

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

**Untersuchung des Nitritgehalts im Blutplasma von Normalpersonen
mittels Flow-Injection-Analyse**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jörn Christian Siemer

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kelm
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Decking

für den Frieden
auf dieser Welt

Liste der Abkürzungen:

b	Ordinatenabschnitt einer Regressionsgeraden
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CV	Variationskoeffizient
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS oder NOS III	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FIA	Flow-Injection-Analyse
gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HDL	High-Density-Lipoproteine
HIV	Human Immundeficiency Virus
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HWZ	Halbwertszeit
IU	Internationale Einheiten
LDL	Low-Density-Lipoproteine
m	Steigungsmaß einer Regressionsgeraden
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
msec	Millisekunden
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO _x	Summe der Gesamtstickoxide
r	Korrelationskoeffizient als Maß für den linearen Zusammenhang
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SEM	Mittelwert ± Standardfehler
sGC	Guanylat-Zyklase
UV	Ultraviolett
w/v	Gewicht (Masse) / Volumen

Inhalt:

I. Einleitung	7
II. Material und Methoden	10
1. Chemikalien	10
2. Materialien	10
3. Geräte	11
4. Flow-Injection-Analyse.....	11
5. Auswertungsverfahren	14
5.1 Standardadditionsverfahren.....	14
6. Stopplösung	15
7. Probenaufarbeitung	16
7.1. Blutabnahme	16
7.2. Zentrifugieren und Trennen	16
8. Nitratmessung	17
9. Probandenkollektiv	17
10. Klinische und laborchemische Parameter	18
11. Mathematisch-statistische Methoden	19
III. Ergebnisse	21
1. Methodik	21
1.1 Evaluierung der Methodik.....	21
1.2. Eigenschaften der Stopplösung	22
2. Probanden.....	24
2.1. Kollektivdaten	24
3. Zielparameter	26

4.	Mögliche Einflußnahmen der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter auf den Nitritgehalt	26
5.	Mögliche Einflußnahmen der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter auf den Nitratgehalt.....	31
6.	Erstellter Referenzbereich für Nitrit im Blutplasma	34
IV.	Diskussion	38
1.	Gegenstand der Studie.....	38
2.	Hauptaussagen.....	38
3.	Korrelationen und Einflußnahmen bezüglich Nitrit.....	39
4.	Endogene Messungen von Nitrit - Nahrungsbeeinflussung	40
5.	Erstellen eines Referenzbereichs.....	41
6.	Schlußfolgerung, klinische Bedeutung und Ausblick.....	43
7.	Methodenkritik.....	44
V.	Literaturverzeichnis	45
VI.	Danksagung	49
VII.	Lebenslauf	50
VIII.	Zusammenfassung	51

I. Einleitung

Das kurzlebige Molekül Stickstoffmonoxid (NO) hat Bedeutung für verschiedene physiologische Prozesse im Säugetierkreislauf. Erst in den letzten zwanzig Jahren fand man heraus, daß NO eine Funktion in der Immunabwehr [47] hat, als Botenstoff im Nervensystem [48] involviert ist und ein wichtiger Regulator des Gefäßtonus [39] ist. Außerdem verursacht NO eine Bronchodilatation [47], hemmt die Thrombozytenaggregation und -adhäsion [39], nimmt Einfluß auf den programmierten Zelltod [49] und ist bei der Regulation der penilen Erektion [50] beteiligt.

Seitdem hat NO eine immer größere Bedeutung in der Wissenschaft erhalten. 1998 erlangten Ignarro, Furchgott und Murad den Nobelpreis für Medizin aufgrund ihrer Forschung über die Physiologie und Pathophysiologie des Stickstoffmonoxids [9, 36].

Was die Relevanz des NO im Gefäßsystem angeht, so entdeckte Furchgott 1980 ein Molekül, welches zu einer Gefäßrelaxation führte, den EDRF (endothelium-derived relaxing factor; deutsch: aus dem Endothel stammender Entspannungsfaktor) [36]. 1987 gelang ihm der Nachweis, daß der Faktor mit Stickstoffmonoxid identisch ist [34].

Der wichtigste physiologische Bildungsort für NO sind die Endothelzellen in der Blutgefäßwand. NO wird hier aus der Aminosäure L-Arginin durch die endotheliale Isoform der NO-Synthasen (eNOS oder NOS III) gebildet. Das Stickstoffmonoxid erreicht in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand per diffusionem sein intrazelluläres Rezeptorenzym, die lösliche Guanylat-Zyklase (sGC). Dieses bildet zyklisches GMP (cGMP), welches zu einer Relaxation der Muskelzellen und somit zu einer Weitstellung der Gefäße führt [15].

Das Endothel ist durch den beschriebenen NO-Stoffwechsel für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von essentieller Bedeutung. Es moduliert den aktuellen und bedarfsgerechten Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, die Architektur der Gefäßwand und die Gefäßpermeabilität. Störungen dieser wesentlichen Endothelfunktionen werden unter dem Oberbegriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefaßt [13]. Eine Störung der

endothelialen Funktion wird unter anderem als frühes Schlüsselereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose angesehen [13,14].

Aufgrund der Regulierung der Endothelfunktionen durch den oben beschriebenen NO-Stoffwechsel ist die Konzentration des Stickstoffmonoxids im Blut möglicherweise ein akuter Parameter für den Endothelzustand und könnte somit auch Marker der endothelialen Dysfunktion sein.

Die in vivo Quantifizierung von NO selbst ist aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (0,3-0,6 msec.) sehr schwierig. Deshalb versucht man die stabileren oxidativen Abbauprodukte, Nitrit und Nitrat, zu bestimmen, um eine quantitative Aussage über die endotheliale NO-Synthese machen zu können [2].

Die Nitratkonzentration im Blutplasma wird allerdings stark durch extravaskuläre Faktoren wie Nahrung, Funktion von Nieren, Leber und Verdauungstrakt beeinflusst und scheint daher ein zu unspezifischer Marker für akute Änderungen in der NO-Synthese zu sein [10, 27]. Es dient somit lediglich als Parameter zur Bilanzierung des gesamten NO-Stoffwechsels im menschlichen Organismus.

Dagegen hat sich Nitrit im Blutplasma als spezifischer und sensitiver Marker bezüglich der akuten Veränderungen der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthese herausgestellt [17, 27]. Endothelial gebildetes Stickstoffmonoxid wird im plasmatischen Randstrom zu Nitrit oxidiert. Dieses plasmatische Nitrit stammt bei gesunden, nüchternen Normalpersonen zu 90% aus dem endothelial gebildeten NO [3].

Allerdings ist auch die Messung des Nitritgehaltes im Blutplasma nicht unproblematisch. Vor allem ist die Probenlagerung und –aufarbeitung schwierig, da der Nitritgehalt zum einen durch kontaminierte Materialien und zum anderen durch einen möglichen Abbau des Nitritgehaltes der Probe nach der Blutabnahme verfälscht werden kann [2].

Die bisher verwendeten Methoden zur Untersuchung des Nitritgehaltes gaben in Bezug auf Validität, Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Auch waren die untersuchten Fallzahlen zu klein, um einen zuverlässigen physiologischen Nitritbereich im Blutplasma zu definieren.

Daher wurde in dieser Studie eine neue Methode, die Flow-Injection-Analyse, zur Bestimmung der Konzentration an plasmatischen Nitrit verwendet.

Mit einer optimierten und standardisierten Probenbehandlung sollte ein großes Kollektiv Normalpersonen analysiert werden, um schließlich einen Referenzbereich für den Nitritgehalt im Blutplasma von gesunden Personen ermitteln zu können. Darüber hinaus sollte eine mögliche Korrelation und Einflußnahme anderer laborchemischer und klinischer Parameter auf den Nitritwert untersucht werden.

Es wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Läßt sich ein Referenzbereich für Nitrit im Blutplasma bei Normalpersonen erstellen?
2. Korreliert der Nitritgehalt im Blutplasma von Normalpersonen mit anderen klinischen oder laborchemischen Parametern?
3. Wie hängt der Nitritgehalt mit dem Nitratgehalt im Blutplasma von Normalpersonen zusammen?

II. Material und Methoden

Im folgenden werden die verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte aufgelistet. Danach schließt sich die Vorstellung des Probenhandlings, der Meßmethode und des Auswertungsverfahrens an. Außerdem erfolgt eine Erläuterung des Patientenkollektivs und der ermittelten klinischen und laborchemischen Parameter.

1. Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden verwendet:

- Citrat (tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Kochsalzlösung (NaCl Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland)
- N-(1-naphtyl)-ethylendiamin (MW: 259,2, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumnitrit (MW: 69, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Salzsäure (1%ige, Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Sulfanilamid (MW: 172,2, Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Wasser für den Chromatographiebedarf (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2. Materialien

Folgende Materialien wurden verwendet:

- 5 mL Luer Einmalplastikspritze (Almo, Arolsen, Deutschland)
- Analyse-Test (Cat# 780001) zur Nitratmessung (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)
- Dreiwegehahn (Discofix-3, Braun, Melsungen, Deutschland)
- EDTA-Röhrchen (Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich)

- Eindrückstopfen für Plastikreagenzglas (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Einmal-Plastik-Reaktionsgefäß (Safe-Locks, 2,0 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Kapillare aus Polyetheretherketon (PEEK™)
- Pipettenspitze (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Plastikreagenzglas (13 mL, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäße (1,5 mL, Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Stopfen für Einmalplastikspritze (Combi stopper, Braun, Melsungen, Deutschland)
- Ultrafiltrationsröhrchen (Sartorius Centrisart, cut-off 10.000 Dalton, Goettingen, Deutschland)
- Vacutainer-System (Becton Dickinson, Meylan Cedex, Frankreich)
- Venenpunktionsbesteck (Abbott, Rep. Irland)

3. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Automatischer Probenaufgeber (Spark Holland Triathlon, Niederlande)
- HPLC-Pumpe (Shimadzu LC-6A, Japan)
- Integrator (Shimadzu C-R4AX Chromatopac, Japan)
- Meßzelle (3 µL Volumen, Shimadzu, Japan)
- UV-Detektor (Shimadzu SPD-6AV, Japan)
- Zentrifuge (Hettich Universal 30RF, Deutschland) mit Ausschwingrotor
- Zentrifuge (Hettich Universal 30RF, Deutschland) mit Festwinkelrotor

4. Flow-Injection-Analyse (FIA)

Die Flow-Injection-Analyse ist ein Verfahren zur Bestimmung von Nitrit im Blutplasma.

Die Meßmethode zur Nitritbestimmung basiert auf der Griess-Reaktion [1, 16]. Das als Laufmittel dienende Farbreagenz besteht zu gleichen Teilen aus Sulfanilamid und in Salzsäure gelöstes N-(1-naphtyl)-ethylendiamin.

Die Anlage der Flow-Injection-Analyse besteht aus einer HPLC-Pumpe, einem automatischen Probenaufgeber, einem UV-Detektor mit einer Meßzelle und aus einem Integrator zur Datenaufnahme. Sämtliche Kapillaren haben einen Durchmesser von 0,25 mm.

Die Proben werden über eine 20 µL-Schleife in das Meßsystem eingebracht. Bei einer konstanten Flußgeschwindigkeit von 1 mL/min findet in der 90 cm langen PEEKTM-Reaktionsschleife die unvollständige Farbreaktion mit dem Laufmittel statt. Die Probe wird im UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 545 nm analysiert. Die ermittelten Daten werden von einem Integrator aufgezeichnet (siehe **Abbildung 1**).

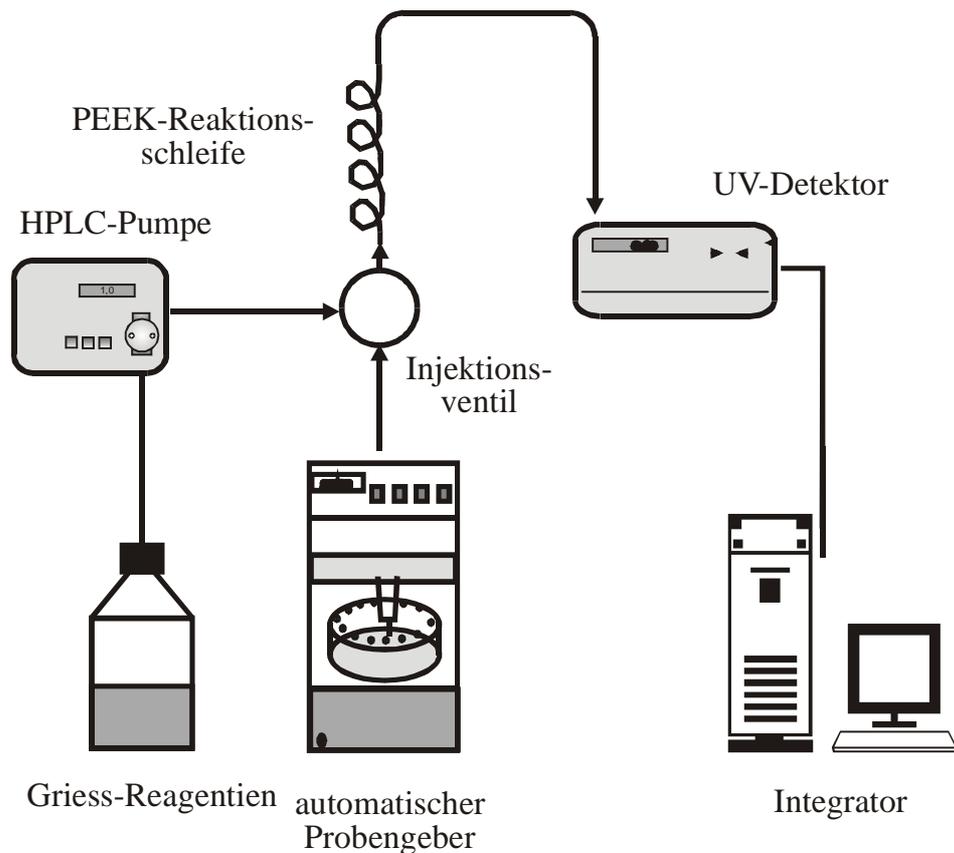


Abb.1: Schematische Darstellung des Geräteaufbaus einer Flow-Injection-Analyse.

Ultrafiltrierte Proben werden automatisch in das System über eine Probenschleife eingebracht. In einer PEEK-Reaktionsschleife werden Probe und Griess-Farbreagenz automatisch zusammengeführt. Anschließend ist im UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 545 nm ein Signal entsprechend der Nitritkonzentration in der Probe ableitbar. Das Signal wird aufgezeichnet und vom Integrator und der Datensoftware ausgewertet.

5. Auswertungsverfahren

5.1. Standardadditionsverfahren

Zur Auswertung der ermittelten Daten im Integrator wurde das Standardadditionsverfahren verwendet. Dieses Verfahren benötigt eine spezielle Meßreihe der zu untersuchenden Probe. Dabei wird die Probe aliquotiert und mit aufsteigenden Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz versehen. Alle Meßwerte enthalten somit den gleichen nativ vorhandenen Anteil und zusätzlich die bekannten aufsteigenden Konzentrationen des zu bestimmenden Analyten. Durch Erstellung einer Regressionsgeraden ($y=mx+b$) kann aus den ermittelten Daten der ursprüngliche (native) Gehalt in der Probe ermittelt werden, wobei die x-Koordinate dem Wert der hinzugefügten Konzentration entspricht. Hierfür wird eine Standard-Lösung aus Natriumnitrit und Wasser für den Chromatographiebedarf verwendet.

Das aus der Ultrafiltration (siehe II.7.2.) erhaltene Filtrat wird in 5 Einzelproben aliquotiert und mit aufsteigender Nitritkonzentration (Endkonzentration bezogen auf das Gesamtvolumen der Einzelprobe: +0, +50, +100, +200, +400 nmol/L) versetzt. Zehn durch Doppelbestimmung (2x5) im Integrator ermittelte Peakhöhen dienen als Grundlage für die lineare Regression. Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse entspricht der negativen Nitritkonzentration der nativen Probe. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren und Subtraktion der Konzentration in der Stopplösung (siehe II.6.) ergibt sich die Ausgangskonzentration in der abgenommenen Probe (siehe **Abbildung 2**).

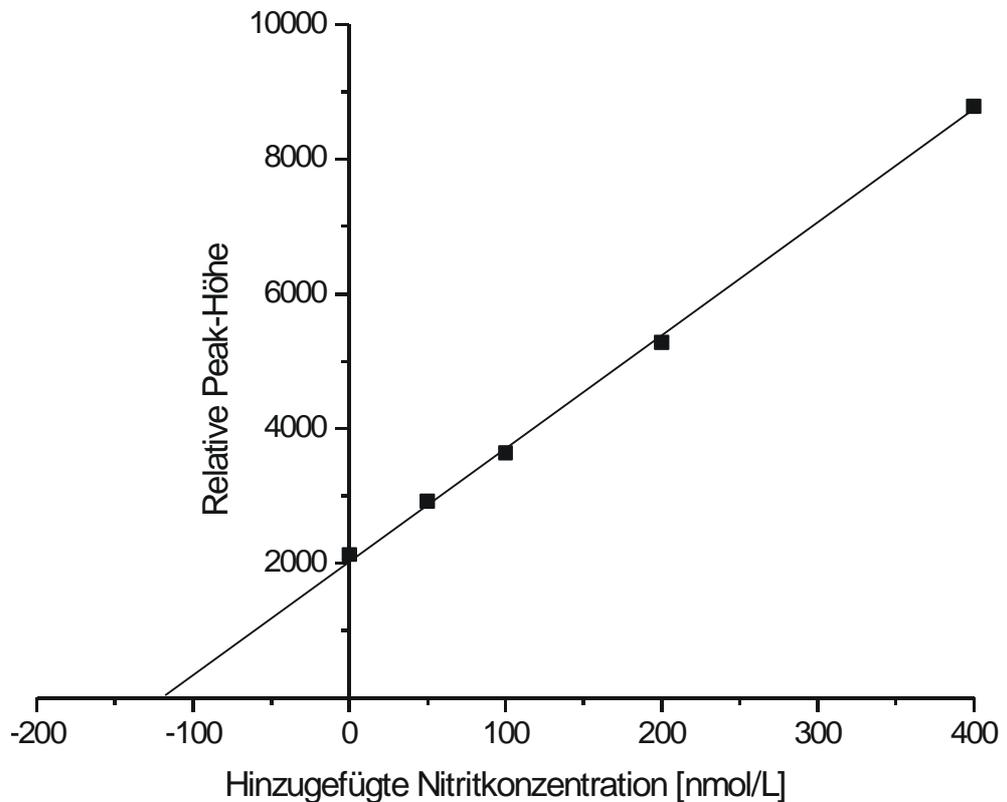


Abb.2: Regressionsgerade nach Standardadditionsverfahren.

