

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Kelm

**Effekte oral aufgenommenen inorganischen Nitrats auf die
Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nassim Ayoub

2012

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Rassaf
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Balzer

Liste der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
APC	Allophycocyanin
bzw.	beziehungsweise
CAC	Circulating Angiogenic Cells / zirkulierende angiogene Zellen
Carboxy-PTIO	2-(4-carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazolyl-1-oxy-3-oxide
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz-Detektion
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMD	Fluss-medierte Dilatation
FMO	Fluorescence-Minus-One
FSC	Forward Scatter
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MbFe(III)	Metmyoglobin
Min.	Minuten
MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NO [·]	Stickstoffmonoxid*
NO ⁻	Nitrosylanion
NO ⁺	Nitrosoniumkation
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur

s.c.	subcutan
SCF	Stem cell factor
SDF1- α	Stromal cell-derived factor-1 α
SE	Standardfehler
SSC	Sideward Scatter
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel

(*Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Metabolismus des Stickstoffmonoxids.....	1
1.2 Der Nitrat-Nitrit-NO Stoffwechsel.....	2
1.3 Herkunft und Funktion zirkulierender angiogener Zellen	4
1.4 Rolle von NO auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen	7
1.5 Zielsetzung	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Chemikalien, Lösungen, Gase	10
2.2 Verbrauchsmaterialien	11
2.3 Geräte	12
2.4 Bestimmung von Nitrat im Plasma mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	13
2.5 Bestimmung von Nitrit im Plasma mittels Chemilumineszenz-Detektion (CLD)	14
2.6 Bestimmung der Endothelfunktion mittels Fluss-medierter Dilatation (FMD).....	16
2.7 Relative Quantifizierung zirkulierender angiogener Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse).....	18
2.8 Isolierung zirkulierender angiogener Zellen aus dem peripheren Blut und Bestimmung der Colony Forming Units (CFU)	20
2.9 Bestimmung der Konzentration von Zytokinen im Plasma mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	23
2.10 Blutabnahme	24
2.11 Probenaufarbeitung.....	25
2.12 Humane Studienkollektive und Studienprotokolle	27
2.13 Murines Studienkollektiv und Studienprotokoll	29
2.14 Mathematisch-statistische Methoden	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Probandencharakteristika.....	31

3.1.1	Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma nach oraler Aufnahme von Nitrat.....	31
3.1.2	Einfluss oral aufgenommenen Nitrats auf die Endothelfunktion	33
3.1.3	Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Nitrataufnahme	34
3.1.4	Einfluss oral aufgenommen Nitrats auf die Funktion zirkulierender angiogener Zellen	36
3.1.5	Konzentration der Zytokine VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF im Plasma nach oraler Nitrataufnahme	37
3.2	Untersuchungen am Mausmodell.....	40
3.2.1	Konzentration von Nitrit und Nitrat im Plasma nach intravenöser Nitrit- und Nitratinjektion	40
3.2.2	Einfluss von Nitrat, Nitrit und cPTIO auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen	42
4.	Diskussion	45
4.1	Umwandlung oral aufgenommenen Nitrats zu Nitrit	45
4.2	Verbesserte Endothelfunktion nach oraler Nitrataufnahme	47
4.3	Mobilisierung und Funktionsfähigkeit zirkulierender angiogener Zellen werden durch orale Nitrataufnahme beeinflusst	48
4.4	Bedeutung der Zytokine VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Aufnahme von Nitrat.....	50
4.5	Bildung von Stickstoffmonoxid ist entscheidend für die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen	52
4.6	Klinische Relevanz und Ausblick.....	53
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis	56
7.	Veröffentlichungen.....	68
8.	Danksagung.....	69
9.	Lebenslauf	70

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems gehören in der industrialisierten Welt zu den häufigsten Todesursachen. Mit 41,1% lag 2010 in Deutschland der Anteil von Erkrankungen des Kreislaufsystems an den Gesamttodesursachen an erster Stelle¹. Der entscheidende Faktor in diesem Zusammenhang stellt die Atherosklerose dar. Das Schlüsselement in der Entstehung der Atherosklerose ist die endotheliale Dysfunktion². Die Entstehung und Progression der Atherosklerose hängt von einer Reihe von Faktoren wie erhöhtes LDL-Cholesterin, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Bewegungsmangel und Rauchen ab. Das Bestreben von vielen Forschergruppen liegt in der Suche nach Einflussfaktoren, welche sich positiv auf die Atherosklerose auswirken. Dabei scheinen sowohl Stickstoffmonoxid (NO), als auch zirkulierende angiogene Zellen (CAC / Circulating Angiogenic Cells) eine wichtige Rolle zu spielen.

1.1 Metabolismus des Stickstoffmonoxids

Stickstoffmonoxid (NO) stellt ein Radikal dar, welches durch die NO-Synthasen (NOS) synthetisiert wird. Bei der NOS wird zwischen drei Isoformen unterschieden: Die konstitutiv aktive neuronale NOS, die endotheliale NOS und die induzierbare NOS³. Des Weiteren konnte ebenfalls eine erythrozytäre NOS nachgewiesen werden⁴. Zur Bildung von NO wandeln die NO-Synthasen die Aminosäure L-Arginin unter Verwendung von Kofaktoren zu NO und Citrullin um⁵. Ein wichtiger Kofaktor ist molekularer Sauerstoff, dessen Anwesenheit die Aktivität der NOS bestimmt⁶.

Im menschlichen Organismus stellt NO ein wichtiges Signalmolekül dar. Beispielsweise spielt das von der endothelialen NOS kontinuierlich gebildete NO eine wichtige Rolle bei der Regulation und Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Dabei fungiert NO als Vasodilatator^{7,8} und inhibiert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen⁹. Neben der Beteiligung von NO an der Neurotransmission^{10,11} und Immunabwehr¹²⁻¹⁴, hemmt es ebenfalls die Aggregation von Thrombozyten^{15,16}, inaktiviert Leukozyten und kontrolliert somit deren Adhäsion¹⁷.

Dabei ergeben sich die meisten Effekte von NO aus der Interaktion mit der Hämgruppe der löslichen Guanylatcyclase, welche zu einem Anstieg zyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP), führt¹⁸. cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G.

NO ist in der Lage an die O₂-Bindungsstelle der Cytochrom c-Oxidase zu binden. Durch diese Tatsache ist es NO schon in nanomolaren Konzentrationen möglich die Cytochrom c-Oxidase zu inhibieren und so die mitochondriale Atmungskette zu beeinflussen¹⁹⁻²¹.

NO stellt ein Radikal dar, welches sowohl mit molekularem Sauerstoff über einen 1-Elektron-Transfer zum Nitrosoniumkation (NO⁺) oxidiert, als auch zum Nitrosylanion (NO⁻) reduziert werden kann. Anschließend reagieren das NO⁺ und das NO⁻ weiter zu höher oxidierten Stickoxiden wie NO₂⁻ oder N₂O₃, wobei das dabei entstehende Hauptoxidationsprodukt Nitrit ist, welches wiederum zum stabileren Nitrat weiter oxidiert²².

Die Reaktion von NO mit oxygenierten Hämproteinen wie Hämoglobin und Myoglobin ist ein zusätzlicher Weg zur Inaktivierung von NO, wobei die Reaktion mit Myoglobin unter der Bildung von Metmyoglobin (MbFe(III)) und Nitrat (NO₃⁻) mit NO abläuft²³. Hierbei spielt die assoziierte Metmyoglobinreduktase eine wichtige Rolle. Sie ist in der Lage das entstandene Metmyoglobin wieder in den O₂-bindungsfähigen Zustand zurückzuführen^{24,25}.

Allerdings ist zu beachten, dass die Kinetik der Oxidation bzw. Autooxidation des NO von der Konzentration des jeweiligen Reaktionspartners bestimmt wird²⁶.

1.2 Der Nitrat-Nitrit-NO Stoffwechsel

Bisher wurde das Nitritanion (NO₂⁻) als inertes Abbauprodukt von NO angesehen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Nitrit entgegen bisheriger Annahmen wieder zu Stickstoffmonoxid reduziert werden kann. Aufgrund dessen stellt Nitrit sowohl einen endokrinen, bioverfügbaren NO-Pool, als auch eine Gewebsspeicherform von bioaktivem NO dar²⁷⁻³⁰. Der plasmatische Nitritspiegel steht in einem engen Verhältnis zur endogenen Produktion von

NO, da Nitrit das Hauptoxidiationsprodukt von NO ist. Der im menschlichem Organismus physiologisch vorliegende plasmatische Nitritspiegel entsteht in etwa zu 70% durch die Oxidation von NO³¹, wobei die Konzentration von Nitrit im Plasma unter 1 µM und im Gewebe bei 1-20 µM³²⁻³⁷ liegt.

Neben der Oxidation endothelial gebildeten NOs beeinflusst auch die Nahrungsaufnahme die plasmatische Konzentration von Nitrit³⁸. In diesem Zusammenhang muss man zwischen der direkten Aufnahme von Nitrit und der gastrointestinalen Reduktion von Nitrat unterscheiden, da etwa 10% des oral zugeführten Nitrats durch Bakterien im menschlichen Speichel zu Nitrit reduziert werden kann und dieses zu einer deutlichen Steigerung der Konzentration von Nitrit im Blut führt³⁸⁻⁴². Dieser Mechanismus gewinnt dadurch an besonderer Bedeutung, dass Nitrat und Nitrit in relativ hoher Konzentration in grünem Gemüse und gepökelten Nahrungsmitteln vorhanden ist und damit Bestandteil der täglichen Ernährung ist.

Unter Anwesenheit von Sauerstoff oxidiert Nitrit, als Hauptoxidiationsprodukt von NO, im Blut zum stabileren Nitrat (Abb. 1)²².

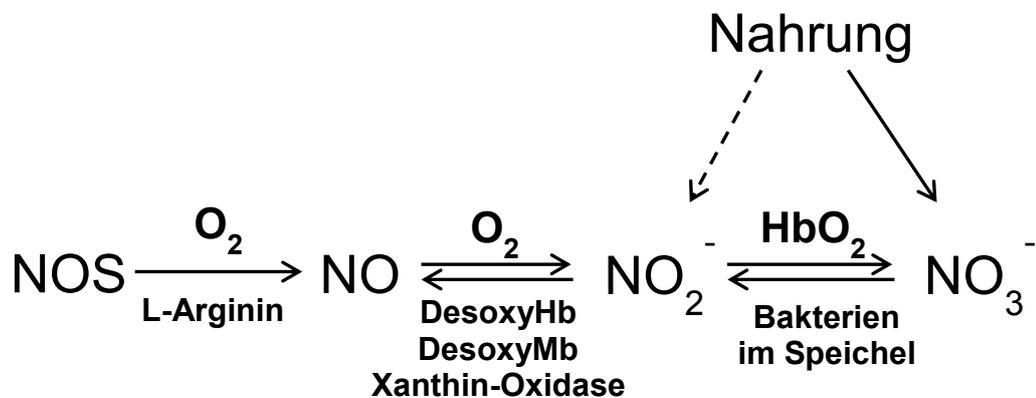


Abbildung 1
Produktion und Abbau des Nitrits (Modifiziert nach Lundberg⁴³)

Der Kofaktor Sauerstoff ist essentiell für die Funktion der NOS. Fehlt dieser z.B. bei Ischämie und Hypoxie, so findet die NO-Produktion bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck und Azidose nicht mehr enzymatisch über die NO-Synthase statt. Desoxygeniertes Hämoglobin und Myoglobin sind in der Lage Nitrit entlang des physiologischen Sauerstoffgradienten zu NO zu

reduzieren und damit unter Hypoxie die verminderte Aktivität der NOS auszugleichen^{27,28,30,44}. Diese Funktion verdeutlicht die ambivalenten Eigenschaften von Myoglobin und Hämoglobin. Unter normoxischen Bedingungen bauen sie NO ab, wobei sie unter hypoxischen Bedingungen an der Produktion von NO beteiligt sind. Diese Eigenschaften des desoxygenierten Myoglobins sind entscheidend für den von Hendgen-Cotta et al. beschriebenen kardioprotektiven Effekt von Nitrit unter Ischämie und anschließender Reperfusion⁴⁴. Bei der Reaktion von Myoglobin mit Nitrit entsteht MbFe(III). Die Metmyoglobinreduktase katalysiert anschließend die Reaktion von MbFe(III) zu seinem nitritreduzierenden Zustand Fe(II)^{24,25}.

Neben der enzymatischen NO-Bildung durch die NO-Synthase gibt es mehrere Möglichkeiten einer nicht-enzymatischen Bildung von NO. Eine dieser Möglichkeiten stellt die Bildung von NO über die Reduktion von desoxygeniertem Hämoglobin und Myoglobin dar. Einen weiteren Weg beschreibt die chemische Reduktion bei einem azidischen pH-Wert^{30,45,46}. Vor allem im Magen, bei einem pH-Wert von annähernd 1 findet diese Reaktion statt, wobei Nitrit zu salpetriger Säure reagiert und anschließend NO abgespalten wird.

Des Weiteren sind sowohl die mitochondriale Cytochrom c-Oxidase⁴⁷, als auch die Xanthinoxidoreduktase⁴⁸, welche hauptsächlich im Endothel von Koronargefäßen zu finden ist⁴⁹ in der Lage NO zu bilden.

1.3 Herkunft und Funktion zirkulierender angiogener Zellen

Lange Zeit ging man davon aus, dass das Endothel eine inerte Zellschicht der Blutgefäße sei. 1980 konnten allerdings Furchgott und Zawadzki diese Annahme widerlegen, indem sie autokrine und parakrine Funktionen des Endothels, sowie die essentielle Rolle dessen bei der Regulation des Gefäßtonus nachwiesen⁵⁰. Das Endothel ist konstant sowohl chemischen, als auch mechanischen Kräften ausgesetzt, welche zu Desquamation von Endothelzellen führen⁵¹. Deswegen sind auch beim gesunden Menschen effektive Reparationsmechanismen notwendig. Die Regeneration verletzten Endothels wurde lange Zeit der Migration und Proliferation von lokal ausgereiften Endothelzellen zugeschrieben⁵². Asahara et al. war allerdings 1997 in der Lage zu zeigen, dass auch dem Knochenmark entstammende

zirkulierende angiogene Zellen (ehemals EPC = Endotheliale Progenitorzellen) einen entscheidenden Einfluss auf die endotheliale Regeneration haben⁵³. Enddifferenzierte Endothelzellen sind in ihrer regenerativen Potenz limitiert, wohingegen zirkulierende angiogene Zellen zu den Gefäßläsionen gelangen wo sie benötigt werden, dort proliferieren und zu Endothelzellen differenzieren^{54,55}. Dies geschieht mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und Zytokinen welche vom verletzten Endothel und Gewebe sezerniert werden⁵⁶. Des Weiteren sind zirkulierende angiogene Zellen (CAC) selbst in der Lage parakrine Funktionen auszuüben, indem sie vaskuläre Wachstumshormone ausschütten⁵⁷. Als Konsequenz führt eine Reduktion der CAC-Anzahl und -Funktion zu einer eingeschränkten Reendothelialisierung und Endothelfunktion⁵⁸.

Zirkulierende angiogene Zellen stellen eine kleine Subpopulation der mononukleären Zellen im peripheren Blut dar⁵⁹. Sie stammen von adulten Stammzellen des Knochenmarks ab und differenzieren über hämatopoetische Stammzellen zu hämatopoetischen Progenitorzellen weiter zu zirkulierenden angiogenen Zellen (Abb. 2)⁶⁰.

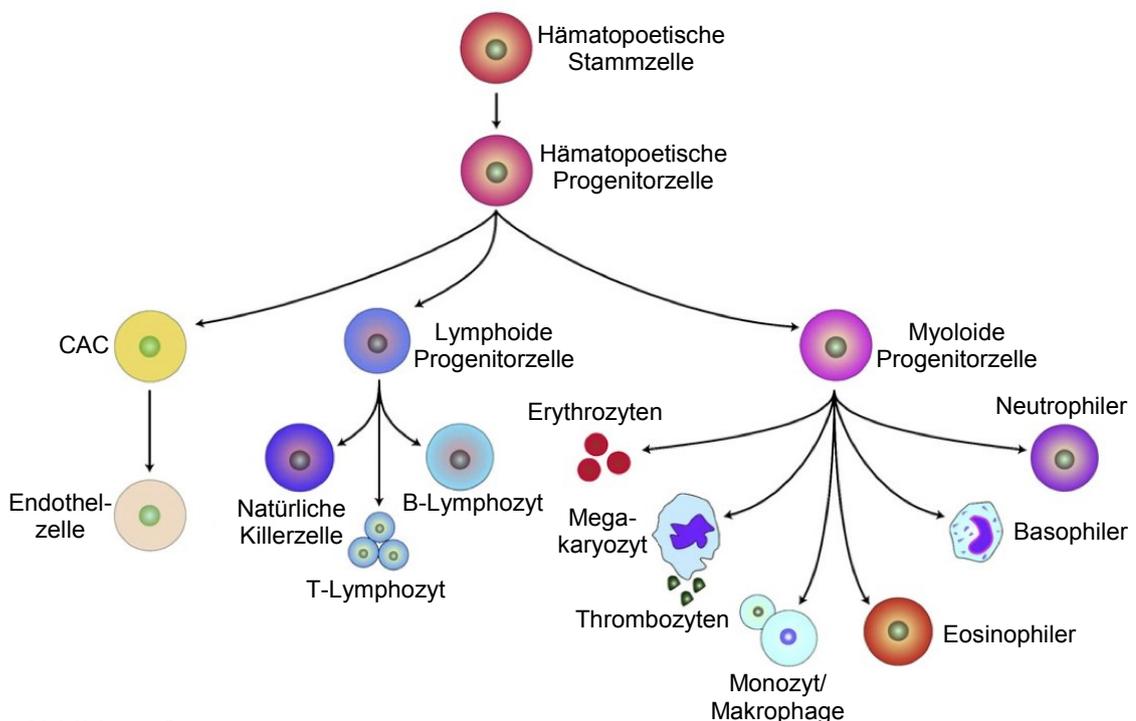


Abbildung 2

Stammzellen des Knochenmarks und ihre Differenzierung. Endothelzellen stammen von adulten Stammzellen des Knochenmarks ab. Die Differenzierung läuft über die hämatopoetische Stammzelle weiter zur hämatopoetischen Progenitorzelle und zirkulierenden angiogenen Zelle (CAC) letztendlich zur Endothelzelle ab. (Modifiziert nach Domen⁶⁰)

Im Knochenmark machen sie in etwa 0,02% der Zellen aus⁶¹. Klassische Marker zirkulierender angiogener Zellen stellen zum einen die Oberflächenproteine CD34 und CD133 dar, welche vor allem für hämatopoetische Stammzellen charakteristisch sind, sowie das für Endothelzellen spezifische Rezeptorprotein VEGF-R2 (KDR)^{62,63}.

Diese Marker sind essentiell für die Quantifizierung zirkulierender angiogener Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse). Eine weitere etablierte Methode sowohl zur Quantifizierung, als auch zur Funktionsanalyse von CAC ist der Colony Forming Unit-Assay (CFU-Assay) nach Hill⁶⁴.

Nach der Entdeckung der CAC konnten eine Reihe von Studien zeigen, dass die zirkulierenden angiogenen Zellen nicht nur einen positiven Einfluss auf die Regeneration von Gefäßläsionen haben, sondern sich positiv auf eine Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen auswirken wie z.B. myokardiale Ischämie/Reperfusionsschäden, Wundheilung, Atherosklerose und Extremitätenischämie⁶⁵⁻⁶⁹. Im Gegenzug sind kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes, Atherosklerose oder auch das Alter mit einer eingeschränkten Funktion und reduzierten Anzahl von CAC assoziiert und mit einer Dysfunktion des Endothels verbunden⁷⁰⁻⁷³. In diesem Zusammenhang war es Werner et al. möglich die Anzahl der im Blut zirkulierenden angiogenen Zellen als prognostischen Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen zu etablieren⁷⁴.

Eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflussen die Anzahl und Funktion von zirkulierenden angiogenen Zellen. Hierbei gibt es sowohl positive Einflüsse auf CAC, welche die Mobilisierung, Migration, Proliferation und Funktion steigern, als auch negative Einflüsse.

Als positive Faktoren sind Hormone wie Östrogen^{75,76}, Statine⁷⁷, sportliche Aktivität⁷⁸⁻⁸⁰, Gemüse⁸¹, Rotwein⁸², grüner Tee⁸³ und Zigarettenkarenz⁸⁴ zu nennen⁸⁵ (Abb. 3).

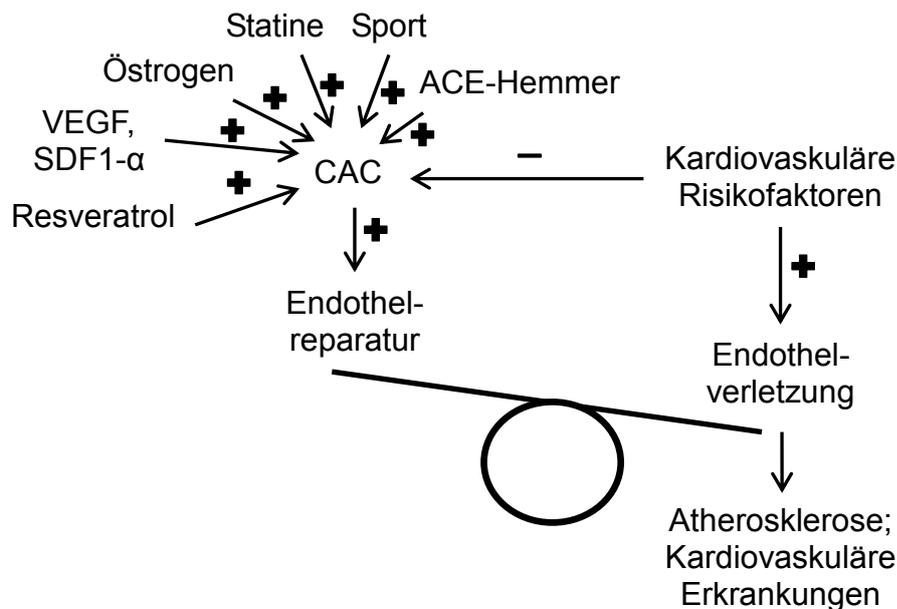


Abbildung 3

Gleichgewicht zwischen Endothelreparatur und Endothelverletzung. Endothelverletzungen können zu Atherosklerose und anderen kardiovaskulären Erkrankungen führen. Die Endothelreparatur wird von CAC positiv beeinflusst, welche wiederum von einer Reihe von Faktoren beeinflusst werden (Modifiziert nach Umemura⁸⁶).

