
122. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8757-8761.
123. Gödecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998;82:186-194.
124. Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, Forfia PR, Seyedi N, Shen W, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH. Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation*. 1995;91:2982-2988.
125. Moriel P, Pereira IR, Bertolami MC, Abdalla DS. Is ceruloplasmin an important catalyst for S-nitrosothiol generation in hypercholesterolemia? *Free Radic Biol Med*. 2001;30:318-326.
126. Lauer T, Köster P, Preik M, Kelm M. Einfluß kompetitiver Substrathemmung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges auf die Stickstoffmonoxidfreisetzung nach rezeptorvermittelter Stimulation der endothelialen NO-Synthase im menschlichen Kreislauf. *Z Kardiol*. 2000;89:74.
127. Tyurin VA, Liu SX, Tyurina YY, Sussman NB, Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Kagan VE. Elevated levels of S-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res*. 2001;88:1210-1215.
128. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:318-322.

129. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res.* 2001;88:e14-e22.
130. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy MA, Ganz P, Creager A. Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Forearm Resistance Vessels of Humans With Hypercholesterolemia. *Circulation.* 1997;95(12):2617-2622.
131. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski H-R, Morawietz H. Induction of NAD(P)H Oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation.* 2001;104:1767-1772.
132. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation.* 1997;95:588-593.
133. Lembo G, Vecchione C, Izzo R, Fratta L, Fontana D, Marino G, Pilato G, Trimarco B. Noradrenergic Vascular Hyper-Responsiveness in Human Hypertension Is Dependent on Oxygen Free Radical Impairment of Nitric Oxide Activity. *Circulation.* 2000;102:552-557.
134. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Söregi G, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K. Effects of Vitamin E on Chronic and Acute Endothelial Dysfunction in Smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(2):277-283.
135. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds L-J, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation.* 2001;104:1905-1910.
136. Minamiyama Y, Takemura S, Inoue M. Effect of Thiol Status on Nitric Oxide Metabolism in the Circulation. *Arch Biochem Biophys.* 1997;341:186-192.
137. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of Vascular Smooth Muscle Relaxation by Organic Nitrates, Nitrites, Nitroprusside and Nitric Oxide: Evidence for the Involvement of S-Nitrosothiols as Active Intermediates. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981;218:739-749.
138. Cannon RO, Schechter AN, Panza JA, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Shelhamer JH, Gladwin MT. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest.* 2001;108:279-287.
139. Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patient with essential hypertension. *Circulation.* 1993;87:1468-1474.
140. Chu A, Chambers DE, Lin C-C, Kuehl WD, Palmer RMJ, Moncada S, Cobb FR. Effects of inhibition of nitric oxide formation on basal vasomotion and endothelium-dependent responses of the coronary arteries in awake dogs. *J Clin Invest.* 1991;87:1964-1968.
141. Quyyumi AA, Dakak N, Andrews NP, Husain S, Arora S, Gilligan DM, Panza JA, Cannon III RO. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1995;95:1747-1755.

142. Cannon III RO. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem*. 1998;44:1809-1819.
143. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104:2673-2678.
144. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubb M, World M, Deanfield JE. Exercise Training Enhances Endothelial Function in Young Men. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1379-1385.
145. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101:1653-1659.
146. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry J-P, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of Endothelial function by Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Heart Failure; Role of Nitric Oxide, Prostanoids, Oxidant Stress, and Bradykinin. *Circulation*. 2000;102:351-356.
147. Mancini GBJ, Henry GC, Macaya C. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1996;94:258-265.
148. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1129-1135.
149. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation*. 1998;98:211-216.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und sein Vertrauen in meine Fähigkeiten. Durch seine fachliche Kompetenz und menschliche Souveränität vermag er es immer wieder seine Mitarbeiter zu Höchstleistungen anzuspornen.

Herrn Dr. med. M. Preik möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Von ihm musste ich lernen, dass eine wissenschaftliche Arbeit keineswegs als literarische Unterform einer Erzählung zu verstehen ist.

Herrn Dr. med. T. Lauer, Herrn Dr. med. A. Dejam, Frau Dipl. Biol. P. Kleinbongard und Herrn Dr. med. T. Rassaf danke ich für ihre unschätzbare Hilfe den roten Faden nicht zu verlieren. Ohne ihre konstruktive Kritik und den Einsatz ihrer kostbaren Freizeit würde der Einleitungs- und Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit womöglich noch immer ausschließlich aus einer Aneinanderreihung von Worten und Fakten bestehen.