Die fünf Punkte entsprechen den fünf Einzelproben (Mittelwert der Doppelbestimmung), die die native Nitritkonzentration und zusätzlich die der Abzisse entsprechend hinzugefügte Nitritkonzentration (Endkonzentrationen bezogen auf Gesamtvolumen der Probe) enthalten.

Der Schnittpunkt mit der Abzisse entspricht der nativen Nitritkonzentration (Negativwert) der aufgegebenen Probe.

6. Stopplösung

Um nach der Blutabnahme den Nitritabbau in der Probe zu verhindern, wurde eine Stopplösung entwickelt. Die Stopplösung besteht aus Kochsalzlösung und Citrat (3,8% (w/v)), in der das Blut aufgenommen wird. Zur Blutanalyse wird diese Lösung in 5 mL Luer Einmalplastikspritzen mit einem Volumen von 4 mL vorgelegt. Danach

wird die Spritze mit einem Stopfen verschlossen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4 °C in Eiswasser gekühlt gelagert.

7. Probenaufarbeitung

7.1. Blutabnahme

Alle Probanden des Kollektivs waren regelmäßige Blutspender in der Blutbank und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf. Nach der Vollblutspende des Probanden fand die Blutabnahme nach einer ausreichenden Ruhepause in einem gesonderten Raum im Liegen statt.

Es wurden ein Venenpunktionsbesteck, ein Dreiwegehahn und ein Vacutainer-System verwendet.

Zuerst wurden 5 mL Blut in ein Vacutainer-System mit EDTA-Röhrchen abgenommen und für Routinezwecke verwendet. Danach wurde die vorgekühlte Spritze mit der Stopplösung am Dreiwegehahn befestigt und mit 1 mL Blut auf exakt 5 mL aufgezogen, mit dem Stopfen verschlossen, gemischt und in einem mit Eis gefüllten Isolierbehälter gelagert.

Die Proben verblieben bis zur weiteren Aufarbeitung maximal 2 Stunden in diesem Behälter.

7.2. Zentrifugieren und Trennen

Die Probe wurde in ein gekühltes Plastikreagenzglas überführt und mit einem Stopfen verschlossen. Das Reagenzglas wurde in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor bei 10.000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert.

Der klare Überstand wurde in ein vorgekühltes Ultrafiltrationsröhrchen pipettiert und mit einem Festwinkelrotor bei 2.500 g und 4 °C für 75 Minuten zentrifugiert.

Danach wurden aus dem Überstand je 190 µL in 5 Reaktionsgefäße gebracht und mit 10 µL Nitritstandard in aufsteigender Konzentration (0, +1000, +2000, +4000, +8000 nmol/L Nitrit) versetzt (Endkonzentrationen

bezogen auf das Gesamtvolumen der Proben siehe II.5.1.). Schließlich standen die Proben zur Analyse bereit.

8. Nitratmessung

Neben der Nitritmessung wurde als zweiter Parameter des NO-Metabolismus die Konzentration an Nitrat im Blutplasma bestimmt.

Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher Analyse-Test verwendet [43, 44].

Nitrat wird durch die Nitrat-Reduktase in Nitrit umgewandelt. Anschließend wird das Griess-Reagenz dazugegeben und es erfolgt eine Azokopplung, die in einem lila Farbumschlag resultiert. Dieser Farbumschlag wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen. Durch Abzug des Leerwertes und Vergleich mit der Standard-Kurve wird der Nitratgehalt der Probe bestimmt.

In der Gebrauchsanweisung des Herstellers ist beschrieben, daß der Test über dem gemessenen Bereich von 2,5 - 200 µmol/L linear ($r=0,99$) ist und eine minimale Auflösung von 2,5 µmol/L hat.

Für die Nitratmessung wurde das Ultrafiltrat der Probandenproben verwendet (siehe II.7.2.). Die Proben wurden in Einmal-Plastik-Reaktionsgefäßen aufbewahrt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

9. Probandenkollektiv

Das Probandenkollektiv dieser Studie setzte sich aus regelmäßigen Vollblutspendern in der Blutbank und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf zusammen, die an dieser Studie freiwillig teilnahmen.

Um dort spenden zu können, mußte der Proband folgende Kriterien erfüllen:

- Alter zwischen 18 und 68 Jahren
- Gewicht mehr als 50 kg
- Systolischer Blutdruck unter 190 mmHg und Puls unter 160/min
- Hb-Wert über 10g/dl

- Körpertemperatur unter 38,5 °C
- Keine Systemerkrankungen oder maligne Tumoren
- Keine Infektionskrankheiten (Hepatitis, Syphilis, HIV)
- Keine akuten Infekte
- Kein Drogenmißbrauch
- Kein Aufenthalt in Tropengebieten oder Ländern der Dritten Welt innerhalb des letzten Jahres
- Letzte Blutspende vor mindestens 2 Monaten

Konnte der Spender nicht alle Kriterien erfüllen, so wurde er nicht zur Blutspende zugelassen und damit auch nicht in diese Untersuchung eingeschlossen.

10.Klinische und laborchemische Parameter

Die klinischen Werte Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht, die detaillierte Rauchgewohnheit (Menge pro Tag und seit wieviel Jahren) und eine mögliche Medikamenteneinnahme wurden in Form eines Fragebogens vor der Blutabnahme erfaßt. Blutdruck, Puls und Temperatur wurden vor der Blutspende von den Ärzten der Blutbank und Transfusionsmedizin bestimmt. Die notwendige Blutabnahme zur Bestimmung der klinischen Laborparameter erfolgte in Zusammenhang mit der Probenabnahme zur Nitrit- und Nitratbestimmung. Im folgenden sind alle ermittelten Parameter aufgelistet:

Klinische Werte

- Geschlecht
- Alter
- Größe
- Gewicht
- Rauchen (detaillierte Rauchgewohnheit)
- Regelmäßige Medikamenteneinnahme

- Blutdruck
- Puls
- Temperatur

Laborchemische Werte

- Leukozyten
- Erythrozyten
- Hämoglobin
- Hämatokrit
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)
- Gamma-Glutamyl-Transferase (gamma-GT)
- Gesamtbilirubin
- Gesamtcholesterin
- Low-Density-Lipoproteine (LDL)
- High-Density-Lipoproteine (HDL)

Spezielle Analytik

- Nitrit
- Nitrat

11.Mathematisch-statistische Methoden

Die Daten wurden, falls nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Eine Normalverteilung der Daten wurde vorher mittels des Shapiro-Wilks-Tests überprüft. Zur Korrelation der verhältnisskalierten und intervallskalierten Parameter wurde der Pearson-Test verwendet. Zweiseitige p-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Nominalskalierte Variablen wurden mittels t-Test für

unabhängige Stichproben in Hinblick auf Unterschiede bei den Zielparametern untersucht. Auch hier wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die Analysen wurden mittels der SPSS-Software for Windows (Statistical Package for Analysis in Social Sciences, Version: 6.1.3; SPSS-Inc., Chicago, ILL, USA) durchgeführt.

III. Ergebnisse

Zunächst erfolgt die Evaluierung der Methodik und eine Beschreibung der Eigenschaften der Stopplösung. Nach der Erläuterung der Kollektivdaten der Probanden werden die Ergebnisse der Zielparameter vorgestellt und deren Zusammenhänge mit den weiteren Parametern untersucht. Schließlich wird der ermittelte Referenzwert für den Nitritgehalt im Blutplasma vorgestellt.

1. Methodik

1.1. Evaluierung der Methodik

Flow-Injection-Analyse

Die Linearität ($r=0,98$) des Verfahrens zur Nitritmessung ist im Bereich von 8 – 1600 nmol/L gegen eine Identitätsgerade dokumentiert (siehe **Abbildung 3**). Bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von $>3:1$ beträgt die kleinste detektierbare Nitritkonzentration (Sensitivität) im Blutplasma 8 nmol/L. Die Auflösung dynamischer Unterschiede (minimale Auflösung) entspricht 2 nmol/L. Die Reproduzierbarkeit der Methode inklusive Aufarbeitung liegt im Bereich von $100 \pm 10\%$. Das heißt, bei mehreren Messungen der gleichen Probe betragen die Unterschiede der einzelnen Messergebnisse zum Mittelwert maximal 10%. Die Wiederfindungsrate beschreibt, wie genau die tatsächliche Nitritkonzentration in der Probe durch die Methodik ermittelt wird. Sie entspricht ebenfalls $100 \pm 10\%$. Der Variationskoeffizient (CV) beträgt $<10\%$ über die gesamte Analyse.