1.4 Rolle von NO auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen

Zirkulierende angiogene Zellen stammen aus dem Knochenmark. Die Mobilisierung der CAC wird mittels einer Reihe von Zytokinen aktiviert. In ischämischem bzw. hypoxischem Gewebe werden von Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen Zytokine wie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) in das Blut sezerniert^{87,88}. Diese Faktoren aktivieren die eNOS und führen somit zu einer Erhöhung des NO-Spiegels. Dieser erhöhte NO-Spiegel scheint essentiell für die Mobilisierung von CAC zu sein⁸⁹. In einem weiteren Schritt wird die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) aktiviert. MMP9 ist im Knochenmark für das Lösen des zunächst membrangebundenen Kit-Liganden zum löslichen Kit-Liganden verantwortlich. Die Aktivierung der MMP9 ist dabei NO abhängig⁹⁰. Der lösliche Kit-Ligand wiederum interagiert mit dem cKit-Rezeptor der CAC. Diese Interaktion zwischen löslichem Kit-Liganden und cKit-Rezeptor der CAC führt letztendlich zur Mobilisierung der zirkulierenden angiogenen Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (Abb. 4)^{91,92}. SDF-1 α hat neben der Mobilisierung von CAC eine weitere entscheidende Rolle beim "Homing" der im

peripheren Blut zirkulierenden angiogenen Zellen. Durch die Interaktion von SDF-1 α mit dem von CAC exprimierten Rezeptor CXCR4 sind die Zellen in der Lage an den Ort ihrer Bestimmung zu gelangen⁹³. Studien waren in der Lage zu zeigen, dass die positiven Effekte von Statinen, Wachstumshormonen (Growth Hormone), Östrogen, Resveratrol, L-Arginin, Clopidogrel und Sport auf die Mobilisierung und Funktion von CAC ohne Ausnahme NO abhängig sind^{63,94-103}. Diese Beobachtung unterstreicht die Tatsache, dass der NOS-Hemmer asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), sowohl die Aktivität der eNOS, als auch die Funktion der CAC hemmt¹⁰⁴⁻¹⁰⁷.

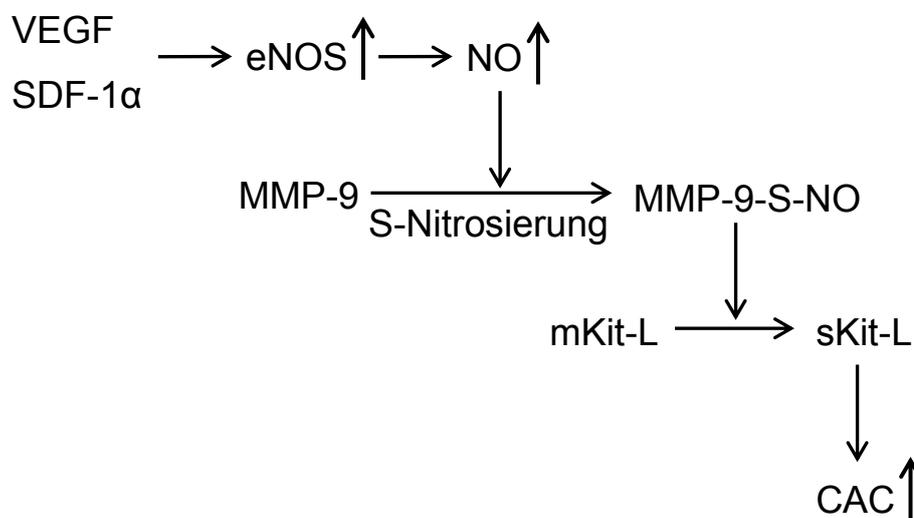


Abbildung 4

Kaskade zur Mobilisierung von CAC. Aufgrund der Aktivierung der eNOS durch VEGF und SDF-1 α steigt die Konzentration von NO im Plasma. NO ist wiederum in der Lage durch eine S-Nitrosierung MMP9 zu aktivieren, welches den membrangebundenen Kit-Liganden (mKit-L) löst. Der nun lösliche Kit-Ligand (sKit-L) aktiviert die Mobilisierung von CAC durch die Interaktion mit dem cKit-Rezeptor (Modifiziert nach Heissig⁹¹).

1.5 Zielsetzung

Aufgrund des dargelegten Stands der Forschung werden mit der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen verfolgt:

1. Welche Auswirkungen hat oral aufgenommenes Nitrat auf die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma?
2. Welchen Einfluss hat oral aufgenommenes Nitrat auf die Endothelfunktion?
3. Welche Effekte hat oral aufgenommenes Nitrat auf die Funktion und Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut?
4. Beeinflusst oral aufgenommenes Nitrat die Konzentration von Zytokinen im Plasma?

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen, Gase

AMD 3100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumine, Bovin Fraction V Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
BD FACS Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Carrierlösung	Eicom, Kyoto, Japan
CD133/1 (AC133)-PE, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD34-PE, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
cPTIO	Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA
ddH ₂ O	Millipore, Schwalbach
Dulbeccos PBS without Ca & Mg	PAA Laboratories, Pasching
Essigsäure (CH ₃ COOH) 100%	Roth, Karlsruhe
FITC Rat anti-Mouse CD34	BD Biosciences, Heidelberg
Glyceroltrinitrat	GTN, Spray, Nitrolingual N, Pohl, Germany
Helium 5.0	Linde, Pullach
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Human CXCR4 FITC Mab	R&D Systems, Wiesbaden
Human VEGF R2/KDR APC Mab	R&D Systems, Wiesbaden
Isofluran (C ₃ H ₂ ClF ₅ O)	Forene®, Abbott, Wiesbaden
Jod (I ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumiodid (KI)	Merck, Darmstadt
Methanol HiPerSolv CHROMANORM 100%	VWR, Darmstadt
Mouse IgG1 APC Isotype Control	R&D Systems, Wiesbaden
Mouse IgG2A FITC Isotype Control	R&D Systems, Wiesbaden

Mouse IgG2a-PE, Isotype	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrat (NaNO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nitrat/Nitrit-Standard	Eicom, Kyoto, Japan
PE Rat Anti-Mouse Flk-1	BD Biosciences, Heidelberg
Purified Human IgG	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionslösung	Eicom, Kyoto
Salzsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt
2.2 Verbrauchsmaterialien	
BD Discardit 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Omnican Insulinspritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Coagulation (Citrat) S-Monovette 3 ml	Sarstedt, Sarstedt
EDTA K S-Monovette 2,7 ml	Sarstedt, Sarstedt
Eppendorf-Reaktionsgefäße 2ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
FACS Reagenzröhrchen (Polystyrol)	Sarstedt, Sarstedt
Glasfritte	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Glas-Reaktionsgefäß	Verhees, Neuss
Human CXCL12/SDF-1 alpha Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Human SCF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Human Total MMP-9 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Human VEGF Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Safety-Multifly-Set	Sarstedt, Sarstedt
Serum-Gel S-Monovette 4,9 ml	Sarstedt, Sarstedt
Spritze, gasdicht	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Zentrifugenröhrchen (Greiner) 15 ml, 50 ml

Greiner bio-one,
Frickenhausen

2.3 Geräte

BD FACSDiva Software

BD Biosciences,
Heidelberg

Brachial Analyse

Medical Imaging
Applications, Iowa City,
Iowa, USA

Chromstar Version 6.2

Software für
Chromatographie
und Prozessanalytik
GmbH, Weyhe-Leeste

CLD-Detektor Typ CLD 88 NO e

Eco Physics, Schweiz

Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Canto

BD Biosciences,
Heidelberg

HPLC/ENO

ENO 20, Eicom, Kyoto

Ultraschallgerät (12MHz Linear Array transducer)

Vivid I, Philipps,
Niederlande

Zentrifugen

Hettich, Tuttlingen

2.4 Bestimmung von Nitrat im Plasma mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Bestimmung der Konzentration an Nitrat im Blutplasma wurde die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem Gieß-System (ENO 20, Eicom, Kyoto) verwendet. Dieses System beruht auf der Reaktion von Gießreagenz mit Nitrit, welches zu einem Farbumschlag führt, der mittels eines Detektors durchflussspektrophotometrisch bestimmt werden kann. Die dabei detektierte Wellenlänge beträgt 540 nm.

Die Anlage bestand aus einer Vorsäule, Auftrennungssäule, Reduktionssäule, einer Reaktionslösung mit Gießreagenz und einem 540nm Detektor (Abb. 5). Die Vorsäule diente zum Schutz des Systems vor nicht gefällten Proteinen der Probe.

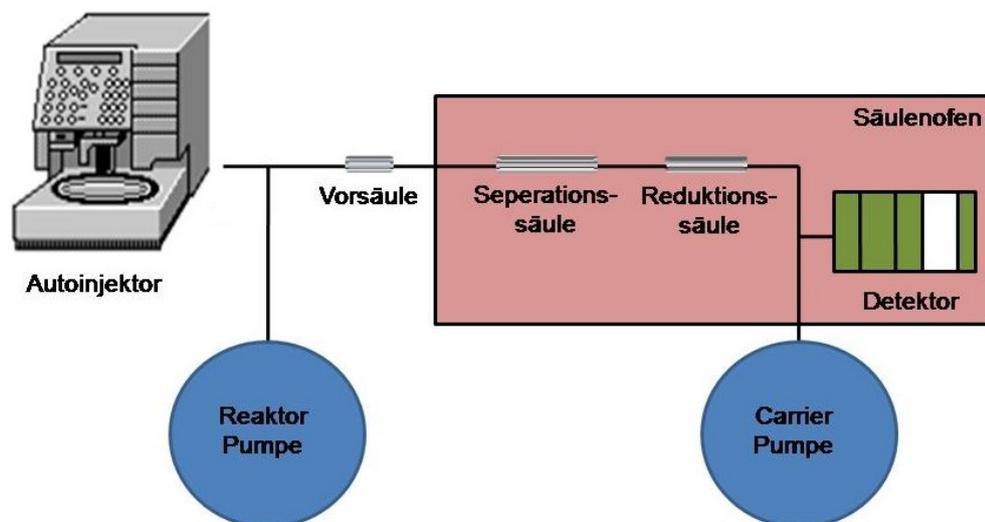


Abbildung 5

Schematischer Aufbau der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie Anlage mit angeschlossenem Gieß-System zur Bestimmung von Nitrat im Plasma (Modifiziert nach Schulz¹⁰⁸ und Kleinbongard¹⁰⁹).

Nach Aufgabe von 10 µl des proteinfreien Plasmas wurden Nitrit und Nitrat mittels der Auftrennungssäule durch die Bindung an ein Polymer (Styrol-divinylbenzol-Harz) zeitlich aufgetrennt. Das Nitrat wurde dann durch die Reduktionssäule, welche aus Kadmium-reduziertem Kupfer bestand, zu Nitrit reduziert. Anschließend kam es zur Reaktion von Nitrit mit der Gießreagenz, welche aus 1% ortho-Phosphorsäure, 5 g/l Sulfanilamid und 0,248 g/l

N-(1-naphthyl)-Ethyldiamin bestand. Hierbei entstand eine violette Azo-Verbindung (Abb. 6), die mittels eines 540-nm Detektors gemessen wurde¹¹⁰.

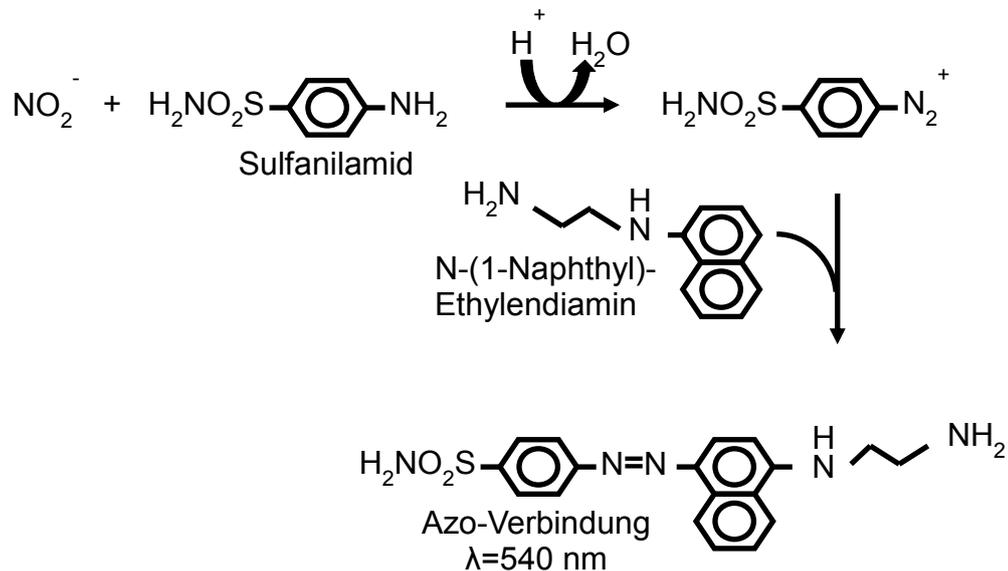


Abbildung 6

Reaktionsschema zur Bestimmung von Nitrit mittels Griessreagenz (Modifiziert nach Schulz¹⁰⁸ und Kleinbongard¹⁰⁹).

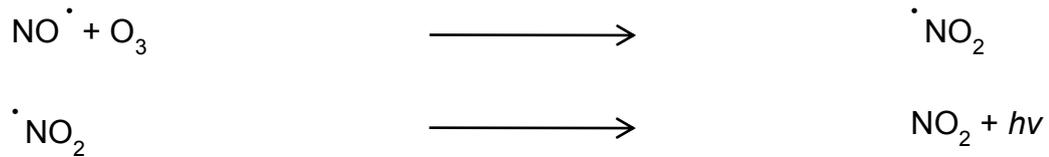
Der Säulenofen wies dabei eine konstante Temperatur von 40°C auf. Vor der Messung wurde das Gerät durch eine vom Hersteller mitgelieferte Nitrit / Nitrat Standardlösung geeicht. Die Auswertung erfolgte automatisch mittels der Software ChromStar (Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH, Weyhe-Leeste).

2.5 Bestimmung von Nitrit im Plasma mittels

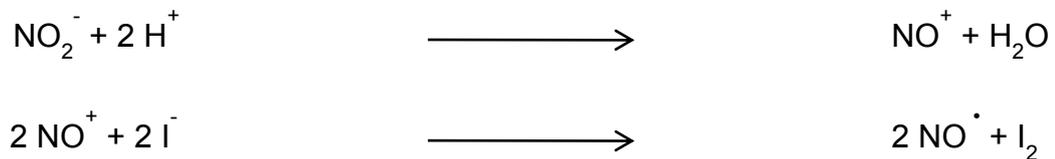
Chemilumineszenz-Detektion (CLD)

Zur Bestimmung von Nitrit im Plasma wurde die reduktive Gasphasen Chemilumineszenz-Detektion (CLD) genutzt.

Diese Methode besitzt für die Detektion von Stickstoffmonoxid sowohl eine hohe Sensitivität als auch Spezifität¹¹¹. Das zu Grunde liegende Prinzip beruht auf der Reaktion von NO mit Ozon, wobei stöchiometrisch Lichtquanten freigesetzt und mittels eines Chemilumineszenz-Detektors detektiert werden.



Zur Messung von Nitrit musste dieses zunächst zu NO reduziert werden. Dies geschah in einem dem Chemilumineszenz-Detektor vorgeschalteten Reaktionsgefäß mittels einer iodhaltig-reduktiven Reaktionslösung bestehend aus 45 mM Kaliumiodid und 10 mM Iod, gelöst in Essigsäure (Aufbau der reduktiven Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage s. Abb. 7). Die Reduktionslösung wurde konstant auf 60°C temperiert^{112,113}.



Das injizierte Volumen der Plasmaproben in das Reaktionsgefäß betrug 300 µl und wurde als Einfachbestimmung mit einer gasdichten Spritze aufgetragen. Als inertes Trägergas, welches das Reaktionsgefäß durchströmte, wurde Helium verwendet, da es nicht mit NO reagieren kann.

Nach dem Durchströmen des Reaktionsgefäßes wurde das gasförmige Proben-Helium-Gemisch auf 3°C gekühlt und mittels einer ebenfalls gekühlten NaOH-Falle, bestehend aus einer 1 M Natriumhydroxid-Lösung, von höheren Stickoxiden und niedermolekularen Proteinen befreit und zum Chemilumineszenz-Detektor geleitet (Abb. 7).

Zur Registrierung der Daten wurde die Software ChromStar auf einem handelsüblichen Computer verwendet.

Zur genauen Bestimmung der Konzentration von Nitrit in den Plasmaproben, fand die Aufgabe einer Nitrit-Eichreihe vor jeder Messung statt.

Die Stoffmenge stellte bei der Auswertung die Fläche unter der Kurve dar.

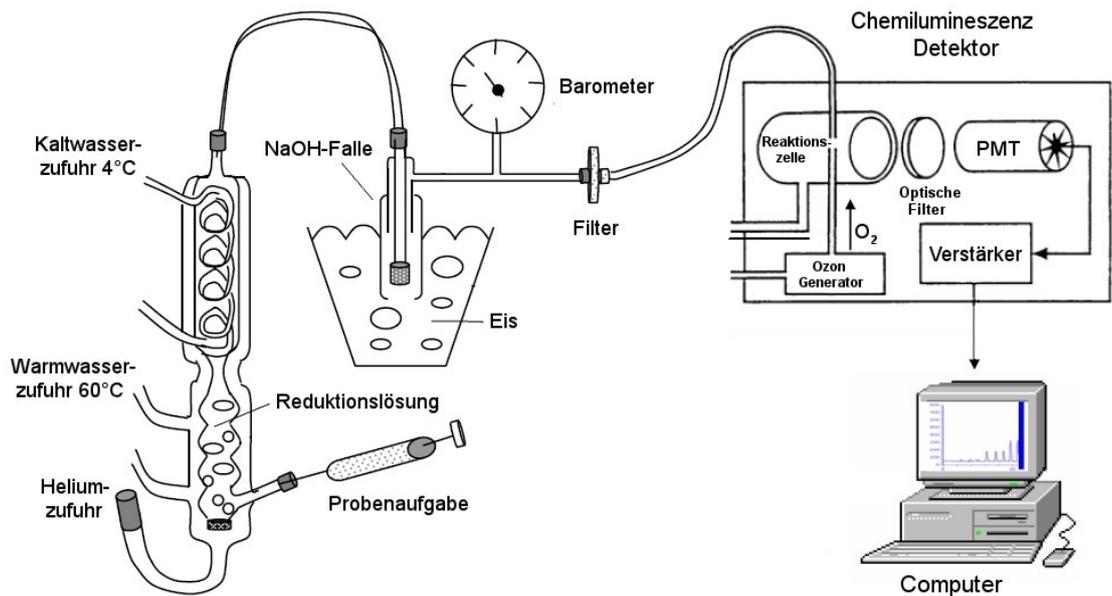


Abbildung 7

Schematischer Aufbau der verwendeten reduktiven Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage zur Bestimmung von Nitrit im Plasma. Zur Registrierung und Auswertung wurde die Software ChromStar auf einem handelsüblichen Computer verwendet (Modifiziert nach Feelisch¹¹² und Cox¹¹⁴).

2.6 Bestimmung der Endothelfunktion mittels Fluss-mediierter Dilatation (FMD)

Die Endothelfunktion wurde duplexsonographisch anhand der endothelabhängigen Vasodilatation untersucht. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Zunahme des Durchmessers der Brachialarterie durch die endogene endotheliale NO-Synthese unter einem gesteigertem Blutfluss-Volumen (Fluss-medierte Dilatation, FMD)^{115–118}.

Alle Untersuchungen wurden in einem auf 23°C klimatisiertem Raum durchgeführt. Die Probanden lagen vor der Messung 15 Minuten ruhig in Rückenlage zur Akklimatisierung. Anschließend erfolgte die Darstellung der Brachialarterie duplexsonographisch an der Oberarminnenseite kurz oberhalb der Fossa cubitalis longitudinal im B-Modus. Die Position des Schallkopfes wurde markiert und während des kompletten Versuches nicht mehr verändert.

Die Bestimmung des Durchmessers erfolgte dabei nicht invasiv mittels eines hochauflösenden Ultraschallgerätes, mit dem Aufnahmeschleifen von 5 Herzzyklen im B-Modus angefertigt wurden.

Nach der basalen Messung in Ruhe wurde zur Einleitung der Fluss-medierten Dilatation eine Blutdruckmanschette am Unterarm distal der Fossa cubitalis für

5 Minuten suprasystolisch aufgepumpt. Dieses führte zu einer Ischämie und damit verbundener Dilatation der stromabwärts gelegenen Widerstandsgefäße. Nach der anschließenden Druckentlastung entsteht nach kurzer Zeit ein sehr hoher Fluss in der Brachialarterie. Dieser erhöhte Fluss kommt aufgrund des nachfolgenden geringeren Widerstandes zustande. Des Weiteren waren die erhöhten Flussgeschwindigkeiten mit einer Steigerung der Scherkräfte verbunden. Diese wiederum führten zu einer erhöhten endothelialen NO-Freisetzung, welche eine Dilatation der Brachialarterie bewirkte. Das Maximum der Fluss-medierten Dilatation liegt bei etwa 75 Sekunden nach Druckentlastung, weshalb zu diesem Zeitpunkt eine weitere Bestimmung des Durchmessers, wie vorher beschrieben, stattfand. Eine zusätzliche Messung erfolgte nach 15 Minuten Ruhe.

Die endothelunabhängige Dilatation wurde 4 Minuten nach der sublingualen Gabe von 400 µg Glyceroltrinitrat (GTN) bestimmt, da vorherige Experimente zeigen konnten, dass der durch GTN gesteigerte Blutfluss in der Brachialarterie nicht signifikant ansteigt und der vasodilatative Effekt nicht flussmediert ist¹¹⁹.

Sowohl die endothelabhängige, als auch die endothelunabhängige Vasodilatation wurden als Prozent des Durchmesseranstieges im Vergleich zum Durchmesser unter Ruhe bestimmt.

Bei der Auswertung der gespeicherten Aufnahmeschleifen wurde die Software Brachial Analyse (Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) verwendet. Nach der Auswahl des zu untersuchenden Gefäßbereiches erfolgte die Erkennung und Markierung der Gefäßwände automatisch vom Programm. Hierbei dienten die vorderen und hinteren M-Linien, welche rechtwinklig zur Gefäßachse gewählt wurden als Referenzpunkte. Die echoärmeren M-Linien stellen dabei die Schicht zwischen Media und Adventitia dar. Zur Sicherheit wurden die vom Programm getätigten Markierungen nochmals manuell mit den Ultraschallbildern verglichen. In den Fällen, in denen die M-Linien nicht korrekt erkannt wurden, nahm man von der Möglichkeit Gebrauch die Grenzen manuell einzustellen. Die Errechnung des Durchmessers erfolgte dann synchron zur R-Welle aus 150 - 300 einzelnen Orientierungspunkten in dem vorher ausgewählten Gefäßbereich im Mittel.