Frau BTA C. Ferfers und Frau MTA S. Matern danke ich für ihre allgegenwärtige, tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten im Kardiologischen Labor.

Herrn Dr. R. Willers danke ich für seine Hilfe bei der Erstellung der Datenbank und statistischen Auswertung, die den Rahmen der vorliegenden Arbeit weit überschreitet.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Sies und Herrn Prof. Dr. T. Schewe danke ich ganz besonders für ihre konstruktive Kritik aus biochemischer Sicht.

Den größten Dank bin ich meinen Eltern Frau E.-M. Heiß und Herrn R. Taphorn schuldig. In besonders tiefer Schuld stehe ich bei meiner Mutter, die über lange Jahre die elterlichen Pflichten allein tragen und zahllose Opfer auf sich nehmen musste, um mir einen unbeschwerlichen Weg zu ermöglichen.

8. Lebenslauf

Christian Heiß
Flurstr. 46
40235 Düsseldorf
Deutschland

31.10.1974 geboren in Essen

Schulbildung

1981-1985 Sankt Barbara-Grundschule, Essen
1985-1991 Gymnasium am Stoppenberg, Essen
1991-1992 Aztec High-School, Aztec, NM, USA
1992 High-School-Diploma
1992-1994 Gymnasium am Stoppenberg, Essen
1994 Abitur

Hochschulbildung

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine Universität,
Düsseldorf
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
03/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2000 Praktisches Jahr
1. Terial: Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie,
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
2. Terial: Texas Heart Institute, Houston, TX, USA
3. Terial: Zentrum für Anästhesiologie, Heinrich-Heine-Universität,
Düsseldorf
11/2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit **01/2002** Arzt im Praktikum, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und
Angiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

S-Nitrosothiole als biochemische Marker der endothelialen

Dysfunktion

- Christian Heiß -

Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen scheinen eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung, als auch dem Fortschreiten einer Arteriosklerose zuzukommen. In diesem Zusammenhang haben zahlreiche Arbeiten die Bedeutung des L-Arginin-Stickstoffmonoxid(NO)-Stoffwechselweges für die Endothelfunktion nahegelegt. NO ist an der Regulation wesentlicher Endothelfunktionen beteiligt und beeinflusst direkt Schlüsselprozesse, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose wichtig sind. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, der Diabetes mellitus und der Nikotinabusus sind mit einer Störung der Endothelfunktion assoziiert und scheinen hierüber ihre proatherogene Wirkung zu vermitteln. Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine endotheliale Dysfunktion therapeutisch rückführbar sein kann. Obwohl der Früherkennung der Arteriosklerose eine enorme sozioökonomische Bedeutung zukommt, existiert derzeit noch kein einfaches Verfahren zur Früherkennung einer Arteriosklerose, welches in der klinischen Routine eingesetzt wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher einen biochemischen Marker zur Diagnose der endothelialen Dysfunktion zu identifizieren.

Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass NO in gebundener Form als S-Nitrosothiole im Kreislauf transportiert und systemisch wirksam werden kann. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die plasmatische Konzentration von S-Nitrosothiolen als direkter biochemischer Marker der endothelialen Dysfunktion dienen kann. Deshalb wurde sowohl die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole, als auch die Fluß-abhängige Dilatation der Arteria brachialis als etablierter nicht-invasiver Parameter einer endothelialen Dysfunktion bei Normalpersonen und Personen mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1.) Die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole ist bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren in Abhängigkeit von der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren zunehmend eingeschränkt.
- (2.) Die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole korreliert mit der Höhe der Fluß-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.
- (3.) Bei einem Grenzwert von 600nmol/l ergab sich im Vier-Felder-Test für die Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole als diagnostischer Marker einer endothelialen Dysfunktion eine Sensitivität von 85% und eine Spezifität von 64%.

Daraus ergab sich die Schlußfolgerung, dass die Bestimmung der Konzentration plasmatischer S-Nitrosothiole als biochemischer Marker für die Diagnostik der endothelialen Dysfunktion dienen kann.