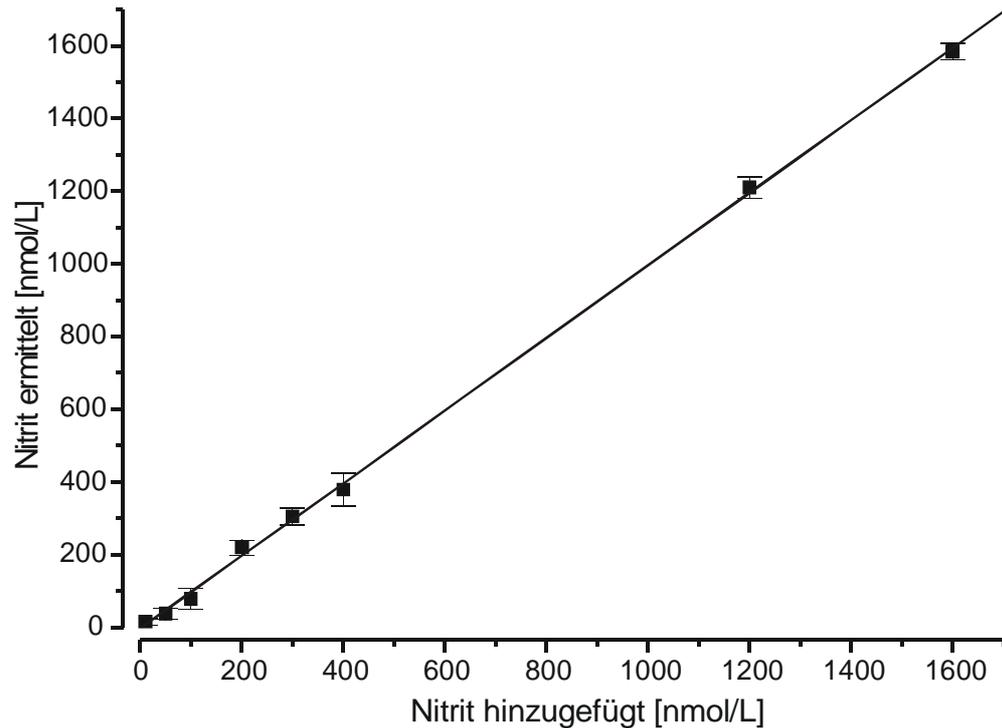


Abb.3: Evaluierung des Verfahrens zur Nitritmessung (n=3).

Über dem Konzentrationsbereich von 8 - 1600 nmol/L beträgt die Linearität $r=0,98$. Die Sensivität liegt bei 8 nmol/L und die minimale Auflösung bei 2 nmol/L. Die Reproduzierbarkeit entspricht $100 \pm 10\%$. Das Gleiche gilt für die Wiederfindungsrate mit $100 \pm 10\%$. Der Variationskoeffizient beträgt $<10\%$.

1.2. Eigenschaften der Stopplösung

Die Stopplösung dient dazu, den oxidativen Abbau von NO_2^- im Blut nach der Blutabnahme weitgehend zu unterbinden. **Abbildung 4** zeigt, daß ohne Stopplösung und Lagerung bei Raumtemperatur die Halbwertszeit von Nitrit in einer Blutprobe bei $130 \text{ sec} \pm 20 \text{ sec}$ liegt.

Dadurch daß die Stopplösung die Blutprobe verdünnt und der Citrat-Anteil von 3,8% als Antikoagulans dient, wird der Nitritabbau vermieden. Dieser Effekt wird zusätzlich durch die Probenlagerung bei $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ unterstützt.

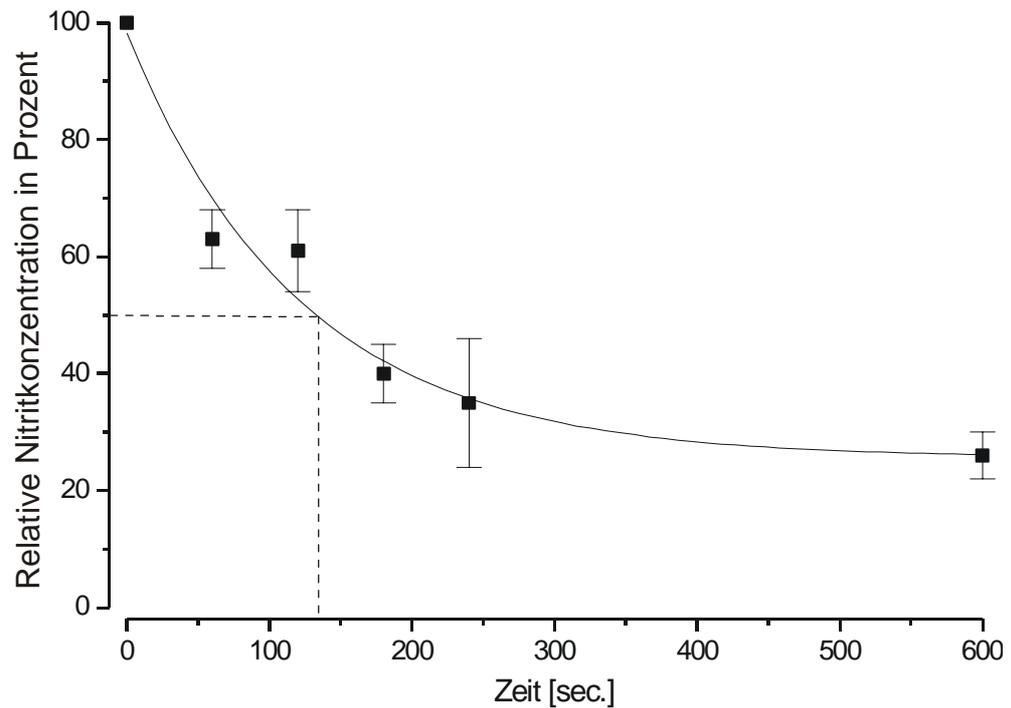


Abb.4: Halbwertszeit von Nitrit im Vollblut nach Probenentnahme ohne sofortige Verwendung der Stopplösung und Lagerung bei Raumtemperatur (n=10).

Die Blutproben wurden entweder direkt in die Stopplösung (0 sec) oder zunächst ohne Behandlung aufbewahrt und zu den vorgegebenen Zeiten (60, 120, 180, 240, 600 sec) in die Stopplösung überführt und bei +4 °C weiterbehandelt. Die ermittelte Halbwertszeit betrug 130 ± 20 sec.

Abbildung 5 zeigt die Stabilität des Nitritgehalts in der mit der Stopplösung versehenen Probe über einen Zeitraum von 250 Minuten in einem Konzentrationsbereich von 300 bis 2100 nmol/L.

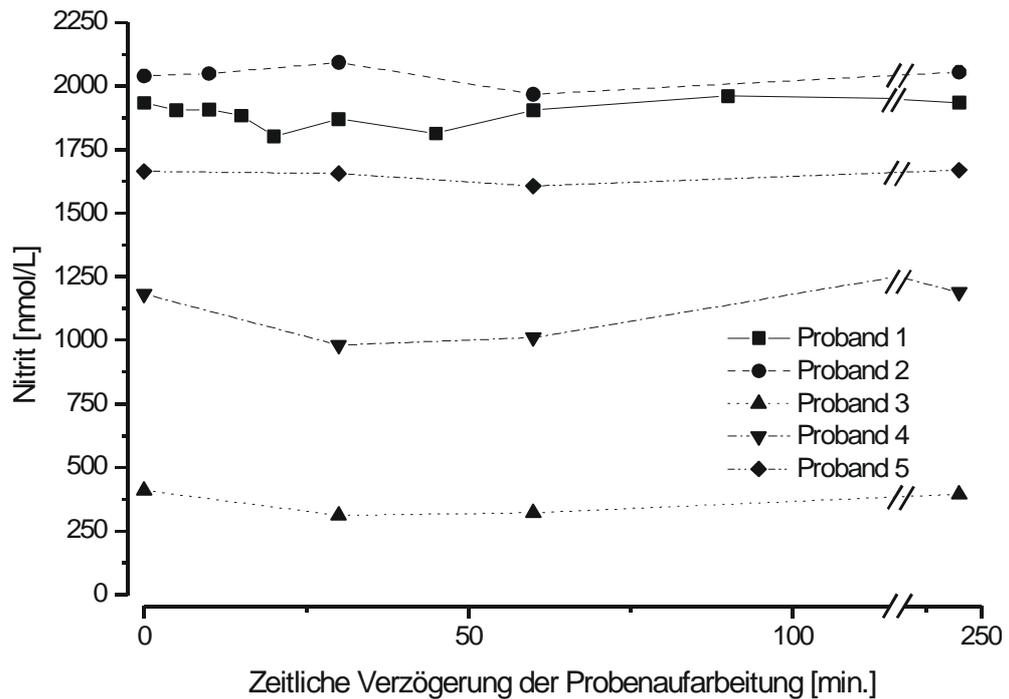


Abb.5: Lagerung von Nitritproben in der Stopplösung mit unterschiedlichen Konzentrationen über einen Zeitraum von 250 Minuten (n=5).

Die Stopplösung und eine niedrige Temperatur (+4 °C) zur Probenlagerung sorgen für einen konstanten Nitritgehalt in der Probe.

2. Probanden

2.1. Kollektivdaten

Die Gesamtprobandenzahl betrug 492. Davon waren 351 (71,3%) männlich und 141 (28,7%) weiblich. Es gab 167 (33,9%) Raucher. 8,1% von ihnen gaben 20 Packyears oder mehr an. 57 (11,6%) Probanden gaben an, daß sie regelmäßig Medikamente einnahmen. Bei 29 (6,0%) Probanden wurde bei der vorausgegangenen Blutdruckmessung ein systolischer Blutdruck von 160 mmHg oder mehr gemessen. 24 (5,3%) Probanden erfüllten die Kriterien einer Hyperlipoproteinämie (LDL >160 mg/dL & LDL/HDL >3,5). Es gab drei (0,6%) Probanden, die einen γ -GT Wert von >24 IU/L und gleichzeitig einen gesamt-Bilirubin Wert >1 mg/dL hatten.