2.7 Relative Quantifizierung zirkulierender angiogener Zellen mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS-Analyse)

Um den relativen Anteil der zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut zu bestimmen wurde die Durchflusszytometrie benutzt. FACS-Geräte messen gleichzeitig sowohl mehrere Fluoreszenzsignale, als auch Zellgröße und -granularität. Die CAC wurden in der lymphozytären und monozytären Fraktion bestimmt (Abb.8).

Um die Expression bestimmter Oberflächenproteine nachzuweisen, wurde die Fluoreszenz mit Fluorochromen konjugierter monoklonaler Antikörper gemessen. Hierbei kamen bei den humanen Proben zwei für CAC spezifische Färbungen zur Anwendung. In der ersten Färbung wurden alle für CD34 / KDR / CXCR4 dreifachpositiven Zellen gezählt¹²⁰. Die dabei verwendeten Fluorochrome waren Phycoerythrin (PE) für CD34, Allophycocyanin (APC) für KDR und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) für CXCR4.

Die zweite Färbung zählte alle doppeltpositiven Zellen für CD133 / KDR. Die Fluorochrome hierbei waren PE für CD133 und APC für KDR.

Sowohl PE, als auch FITC werden über einen 488 nm Laser, APC über einen 647 nm Laser angeregt. Um unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, wurden sowohl isotypische Immunglobuline mit den oben genannten Fluorochromen (Isotypenkontrollen) verwendet, als auch FMO-Kontrollen (Fluorescence-Minus-One) durchgeführt, indem man die Zellen mit allen Antikörpern, außer mit dem Marker mit der schwächsten Expression, markierte. Die Durchführung der FMO-Kontrollen diene als so genannte Gating-Kontrolle, um die Unterscheidung zwischen falsch und richtig positiven Zellen zu vereinfachen¹²¹. Die Quantifizierung der CAC erfolgte im Vollblut. Hierbei wurden 3 ml im Citratröhrchen abgenommenes Vollblut zunächst mit 10 ml Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen (300xg, 4°C, 7 Min.), daraufhin die Fc-Rezeptoren mittels 300 µl humanem IgG (1000 µg/ml) für 15 Minuten auf Eis geblockt und anschließend 100 µl des Blutes für 30 Minuten mit 10 µl der Antikörper spezifisch für CD34, KDR und CXCR4 (CD34: 2,2 µg/ml; VEGF-R2: 2,5 µg/ml; CXCR4: 10 µg/ml) bzw. CD133 (2,2 µg/ml) und KDR im Dunkeln auf Eis inkubiert.

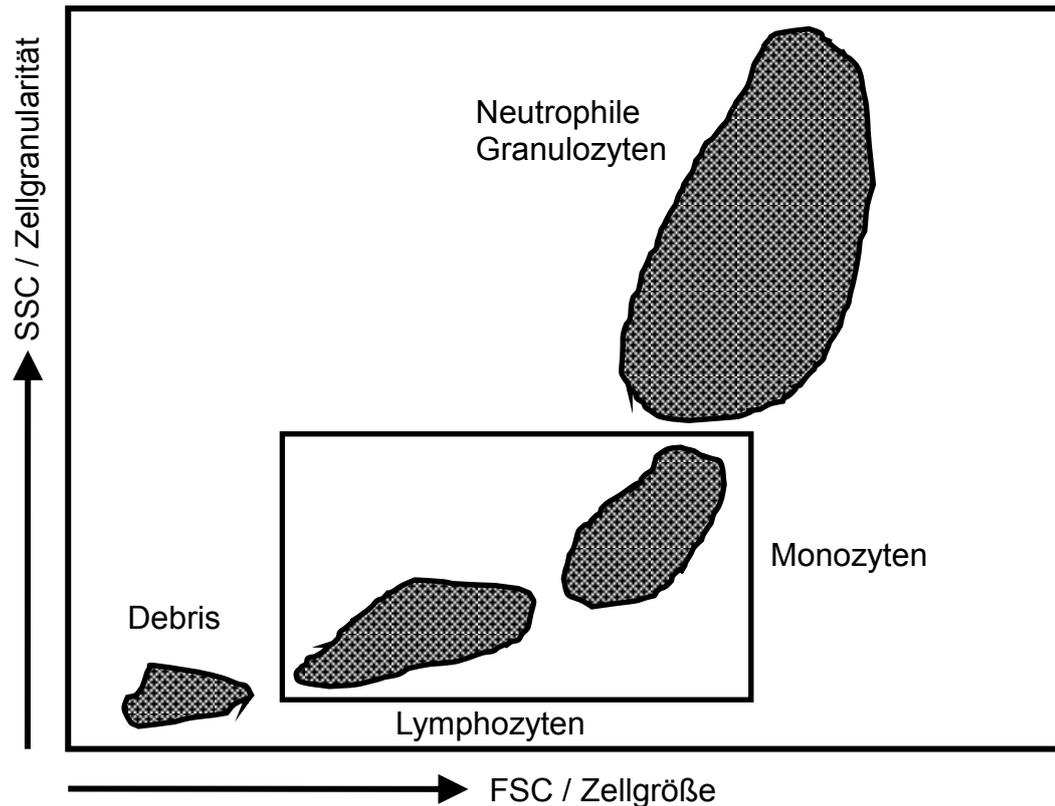


Abbildung 8

Schematische Darstellung eines FACS-Dotplots einer humanen Blutprobe. Auf der X-Achse ist die Zellgröße, auf der Y-Achse die Zellgranularität abgebildet. Die Bestimmung der CAC-Anzahl erfolgte in der lymphozytären und monozytären Fraktion. (Modifiziert nach Asahara⁶⁶)

Nach der Lyse der roten Blutzellen mittels FACS Lysing Solution für 10 Minuten im Dunkeln unter Raumtemperatur (RT) und einmaligem Waschen (300xg, RT, 5 Min.) mit FACS Puffer (PBS + 0,5% BSA) wurden die Proben bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt.

Die Proben wurden am selben Tag am Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Canto mittels der Software BD FACSDiva gemessen und hierbei 50000 Events im Lymphozyten + Monozyten Gate aufgenommen.

Die FMO-Kontrollen wurden nach dem gleichem Vorgehen gemessen. Als FMO-Kontrollen dienten die Antikörperkombinationen CD34 / CXCR4, CD34 / KDR und CXCR4 für die erste Färbung (Tab. 1).

Tabelle 1: Kombination der Antikörper für die erste Färbung und Kontrollen

	CD 34	KDR	CXCR4
1. Färbung	+	+	+
FMO 1	+	-	+
FMO 2	+	+	-
FMO 3	-	-	+

Die FMO-Kontrollen der zweiten Färbung waren CD133 und KDR (Tab. 2).

Tabelle 2: Kombination der Antikörper für die zweite Färbung und Kontrollen

	CD 133	KDR
2. Färbung	+	+
FMO 1	+	-
FMO 2	-	+

Bei den murinen Proben wurden 100 µl des heparinisierten Vollblutes für 30 Minuten mit 7,5 µl der Antikörper spezifisch für CD34 und Flk-1 (CD34: 0,5 mg/ml; Flk-1: 0,2 mg/ml) im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die dabei verwendeten Fluorochrome waren FITC für CD34 und PE für Flk-1. Anschließend wurde analog den humanen Proben verfahren. Die verwendeten FMO-Kontrollen bestanden jeweils aus der Färbung mit CD34 und der Färbung mit Flk-1.

2.8 Isolierung zirkulierender angiogener Zellen aus dem peripheren Blut und Bestimmung der Colony Forming Units (CFU)

Zur Isolierung der mononukleären Zellen wurde die Ficoll-Dichtezentrifugation¹²² verwendet. Dabei erfolgte die Durchführung aller Arbeitsschritte unter einer Flow Bench, um die Sterilität zu gewährleisten. Unter Raumtemperatur wurden hierbei 15 ml BioColl vorsichtig mit 25 ml heparinisiertem Vollblut überschichtet und anschließend einer 25 minütigen Zentrifugation bei 450xg und 25°C unterzogen. Unter der Zentrifugation erfolgte die Auftrennung der unterschiedlichen Blutbestandteile, wobei Erythrozyten und Granulozyten aufgrund der Aggregation mit der Polysaccharose der

BioColl-Lösung schneller sedimentieren. Die Schicht zwischen der Plasma- und der BioColl-Schicht wird Plasma-Biocoll-Zwischenphase genannt und beinhaltet die mononukleären Zellen (Abb. 9).

Die Überführung der BioColl-Zwischenphase erfolgte in ein Zentrifugenröhrchen mittels einer Einmalspritze und einer Einmalkanüle. Vor der 10 minütigen Zentrifugation bei 450xg und 4°C wurde das Zentrifugenröhrchen mit EDTA / PBS (5 mmol/l EDTA in PBS) auf 50 ml aufgefüllt. Mit dem Ziel noch vorhandene Thrombozyten zu beseitigen wurde im Anschluss der Überstand vorsichtig verworfen und das zurückgebliebene Pellet in EDTA/PBS resuspendiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 300xg für 10 Minuten unter 4°C.

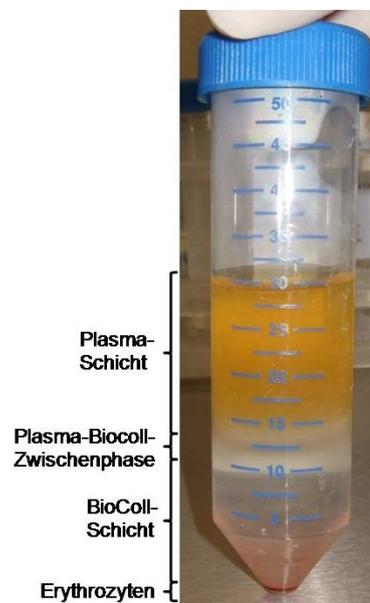


Abbildung 9

Auftrennung des Blutes mittels Ficoll-Dichtezentrifugation in seine Bestandteile.

Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt und die nun isolierten Zellen mittels Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 8 Minuten auf Eis gelagert. Dieser Schritt diente der Lyse noch vorhandener restlicher Erythrozyten. Das nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 300xg und 4°C gewonnene Zellpellet wurde in auf 37°C erwärmten EndoCult Liquid Medium resuspendiert, welches zur Vermeidung von bakteriellen Infektionen mit einer Mischung aus Penicillin-Streptomycin supplementiert wurde. Bei der Durchführung des von Hill et al⁶⁴ beschriebenen Colony Forming Unit Assays

für zirkulierende angiogene Zellen, kam das speziell hierfür entwickelte EndoCult Liquid Medium zur Anwendung. Das EndoCult Liquid Medium fördert insbesondere das Wachstum und die Vermehrung der CFU-Hill Kolonien. Dieser standardisierte Versuch über fünf Tage unterstützt nicht das Wachstum enddifferenzierter Endothelzellen. Die sich bildenden Kolonien sind als zentral runde Zellen mit elongierten spindelförmigen Zellen in der Peripherie zu erkennen (Abb. 10).

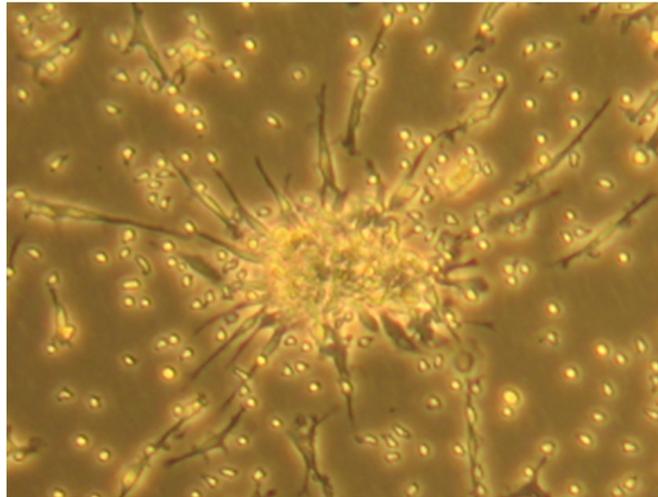


Abbildung 10

CFU-Hill Kolonie unter dem Lichtmikroskop nach fünftägiger Kultur. Zentral sind runde, in der Peripherie elongierte spindelförmige Zellen zu erkennen.

Zur Kultivierung der Zellen wurde eine 6 Well Platte verwendet, wobei 5×10^6 Zellen/Well ausgesät wurden. Die Bestimmung der Anzahl der mononukleären Zellen in der Suspension erfolgte mittels eines Lichtmikroskops unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer, wobei die Probe vor dem Zählen, um tote Zellen auszuschließen, mit Trypanblau gefärbt wurde. Jedes Experiment wurde in Duplikaten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte nach zweitägiger Inkubation im CO₂-Inkubator die Überführung des Überstands in separate Zentrifugenröhrchen, um adhärenente Zellen zu entfernen. Nach erneuter Zellzahlbestimmung wurden 1×10^6 Zellen/Well in 1 ml frischem Medium auf vorher mit Fibronectin beschichteten 24 Well Platten in Duplikaten überführt und anschließend für weitere 3 Tage im CO₂-Inkubator kultiviert. Nach insgesamt 5 Tagen in Kultur fand die Fixierung und Färbung der Zellen statt, indem das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 1 ml PBS

gewaschen wurden. Nach erneutem Absaugen wurden die Zellen zur Fixierung 3 Minuten in 300 μ l/Well Methanol inkubiert und anschließend mittels 300 μ l/Well Giemsa-Lösung (Verdünnung von 1/20 in ddH₂O) gefärbt. Nach erneuter 3 minütiger Inkubation wurde die Giemsa-Lösung abgesaugt und die Wells vorsichtig mit PBS gespült, bis sich die Kolonien vom Hintergrund abgrenzen ließen. Zur Auszählung der Kolonien kam ein Lichtmikroskop mit einem 10x Objektiv zur Anwendung.

2.9 Bestimmung der Konzentration von Zytokinen im Plasma mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die Konzentrationen von VEGF, MMP9, SDF1- α und Stem cell factor (SCF) im Plasma zu bestimmen, wurden quantitative nach dem "Sandwichprinzip" aufgebaute ELISAs verwendet. Eine 96-well Platte war dabei mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für das zu bestimmende Protein vorbeschichtet (Abb. 11). Die verwendeten Quantikine® Kits enthielten die mit dem spezifischen Antikörper vorbeschichtete 96-well Platte, den für die Eichreihe benötigten Standard, eine Verdünnungslösung, einen Waschpuffer, eine Substratlösung, eine Stopplösung und eine Konjugatlösung bestehend aus spezifischen enzymgebundenen polyklonalen Antikörpern.

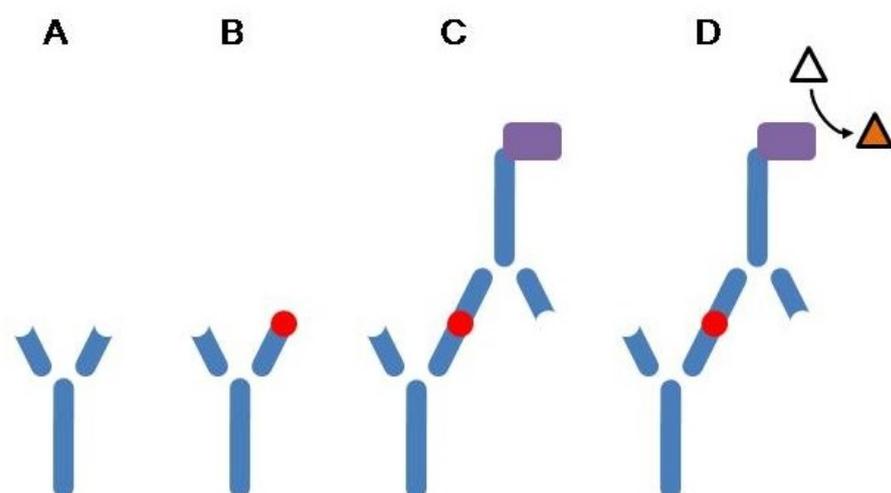


Abbildung 11
Schematische Darstellung eines Enzyme-Linked Immunosorbent Assays nach dem "Sandwichprinzip". (roter Punkt: Antigen; lila Viereck: Enzym; weißes Dreieck: Substrat; oranges Dreieck: Farbe) (Modifiziert nach Janeway¹²³)

Zunächst wurden 100 µl der Verdünnungslösung in jedes Well vorgelegt. Anschließend erfolgte die Aufgabe der Proben in die Wells, wobei das zu bestimmende Protein an die unbeweglichen Antikörper im Well band. Nach einer zweistündigen Inkubation auf dem Rüttler folgten vier Waschschriffe mit 400 µl des Waschpuffers.

Im Anschluss wurden 200 µl der Konjugatlösung in die Wells gegeben, worauf weitere zwei Stunden Inkubationszeit auf dem Rüttler folgten. Hierbei band der enzymkonjugierte polyklonale Antikörper an das Protein, welches in den Wells verblieben war. Anschließend fanden wiederum vier Waschschriffe mit dem Waschpuffer statt, um ungebundene Antikörper zu entfernen, bevor 200 µl der Substratlösung in die Wells pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert wurden. Das Substrat wurde dabei von dem Enzym in Farbe umgesetzt, die proportional zu dem Anfangs gebundenen Proteinanteil war. Nach dem Stoppen der Reaktion mittels der Stopplösung erfolgte die Messung der Absorption am Plattenphotometer bei 450 nm mit einer Korrekturwellenlänge von 540 nm. Die Konzentration wurde mit Hilfe einer ebenfalls aufgetragenen Eichreihe errechnet.

Als Proben wurden für alle ELISAs thrombozytenfreies Plasma verwendet.

Für die Bestimmung von MMP-9 und SCF wurde das Plasma vor der Aufgabe mit der im Kit enthaltenen Verdünnungslösung verdünnt (MMP-9: 1:40; SCF: 1:2). Die Bestimmung von SDF1- α und VEGF erfolgte aus unverdünntem Plasma.

2.10 Blutabnahme

Die Blutentnahme beim humanen Studienkollektiv erfolgte aus der Vena cubiti mittels eines Safety-Multifly-Sets unter Vermeidung einer Hämolyse. Zu jedem Abnahmezeitpunkt erfolgte die Entnahme von Vollblut. Dabei wurden pro Zeitpunkt 15 ml Vollblut zur Bestimmung der Konzentrationen von Nitrat, Nitrit, VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF im Plasma benötigt. Zur Erfassung der Anzahl zirkulierender angiogener Zellen mittels FACS Messung wurde das Vollblut mit Hilfe einer Citrat-Monovette abgenommen. Die Blutentnahmen für das Basislabor (Differential Blutbild, Kreatinin, C-reatives Protein, Glukose,

Triglyzeride, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin) fanden mittels einer EDTA-Monovette und einer Serum-Gel-Monovette statt.

Beim murinen Studienkollektiv erfolgte die Blutgewinnung transthorakal direkt aus dem Herzen mittels Omnican Insulinspritzen bei gleichzeitiger Isofluran-Anästhesie. Die Mäuse wurden 10 Minuten vor der Abnahme mit intraperitoneal appliziertem Heparin (1000 IE) antikoaguliert.

2.11 Probenaufarbeitung

Die 15 ml humanes Vollblut wurden umgehend in ein mit Heparin vorgelegtes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 800xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile vom Plasma abzutrennen. Der Plasmaüberstand wurde auf Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert.

Die Bestimmung von Nitrit im Plasma erfolgte unmittelbar durch Aufgabe von 400 µl des Plasmaüberstandes mittels Chemilumineszenz-Detektion (CLD).

Für die Messung von Nitrat, VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF mussten weitere Schritte zur Aufreinigung des Plasmas erfolgen (Abb. 12).

Zur Messung von Nitrat wurden 500 µl Plasma zur Fällung der Proteine 1:1 mit Methanol verdünnt und anschließend bei 14000xg und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der proteinfreie Plasmaüberstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bis zur späteren Messung bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung von VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF erfolgte aus thrombozytenfreiem Plasma. Hierfür wurden 2 ml Plasma bei 10000xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden jeweils 400 µl thrombozytenfreier Plasmaüberstand auf Eppis aliquotiert und bis zur späteren Messung bei -80°C gelagert.

Die Aufbereitung der murinen Blutproben zur Messung von Nitrat und Nitrit im Plasma fand analog dem humanen Protokoll statt.

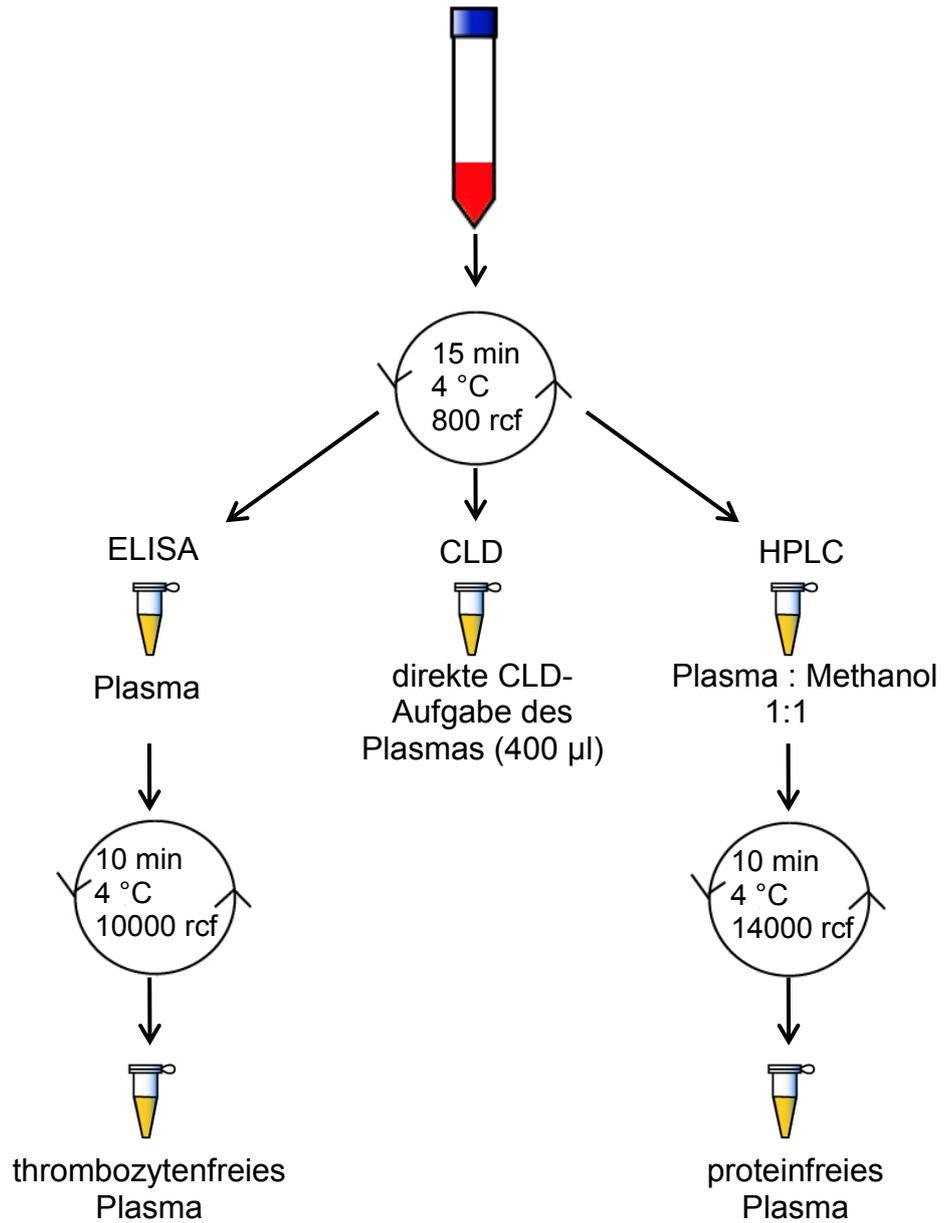


Abbildung 12

Schematischer Ablauf der weiteren Blutverarbeitung für die einzelnen Assays nach der Abnahme aus der Vena cubiti. (ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; CLD: Chemilumineszenz-Detektion; HPLC: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie; min: Minuten; °C: Grad Celsius; rcf: relative Zentrifugalbeschleunigung)

2.12 Humane Studienkollektive und Studienprotokolle

Bei der durchgeführten Humanstudie handelte es sich um eine randomisierte, placebokontrollierte Studie im cross-over Aufbau (Studiennummer ClinicalTrials.gov: NCT01262521; Ethikvotum RWTH-Aachen: EK 089/07). Die Studie bestand dabei aus zwei Teilen (Abb. 13).

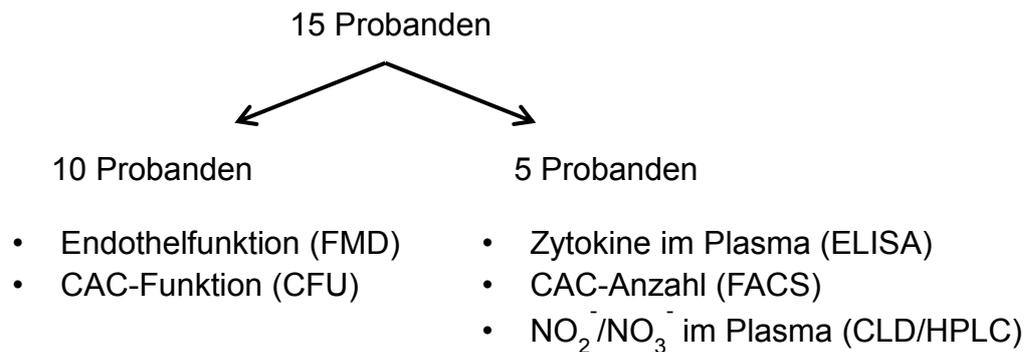


Abbildung 13

Übersicht über die Aufteilung der 15 Probanden auf die beiden Teile der Humanstudie und die Untersuchungen mit Methoden in Klammern. (FMD: Fluss-medierte Dilatation; CFU: Colony Forming Units; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting; CLD: Chemilumineszenz-Detektion; HPLC: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie)

Das Probandenkollektiv, welches auf beide Teile aufgeteilt wurde, bestand insgesamt aus fünfzehn gesunden männlichen Freiwilligen.

Dem ersten Teil der Studie, welcher sich mit der Endothelfunktion und der Funktion zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Aufnahme von Nitrat befasste waren 10 Probanden zugeteilt. Alle 10 Probanden waren Raucher, weil sowohl die Endothelfunktion, als auch die Funktion zirkulierender angiogener Zellen bei Rauchern eingeschränkt ist⁷¹.

Bei Versuchsbeginn waren alle 10 Probanden mindestens 12 Stunden nüchtern und mussten nach der Ankunft im Versuchsraum zur Stabilisierung ihres Kreislaufes mindestens 15 Minuten lang ruhig in einem Bett liegen. Im Anschluss wurden 15 ml venöses Blut aus der Vena cubiti zur Bestimmung der basalen Werte der Colony Forming Units (CFU) abgenommen. Die Messung der basalen Fluss-medierten Dilatation (FMD) erfolgte nach weiteren 15

Minuten Erholung von der Blutabnahme am rechten Arm. Anschließend wurde den Probanden vom Versuchsleiter randomisiert 0,15 mmol Natriumnitrat / kg Körpergewicht bzw. Natriumchlorid in Wasser gelöst zur oralen Aufnahme gegeben. Die Menge an Nitrat entsprach einer Menge von 150 – 250 g Spinat, rote Beete oder Kopfsalat^{38,124}. Natriumchlorid in einer äquivalenten Menge diente als Kontrolle. Zur erleichterten Aufnahme wurde das Natriumnitrat bzw. Natriumchlorid in nitratarmem stillem Wasser der Marke Chapelle gelöst. Zwischen den Einnahmen von Natriumnitrat oder Natriumchlorid lag als Auswaschungsphase ein Zeitraum von mindestens einer Woche.

Weitere Bestimmungen der FMD fanden 90, 180 und 270 Minuten nach der Aufnahme von Natriumnitrat bzw. Natriumchlorid statt. Zur postinterventionellen Bestimmung der CFUs erfolgte eine erneute Blutabnahme nach 270 Minuten. Eine schematische Übersicht des ersten Versuchsteils stellt Abbildung 14 dar.

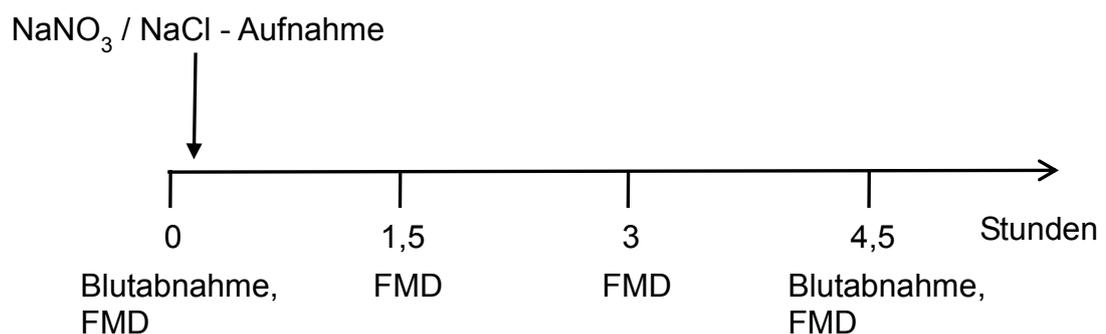


Abbildung 14
 Protokoll des ersten Teils der Humanstudie. Vor der Natriumnitrat/Natriumchlorid-Aufnahme erfolgte sowohl eine Blutabnahme, als auch eine Bestimmung der Fluss-medierten Dilatation zur Bestimmung des basalen Zustandes.

Dem zweiten Teil der Studie, welche die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Aufnahme von Nitrat untersuchte, waren 5 Nicht-Raucher zugeordnet.

Die 5 Probanden mussten analog zum ersten Studienteil nach der Ankunft im Versuchsraum zur Stabilisierung ihres Kreislaufes für mindestens 15 Minuten ruhig im Bett liegen. Bevor die Freiwilligen das in Wasser der Marke Chapelle gelöste Natriumnitrat bzw. Natriumchlorid zu sich nahmen, wurde eine Blutabnahme durchgeführt, um die basalen NOx-, CAC- und Zytokin-Werte zu

bestimmen. Weitere vier Blutabnahmen erfolgten im stündlichen Abstand (Abb. 15).

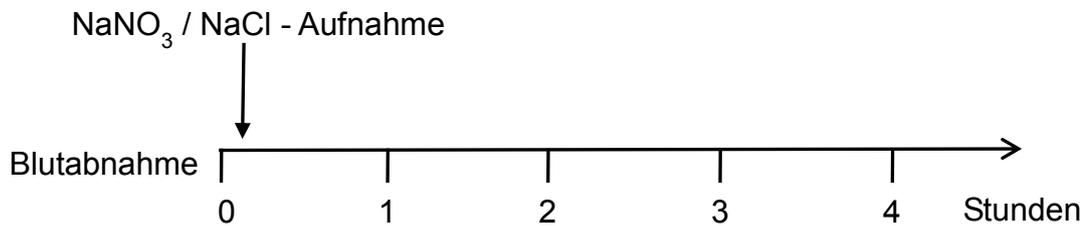


Abbildung 15

Protokoll des zweiten Teils der Humanstudie. Vor der Natriumnitrat/Natriumchlorid-Aufnahme erfolgte eine Blutabnahme zur Bestimmung der basalen NO_x-, CAC- und Zytokin-Werte. Anschließend fanden stündliche Blutabnahmen statt.

2.13 Murines Studienkollektiv und Studienprotokoll

Bei dem murinen Studienkollektiv wurden männliche Mäuse der Linie C57BL/6 aus der Versuchstierkunde der RWTH Aachen (Tierversuchsgenehmigung RWTH-Aachen: G. 086/08; LANUV-Aktenzeichen: 8.87-50-10.35.08.086) verwendet. Die Tierversuche wurden von einer Person mit entsprechender Befähigung durchgeführt. Das durchschnittliche Alter der Versuchstiere lag bei 12 ± 3 Wochen mit einem Gewicht von 25 g bis 30 g. Die Tiere wurden bis zum Tag des Versuches in der Versuchstierkunde bei einer Raumtemperatur von 19-21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% und einem zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Den Mäusen wurde, um akute diätetische Einflüsse auszuschließen, zwölf Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen und das normale Trinkwasser gegen ddH₂O ausgetauscht.

Die Injektion der Stimulanzen fand mit Hilfe einer Insulinspritze in die Schwanzvene statt. Als Stimulanzen dienten Natriumnitrat (10 nmol i.v.; 1 µmol i.v.), Natriumnitrit (10 nmol i.v.) und als Positivkontrolle AMD3100 (5 mg/kg s.c.). Als NO-Radikalfänger wurde das Kalisalz Carboxy-PTIO (cPTIO; 1 mg/kg i.v.) eingesetzt. Jede Versuchsgruppe bestand aus 5 Versuchstieren (n=5). Eine Stunde nach der Injektion der oben genannten Stimulanzen erfolgte die Blutabnahme transthorakal aus dem Herzen, nachdem 10 Minuten zuvor 200 µl Heparin (1000 IE) intraperitoneal zur Antikoagulation injiziert wurde.

In den Carboxy-PTIO enthaltenden Versuchsgruppen wurde dieses 30 Minuten vor der Injektion der Stimulantien intravenös appliziert (Abb. 16).

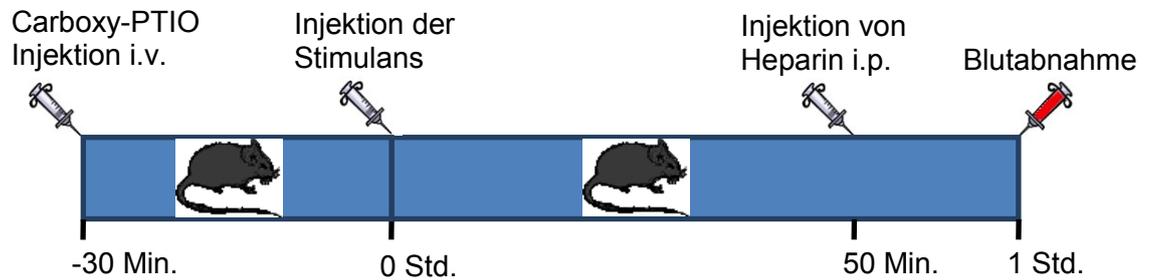


Abbildung 16

Murines Studienprotokoll. Die Blutabnahme erfolgte transthorakal aus dem Herzen eine Stunde nach intravenöser Injektion der Stimulans. Die Applikation von Carboxy-PTIO erfolgte in den jeweiligen Versuchsgruppen 30 Minuten vor dem Stimulans.

2.14 Mathematisch-statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Origin 7GSR2 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Alle Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler (SE) angegeben. Der „Student`s t-Test“ wurde nach der Überprüfung auf Gauß`sche Normalverteilung verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $p \leq 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Probandencharakteristika

Das Studienkollektiv der durchgeführten Studie bestand aus fünfzehn männlichen gesunden Probanden. Anamnestisch wurden Herz-, Kreislauf-, Lungen- und Gefäßerkrankungen ausgeschlossen. Um aktuelle Infekte auszuschließen wurde ein Basislabor durchgeführt. Die Werte des Studienkollektivs für CRP, Glukose, Triglyzeride, Cholesterin, HDL, LDL und Kreatinin lagen dabei alle im Normbereich (Tab. 3).

Tabelle 3: Basislabor des Studienkollektivs

		Raucher (n=10)	Nicht- Raucher (n=5)	
	Einheit	Mittelwert	Mittelwert	Normwerte
Alter	Jahre	26	28	
CRP	mg/dl	<5	<5	<5
Glukose	mg/dl	94	90	60 - 100
Triglyzeride	mg/dl	78	62	<200
Cholesterin	mg/dl	175	160	<240
HDL	mg/dl	57	55	>40
LDL	mg/dl	94	88	<159
Kreatinin	mg/dl	0,7	0,8	0,7 - 1,2

3.1.1 Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma nach oraler Aufnahme von Nitrat

Um die Effekte oral aufgenommenen Nitrats auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen zu untersuchen, musste zunächst die Resorption des Nitrats ins Blut gewährleistet werden. Dafür wurde nach der oralen Aufnahme von 0,15 mmol Natriumnitrat/kg Körpergewicht bzw. Natriumchlorid als Kontrolle, die Konzentration von Nitrat im Plasma zu jedem Zeitpunkt (T0-T4) mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (s. 2.4) bestimmt. Um akute diätetische Einflussfaktoren auf die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma zu vermeiden, durften die Probanden 12 Stunden vor der Versuchsdurchführung keine feste oder flüssige Nahrung zu sich nehmen. Wie in Abbildung 17 A zu sehen, stieg die Konzentration von Nitrat im Plasma eine Stunde nach oraler Gabe von in Wasser der Marke Chapelle gelöstem Nitrat

signifikant an. Anschließend sank die Konzentration von Nitrat langsam ab, blieb aber deutlich erhöht (T0: $26,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$; T1: $522,2 \pm 29,4 \mu\text{M}$; $p \leq 0,0005$). Die Aufnahme von Natriumchlorid führte hingegen zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration von Nitrat im Plasma (T0: $28,1 \pm 4,8 \mu\text{M}$; T1: $28,1 \pm 6,1 \mu\text{M}$; $p \geq 0,05$).

Nachdem die Resorption des oral aufgenommenen Nitrats nachgewiesen werden konnte, bestand der nächste Schritt in der Sicherstellung der Reduktion des resorbierten Nitrats zu Nitrit. Um diese Reduktion nachzuweisen wurde die Konzentration von Nitrit im Plasma mit Hilfe der reduktiven Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion (s. 2.5) zu jedem Zeitpunkt gemessen. Aufgrund der Kurzlebigkeit von Nitrit wurde die Messung direkt im Anschluss der Blutaufbereitung durchgeführt (s. 2.11).

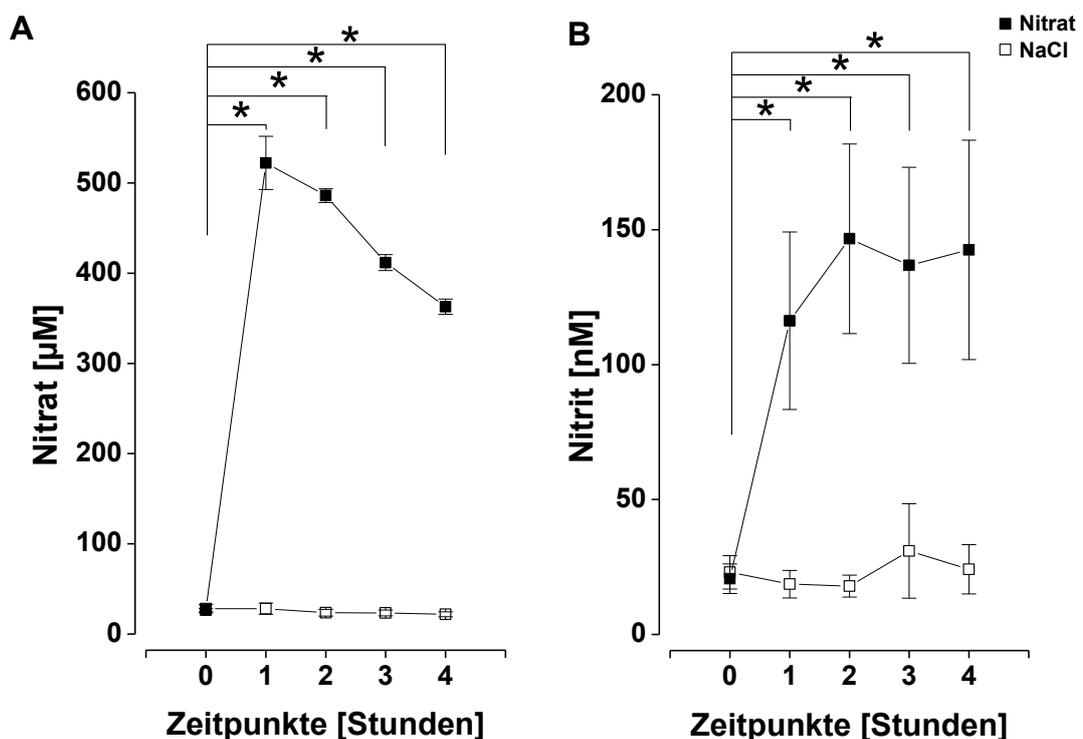


Abbildung 17

(A) Konzentration von Nitrat im Plasma [μM] in Bezug auf die unterschiedlichen Zeitpunkte [Std.]. Eine Stunde nach oraler Gabe von Nitrat stieg die Konzentration von Nitrat im Plasma an (T0: $26,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$; T1: $522,2 \pm 29,4 \mu\text{M}$) und zeigte anschließend einen leichten Abwärtstrend. Nach oraler Aufnahme von Natriumchlorid war keine signifikante Veränderung der Konzentration von Nitrat im Plasma zu beobachten. **(B)** Konzentration von Nitrit im Plasma [nM] in Bezug auf die unterschiedlichen Zeitpunkte [Std.]. Eine Stunde nach oraler Gabe von Nitrat stieg die Konzentration von Nitrit im Plasma signifikant an (T0: $21 \pm 6 \text{ nM}$; T1: $116 \pm 33 \text{ nM}$) und blieb daraufhin konstant. Die orale Aufnahme von Natriumchlorid bewirkte keine Veränderung der Konzentration von Nitrit im Plasma. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

Eine Stunde nach oraler Gabe von Nitrat stieg die Konzentration von Nitrit im Plasma signifikant von T0: 21 ± 6 nM auf T1: 116 ± 33 nM ($p \leq 0,05$) an und blieb über den Zeitraum der Messung konstant (Abb. 17 B).

Im Gegensatz zur oralen Aufnahme von Nitrat war nach der Aufnahme von Natriumchlorid als Kontrolle keine signifikante Änderung der Konzentration von Nitrit im Plasma zu beobachten (T0: 23 ± 6 nM; T1: 19 ± 5 nM; $p \geq 0,05$).

3.1.2 Einfluss oral aufgenommenen Nitrats auf die Endothelfunktion

Nach der oralen Aufnahme von Nitrat kam es bereits nach 1,5 Std. zu einem Anstieg der Fluss-medierten Dilatation der Arteria brachialis von $3,0 \pm 0,4\%$ auf $4,7 \pm 0,7\%$ ($p \leq 0,05$). Diese Steigerung der FMD erreichte ihr Maximum 3 Stunden nach der Gabe von Nitrat ($5,1 \pm 0,9\%$; $p \leq 0,05$). Anschließend fiel die Dilatation beim Zeitpunkt von 4,5 Stunden wieder auf $4,6 \pm 1\%$ ab (Abb. 18). Im Vergleich zur oralen Aufnahme von Nitrat zeigte die Gabe von Natriumchlorid als Kontrolle zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied bezogen auf den Basalwert (Basal: $2,8 \pm 0,8\%$; 1,5 Std.: $3,1 \pm 0,8\%$; 3 Std.: $2,9 \pm 0,5\%$; $p \geq 0,05$).

Als Positiv-Kontrolle wurde die endothelunabhängige Dilatation 4 Minuten nach der sublingualen Gabe von 400 μ g Glyceroltrinitrat bestimmt. Durch die Gabe von GTN kommt es zu keinem signifikanten Anstieg des Flussvolumens, allerdings zu einer maximalen Vasodilatation, welche nicht flussmediert ist. Nach der sublingualen Gabe von GTN zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Nitrat- und der Natriumchlorid-Gruppe (Nitrat: $13,2 \pm 1,1\%$; NaCl: $14,5 \pm 2,0\%$; $p \geq 0,05$).