Die **Tabelle 1** stellt die deskriptive Statistik aller klinischen und laborchemischen erhobenen Parameter dar.

Variable	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD
Alter (Jahre)	18	66	37	12
Größe (cm)	153	204	176	9
Gewicht (kg)	49	165	77	14
Bodymaßindex (kg/m ²)	17,6	68,7	24,7	4,0
RRsys (mmHg)	99	183	135	16
RRdia (mmHg)	39	111	78	11
RRmean (mmHg)	61	129	97	11
Puls (min-1)	50	156	76	14
Druckfrequenzprodukt (mmHg/min)	3435	15113	7418	1726
Temperatur (Celsius)	35	38	37	1
Hb (g/dl)	12,0	18,0	14,0	1,3
Hkt (%)	34	52	42	3
Erythrozyten (Mio/μL)	3,6	5,8	4,7	0,4
Leukozyten (μL-1)	3000	13300	5800	1468
GPT (IU/L)	4	45	13	6
gamma-GT (IU/L)	5	51	13	8
Gesamtbilirubin (mg/dL)	0,3	1,8	0,7	0,2
HDL (mg/dL)	24	129	57	16
LDL (mg/dL)	54	247	123	38
Gesamtcholesterin (mg/dL)	113	361	216	44
LDL-HDL-Quotient	0,78	7,56	2,40	1,08

Tab.1: Deskriptive Statistik der klinischen und laborchemischen Parameter.

3. Zielparameter

Die ermittelten Werte für die Zielparameter Nitrit und Nitrat bezogen auf das Gesamtkollektiv sind in der **Tabelle 2** zusammengefügt.

Es wurden mit der Flow-Injection-Analyse Werte für Nitrit im Blutplasma zwischen 10 und 1021 nmol/L gemessen. Der Mittelwert betrug 278 nmol/L mit einem Standardfehler von 8,4 nmol/L. Der Median wurde mit 245 nmol/L ermittelt.

Für den zweiten Zielparameter Nitrat wurden mit Hilfe des kommerziellen Analyse-Tests Werte zwischen 4 und 141 $\mu\text{mol/L}$ im Blutplasma gemessen. Hier betrug der Mittelwert 34 $\mu\text{mol/L}$ mit einem Standardfehler von 0,9 $\mu\text{mol/L}$. Der Median lag bei 30 $\mu\text{mol/L}$.

Variable	Min.	Mittel	Max.	Median	SD	SEM
Nitrit (nmol/L)	10	278	1021	245	173	8,4
Nitrat ($\mu\text{mol/L}$)	4	34	141	30	20	0,9
NO_x ($\mu\text{mol/L}$)	4,125	34,511	141,230	30,220	19,9	1,0
NO_2/NO_3	0,001	0,010	0,079	0,008	0,009	0,001

Tab.2: Daten der ermittelten Zielparameter dieser Studie.

4. Mögliche Einflußnahmen der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter auf den Nitritgehalt

Alle verhältnisskalierten bzw. intervallskalierten erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter wurden mit dem Pearson-Test auf eine Korrelation mit dem Nitritgehalt untersucht, um eine mögliche Einflußnahme auf die unabhängige Variable festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Korrelationen sind in der **Tabelle 3** festgehalten.

Nitrit-Korrelation			
Variable	Korrelationskoeffizient (r)	Bestimmtheitsmaß (r ²)	Signifikanz (p)
Alter	0,001	<0,001	0,981
Größe	-0,015	<0,001	0,754
Gewicht	-0,026	<0,001	0,571
Bodymaßindex	-0,032	0,001	0,506
RRsys	-0,112	0,013	0,022
RRdia	-0,029	<0,001	0,547
RRmean	-0,074	0,005	0,132
Puls	0,056	0,003	0,253
Druckfrequenzprodukt	0,014	<0,001	0,782
Temperatur	0,036	0,001	0,465
Hb	-0,125	0,016	0,01
Hkt	-0,069	0,005	0,164
Erythrozyten	-0,03	<0,001	0,547
Leukozyten	0,081	0,007	0,101
GPT	0,038	0,001	0,445
gamma-GT	-0,005	<0,001	0,923
Gesamtbilirubin	-0,028	<0,001	0,57
HDL	-0,064	0,004	0,206
LDL	-0,004	<0,001	0,94
Gesamtcholesterin	-0,089	0,008	0,079
LDL-HDL-Quotient	0,047	0,002	0,354
Packyear	0,04	0,002	0,413
Nitrat	0,225	0,051	<0,001

Tab. 3: Pearson-Tests bei verhältnisskalierten bzw. intervallskalierten Parametern bzgl. der möglichen Korrelationen mit Nitrit.

Die signifikanten Ergebnisse sind fett gedruckt.

Bezüglich der nominalskalierten Kriteriumsvariablen (Geschlecht, Rauchen, Medikamenteneinnahme) wurden t-Tests für unabhängige Stichproben gerechnet, um mögliche Unterschiede hinsichtlich des Nitritwertes bei den jeweiligen Subgruppen aufzeigen zu können (siehe **Tabelle 4**).

Nitrit-Differenzen in den Subgruppen		
Variable	t-Wert	Signifikanz (p)
Geschlecht (männlich: 351; weiblich: 141)	0,240	0,811
Rauchen (Raucher: 167; Nichtraucher: 325)	0,716	0,474
Medikamenteneinnahme (positiv: 57; negativ: 435)	0,827	0,409

Tab. 4: t-Tests für unabhängige Stichproben bzgl. möglicher Unterschiede beim Nitritwert der jeweiligen Subgruppen.

Eine signifikante Korrelation mit dem Nitritgehalt liegt beim systolischen Blutdruck (siehe **Abbildung 6**) und beim Hämoglobinwert (siehe **Abbildung 7**) vor. Allerdings ist das Bestimmtheitsmaß (r^2) mit 0,013 und 0,016 sehr klein, so daß nur ein sehr geringer Zusammenhang mit dem Nitritwert vorliegt.

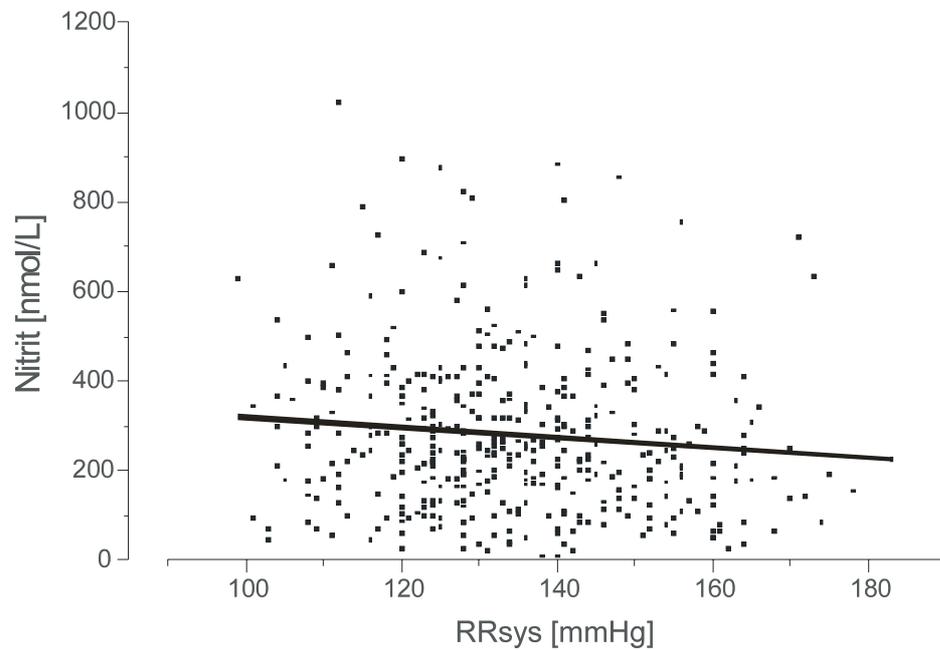


Abb.6: Dargestellte Korrelation zwischen den Werten des systolischen Blutdrucks und den ermittelten Nitritwerten ($r=-0,112$).