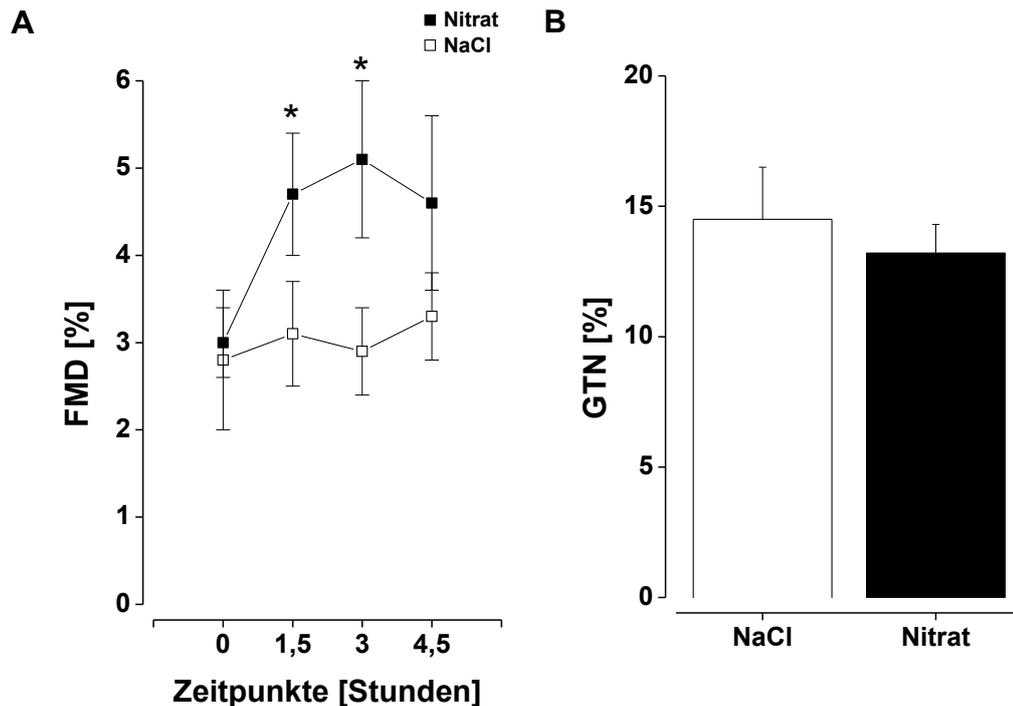


Abbildung 18

(A) Fluss-medierte Dilatation in [%] in Bezug auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Messung nach der Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid als Kontrolle. Nach der oralen Aufnahme von Nitrat kam es zu einem signifikanten Anstieg der Dilatation nach 1,5 Std. (Basal: $3 \pm 0,4\%$; 1,5 Std.: $4,7 \pm 0,7\%$; $p \leq 0,05$) welche ihr Maximum nach 3 Stunden erreichte ($5,1 \pm 0,9\%$) und anschließend wieder leicht abfiel. Die Gabe von Natriumchlorid zeigte über alle Messzeitpunkte hinweg keine signifikante Änderung der FMD im Vergleich zum Basalwert. **(B)** Als Positiv-Kontrolle wurde die endothelunabhängige Dilatation nach der sublingualen Gabe von Glyceroltrinitrat gemessen. Die FMD zeigte dabei sowohl in der Nitrat als auch in der Natriumchlorid Gruppe keinen signifikanten Unterschied (Nitrat: $13,2 \pm 1,1\%$; NaCl: $14,5 \pm 2\%$). (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

3.1.3 Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Nitrataufnahme

Zusätzlich zu dem Effekt von oral zugeführtem Nitrat auf die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma und die Fluss-medierte Dilatation, wurde die Wirkung auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen untersucht. Hierbei wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die relative Anzahl der CAC im peripheren Blut gemessen. CAC lassen sich mittels spezifischer Antikörper gegen Oberflächenproteine in der Lympho- und Monozytenpopulation bestimmen. Die in der Studie verwendeten Antikörperkombinationen waren CD34 / KDR / CXCR4 und CD133 / KDR (s. 2.7). Die erhobenen Daten nach der Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid wurden auf den jeweiligen Basalwert normiert, um die genaue Veränderung der Anzahl an CAC erfassen

zu können. Die Anzahl zirkulierender angiogener Zellen wird in Prozent von der Lympo- und Monozytenpopulation angegeben.

In Abbildung 19 A ist zu erkennen, dass eine Stunde nach oraler Aufnahme von Nitrat ein signifikanter Anstieg der dreifachpositiven Zellen für CD34 / KDR / CXCR4 im Vergleich zur oralen Aufnahme von Natriumchlorid zu verzeichnen war (T1: NaCl: $0,003 \pm 0,006\%$, Nitrat: $0,023 \pm 0,007\%$; $p \leq 0,05$). Im Anschluss an den Anstieg nach einer Stunde zeigte die relative Anzahl an CAC in der Nitratgruppe einen leichten Abwärtstrend.

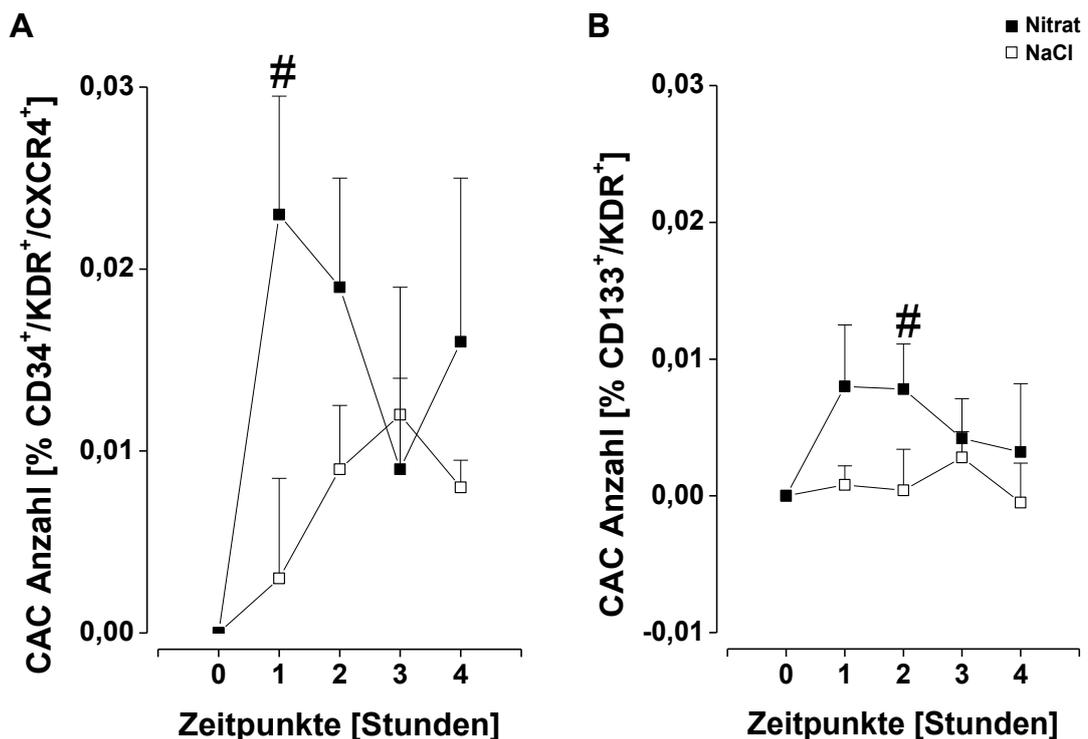


Abbildung 19

(A) Auf den Basalwert normierte CAC-Anzahl in der Lympo- und Monozytenpopulation [%] der Antikörperkombination CD34 / KDR / CXCR4 in Bezug auf die unterschiedlichen Zeitpunkte nach oraler Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid. Eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat stieg die relative CAC-Anzahl im Vergleich zur Anzahl nach oraler Aufnahme von Natriumchlorid signifikant an ($\#p \leq 0,05$) und glich sich über den zeitlichen Verlauf wieder an.

(B) Auf den Basalwert normierte CAC-Anzahl in der Lympo- und Monozytenpopulation [%] der zweiten Antikörperkombination CD133 / KDR. Eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Nitrat zeigte die relative CAC-Anzahl einen Aufwärtstrend und zum Zeitpunkt T2 einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Kontrollgruppe mit Natriumchlorid. ($\#p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

Zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse wurde eine zweite Antikörperkombination gegen die Oberflächenmarker CD133 und KDR verwendet. Der Unterschied zur ersten Färbung lag in der Verwendung des Oberflächenmarkers CD133, welcher spezifisch für hämatogene Vorläuferzellen ist. In Übereinstimmung mit Abbildung 19 A war eine Stunde nach der oralen

Aufnahme von Nitrat ein Aufwärtstrend der relativen Anzahl von CAC (Abb. 19 B) zu erkennen. Ebenfalls war zum Zeitpunkt T2 ein signifikanter Zuwachs der relativen CAC Anzahl in der Nitratgruppe gegenüber der Kontrolle mit Natriumchlorid zu verzeichnen (T2: NaCl: $0,0082 \pm 0,0039\%$, Nitrat: $0,0151 \pm 0,0035\%$; $p \leq 0,005$).

Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem maximalen Anstieg der Konzentration von Nitrit im Plasma und der relativen Anzahl zirkulierender angiogener Zellen positiv für CD133 / KDR festgestellt werden ($p \leq 0,05$).

3.1.4 Einfluss oral aufgenommen Nitrats auf die Funktion zirkulierender angiogener Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach oraler Aufnahme von Nitrat die Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut signifikant ansteigt (s. 3.1.3), bestand der nächste Schritt aus dem Nachweis der Funktionsfähigkeit der mobilisierten CAC. Um die Funktionsfähigkeit der mobilisierten CAC zu untersuchen, wurden diese aus dem peripheren Blut isoliert und in Kultur genommen. Der durchgeführte Colony Forming Unit Assay nach Hill (s. 2.8) unterstützte spezifisch das Wachstum zirkulierender angiogener Zellen, nicht aber das enddifferenzierter Endothelzellen. Neben der Aussage zur Funktionsfähigkeit der CAC ist der Colony Forming Unit Assay nach Hill ein semi-quantitativer Test zu Bestimmung der Anzahl von zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut⁶⁴.

Abbildung 20 zeigt, dass 4,5 Stunden nach der oralen Aufnahme von Nitrat die Colony Forming Units (n) im Vergleich zum Basalwert signifikant anstiegen (Basal: $11,3 \pm 4,5$ n; 4,5 Std.: $29,3 \pm 15,9$ n; $p \leq 0,05$). Hingegen zeigte sich 4,5 Std. nach der oralen Aufnahme von Natriumchlorid kein signifikanter Anstieg in Hinblick auf den Basalwert (Basal: $15,2 \pm 5,4$ n; 4,5 Std.: $16,1 \pm 5,5$ n; $p \geq 0,05$).

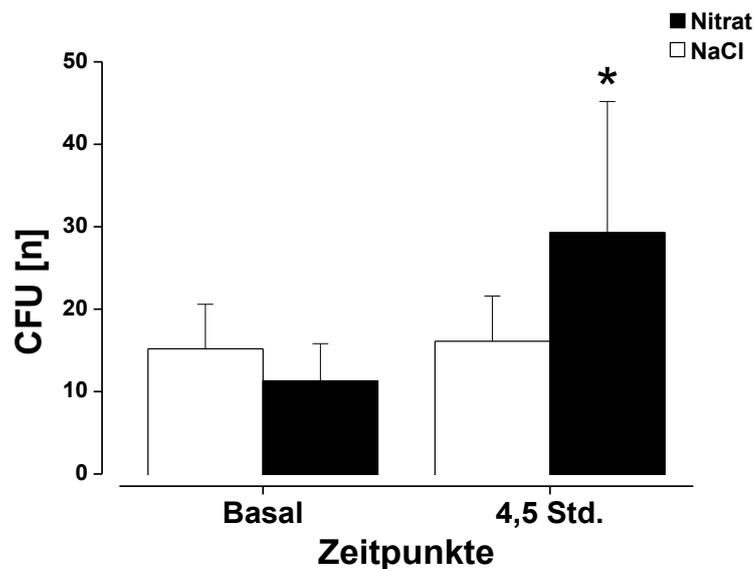


Abbildung 20

Anzahl der Colony Forming Units nach Hill (CFU) [n] im peripheren Blut vor und 4,5 Stunden nach oraler Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid. 4,5 Std. nach der oralen Aufnahme von Nitrat stieg die Anzahl der CFU im Vergleich zum Basalwert signifikant an. Die Aufnahme von Natriumchlorid führte zu keinem signifikanten Anstieg nach 4,5 Std. verglichen mit dem Basalwert. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

3.1.5 Konzentration der Zytokine VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF im Plasma nach oraler Nitrataufnahme

Um einen genaueren Einblick in die Mechanismen der Mobilisierung von zirkulierenden angiogenen Zellen nach der oralen Aufnahme von Nitrat zu bekommen, wurden die Zytokine VEGF, MMP9, SDF-1 α und SCF im Plasma bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zytokine VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF eine wesentliche Rolle bei der Mobilisierung von CAC spielen^{66,90,91,125}. SCF und VEGF führen zu einer Mobilisierung von CAC, wobei VEGF die eNOS aktiviert, was konsekutiv zum Anstieg der Konzentration von NO im Plasma führt^{89,126}. SDF1- α hingegen aktiviert den CXCR4 Rezeptor und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung der zirkulierenden angiogenen Zellen. Bei der Freisetzung von CAC aus der Knochenmarksnische spielt MMP9 eine wichtige Rolle^{90,91}.

Aufgrund des signifikanten Anstiegs der Anzahl von CAC nach oraler Aufnahme von Nitrat im Gegensatz zur Aufnahme von Natriumchlorid zum Zeitpunkt T1,

lag der Fokus der Bestimmung der Zytokine im Plasma eine Stunde nach der oralen Gabe von Nitrat bzw. Natriumchlorid.

Eine Stunde nach oraler Gabe von Nitrat bzw. Natriumchlorid als Kontrolle zeigten sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von VEGF im Plasma (Abb. 21 A; NaCl: 299 ± 66 pg/ml; Nitrat: 283 ± 78 pg/ml; $p \geq 0,05$).

Die MMP9 Konzentration im Plasma zeigte eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat einen signifikanten Abfall gegenüber dem Basalwert (T0: 31 ± 3 ng/ml; T1: 27 ± 3 ng/ml; $p \leq 0,05$). In der Kontrollgruppe mit Natriumchlorid hingegen war keine Veränderung der MMP9 Konzentration eine Stunde nach oraler Aufnahme zu verzeichnen (Abb. 21 B).

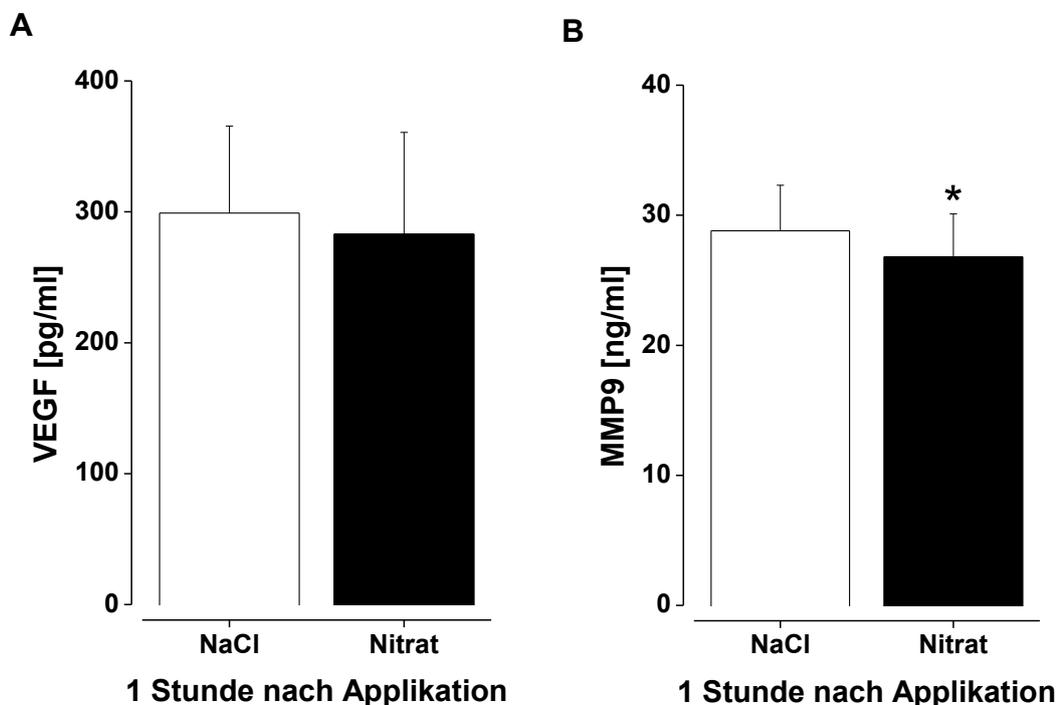


Abbildung 21

(A) Eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid (NaCl) war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentration von VEGF im Plasma erkennbar. (B) Eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Nitrat fiel die Konzentration von MMP9 im Plasma im Vergleich zum Basalwert signifikant ab. Nach der oralen Aufnahme von NaCl waren keine Unterschiede zu verzeichnen. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

Eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Nitrat zeigte die Konzentration von SDF1- α im Plasma einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Aufnahme von Natriumchlorid zum Zeitpunkt T1 (Abb. 22 A; NaCl: 2565 ± 99 pg/ml; Nitrat: 2664 ± 128 pg/ml; $p \leq 0,05$).

Übereinstimmend mit der SDF1- α Konzentration im Plasma stieg die auf die Basalwerte normierte Plasma SCF Konzentration eine Stunde nach oraler Aufnahme von Nitrat im Vergleich zur Aufnahme von Natriumchlorid signifikant an (Abb. 22 B).

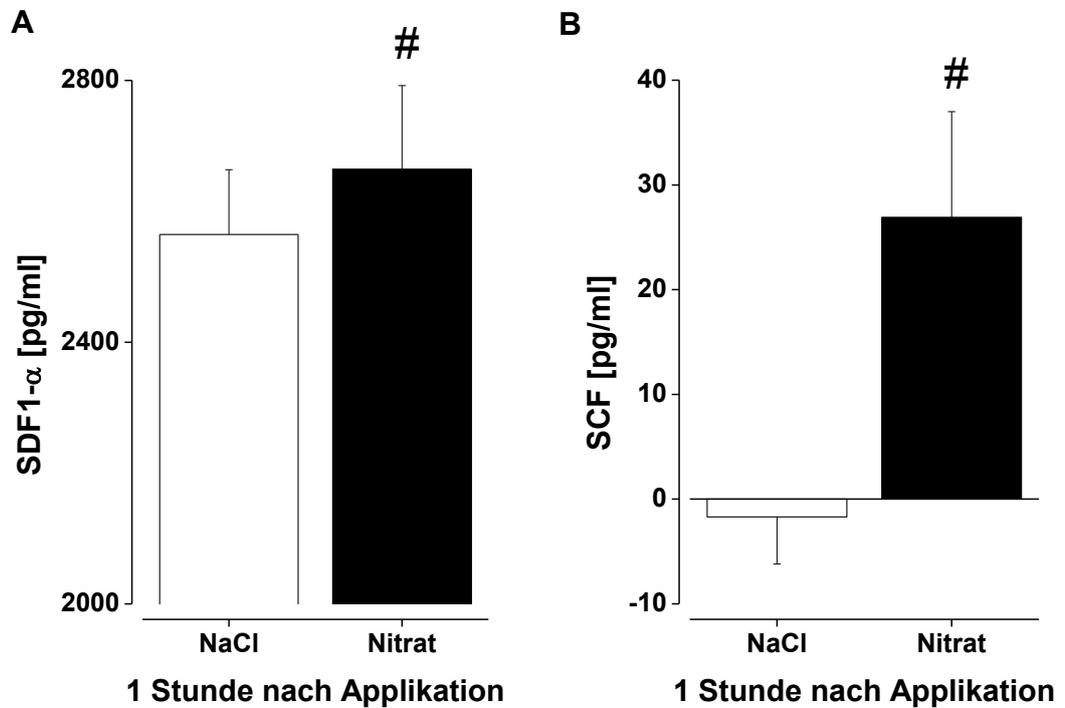


Abbildung 22

(A) Plasma SDF1- α Konzentration [pg/ml] eine Stunde nach oraler Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid. Die Plasma SDF1- α Konzentration eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat war im Vergleich zu der Konzentration nach der Aufnahme von Natriumchlorid signifikant erhöht. (B) Auf die Basalwerte normierte Plasma SCF Konzentration [pg/ml] eine Stunde nach oraler Aufnahme von Nitrat bzw. Natriumchlorid. Eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat stieg die Plasma SCF Konzentration im Vergleich zur Konzentration nach der Aufnahme Natriumchlorid signifikant an. (# $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

3.2 Untersuchungen am Mausmodell

3.2.1 Konzentration von Nitrit und Nitrat im Plasma nach intravenöser Nitrit- und Nitratinjektion

Um die bei der humanen Studie vermutete NO-abhängige Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen zu verifizieren wurden weitere Versuche an einem Mausmodell durchgeführt. Dabei bestand zum einen die Möglichkeit die Freisetzung von NO mit Hilfe eines NO-Radikalfängers abzufangen, zum anderen konnten potente Positivkontrollen eingesetzt werden. Der verwendete NO-Radikalfänger war das Kalisalz Carboxy-PTIO. Als Positivkontrolle wurde AMD3100 verwendet. Des Weiteren wurde den Versuchstieren analog zum humanen Studienkollektiv 12 Stunden vor Versuchsbeginn das Futter entzogen und das normale Trinkwasser gegen ddH₂O ausgetauscht.

Zunächst musste sichergestellt werden, dass bei der intravenösen Injektion von in PBS gelöstem Natriumnitrat und Natriumnitrit in die Schwanzvene, die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma ansteigt. Hierfür wurde nach der Applikation von 10 µmol Natriumnitrat bzw. 10 nmol Natriumnitrit die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma bestimmt. Alle Stimulanzien waren hierfür zu Injektionszwecken in PBS gelöst.

Die Konzentration von Nitrit im Plasma der basalen Versuchsgruppe lag bei 244 ± 71 nM. 10 Minuten nach der intravenösen Injektion von Natriumnitrit in die Schwanzvene stieg die Konzentration signifikant auf 720 ± 107 nM an ($p \leq 0,05$). Beim nächsten Untersuchungszeitpunkt nach 60 Minuten fiel die Konzentration von Nitrit im Plasma leicht ab, war aber weiterhin signifikant zum Basalwert erhöht (500 ± 73 nM; $p \leq 0,05$). Die intravenöse Applikation von Natriumnitrat zeigte nach 10 Minuten keine signifikante Veränderung der Konzentration von Nitrit im Plasma (Abb. 23).

Analog zu der steigenden Konzentration von Nitrit im Plasma, stieg nach der Injektion von Natriumnitrit die Konzentration von Nitrat im Plasma im Vergleich zur Basalgruppe 60 Minuten nach der Injektion signifikant an (Basal: 78 ± 26 µM; Nitrat 60 Min.: 191 ± 43 µM; $p \leq 0,05$) (Abb. 24).