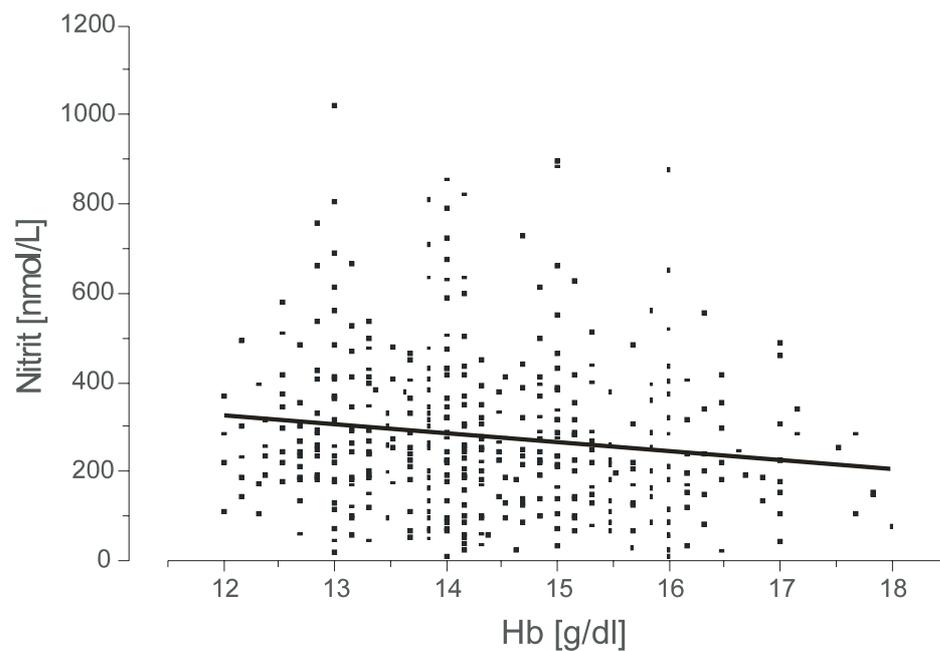


Abb.7: Dargestellte Korrelation zwischen den Hämoglobinwerten und den ermittelten Nitritwerten ($r=-0,125$).

Eine ebenfalls signifikante Korrelation besteht zwischen Nitrit und dem zweiten Zielparame- ter Nitrat (siehe **Abbildung 8**). Hier beträgt das Bestimmtheitsmaß 0,051.

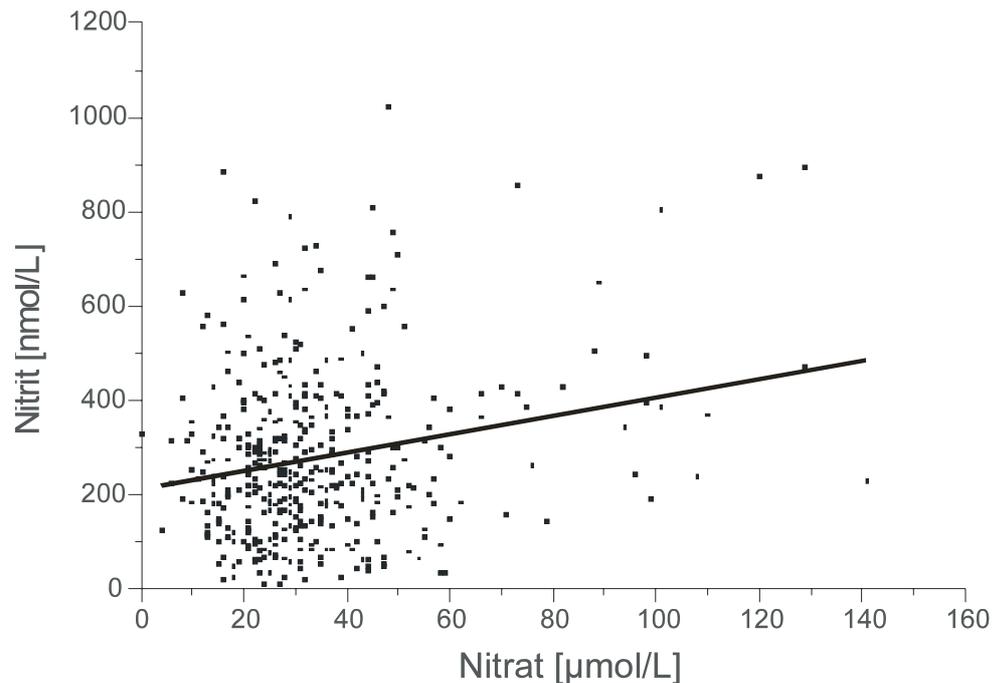


Abb.8: Dargestellte Korrelation zwischen den ermittelten Nitrat- und Nitritwerten ($r=0,225$).

Dieser Wert erhöht sich auf 0,151, wenn man nur die Gruppe der Raucher betrachtet. Allerdings besteht in dieser Untergruppe mit $n=167$ keine signifikante Korrelation mehr zwischen dem systolischen Blutdruck bzw. dem Hämoglobinwert und dem Zielparame- ter Nitrit.

In der Gruppe der Nichtraucher nimmt die Beziehung zwischen Nitrit und Nitrat auf 0,019 des Bestimmtheitsmaßes ab. Dagegen verstärken sich die Zusammenhänge des systolischen Blutdrucks bzw. Hämoglobinwerts mit dem Nitritwert (Bestimmtheitsmaß: 0,029 bzw. 0,021).

Unterteilt man in Männer und Frauen, so fällt auf, daß bei den Frauen der Zusammenhang zwischen Nitrit- und Nitratwert leicht steigt

(Bestimmtheitsmaß: 0,069). Die Beziehung von systolischen Blutdruck bzw. Hämoglobinwert zu Nitrit ist in dieser Gruppe nicht mehr signifikant.

Bei den Männern ist diese Beziehung wieder signifikant (Bestimmtheitsmaß: 0,027 bzw. 0,025). Das Bestimmtheitsmaß zwischen Nitrit und Nitrat beträgt hier 0,044.

Insgesamt zeigt sich, daß die Korrelation zwischen systolischem Blutdruck bzw. Hämoglobinwert und Nitritwert in der Gesamtgruppe vor allem durch die Subgruppe der Männer, die nicht rauchen, erzeugt wird.

Die höchste Korrelation zwischen Nitrit und Nitrat liegt bei der Subgruppe der Raucher vor.

Allerdings ist die Einflussnahme dieser Parameter auf den Nitritgehalt letztendlich gering.

5. Mögliche Einflüsse der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter auf den Nitratgehalt

Auch wurden alle verhältnisskalierten bzw. intervallskalierten erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter mit dem Pearson-Test auf eine Korrelation mit dem Nitratgehalt untersucht, um eine mögliche Einflussnahme auf die zweite unabhängige Variable festzustellen.

Die Ergebnisse dieser Korrelationen sind in der **Tabelle 5** festgehalten.

Nitrat-Korrelation			
Variable	Korrelationskoeffizient (r)	Bestimmtheitsmaß (r²)	Signifikanz (p)
Alter	0,044	0,002	0,339
Größe	-0,07	0,005	0,129
Gewicht	-0,026	<0,001	0,571
Bodymaßindex	0,012	<0,001	0,506
RRsys	0,066	0,004	0,154
RRdia	0,05	0,003	0,276
RRmean	0,065	0,004	0,158
Puls	-0,038	0,001	0,419
Druckfrequenzprodukt	-0,004	<0,001	0,937
Temperatur	0,07	0,005	0,131
Hb	-0,082	0,007	0,076
Hkt	-0,048	0,002	0,311
Erythrozyten	-0,047	0,002	0,314
Leukozyten	0,049	0,002	0,295
GPT	0,05	0,003	0,284
gamma-GT	0,022	<0,001	0,641
Gesamtbilirubin	-0,077	0,006	0,102
HDL	0,004	<0,001	0,929
LDL	0,02	<0,001	0,676
Gesamtcholesterin	0,024	<0,001	0,615
LDL-HDL-Quotient	0,028	<0,001	0,559
Packyear	0,087	0,008	0,057

Tab. 5: Pearson-Tests bei verhältnisskalierten bzw. intervallskalierten Parametern bzgl. der möglichen Korrelationen mit Nitrat.

Bezüglich der nominalskalierten Kriteriumsvariablen (Geschlecht, Rauchen, Medikamenteneinnahme) wurden auch hier t-Tests für unabhängige Stichproben gerechnet, um mögliche Unterschiede hinsichtlich des Nitratwertes bei den jeweiligen Subgruppen aufzeigen zu können (siehe **Tabelle 6**).

Nitrat-Differenzen in den Subgruppen		
Variable	t-Wert	Signifikanz (p)
Geschlecht (männlich: 351; weiblich: 141)	0,514	0,608
Rauchen (Raucher: 167; Nichtraucher: 325)	2,080	0,038
Medikamenteneinnahme (positiv: 57; negativ: 435)	0,502	0,616

Tab. 6: t-Tests für unabhängige Stichproben bzgl. möglicher Unterschiede beim Nitratwert der jeweiligen Subgruppen.

Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt.

Es zeigt sich, daß es zwischen Rauchern und Nichtrauchern einen signifikanten Unterschied im Nitratwert gibt. Die Nitratwerte bei Rauchern liegen im Mittel leicht höher als bei den Nichtrauchern. Allerdings korreliert die Nikotinmenge in Form von Packyears nicht signifikant mit dem Nitratwert. Da dieser Unterschied im Nitritwert zwischen Rauchern und Nichtrauchern nicht vorliegt und die hier gefundene Differenz einen nur schwach signifikanten Effekt aufweist, ist eine systematische Interpretation dieses Befundes nicht möglich.

Eine signifikante Korrelation mit dem systolischen Blutdruck und dem Hämoglobinwert liegt beim Nitratgehalt anders als beim Nitritgehalt nicht vor.

6. Erstellter Referenzbereich für Nitrit im Blutplasma

Da mit der Flow-Injection-Analyse bisher keine großen Kollektive mit gesunden Probanden vermessen wurden und es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben für den Nitritgehalt im Blut gibt, war es Ziel dieser Studie, einen Referenzbereich für Nitrit zu ermitteln.

Zur Erstellung von Referenzwerten für Nitrit im Blutplasma wurde ein Subkollektiv erstellt, um hierfür nur eindeutig gesunde Probanden auszuwerten. Hierzu wurden die im Kapitel II.9. beschriebenen Einschlußkriterien noch erweitert.

Grundsätzlich wurden alle Raucher und Probanden, die eine Medikamenteneinnahme angaben, ausgeschlossen. Außerdem wurden Probanden, die einen gemessenen systolischen Blutdruck von ≥ 160 mmHg hatten, den Kriterien einer Hyperlipoproteinämie (LDL >160 mg/dL & LDL/HDL $>3,5$) entsprachen oder eine Lebererkrankung (gamma-GT Wert >24 IU/L & gesamt-Bilirubin Wert >1 mg/dL) vermuten ließen, nicht berücksichtigt.

Man erstellte somit ein Subkollektiv mit einer Gesamtprobandenzahl von $n=242$. Davon waren 184 (76%) männlich und 58 (24%) weiblich. Die deskriptive Statistik ist in **Tabelle 7** festgehalten.

Variable	Minimum	Mittel	Maximum	SD
Alter (Jahren)	19	38	66	12
Größe (cm)	153	176	201	9
Gewicht (kg)	51	76	110	12
Bodymaß-Index (kg/m ²)	17,6	24,4	34,0	3,0
RRsys (mmHg)	99	133	160	15
RRdia (mmHg)	39	77	98	11
RRmean (mmHg)	61	95	117	10
Puls (min ⁻¹)	50	74	110	13
Druckfrequenzprodukt (mmHg/min)	3435	7098	12797	1589
Temperatur (Celsius)	35	37	38	1
Hb (g/dL)	12	15	18	1
Hkt (%)	34	42	49	3
Erythrozyten (Mio/ μ L)	3,7	4,8	5,7	0,4
Leukozyten (μ L ⁻¹)	3000	5314	8800	1082
GPT (IU/L)	6	13	45	6
gamma-GT (IU/L)	5	13	39	7
Gesamtbilirubin (mg/dL)	0,3	0,7	1,8	2,5
HDL (mg/dL)	33	58	114	14
LDL (mg/dL)	60	124	237	36
Gesamtcholesterin (mg/dL)	118	216	343	43
LDL/HDL-Quotient	0,81	2,26	5,85	0,87

Tab.7: Deskriptive Statistik aller klinischen und laborchemischen Parameter des bereinigten Subkollektives.

Die mit Hilfe der Flow-Injection-Analyse ermittelten Nitritwerte, sowie die mit dem kommerziellen Analyse-Test ermittelten Nitratwerte für dieses Subkollektiv wurden in der **Tabelle 8** festgehalten.

Variable	Min.	Mittel	Max.	Median	SD	SEM
Nitrit (nmol/L)	10	271	688	245	156	10,7
Nitrat ($\mu\text{mol/L}$)	4	33	110	29	18	1,2
NO _x ($\mu\text{mol/L}$)	4	33	110	30	19	1,3
NO ₂ /NO ₃	0,001	0,011	0,079	0,008	0,010	0,001

Tab.8: Die Daten der ermittelten Zielparame-ter des Subkollektivs.

Um einen Referenzbereich zu erstellen, der 95% der Probanden einschließen sollte, wurden die Percentile für den Nitritwert festgelegt. Das 2,5-Percentil gab den Wertebereich von Nitrit an, bei dem lediglich 2,5% der Probanden unterhalb des zu ermittelnden Referenzbereichs lagen. Das 97,5-Percentil definierte den Nitritwert, bei dem 97,5% der Probanden einen geringeren Nitritwert hatten. Der Bereich zwischen dem 2,5- und 97,5-Percentil entsprach dem ermittelten Referenzbereich.

Man erhielt folgende Werte für die einzelnen Percentile (**Tabelle 9**):

Variable	2,5. Perc.	5. Perc.	10. Perc.	90. Perc.	95. Perc.	97,5. Perc.
Nitrit (nmol/L)	35	51	90	492	603	657
Nitrat ($\mu\text{mol/L}$)	10	13	14	50	69	98
NO _x ($\mu\text{mol/L}$)	10	13	15	52	75	98
NO ₂ /NO ₃	0,001	0,001	0,002	0,022	0,030	0,035

Tab.9: Percentilen-Werte des Subkollektivs.

95% der Probanden des bereinigten Subkollektives zeigten eine Nitritkonzentration zwischen 35 – 657 nmol/L und einen Nitrat-Wert zwischen 10 – 98 µmol/L im Blutplasma. Der NO_x-Wert für 95% der Probanden lag zwischen 10 – 98 µmol/L.

IV. Diskussion

1. Gegenstand der Studie

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal bei einer Probandengruppe in dieser Größe (n=492) mit Hilfe der Flow-Injection-Analyse der Nitritgehalt im Blutplasma gemessen. Es wurden gesunde Probanden untersucht, um einen Referenzbereich für Nitrit im Blutplasma zu erhalten. Außerdem wurden die erhobenen klinischen und laborchemischen Werte mit dem Nitritwert korreliert, um eine mögliche Einflußnahme auf diesen Parameter zu untersuchen. Des weiteren wurde der ermittelte Nitratwert als unspezifischer Marker des gesamten Stickoxid-Umsatzes [4, 6, 7, 8, 11, 12, 15] identifiziert und mit dem Nitritwert verglichen bzw. korreliert.

2. Hauptaussagen

1. Der durch diese Studie ermittelte Referenzbereich für die Nitritkonzentration im Blutplasma bei gesunden Personen betrug 35 – 657 nmol/L (SEM: $271 \pm 10,7$ nmol/L).
2. Die Nitritkonzentration im Blutplasma bei Normalpersonen korrelierte signifikant mit dem systolischen Blutdruck und dem Hämoglobinwert . Allerdings waren diese Zusammenhänge in ihrer Effektgröße gering.
3. Die Nitritkonzentration im Blutplasma korrelierte signifikant mit der Nitratkonzentration im Blutplasma.

3. Korrelationen und Einflußnahmen bezüglich Nitrit

Nur zwei der erhobenen klinischen und laborchemischen Parameter in der Studie korrelierten mit dem Nitritwert signifikant. Allerdings zeigten der systolische Blutdruck und der Hämoglobinwert nur eine geringe Einflußnahme. Auf Subgruppen unterteilt zeigte sich das höchste Bestimmtheitsmaß dieser Einflußvariablen bei Männern, die nicht rauchen. Folglich hing der Nitritwert weder vom Alter noch vom Geschlecht ab. Auch konnte nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern unterschieden werden. Des Weiteren war der Nitritwert unabhängig von den anderen Kreislauf- und Blutbildparametern. Schließlich gab es auch keine Einflußnahme durch die Parameter des Lipidstoffwechsels.

Diese Beeinflussungen durch den systolischen Blutdruck und den Hämoglobinwert lassen sich im Einzelnen durch die bisherigen Kenntnisse über die endothelialen Funktionen und den NO-Stoffwechsel erklären.

Eine niedrige endotheliale NO-Synthese führt zu einer geringeren Vasodilatation und dadurch zu einem erhöhten Blutdruck [18, 19]. Dies stimmt mit der in dieser Studie festgestellten negativen Beeinflussung des Nitritgehaltes im Blutplasma durch den systolischen Blutdruck überein. Allerdings wäre eine negative Beeinflussung durch den diastolischen Blutdruck ebenfalls zu erwarten, was sich aber in dieser Studie nicht zeigte. Das Hämoglobin beeinflusst den NO-Stoffwechsel durch seine mögliche Bindung („scavenging“) des NO. Das Abbauprodukt Nitrit kommt hierbei nicht zustande. Ein hoher Hb-Wert führt zu einem vermehrten "Scavenging“ des NO und dadurch zu einem verminderten Abbau zu Nitrit (negative Beeinflussung) [20-24, 30].

In dieser Studie zeigte sich keine Korrelation des Lipidstoffwechsels mit dem Nitritgehalt. Weder das Gesamtcholesterin noch LDL oder HDL zeigten eine signifikante Beeinflussung des Nitrits im Blutplasma. Dies ist mit der gängigen Literatur insofern schlüssig, da natives LDL und HDL gewöhnlich die Expression von NOS III nicht hemmen außer bei fortgeschrittener Arteriosklerose [13]. An dieser Studie nahmen aber nur

gesunde Probanden teil, bei denen eine ausgeprägte Veränderung des Gefäßsystems nicht zu erwarten war. Oxidiertes LDL reduziert die endotheliale Produktion von NO [46]. Außerdem ist es mit einer vermehrten Zirkulation von asymmetrischem Dimethyl-Arginin assoziiert. Diese Aminosäure konkurriert mit der Verfügbarkeit von L-Arginin zur NO-Synthese [46]. In dieser Studie wurde bei den Probanden die vollständige LDL-Fraktion bestimmt, so daß eine Korrelation mit dem rein oxidierten LDL nicht durchgeführt werden konnte.

Unter den Rauchern in der Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Nitritgehalt gegenüber Nichtrauchern, obwohl Nikotingenuß zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann [13]. Allerdings hatten nur 8,1% der Raucher eine Anamnese mit 10 oder mehr Packyears. Dadurch war eine Auswirkung auf das Gefäßsystem im Probandenkollektiv sicherlich zu gering ausgeprägt.