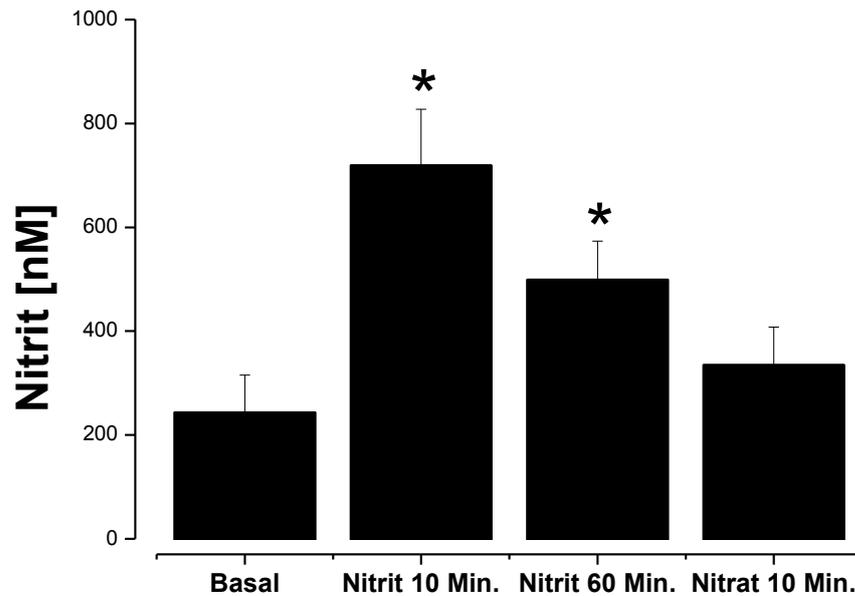


Abbildung 23

Konzentration von Nitrit im Plasma [nM] vor und nach der intravenösen Injektion von 10 nmol Natriumnitrit bzw. 10 μ mol Natriumnitrat gelöst in PBS. 10 Minuten nach der Injektion von Natriumnitrit stieg die Konzentration von Nitrit im Plasma signifikant zum Basalwert an und blieb auch nach 60 Minuten erhöht, wohingegen die Injektion von Natriumnitrat keine Veränderung der Konzentration von Nitrit im Plasma bewirkte. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

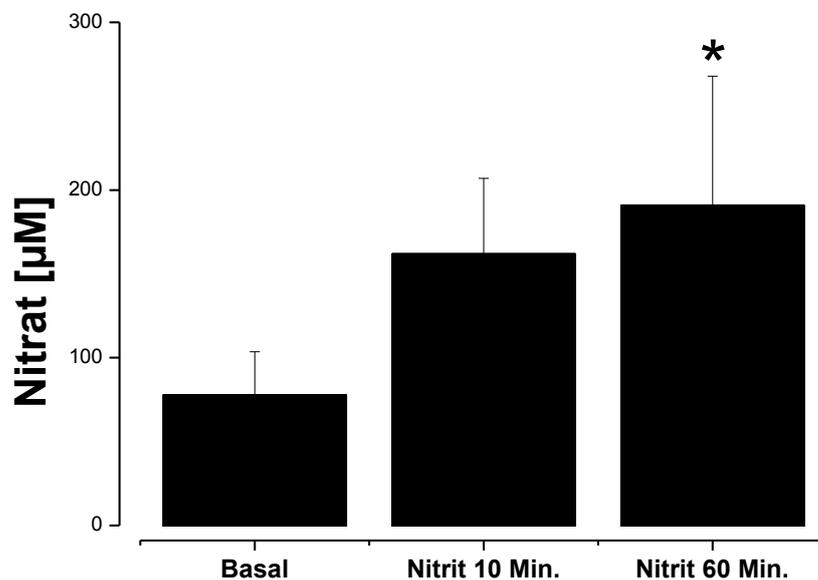


Abbildung 24

Konzentration von Nitrat im Plasma [μ M] vor und nach der intravenösen Injektion von 10 nmol Natriumnitrit. 10 Minuten nach der Stimulation mit Natriumnitrit stieg die Konzentration von Nitrat im Plasma im Vergleich zum Basalwert an und war nach 60 Minuten signifikant erhöht. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

Nach der Injektion von Natriumnitrat war ebenfalls ein Anstieg der Konzentration von Nitrat im Plasma von basal $78 \pm 26 \mu\text{M}$ auf $240 \pm 21 \mu\text{M}$ ($p \leq 0,05$) nach 10 Minuten zu beobachten (Abb. 25).

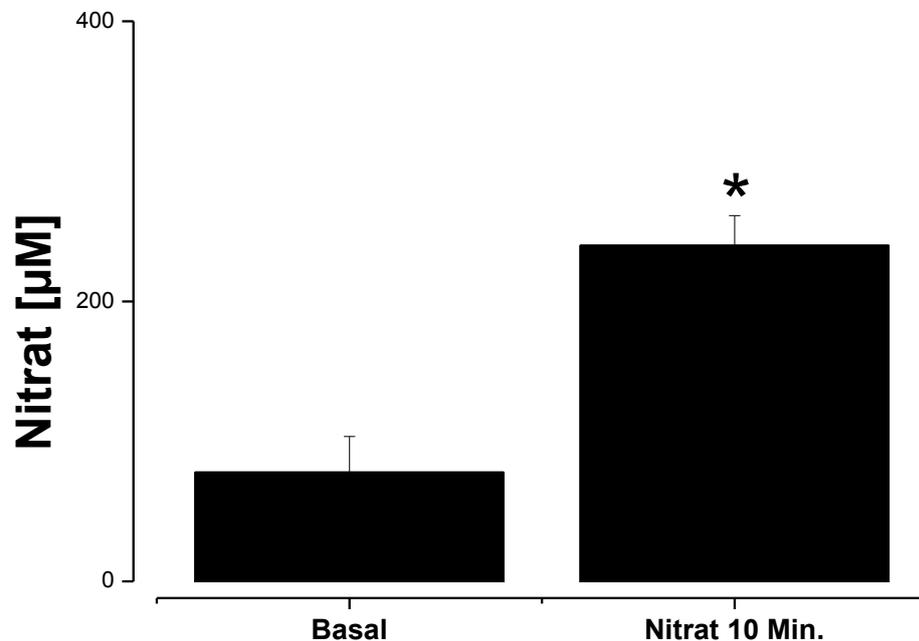


Abbildung 25

Konzentration von Nitrat im Plasma [μM] vor und nach der intravenösen Injektion von $10 \mu\text{mol}$ Natriumnitrat. Die Konzentration von Nitrat im Plasma stieg 10 Minuten nach der intravenösen Injektion von Natriumnitrat im Vergleich zum Basalwert signifikant an. (* $p \leq 0,05$; Mittelwert \pm SE)

3.2.2 Einfluss von Nitrat, Nitrit und cPTIO auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen

Nachdem im humanen Studienkollektiv ein Anstieg der zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut nach der Aufnahme von Nitrat nachgewiesen werden konnte, bestand der nächste Schritt darin den Mechanismus dieses Anstieges aufzuzeigen. Die Vermutung der Abhängigkeit des Anstieges von NO, welches durch Reduktion von Nitrat zu Nitrit und einer weiteren Reduktion zu NO freigesetzt wird, sollte mit Hilfe eines NO-Radikalfängers nachgewiesen werden. Der hierbei verwendete NO-Radikalfänger Carboxy-PTIO (1 mg/kg i.v.) bindet das im Blut zirkulierende NO, so dass dessen Einfluss auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen

unterdrückt wird. Des Weiteren ist es mit Hilfe des murinen Studienkollektives möglich gut wirksame Positivkontrollen zu verwenden. Als Positivkontrolle kam AMD3100 (5 mg/kg s.c.) zum Einsatz, da es sich in vorherigen Studien als potentes Stimulans zur Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen herausgestellt hat^{127,128}.

Abbildung 26 zeigt, dass nach der intravenösen Injektion von in PBS gelöstem Nitrit (10 nmol) die relative Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im Blut signifikant zur Injektion von PBS ohne Stimulans anstieg (PBS: $0,29 \pm 0,03\%$; Nitrit: $0,44 \pm 0,04\%$; $p \leq 0,05$). Dieser Effekt konnte mit einer Injektion von Carboxy-PTIO 30 Minuten vor der Injektion von Nitrit unterdrückt werden (Nitrit + cPTIO: $0,32 \pm 0,02\%$). Ferner waren nach der Injektion von Nitrat (1 μmol bzw. 10 nmol) und von Carboxy-PTIO ebenfalls keine signifikanten Änderungen in der relativen Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im Vergleich zur Injektion von PBS ohne Stimulans zu verzeichnen (Nitrat 1 μmol : $0,3 \pm 0,04\%$; Nitrat 10 nmol: $0,25 \pm 0,01\%$; cPTIO: $0,33 \pm 0,02\%$; $p \geq 0,05$). Nach der Injektion von AMD3100, welches als Positivkontrolle diente, stieg die relative Anzahl zirkulierender angiogener Zellen ebenfalls signifikant an (AMD3100: $0,61 \pm 0,05\%$; $p \leq 0,05$).

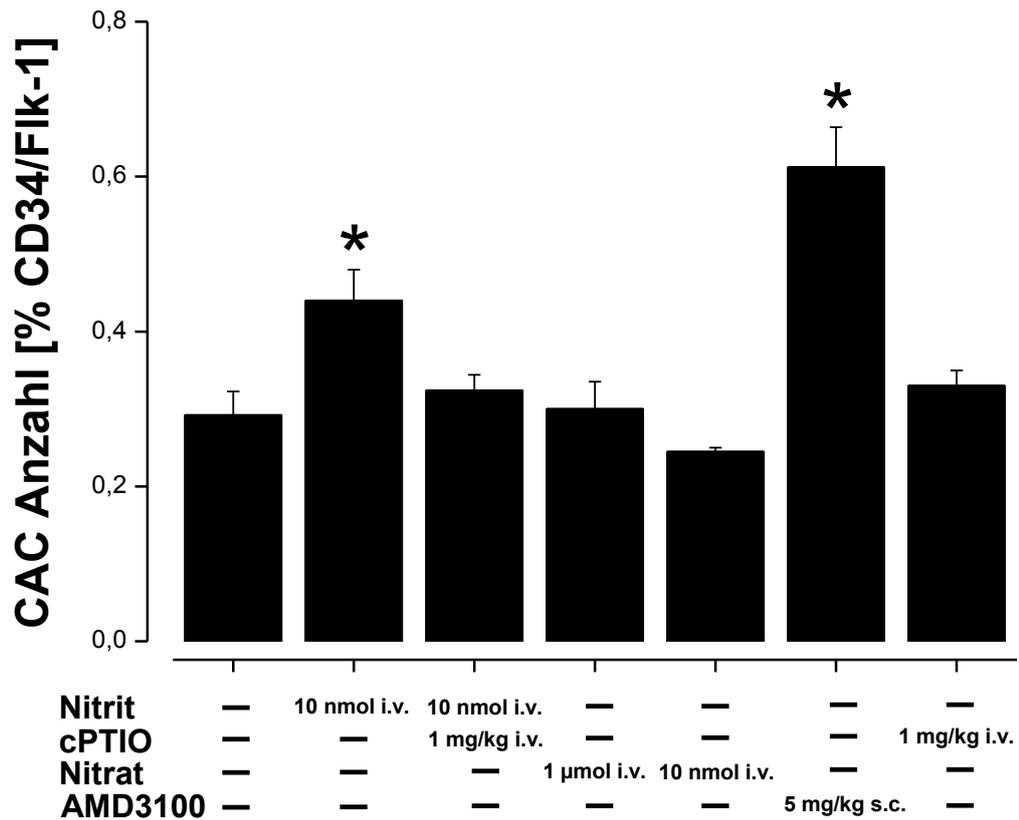


Abbildung 26

Relative Anzahl zirkulierender angiogener Zellen [%] im murinen Blut bei unterschiedlichen Stimulanzen. Nach der intravenösen Injektion von in PBS gelöstem Nitrit stieg die relative Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im Vergleich zur alleinigen Injektion von PBS signifikant an. Dieser Effekt wurde durch eine 30 minütige vorherige Injektion von Carboxy-PTIO unterdrückt. Des Weiteren zeigte die Injektion von Nitrat (1 µmol bzw. 10 nmol) keinen Einfluss auf die relative Anzahl von CAC. AMD3100 als Positivkontrolle führte zu einem signifikanten Anstieg der CAC im Vergleich zur Injektion von PBS. (*p ≤ 0,05; Mittelwert ± SE)

4. Diskussion

4.1 Umwandlung oral aufgenommenen Nitrats zu Nitrit

Lange Zeit galt das Nitrat anion als ein physiologisch inertes Abbauprodukt von NO^{29,129,130}. Dies liegt vor allem an der Tatsache, dass Säugetiere keine entsprechenden Enzyme zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit besitzen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Bakterien in der menschlichen Mundhöhle in der Lage sind Nitrat zu Nitrit zu reduzieren³⁸⁻⁴¹. Dieses Nitrit kann nach erneuter Aufnahme in den Organismus weiter zu NO reduziert werden (s. 1.2)^{42,45,46,131}. Nitrat ist vor allem in grünem Gemüse und gepökelten Nahrungsmitteln in relativ hoher Konzentration vorhanden und somit ein Bestandteil der täglichen Ernährung^{38,124,130}. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach oraler Gabe von 0.15 mmol/kg Körpergewicht (12.7 mg/kg Körpergewicht) inorganischem Nitrat die Konzentration von Nitrat im Plasma von basal $26,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$ auf $522,2 \pm 29,4 \mu\text{M}$ nach einer Stunde anstieg. Konsekutiv war ein Anstieg der Konzentration von Nitrit im Plasma zu verzeichnen. Die basale Konzentration von Nitrit im Plasma lag bei $21 \pm 6 \text{ nM}$. Der Anstieg der Konzentration von Nitrit auf $116 \pm 33 \text{ nM}$ war schon nach einer Stunde zu beobachten und setzte sich bis zur zweiten Stunde ($147 \pm 35 \text{ nM}$) fort, wonach die Konzentration von Nitrit im Plasma bis zur vierten Stunde weitgehend konstant blieb. Die orale Aufnahme von Natriumchlorid als Kontrolle hingegen zeigte keine Veränderungen der Konzentration von Nitrit im Plasma. Diese Beobachtung ist in der Hinsicht grundlegend, da nur durch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit letzteres weiter zu NO reduziert werden kann. Bei der NO-Bildung wird zwischen der enzymatischen und der nicht-enzymatischen Bildung von NO unterschieden. Die enzymatische NO-Produktion findet mittels der NO-Synthasen statt. Die nicht-enzymatische NO-Bildung kann auf mehreren unterschiedlichen Wegen geschehen (s. 1.2). Eine Möglichkeit stellt die Reduktion von Nitrit bei einem azidischen pH-Wert im Magen dar. Zunächst wird das im Speichel konzentrierte Nitrat von den Bakterien in der menschlichen Mundhöhle zu Nitrit reduziert. Nach Absorption des Nitrits über die Magenschleimhaut und Darmmukosa gelangt es in den Magen, wo es weiter zu NO reduziert werden kann (Abb. 27)^{45,46,132}.

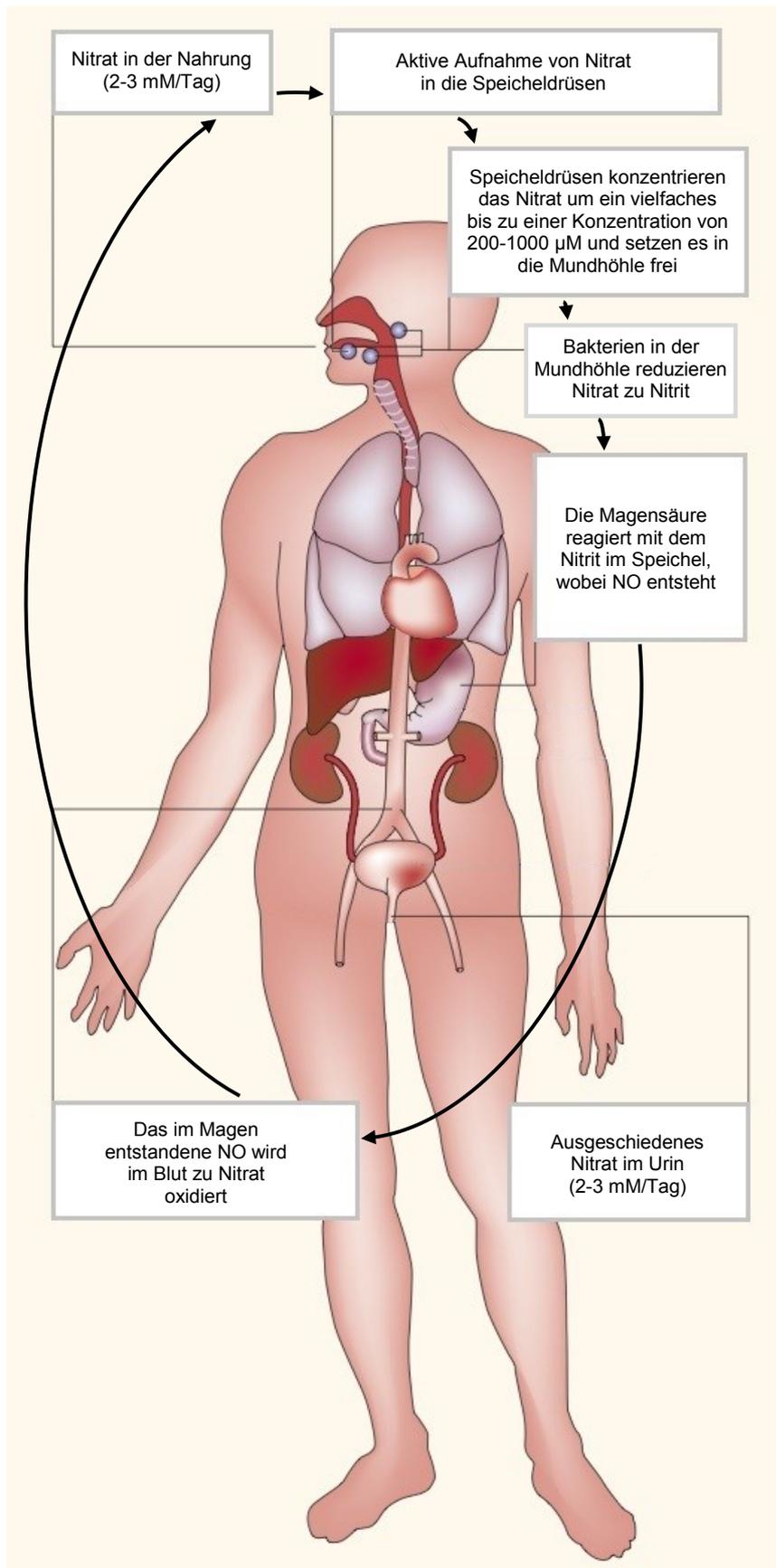


Abbildung 27
 Der Nitrat-Nitrit-NO Stoffwechsel im menschlichem Organismus nach der oralen Aufnahme von Nitrat. (Modifiziert nach Lundberg⁴³)

Modin et al. konnten zeigen, dass selbst physiologische Mengen von Nitrit bei einem reduzierten pH-Wert einen vasodilatativen Effekt aufweisen¹³¹. Begleitend zum vasodilatativen Effekt kam es zu einem Anstieg von NO. Ein weiterer Weg der nicht-enzymatischen NO-Bildung stellt die NO-Freisetzung mittels Deoxyhämoglobin und Deoxymyoglobin dar. Cosby et al konnten zeigen, dass durch die Infusion von Nitrit eine lokale Vasodilatation durch die deoxyhämoglobin abhängige Bildung von NO zu erreichen ist²⁷. Des Weiteren waren Rassaf et al. in Lage auch für Deoxymyoglobin nitritreduzierende Eigenschaften aufzuzeigen²⁸.

Nitrit stellt somit einen wichtigen NO-Pool dar. Die Synthese von NO ist von zentraler Bedeutung, da es als ein wichtiges Signalmolekül im menschlichen Organismus gilt. Neben der Regulation und Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase⁵⁰ fungiert NO als Vasodilatator^{7,8}, inhibiert die Aggregation von Thrombozyten^{15,16}, hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen⁹ und inaktiviert Leukozyten¹⁷. Im Zusammenhang mit der Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen spielen die Ergebnisse von Iwakura et al. eine entscheidende Rolle, da sie zeigen konnten, dass NO die Matrix Metalloproteinase 9 aktiviert, welche essentiell für die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen ist⁹⁰.

4.2 Verbesserte Endothelfunktion nach oraler Nitrataufnahme

Die Endothelfunktion stellt einen wichtigen Marker des kardiovaskulären Systems dar¹³³. Ein essentieller Faktor in Hinblick auf eine ungestörte Endothelfunktion ist die Produktion von NO durch die endotheliale NO-Synthase¹³⁴. Bei Probanden mit einer eingeschränkten NO-Synthase ist die Endothelfunktion beeinträchtigt. Dieser Zustand führt zu einem höheren Risiko an einer koronaren Herzkrankheit zu erkranken oder eine Re-Stenose nach erfolgreicher Stent-Implantation zu erleiden^{133–135}.

Wie bereits beschrieben stellt Nitrit nicht nur ein Abbauprodukt von NO dar, sondern fungiert als ein wichtiger NO-Pool^{28,44,129,130,136}. Diese Tatsache qualifiziert die Konzentration von Nitrit im Plasma als einen wichtigen Parameter zur Bestimmung der Endothelfunktion³².

Des Weiteren stellt eine Erhöhung der Konzentration von Nitrit im Plasma eine Möglichkeit dar, die eingeschränkte Endothelfunktion wieder herzustellen^{27,137}.

Wichtig ist in dem Zusammenhang ebenfalls die Tatsache, dass Studien eine positive Korrelation zwischen der Endothelfunktion und der Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im Blut belegen konnten^{55,58,138}. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass auch oral aufgenommenes Nitrat zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt. Die hierfür zu Grunde gelegte Fluss-medierte Dilatation lag bei der Aufnahme von Natriumchlorid als Kontrolle bei $2,8\% \pm 0,8\%$ und verbesserte sich 1 Stunde nach der Aufnahme von Nitrat auf $4,7 \pm 0,7\%$. Zwei Stunden nach der Aufnahme war ein weiterer Anstieg der FMD auf $5,1\% \pm 0,9\%$ zu beobachten. Als Kontrolle zeigte die endothelunabhängige Dilatation nach der sublingualen Gabe von Glyceroltrinitrat keinen signifikanten Unterschied zwischen der Nitrat- und der Natriumchlorid-Gruppe. Die mögliche Erklärung für diesen Anstieg ist die höhere Konzentration von Nitrit im Plasma nach der oralen Aufnahme von Nitrat. Durch die höhere Konzentration von Nitrit im Plasma steigt ebenfalls die Verfügbarkeit bioaktiven NOs, welches sich positiv auf die Endothelfunktion auswirkt. Dies führt zu der Annahme, dass durch die Aufnahme von oralem Nitrat die Endothelfunktion verbessert wird. Dieses Ergebnis ist vor allem in Hinblick auf das Vorkommen von Nitrat in unserer täglichen Ernährung interessant. Nitrat ist vor allem in grünem Gemüse und gepökelten Nahrungsmitteln vorhanden und somit Bestandteil unserer täglichen Ernährung^{38,124,130}.

4.3 Mobilisierung und Funktionsfähigkeit zirkulierender angiogener Zellen werden durch orale Nitrataufnahme beeinflusst

Zirkulierende angiogene Zellen stammen aus dem Knochenmark und zirkulieren im peripheren Blut⁵³. Die wichtigsten Funktionen dieser Zellen sind sowohl die Beteiligung an der Neovaskulogenese, als auch ihr positiver Einfluss auf atherosklerotische Läsionen durch die Regeneration des verletzten Endothels⁶⁵⁻⁶⁷. Neben diesen Eigenschaften von zirkulierenden angiogenen Zellen fördern auch die Beteiligung von CAC an der Wundheilung und der Regeneration von Myokardinfarkten das klinische Interesse^{68,69}.

Es konnten bereits eine Vielzahl von Faktoren, welche sowohl einen positiven, als auch einen negativen Einfluss auf die Anzahl und Funktion von CAC

ausüben identifiziert werden. Neben der Therapie mit Statinen⁷⁷ oder Östrogen^{75,76,96}, sind körperliche Aktivität⁷⁹ und Rauchverbot¹³⁹ anzuführen, welche zu einem Anstieg der Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut führen. Negative Einflüsse, welche die Funktion oder Anzahl von CAC beeinträchtigen, sind vor allem kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes und Atherosklerose⁷¹⁻⁷³. Das durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildete NO spielt eine entscheidende Rolle in dem der Mobilisierung von CAC zu Grunde liegenden Mechanismus⁸⁹. Das gebildete NO ist in der Lage durch die Aktivierung der MMP9 im Knochenmark zirkulierende angiogene Zellen zu mobilisieren^{89,103}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass auch die orale Aufnahme von Natriumnitrat einen signifikanten Anstieg der zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut im Vergleich zur Aufnahme von Natriumchlorid bewirkt. Mit Hilfe von zwei unterschiedlichen für CAC spezifischen Färbungen und anschließender FACS-Messung konnte der Anstieg der CAC im peripheren Blut gezeigt werden. Eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Natriumnitrat betrug für die erste Färbung die relative Anzahl der CAC $0,023 \pm 0,007\%$. Nach Aufnahme von Natriumchlorid hingegen lag die relative Anzahl der CAC bei $0,003 \pm 0,006\%$. Die zweite Färbung zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg zwei Stunden nach Aufnahme von Natriumnitrat. Vorherige Studien welche einen Anstieg der CAC mittels Statin- oder Östrogen-Therapie, Sport und Rauchverbot zeigen konnten, beobachteten einen zwei- bis dreifachen Zuwachs zirkulierender angiogener Zellen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche einen fast zweifachen Anstieg der CAC zeigten, entsprechen somit der Größenordnung vorheriger Studien. Die Aussagekraft der Ergebnisse wird durch die positive Korrelation zwischen dem maximalen Anstieg der Konzentration von Nitrit im Plasma und der relativen Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut unterstrichen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Funktionsfähigkeit der mobilisierten zirkulierenden angiogenen Zellen. Zwar war es vorherigen Studien möglich einen Anstieg der CAC im peripheren Blut nachzuweisen, allerdings war die Funktionsfähigkeit der mobilisierten Zellen nicht immer gegeben⁸⁴. Die vorliegende Arbeit hingegen war in der Lage durch den durchgeführten Colony Forming Unit Assay nach Hill zu zeigen, dass 4,5 Stunden nach der oralen

Aufnahme von Nitrat die gebildeten Kolonien im Vergleich zum Basalwert signifikant ansteigen (Basal: $11,3 \pm 4,5$ n; 4,5 Std.: $29,3 \pm 15,9$ n). Die Tatsache, dass die mobilisierten Zellen weiterhin in der Lage waren Kolonien zu bilden führt zu dem Schluss, dass die orale Aufnahme von Nitrat funktionsfähige CAC mobilisiert. Diese Beobachtung ist dahingehend grundlegend, da die Funktionsfähigkeit der mobilisierten Zellen essentiell für die spätere klinische Beurteilung der Mobilisierung von CAC durch Nitrat ist.

4.4 Bedeutung der Zytokine VEGF, MMP9, SDF1- α und SCF auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen nach oraler Aufnahme von Nitrat

Nachdem ein Anstieg zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut aufgrund der oralen Aufnahme von Nitrat beobachtet werden konnte, bestand der nächste Schritt darin, den zu Grunde liegenden Mechanismus zu identifizieren.

Bei der Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut spielen die Zytokine VEGF und SDF-1 α eine wichtige Rolle^{66,125,126}. Aicher et al. gelang es die Abhängigkeit der Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen durch VEGF und SDF-1 α von der eNOS zu beweisen⁸⁹. Das durch die erhöhte Aktivität der eNOS gebildete NO scheint dabei essentiell zur Aktivierung von MMP9 zu sein⁹⁰. MMP9 wird als inaktive Vorstufe sekretiert und kann erst nach Aktivierung durch NO ihre Proteinase-Eigenschaften ausüben. Im Knochenmark ist sie an der Konversion von membrangebundenem Kit-Ligand zu löslichem Kit-Ligand beteiligt. Löslicher Kit-Ligand, auch Stammzellofaktor (SCF) genannt interagiert in einem weiteren Schritt mit cKit-positiven CAC im Knochenmark und führt somit zur Mobilisierung dieser Zellen ins periphere Blut^{91,92}.

Welchen Einfluss oral aufgenommenes Nitrat auf diesen Mechanismus hat, wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Konzentration der für die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen wichtigen Zytokine im Plasma nach der oralen Aufnahme von Nitrat untersucht. Hierbei ist es denkbar, dass es durch die erhöhte NO-Verfügbarkeit nach der Aufnahme von Nitrat zu einer gesteigerten Expression von

Mobilisierungsmarkern kommt. VEGF als potentes Zytokin zur Mobilisierung von CAC ist im vorher beschriebenen Mechanismus der Bildung von NO vorgestellt. Dies könnte ein Grund sein, weswegen keine signifikante Änderung der Konzentration von VEGF im Plasma nach der Aufnahme von Nitrat im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte (NaCl: 299 ± 66 pg/ml; Nitrat 283 ± 78 pg/ml)

Im Gegensatz zu VEGF ist die Aktivierung von MMP9 der eNOS nachgeschaltet und somit NO abhängig. Aufgrund der Reduktion des oral aufgenommenen Nitrats zu Nitrit und der konsekutiv erhöhten NO-Verfügbarkeit wäre hierbei ein Anstieg der MMP9 Konzentration nach oraler Gabe von Nitrat zu erwarten gewesen. Allerdings fiel im Gegensatz zu den Erwartungen die Konzentration von MMP9 im Plasma eine Stunde nach oraler Gabe von Nitrat ab (Basal: 31 ± 3 ng/ml; T1: 27 ± 3 ng/ml). Der Grund für diesen Abfall konnte noch nicht geklärt werden. Eine mögliche Ursache für den Abfall der Konzentration im Plasma könnte die erhöhte Aktivität und der Verbrauch von MMP9 im Knochenmark sein, welche zu einer geringeren Konzentration im peripheren Blut führen.

Diese Vermutung würde die Beobachtung der SCF Konzentration im Plasma stützen. Eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat stieg die SCF Konzentration im Plasma im Vergleich zur Aufnahme von Natriumchlorid signifikant an. Als Ursache hierfür kann die vermutlich erhöhte Aktivität von MMP9 im Knochenmark angesehen werden, welche den zunächst membrangebunden Kit-Liganden von der Membran löst und somit den löslichen Kit-Liganden / SCF freisetzt. Die erhöhte Konzentration von SCF im Plasma würde auch den Anstieg der zirkulierenden angiogenen Zellen eine Stunde nach der Aufnahme von Nitrat erklären, da diese durch SCF aus dem Knochenmark ins periphere Blut mobilisiert werden.

Als ein weiterer wichtiger Marker wurde SDF1- α untersucht. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass die Plasma SDF1- α Konzentration eine Stunde nach der oralen Aufnahme von Nitrat im Gegensatz zur Kontrolle signifikant höher war (Kontrolle: 2565 ± 99 pg/ml; Nitrat: 2664 ± 128 pg/ml). Eine Erklärung hierfür könnte ein positiver Einfluss von NO sein, welches nach der oralen Aufnahme von Nitrat und dessen Reduktion zu Nitrit vermehrt verfügbar ist. Als weitere wichtige Beobachtung ist die positive Korrelation zwischen dem Anstieg

der SDF1- α Konzentration im Plasma und dem Anstieg der zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut hervorzuheben. Da SDF1- α eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von CAC aus dem Knochenmark ins periphere Blut spielt, ist diese Beobachtung schlüssig⁹³.

4.5 Bildung von Stickstoffmonoxid ist entscheidend für die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen

Ein entscheidender Schritt war es den zu Grunde liegenden Mechanismus der Mobilisierung von zirkulierenden angiogenen Zellen nach der oralen Aufnahme von Nitrat nachzuweisen.

Stickstoffmonoxid spielt bei der Mobilisierung von CAC eine essentielle Rolle⁸⁹. Die Reduktion oral aufgenommenen Nitrats durch Bakterien in der Mundhöhle führt zu einer Bildung von Nitrit³⁸⁻⁴¹. Dieses Nitrit kann durch schlucken erneut aufgenommen werden und weiter zu NO reduziert werden (s. 1.2)^{42,45,46,131}. Dies lässt die Frage aufkommen, ob das aus dem oral aufgenommenen Nitrat gebildete NO einen Einfluss auf die Mobilisierung von CAC hat. Auf der anderen Seite stellt sich die Frage, ob Nitrat oder Nitrit nicht direkt mit CAC interagieren können bzw. direkt Zytokine beeinflussen, welche zur Mobilisierung von CAC führen und der erhöhte NO-Pool nur ein weniger wichtiges Nebenprodukt darstellt.

Um die Abhängigkeit der Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen von NO nachzuweisen wurde im Mausmodell der NO-Radikalfänger Carboxy-PTIO eingesetzt. Das im Organismus freigesetzte NO kann mit Hilfe des Carboxy-PTIO abgefangen werden. Unter der Gabe von Carboxy-PTIO müsste bei einer direkten Wirkung von Nitrat bzw. Nitrit auf zirkulierende angiogene Zellen ebenfalls ein Anstieg der relativen Anzahl zu beobachten sein.

Die Versuchsgruppe, welche sowohl mit Nitrit bzw. Nitrat, als auch Carboxy-PTIO stimuliert wurde, zeigte allerdings keinen signifikanten Anstieg der relativen Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wohingegen die alleinige Applikation von Nitrit zu einer signifikanten Zunahme zirkulierender angiogener Zellen im Blut führte. Diese Ergebnisse unterstreichen die essentielle Rolle von NO bei der Mobilisierung von CAC und führen zu der Schlussfolgerung, dass beim Menschen aufgrund

des erhöhten NO-Pools nach der oralen Aufnahme von Nitrat die Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut steigt. Hierbei liegt die Vermutung nahe, dass das durch die orale Aufnahme von Nitrat vermehrt verfügbare Stickstoffmonoxid MMP9 aktiviert. MMP9 setzt wiederum SCF frei und mobilisiert somit zirkulierende angiogene Zellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut.

4.6 Klinische Relevanz und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass oral aufgenommenes Nitrat sowohl einen Effekt auf zirkulierende angiogene Zellen, als auch auf die Endothelfunktion hat¹⁴⁰. Diese Effekte sind potenziell protektiv in Hinblick auf das kardiovaskuläre System und unterstreichen schon vorher beschriebene nützliche Effekte von Nitrat. Nitrat als Salz und als Bestandteil von Spinat oder rote Beete-Saft besitzt die Eigenschaft den Blutdruck bei gesunden Probanden zu senken¹⁴¹⁻¹⁴³. Des Weiteren reduziert Nitrat den Sauerstoffverbrauch bei körperlicher Anstrengung^{141,144}. Hinzu kommen Beobachtungen von Tierversuchen, in denen sich Nitrat beim Metabolischen Syndrom¹⁴⁵, Myokardinfarkt¹⁴⁶ und der peripheren Ischämie¹⁴⁷ als protektiv erweist. Die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen findet physiologischerweise nach der Verletzung des Endothels zur Reparatur dessen statt¹⁴⁸. Die vorliegende Arbeit konnte den Anstieg zirkulierender angiogener Zellen ebenfalls nach der oralen Aufnahme von Nitrat nachweisen. Ferner konnten Forschergruppen nachweisen, dass CD34⁺/KDR⁺ positive CAC einen Marker sowohl für das Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen als auch für die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen⁷⁴. In der Studie von Werner et al. unterscheidet sich die Anzahl an zirkulierenden angiogenen Zellen im peripheren Blut in den Gruppen mit dem geringsten kardiovaskulären Risiko und die mit dem Höchsten um den Faktor 2 bis 3. Dabei differierten die beiden Gruppen in Hinblick auf das Todesrisiko um einen Faktor höher 3. Durch die orale Gabe von Nitrat war fast eine Verdoppelung der im peripheren Blut zirkulierenden angiogenen Zellen zu beobachten.

Die Tatsache, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Nitratdosis leicht durch Lebensmittel erreicht werden kann, bringt einen interessanten Aspekt der Ernährung hinzu. In der Tat war es vorherigen Studien möglich zu beweisen,

dass ein erhöhter Anteil von Gemüse in der täglichen Ernährung zu einem positiven Effekt auf CAC führt^{81,149}. In Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, ist der positive Effekt von Gemüse in der Ernährung auf die Mobilisierung zirkulierender angiogener Zellen zum Teil auf die ansteigende Konzentration von Nitrit im Plasma zurückzuführen.

Zusammenfassend stellen die gezeigten Ergebnisse einen neuen Mechanismus dar, bei dem die orale Gabe von Nitrat zu positiven Effekten auf das kardiovaskuläre System führen könnte. Des Weiteren könnte die orale Gabe von Nitrat zukünftig eine interessante adjuvante Therapie zur endothelialen Regeneration bei Verletzungen des Endothels, wie z.B. bei der Angioplastie, darstellen.

5. Zusammenfassung

Nitrit und Nitrat stellen entgegen bisheriger Auffassungen keine inerten Abbauprodukte von Stickstoffmonoxid (NO) dar. Oral aufgenommenes inorganisches Nitrat kann mittels Bakterien in der Mundhöhle zunächst zu Nitrit und anschließend auf mehreren unterschiedlichen Wegen weiter zu NO reduziert werden. Diese Tatsache qualifiziert Nitrit als einen endokrinen Speicher von NO. Ein prognostischer Biomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen und die Endothelfunktion stellen die Anzahl zirkulierender angiogener Zellen (CAC) im peripheren Blut dar. Die Mobilisierung von CAC aus dem Knochenmark ins periphere Blut ist NO abhängig.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren: (1.) Die Auswirkungen oral aufgenommenen inorganischen Nitrats auf die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma zu untersuchen, (2.) dessen Einfluss auf die Endothelfunktion zu beobachten, (3.) die Folgen der oralen Aufnahme inorganischen Nitrats auf die Funktion und Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut zu analysieren, (4.) die Veränderungen der Konzentrationen von SCF, SDF1- α , MMP9 und VEGF im Plasma nach der oralen Aufnahme inorganischen Nitrats zu bestimmen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1.) Oral aufgenommenes inorganisches Nitrat führt zu einem Anstieg der Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma.
- (2.) Der Anstieg der Konzentration von Nitrat und Nitrit geht mit einer verbesserten Endothelfunktion einher.
- (3.) Die Anzahl zirkulierender angiogener Zellen im peripheren Blut steigt signifikant nach der oralen Aufnahme von inorganischem Nitrat an. Hierbei bleibt die Funktion der CAC unbeeinträchtigt.
- (4.) Zeitgleich mit der Mobilisierung der CAC kommt es zu einem Anstieg der Zytokine SCF und SDF1- α im Plasma, während die MMP9 Konzentration abfällt. Die VEGF Konzentration zeigte keine signifikante Veränderung.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Wirkung von oral aufgenommenem Nitrat auf CAC. Die Aufklärung dieses Mechanismus kann dazu verhelfen, einen neuartigen adjuvanten therapeutischen Ansatz für akute Endothelverletzungen zu entwickeln.

6. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). Pressemitteilung Nr. 354: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachten rund 41 % aller Todesfälle (2010).
2. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126 (1999).
3. Nathan, C. & Xie, Q.W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**, 915–918 (1994).
4. Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Ozüyaman, B., Schnürch, H.-G., Gödecke, A., Weber, A.-A., Robenek, M., Robenek, H., Bloch, W., Rösen, P. & Kelm, M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* **107**, 2943–2951 (2006).
5. Closs, E.I., Scheld, J.S., Sharafi, M. & Förstermann, U. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol. Pharmacol* **57**, 68–74 (2000).
6. Leone, A.M., Palmer, R.M., Knowles, R.G., Francis, P.L., Ashton, D.S. & Moncada, S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J. Biol. Chem* **266**, 23790–23795 (1991).
7. Rees, D.D., Palmer, R.M. & Moncada, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 3375–3378 (1989).
8. Amezcua, J.L., Palmer, R.M., de Souza, B.M. & Moncada, S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol* **97**, 1119–1124 (1989).
9. Garg, U.C. & Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* **83**, 1774–1777 (1989).
10. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M. & Moncada, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **86**, 5159–5162 (1989).
11. Bredt, D.S., Hwang, P.M. & Snyder, S.H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768–770 (1990).
12. Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D. & Wishnok, J.S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**, 8706–8711 (1988).
13. Nathan, C.F. & Hibbs, J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol* **3**, 65–70 (1991).
14. Lepoivre, M., Flaman, J.M. & Henry, Y. Early loss of the tyrosyl radical in ribonucleotide reductase of adenocarcinoma cells producing nitric oxide. *J. Biol. Chem* **267**, 22994–23000 (1992).
15. Azuma, H., Ishikawa, M. & Sekizaki, S. Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol* **88**, 411–415 (1986).
16. Radomski, M.W., Palmer, R.M. & Moncada, S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* **2**, 1057–1058 (1987).

17. Kubes, P., Suzuki, M. & Granger, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **88**, 4651–4655 (1991).
18. Waldman, S.A., Leitman, D.C., Andresen, J. & Murad, F. Guanylate cyclase and the adrenal natriuretic factor receptor. *Science* **240**, 805–806 (1988).
19. Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-Usmar, V.M., Moncada, S. & Schapira, A.H. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**, 50–54 (1994).
20. Torres, J., Darley-Usmar, V. & Wilson, M.T. Inhibition of cytochrome c oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem. J* **312 (Pt 1)**, 169–173 (1995).
21. Shiva, S., Brookes, P.S., Patel, R.P., Anderson, P.G. & Darley-Usmar, V.M. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 7212–7217 (2001).
22. Tannenbaum, S.R. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science* **205**, 1332, 1334–1337 (1979).
23. Eich, R.F., Li, T., Lemon, D.D., Doherty, D.H., Curry, S.R., Aitken, J.F., Mathews, A.J., Johnson, K.A., Smith, R.D., Phillips, G.N. & Olson, J.S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* **35**, 6976–6983 (1996).
24. Hagler, L., Coppes, R.I. & Herman, R.H. Metmyoglobin reductase. Identification and purification of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from bovine heart which reduces metmyoglobin. *J. Biol. Chem* **254**, 6505–6514 (1979).
25. Livingston, D.J., McLachlan, S.J., La Mar, G.N. & Brown, W.D. Myoglobin: cytochrome b5 interactions and the kinetic mechanism of metmyoglobin reductase. *J. Biol. Chem* **260**, 15699–15707 (1985).
26. Ford, P.C., Wink, D.A. & Stanbury, D.M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* **326**, 1–3 (1993).
27. Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., Yang, B.K., Waclawiw, M.A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K.T., Shields, H., Kim-Shapiro, D.B., Schechter, A.N., Cannon, R.O. & Gladwin, M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med* **9**, 1498–1505 (2003).
28. Rassaf, T., Flögel, U., Drexhage, C., Hendgen-Cotta, U., Kelm, M. & Schrader, J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res* **100**, 1749–1754 (2007).
29. Gladwin, M.T., Schechter, A.N., Kim-Shapiro, D.B., Patel, R.P., Hogg, N., Shiva, S., Cannon, R.O., Kelm, M., Wink, D.A., Espey, M.G., Oldfield, E.H., Pluta, R.M., Freeman, B.A., Lancaster, J.R., Feelisch, M. & Lundberg, J.O. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat. Chem. Biol* **1**, 308–314 (2005).
30. Zweier, J.L., Wang, P., Samouilov, A. & Kuppusamy, P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat. Med* **1**, 804–809 (1995).

31. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., Heusch, G., Schaub, G.A., Bryan, N.S., Feelisch, M. & Kelm, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med* **35**, 790–796 (2003).
32. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Jax, T., Kerber, S., Gharini, P., Balzer, J., Zotz, R.B., Scharf, R.E., Willers, R., Schechter, A.N., Feelisch, M. & Kelm, M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic. Biol. Med* **40**, 295–302 (2006).
33. Gladwin, M.T., Shelhamer, J.H., Schechter, A.N., Pease-Fye, M.E., Waclawiw, M.A., Panza, J.A., Ognibene, F.P. & Cannon, R.O. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 11482–11487 (2000).
34. Rodriguez, J., Maloney, R.E., Rassaf, T., Bryan, N.S. & Feelisch, M. Chemical nature of nitric oxide storage forms in rat vascular tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 336–341 (2003).
35. Rassaf, T., Bryan, N.S., Maloney, R.E., Specian, V., Kelm, M., Kalyanaraman, B., Rodriguez, J. & Feelisch, M. NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little? *Nat. Med* **9**, 481–482; author reply 482–483 (2003).
36. Bryan, N.S., Rassaf, T., Maloney, R.E., Rodriguez, C.M., Saijo, F., Rodriguez, J.R. & Feelisch, M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 4308–4313 (2004).
37. Gladwin, M.T. Haldane, hot dogs, halitosis, and hypoxic vasodilation: the emerging biology of the nitrite anion. *J. Clin. Invest* **113**, 19–21 (2004).
38. Lundberg, J.O. & Govoni, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med* **37**, 395–400 (2004).
39. Sato, E.F., Choudhury, T., Nishikawa, T. & Inoue, M. Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *J Clin Biochem Nutr* **42**, 8–13 (2008).
40. Duncan, C., Dougall, H., Johnston, P., Green, S., Brogan, R., Leifert, C., Smith, L., Golden, M. & Benjamin, N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med* **1**, 546–551 (1995).
41. Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G. & Preussmann, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol* **14**, 545–548 (1976).
42. Björne H, H., Petersson, J., Phillipson, M., Weitzberg, E., Holm, L. & Lundberg, J.O. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J. Clin. Invest* **113**, 106–114 (2004).
43. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Cole, J.A. & Benjamin, N. Nitrate, bacteria and human health. *Nat. Rev. Microbiol* **2**, 593–602 (2004).

44. Hendgen-Cotta, U.B., Merx, M.W., Shiva, S., Schmitz, J., Becher, S., Klare, J.P., Steinhoff, H.-J., Goedecke, A., Schrader, J., Gladwin, M.T., Kelm, M. & Rassaf, T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 10256–10261 (2008).
45. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Lundberg, J.M. & Alving, K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* **35**, 1543–1546 (1994).
46. Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., Duncan, C., Smith, L., Golden, M. & McKenzie, H. Stomach NO synthesis. *Nature* **368**, 502 (1994).
47. Castello, P.R., David, P.S., McClure, T., Crook, Z. & Poyton, R.O. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab* **3**, 277–287 (2006).
48. Webb, A., Bond, R., McLean, P., Uppal, R., Benjamin, N. & Ahluwalia, A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 13683–13688 (2004).
49. Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Agbedana, O.E., Hada, T. & Higashino, K. Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1164**, 327–330 (1993).
50. Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376 (1980).
51. Boos, C.J., Lip, G.Y.H. & Blann, A.D. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol* **48**, 1538–1547 (2006).
52. Hirsch, E.Z., Chisolm, G.M. & White, H.M. Reendothelialization and maintenance of endothelial integrity in longitudinal denuded tracks in the thoracic aorta of rats. *Atherosclerosis* **46**, 287–307 (1983).
53. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. & Isner, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964–967 (1997).
54. Hu, Y., Davison, F., Zhang, Z. & Xu, Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* **108**, 3122–3127 (2003).
55. Wassmann, S., Werner, N., Czech, T. & Nickenig, G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ. Res* **99**, e74–83 (2006).
56. Schatteman, G.C., Dunnwald, M. & Jiao, C. Biology of bone marrow-derived endothelial cell precursors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* **292**, H1–18 (2007).
57. Zentilin, L., Tafuro, S., Zacchigna, S., Arsic, N., Pattarini, L., Sinigaglia, M. & Giacca, M. Bone marrow mononuclear cells are recruited to the sites of VEGF-induced neovascularization but are not incorporated into the newly formed vessels. *Blood* **107**, 3546–3554 (2006).
58. Heiss, C., Keymel, S., Niesler, U., Ziemann, J., Kelm, M. & Kalka, C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol* **45**, 1441–1448 (2005).

59. Shi, Q., Rafii, S., Wu, M.H., Wijelath, E.S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L.R., Moore, M.A., Storb, R.F. & Hammond, W.P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* **92**, 362–367 (1998).
60. Domen, J. Bone Marrow (Hematiopoietic) Stem Cells. *Stem Cell Information: The National Institutes of Health resource for stem cell research*. (2006).
61. Li Calzi, S., Neu, M.B., Shaw, L.C., Kielczewski, J.L., Moldovan, N.I. & Grant, M.B. EPCs and pathological angiogenesis: when good cells go bad. *Microvasc. Res.* **79**, 207–216 (2010).
62. Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A. & Rafii, S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95**, 952–958 (2000).
63. Thum, T., Hoeber, S., Froese, S., Klink, I., Stichtenoth, D.O., Galuppo, P., Jakob, M., Tsikas, D., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., Borlak, J., Ertl, G. & Bauersachs, J. Age-dependent impairment of endothelial progenitor cells is corrected by growth-hormone-mediated increase of insulin-like growth-factor-1. *Circ. Res* **100**, 434–443 (2007).
64. Hill, J.M., Zalos, G., Halcox, J.P.J., Schenke, W.H., Waclawiw, M.A., Quyyumi, A.A. & Finkel, T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med* **348**, 593–600 (2003).
65. Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. & Isner, J.M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res* **85**, 221–228 (1999).
66. Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M. & Isner, J.M. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* **18**, 3964–3972 (1999).
67. Zhang, M., Zhou, S., Li, X., Shen, X.-Q. & Fang, Z. A novel hypothesis of atherosclerosis: EPCs-mediated repair-to-injury. *Med. Hypotheses* **70**, 838–841 (2008).
68. Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M.L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H. & Rafii, S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ. Res* **88**, 167–174 (2001).
69. Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y. & Imaizumi, T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* **103**, 2776–2779 (2001).
70. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ. Res* **89**, E1–7 (2001).
71. Michaud, S.E., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J. & Rivard, A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* **187**, 423–432 (2006).

72. Chen, Y.-H., Lin, S.-J., Lin, F.-Y., Wu, T.-C., Tsao, C.-R., Huang, P.-H., Liu, P.-L., Chen, Y.-L. & Chen, J.-W. High glucose impairs early and late endothelial progenitor cells by modifying nitric oxide-related but not oxidative stress-mediated mechanisms. *Diabetes* **56**, 1559–1568 (2007).
73. Zhou, B., Gu, D.-S., Liu, P.-X., Zheng, C.-L., Dong, C.-L., Du, W.-T., Wu, K.-H. & Han, Z.-C. Neovascularization potential of mobilized peripheral mononuclear cells from diabetes patients. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* **29**, 262–267 (2007).
74. Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., Böhm, M. & Nickenig, G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N. Engl. J. Med* **353**, 999–1007 (2005).
75. Zhao, X., Huang, L., Yin, Y., Fang, Y., Zhao, J. & Chen, J. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways. *Microvasc. Res* **75**, 45–52 (2008).
76. Fadini, G.P., de Kreutzenberg, S., Albiero, M., Coracina, A., Pagnin, E., Baesso, I., Cignarella, A., Bolego, C., Plebani, M., Nardelli, G.B., Sartore, S., Agostini, C. & Avogaro, A. Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **28**, 997–1004 (2008).
77. Urbich, C. & Dimmeler, S. Risk factors for coronary artery disease, circulating endothelial progenitor cells, and the role of HMG-CoA reductase inhibitors. *Kidney Int* **67**, 1672–1676 (2005).
78. Hoetzer, G.L., Van Guilden, G.P., Irmiger, H.M., Keith, R.S., Stauffer, B.L. & DeSouza, C.A. Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men. *J. Appl. Physiol* **102**, 847–852 (2007).
79. Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M. & Nickenig, G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109**, 220–226 (2004).
80. Steiner, S., Niessner, A., Ziegler, S., Richter, B., Seidinger, D., Pleiner, J., Penka, M., Wolzt, M., Huber, K., Wojta, J., Minar, E. & Kopp, C.W. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* **181**, 305–310 (2005).
81. Mano, R., Ishida, A., Ohya, Y., Todoriki, H. & Takishita, S. Dietary intervention with Okinawan vegetables increased circulating endothelial progenitor cells in healthy young women. *Atherosclerosis* **204**, 544–548 (2009).
82. Lefèvre, J., Michaud, S.-E., Haddad, P., Dussault, S., Ménard, C., Groleau, J., Turgeon, J. & Rivard, A. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J* **21**, 3845–3852 (2007).
83. Kim, W., Jeong, M.H., Cho, S.H., Yun, J.H., Chae, H.J., Ahn, Y.K., Lee, M.C., Cheng, X., Kondo, T., Murohara, T. & Kang, J.C. Effect of green tea consumption on endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in chronic smokers. *Circ. J* **70**, 1052–1057 (2006).

84. Heiss, C., Amabile, N., Lee, A.C., Real, W.M., Schick, S.F., Lao, D., Wong, M.L., Jahn, S., Angeli, F.S., Minasi, P., Springer, M.L., Hammond, S.K., Glantz, S.A., Grossman, W., Balmes, J.R. & Yeghiazarians, Y. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J. Am. Coll. Cardiol* **51**, 1760–1771 (2008).
85. Fleissner, F. & Thum, T. Critical role of the nitric oxide/reactive oxygen species balance in endothelial progenitor dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 933–948 (2011).
86. Umemura, T. & Higashi, Y. Endothelial progenitor cells: therapeutic target for cardiovascular diseases. *J. Pharmacol. Sci.* **108**, 1–6 (2008).
87. Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T. & Caro, J. Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene. *Cell. Mol. Biol. Res* **40**, 35–39 (1994).
88. Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J.F., Fishman, M.C., Huang, P.L. & Isner, J.M. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest* **101**, 2567–2578 (1998).
89. Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat. Med* **9**, 1370–1376 (2003).
90. Iwakura, A., Shastry, S., Luedemann, C., Hamada, H., Kawamoto, A., Kishore, R., Zhu, Y., Qin, G., Silver, M., Thorne, T., Eaton, L., Masuda, H., Asahara, T. & Losordo, D.W. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation* **113**, 1605–1614 (2006).
91. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A.S., Werb, Z. & Rafii, S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625–637 (2002).
92. Kirton, J.P. & Xu, Q. Endothelial precursors in vascular repair. *Microvasc. Res.* **79**, 193–199 (2010).
93. Ceradini, D.J. & Gurtner, G.C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc. Med* **15**, 57–63 (2005).
94. Thum, T., Fraccarollo, D., Galuppo, P., Tsikas, D., Frantz, S., Ertl, G. & Bauersachs, J. Bone marrow molecular alterations after myocardial infarction: Impact on endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res* **70**, 50–60 (2006).
95. Thum, T., Fleissner, F., Klink, I., Tsikas, D., Jakob, M., Bauersachs, J. & Stichtenoth, D.O. Growth hormone treatment improves markers of systemic nitric oxide bioavailability via insulin-like growth factor-I. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**, 4172–4179 (2007).

96. Iwakura, A., Luedemann, C., Shastry, S., Hanley, A., Kearney, M., Aikawa, R., Isner, J.M., Asahara, T. & Losordo, D.W. Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase-dependent mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* **108**, 3115–3121 (2003).
97. Huang, P.-H., Chen, Y.-H., Tsai, H.-Y., Chen, J.-S., Wu, T.-C., Lin, F.-Y., Sata, M., Chen, J.-W. & Lin, S.-J. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **30**, 869–877 (2010).
98. Ramprasath, V.R. & Jones, P.J.H. Anti-atherogenic effects of resveratrol. *Eur J Clin Nutr* **64**, 660–668 (2010).
99. Javanmard, S.H., Gheisari, Y., Soleimani, M., Nematbakhsh, M. & Monajemi, A. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells in hypercholesterolemic rabbits. *Int. J. Cardiol* **143**, 213–216 (2010).
100. Fiorito, C., Balestrieri, M.L., Crimi, E., Giovane, A., Grimaldi, V., Minucci, P.B., Servillo, L., D'Armiento, F.P., Farzati, B. & Napoli, C. Effect of L-arginine on circulating endothelial progenitor cells and VEGF after moderate physical training in mice. *Int. J. Cardiol* **126**, 421–423 (2008).
101. McClung, J.A., Kruger, A.L., Ferraris, A., Vanella, L., Tsenovoy, P., Weiss, M.B. & Abraham, N.G. Usefulness of clopidogrel to protect against diabetes-induced vascular damage. *Am. J. Cardiol* **105**, 1014–1018 (2010).
102. Schäfer, A., Fraccarollo, D., Pförtsch, S., Loch, E., Neuser, J., Vogt, C. & Bauersachs, J. Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 485–494 (2011).
103. Balligand, J.-L., Feron, O. & Dessy, C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol. Rev* **89**, 481–534 (2009).
104. Thum, T. & Bauersachs, J. ADMA, endothelial progenitor cells, and cardiovascular risk. *Circ. Res* **97**, e84 (2005).
105. Thum, T. & Bauersachs, J. Endothelial progenitor cells as potential drug targets. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **5**, 277–286 (2005).
106. Thum, T. & Bauersachs, J. Spotlight on endothelial progenitor cell inhibitors: short review. *Vasc Med* **10 Suppl 1**, S59–64 (2005).
107. Thum, T., Tsikas, D., Stein, S., Schultheiss, M., Eigenthaler, M., Anker, S.D., Poole-Wilson, P.A., Ertl, G. & Bauersachs, J. Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J. Am. Coll. Cardiol* **46**, 1693–1701 (2005).
108. Schulz, K., Kerber, S. & Kelm, M. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* **3**, 225–234 (1999).
109. Kleinbongard, P., Rassaf, T., Dejam, A., Kerber, S. & Kelm, M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing samples. *Meth. Enzymol.* **359**, 158–168 (2002).

110. Ishibashi, T., Miwa, T., Shinkawa, I., Nishizawa, N., Nomura, M., Yoshida, J., Kawada, T. & Nishio, M. Quantifying nanomolar levels of nitrite in biological samples by HPLC-Griess method: special reference to arterio-venous difference in vivo. *Tohoku J. Exp. Med* **215**, 1–11 (2008).
111. Marley, R., Feelisch, M., Holt, S. & Moore, K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic. Res* **32**, 1–9 (2000).
112. Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N.S., Jourd'Heuil, D. & Kelm, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J* **16**, 1775–1785 (2002).
113. Rassaf, T., Feelisch, M. & Kelm, M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic. Biol. Med* **36**, 413–422 (2004).
114. Cox, R.D. & Frank, C.W. Determination of nitrate and nitrite in blood and urine by chemiluminescence. *J Anal Toxicol* **6**, 148–152 (1982).
115. Kelm, M. & Strauer, B.E. [Endothelial dysfunction. Therapeutic and prognostic issues]. *Internist (Berl)* **40**, 1300–1307 (1999).
116. Sorensen, K.E., Celermajer, D.S., Spiegelhalter, D.J., Georgakopoulos, D., Robinson, J., Thomas, O. & Deanfield, J.E. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* **74**, 247–253 (1995).
117. Leeson, P., Thorne, S., Donald, A., Mullen, M., Clarkson, P. & Deanfield, J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart* **78**, 22–27 (1997).
118. Raitakari, O.T. & Celermajer, D.S. Testing for endothelial dysfunction. *Ann. Med* **32**, 293–304 (2000).
119. Levenson, J.A., Peronneau, P.A., Simon, A. & Safar, M.E. Pulsed Doppler: determination of diameter, blood flow velocity, and volumic flow of brachial artery in man. *Cardiovasc. Res* **15**, 164–170 (1981).
120. Rafii, S. & Lyden, D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med* **9**, 702–712 (2003).
121. Mahnke, Y.D. & Roederer, M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med* **27**, 469–485, v (2007).
122. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka-Moll, W.M., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J.M. & Asahara, T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 3422–3427 (2000).
123. Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie*. (Spektrum Akademischer Verlag GmbH: 2002).
124. Chung, S.Y., Kim, J.S., Kim, M., Hong, M.K., Lee, J.O., Kim, C.M. & Song, I.S. Survey of nitrate and nitrite contents of vegetables grown in Korea. *Food Addit Contam* **20**, 621–628 (2003).
125. Moore, M.A., Hattori, K., Heissig, B., Shieh, J.H., Dias, S., Crystal, R.G. & Rafii, S. Mobilization of endothelial and hematopoietic stem and progenitor cells by adenovector-mediated elevation of serum levels of SDF-1, VEGF, and angiopoietin-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **938**, 36–45; discussion 45–47 (2001).

126. Daher, Z., Boulay, P.-L., Desjardins, F., Gratton, J.-P. & Claing, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J. Biol. Chem* **285**, 24591–24599 (2010).
127. Broxmeyer, H.E., Orschell, C.M., Clapp, D.W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P.A., Liles, W.C., Li, X., Graham-Evans, B., Campbell, T.B., Calandra, G., Bridger, G., Dale, D.C. & Srour, E.F. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *J. Exp. Med* **201**, 1307–1318 (2005).
128. Yin, Y., Huang, L., Zhao, X., Fang, Y., Yu, S., Zhao, J. & Cui, B. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine/paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **50**, 61–67 (2007).
129. Lundberg, J.O., Weitzberg, E. & Gladwin, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 156–167 (2008).
130. Lundberg, J.O., Gladwin, M.T., Ahluwalia, A., Benjamin, N., Bryan, N.S., Butler, A., Cabrales, P., Fago, A., Feelisch, M., Ford, P.C., Freeman, B.A., Frenneaux, M., Friedman, J., Kelm, M., Kevil, C.G., Kim-Shapiro, D.B., Kozlov, A.V., Lancaster, J.R., Jr, Lefer, D.J., McColl, K., McCurry, K., Patel, R.P., Petersson, J., Rassaf, T., Reutov, V.P., Richter-Addo, G.B., Schechter, A., Shiva, S., Tsuchiya, K., van Faassen, E.E., Webb, A.J., Zuckerbraun, B.S., Zweier, J.L. & Weitzberg, E. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 865–869 (2009).
131. Modin, A., Björne, H., Herulf, M., Alving, K., Weitzberg, E. & Lundberg, J.O. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of “acidic-metabolic” vasodilation. *Acta Physiol. Scand.* **171**, 9–16 (2001).
132. McKnight, G.M., Smith, L.M., Drummond, R.S., Duncan, C.W., Golden, M. & Benjamin, N. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* **40**, 211–214 (1997).
133. Bugiardini, R., Manfrini, O., Pizzi, C., Fontana, F. & Morgagni, G. Endothelial function predicts future development of coronary artery disease: a study of women with chest pain and normal coronary angiograms. *Circulation* **109**, 2518–2523 (2004).
134. Cattaruzza, M., Guzik, T.J., Słodowski, W., Pelvan, A., Becker, J., Halle, M., Buchwald, A.B., Channon, K.M. & Hecker, M. Shear stress insensitivity of endothelial nitric oxide synthase expression as a genetic risk factor for coronary heart disease. *Circ. Res* **95**, 841–847 (2004).
135. Patti, G., Pasceri, V., Melfi, R., Goffredo, C., Chello, M., D’Ambrosio, A., Montesanti, R. & Di Sciascio, G. Impaired flow-mediated dilation and risk of restenosis in patients undergoing coronary stent implantation. *Circulation* **111**, 70–75 (2005).
136. Zuckerbraun, B.S., Shiva, S., Ifedigbo, E., Mathier, M.A., Mollen, K.P., Rao, J., Bauer, P.M., Choi, J.J.W., Curtis, E., Choi, A.M.K. & Gladwin, M.T. Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation. *Circulation* **121**, 98–109 (2010).

137. Rassaf, T., Heiss, C., Hendgen-Cotta, U., Balzer, J., Matern, S., Kleinbongard, P., Lee, A., Lauer, T. & Kelm, M. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic. Biol. Med* **41**, 295–301 (2006).
138. Werner, N., Wassmann, S., Ahlers, P., Schiegl, T., Kosiol, S., Link, A., Walenta, K. & Nickenig, G. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res. Cardiol* **102**, 565–571 (2007).
139. Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., Inden, Y. & Murohara, T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **24**, 1442–1447 (2004).
140. Heiss, C., Meyer, C., Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Heinen, Y., Luedike, P., Keymel, S., Ayoub, N., Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Kelm, M. & Rassaf, T. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1767–1772 (2012).
141. Larsen, F.J., Ekblom, B., Sahlin, K., Lundberg, J.O. & Weitzberg, E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med* **355**, 2792–2793 (2006).
142. Kapil, V., Milsom, A.B., Okorie, M., Maleki-Toyserkani, S., Akram, F., Rehman, F., Arghandawi, S., Pearl, V., Benjamin, N., Loukogeorgakis, S., Macallister, R., Hobbs, A.J., Webb, A.J. & Ahluwalia, A. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* **56**, 274–281 (2010).
143. Webb, A.J., Patel, N., Loukogeorgakis, S., Okorie, M., Aboud, Z., Misra, S., Rashid, R., Miall, P., Deanfield, J., Benjamin, N., MacAllister, R., Hobbs, A.J. & Ahluwalia, A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension* **51**, 784–790 (2008).
144. Bailey, S.J., Fulford, J., Vanhatalo, A., Winyard, P.G., Blackwell, J.R., DiMenna, F.J., Wilkerson, D.P., Benjamin, N. & Jones, A.M. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *J. Appl. Physiol* **109**, 135–148 (2010).
145. Carlström, M., Larsen, F.J., Nyström, T., Hezel, M., Borniquel, S., Weitzberg, E. & Lundberg, J.O. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 17716–17720 (2010).
146. Bryan, N.S., Calvert, J.W., Elrod, J.W., Gundewar, S., Ji, S.Y. & Lefer, D.J. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 19144–19149 (2007).
147. Kumar, D., Branch, B.G., Pattillo, C.B., Hood, J., Thoma, S., Simpson, S., Illum, S., Arora, N., Chidlow, J.H., Jr, Langston, W., Teng, X., Lefer, D.J., Patel, R.P. & Kevil, C.G. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**, 7540–7545 (2008).
148. Dimmeler, S. & Zeiher, A.M. Vascular repair by circulating endothelial progenitor cells: the missing link in atherosclerosis? *J. Mol. Med* **82**, 671–677 (2004).

149. Marin, C., Ramirez, R., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E.M., Perez-Martinez, P., Carracedo, J., Garcia-Rios, A., Rodriguez, F., Gutierrez-Mariscal, F.M., Gomez, P., Perez-Jimenez, F. & Lopez-Miranda, J. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am. J. Clin. Nutr* **93**, 267–274 (2011).

7. Veröffentlichungen

Heiss, C., Meyer, C., Totzeck, M., Hendgen-Cotta, U.B., Heinen, Y., Luedike, P., Keymel, S., **Ayoub, N.**, Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Kelm, M. & Rassaf, T. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1767–1772 (2012).

8. Danksagung

Ich danke:

Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm

Univ.-Prof. Dr. med. T. Rassaf

PD Dr. med. C. Heiss

Dipl. Biol. C. Drexhage

Graduiertenkolleg 1089

Ebenfalls möchte ich meinen Freunden danken, die mich in dieser Zeit moralisch unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern. Sie sind stets große Vorbilder für mich. Sie haben mir erst dieses Studium ermöglicht und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt. Ihr Rückhalt stellt eine unersetzliche Hilfe dar. Ihnen ist diese Arbeit in Dankbarkeit und Liebe gewidmet.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Nassim Ayoub
Geburtsdatum	04.09.1984
Geburtsort	Halle / Saale
Eltern	Hussein Youssef Ayoub, Zahnarzt Ines Ayoub, Zahnärztin

Schulbildung:

1992 – 1995	Grundschule Hagen – Dahl; Hagen
1995 – 2004	Albrecht Dürer Gymnasium; Hagen
2004	Abitur

Hochschulausbildung:

10/2004 – 2010	Medizinstudium an der RWTH-Aachen
11/2010	Approbation als Arzt

Auszeichnungen:

2007 – 2008	Stipendiat im Graduiertenkolleg 1089 der deutschen Forschungsgemeinschaft
-------------	--

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

18.03.2013, Nassim Ayoub