Im Rahmen des NO-Stoffwechsels oxidiert das entstandene Abbauprodukt Nitrit weiter zu Nitrat im Blut. Des weiteren entsteht aus NO, das in Erythrozyten aufgenommen wird und einer darauf folgenden Konversion unterliegt, ebenfalls Nitrat [2]. Dies erklärt, warum in dieser Studie gezeigt werden konnte, daß der Nitritwert signifikant mit dem Nitratwert im Blutplasma korrelierte. Im übrigen zeigte sich das höchste Bestimmtheitsmaß in der Subgruppe der Raucher.

4. Endogene Messung von Nitrit – Nahrungsbeeinflussung

Frühere Untersuchungen aus unserer und anderen Arbeitsgruppen haben gezeigt, daß der Nitritgehalt im Plasma im Gegensatz zum Nitratgehalt [12, 25, 26] nicht wesentlich von der Nahrungsaufnahme beeinflusst wird. Somit beruhen die ermittelten Nitritwerte auf endogenen Prozesse im Körper [2, 4, 6, 7, 8].

5. Erstellen eines Referenzbereichs

Da in der Literatur keine konsistenten Normwerte für Nitrit im Plasma existieren [28, 29, 31, 32, 33, 35, 37, 45] und mit der Flow-Injection-Analyse bisher keine größeren Probandenkollektive untersucht wurden, ist ein Referenzbereich für Normalpersonen erstellt worden.

Hierzu wurden die Kriterien der Blutspendezentrale zusätzlich verschärft, um nur gesunde Probanden für die Erstellung des Referenzbereichs zu analysieren. Sämtliche Raucher und Probanden mit positiver Medikamentenangabe wurden ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Probanden mit erhöhtem systolischem Blutdruck, mit einer Hyperlipoproteinämie oder erhöhten Leberwerten nicht ins Kollektiv aufgenommen.

Dadurch entstand ein Subkollektiv mit $n=242$ Personen. 95% dieser Probanden hatten einen gemessenen Nitritgehalt zwischen 35 und 657 nmol/L.

Verglichen mit anderen Studien, die andere Verfahren zur Nitritbestimmung im Blutplasma verwendet haben entspricht der ermittelte Nitritbereich Untersuchungen der Arbeitsgruppen Meulemans et al. (<500 nmol/L) [31] und Leone et al. (450 nmol/L) [32]. Andere Arbeitsgruppen ermittelten zum Teil erheblich höhere Nitritwerte [28, 29, 33, 35, 37, 45]. Maximal wurden 9500 nmol/L Nitrit im Blut durch Curtis et al. [28] ermittelt. In **Tabelle 10** sind die ermittelten Nitritwerte der einzelnen Studien aufgeführt.

Autor	Durchschnittliche Nitritkonzentration in nmol/L (Mittelwert \pm SD)	n
Michigami et al. [29]	4400 \pm 2800	34
Curtis et al. [28]	9500 \pm 600	59
Radisavljevic et al. [45]	3100 \pm 400	22
Leone et al. [32]	450 \pm 200	5
Meulemans et al. [31]	< 500	10
Monaghan et al. [37]	4200 \pm 3900	200
Tsikas et al. [33]	3650 \pm 840	12
Ueda et al. [35]	3261 \pm 1522	41
Diese Studie	271 \pm 156	242

Tab.10: Ermittelte Referenzwerte für die Nitritkonzentration im humanen Blut bei verschiedenen Studien.

Michigami et al. [29], bei dessen Untersuchungen der Nitritgehalt im Blut bei 4500 nmol/L lag, konnte wie auch in dieser Studie keine Unterschiede bzgl. Geschlecht oder Alter feststellen. Andere Parameter wurden von Michigami et al. nicht untersucht.

Bei allen anderen Studien [28, 31, 32, 33, 35, 37, 45] wurden keine klinischen oder laborchemischen Parameter mit den Nitritgehalt verglichen. Dies lag sicherlich auch daran, daß es sich zum Teil um sehr geringe Fallzahlen handelte.

Die Unterschiede bei den ermittelten Nitritwerten der einzelnen Studien können zum einen an der unterschiedlichen Analytik der einzelnen Arbeitsgruppen mit unterschiedlicher Spezifität liegen.

Zum anderen sind die Probandenzahlen der Arbeitsgruppen erheblich niedriger. Allerdings sind die angegebenen Standardabweichungen bei den einzelnen Arbeiten verhältnismäßig gering, so daß die unterschiedlichen Ergebnisse nicht vorrangig hierdurch zu erklären sind.

Entscheidend aber ist wohl auch die Probenaufarbeitung [16]. In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, daß der Nitritgehalt der Probe nach der

Blutabnahme aufgrund der Stopplösung und der Probenlagerung bei +4 °C nicht durch weitere Stoffwechselreaktionen verändert wurde. Vorausgegangene Untersuchungen zeigten, daß durch die Stopplösung die Proben zur Nitritmessung über einen ausreichenden Zeitraum stabil blieben, so daß eine zuverlässige Messung der Proben ermöglicht wurde. Schließlich ergab sich dadurch eine standardisierte und kontrollierte Durchführung mit ausreichend großer Probandenzahl.

6. Schlußfolgerung, klinische Bedeutung und Ausblick

Diese Studie hat gezeigt, daß es mit der Flow-Injection-Analyse möglich ist, verläßlich Nitrit im Blutplasma des Menschen zu messen. Durch diese Tatsache ist es möglich, Rückschlüsse auf den NO-Stoffwechsel zu ziehen, da Nitrit das direkte oxidative Abbauprodukt von endothelial synthetisierten NO ist und einen instabilen aber sensitiven Marker darstellt [2- 9].

Der erstellte Referenzbereich könnte eine ausreichende Norm darstellen, die es möglich macht, pathologische Nitritwerte abzugrenzen.

Was die klinische Bedeutung angeht, so bleibt abzuwarten, was andere Studien mit charakteristischen Patientenkollektiven für Nitritwerte ermitteln. Sollte eine deutliche Unterscheidung von z. B. Patienten mit arteriosklerotischen Gefäßveränderungen oder unterschiedlichen kardiovaskulären Risikofaktoren aufgrund des Nitritgehalts möglich sein, so ist eine klinische Relevanz für diesen Parameter durchaus denkbar [41, 42]. Zudem hat der NO-Stoffwechsel in den letzten Jahren immer größeres wissenschaftliches Interesse gefunden [38, 39]. Es hat sich gezeigt, daß NO an vielen Regulationsmechanismen im Körper beteiligt ist [2, 4, 39]. Auch verschiedene pathologische Prozesse werden durch NO reguliert [40, 41]. Dadurch ist Nitrit neben der klinischen Routine auch als Akutphase-Parameter zur Bestimmung der Gefäßsystem- bzw. der Herzkreislaufsituation denkbar.

7. Methodenkritik

Alle 494 Probanden des Kollektivs waren regelmäßige Blutspender in der Blutbank und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf. Aufgrund der Anamnese, der klinischen Untersuchung und den ermittelten Laborwerten wurden diese Personen als gesund betrachtet.

Aus organisatorischen Gründen konnte die Blutabnahme für die Analyse erst nach der Blutspende erfolgen. Allerdings wurde darauf geachtet, daß die Probanden nach der Spende eine möglichst lange Ruhephase hatten (mindestens 30 min). Ein systematischer Fehler des Kollektivs aufgrund der vorausgegangenen Blutspende ließ sich weitgehend dadurch ausschließen, daß die gemessenen Nitritwerte im Blutplasma von Mitarbeitern aus dem Labor im selben Bereich lagen.

Es wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt, ob die Probanden nüchtern waren. Eventuelle Einflüsse durch Nahrungsaufnahme wurden aber durch vorangegangene Untersuchungen aus unserer und anderen Arbeitsgruppen bezüglich des Nitritgehalts im Plasma weitgehend ausgeschlossen [12, 25, 26].

Durch eine standardisierte Blutabnahme und Organisation der weiteren Bearbeitung der Blutproben wurden mögliche Fehler bei der Blutabnahme und Probenbearbeitung minimiert. Es konnten nicht alle Proben unmittelbar nach Abnahme aufgearbeitet werden, so daß sie zum Teil bis zu zwei Stunden zwischengelagert wurden. Allerdings hatten vorhergegangene Untersuchungen gezeigt, daß in dieser Zeit kein wesentlicher Nitritabbau in den Proben erfolgt (siehe III.1.2.).

Alle zur Aufarbeitung verwendeten Materialien sind auf eine mögliche Kontamination der Proben bezüglich des Nitritgehalts getestet worden. Wenn möglich wurde ausschließlich eine Produktionscharge des Materials verwendet. Sämtliche Proben wurden mit derselben Flow-Injection-Anlage und Integrator analysiert.

V. Literaturverzeichnis

1. Schmidt H.H.H.W., M. Kelm. Determination of nitrite and nitrate by the griess reaction. In Feelisch M., and J. S. Stamler (eds.), Nitric oxide research 1996.: 492-497
2. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999. 1411: 273-289
3. Rhodes P., A.M. Leone, P.L. Francis, A.D. Struthers, S. Moncada. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biophys Res Commun* 1995. 209 (2): 590-596
4. Grube R., M. Kelm, W. Motz, B.E. Strauer. In Moncada S., M. Feelisch, R. Busse, E.A. Higgs (eds.), *The biology of nitric oxide*, Vol. 4, Enzymology, Biochemistry and Immunology, Portland Press, London, 1994.: 201-204
5. Klebanoff S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite. *Free Radic Biol Med* 1993. 14 (4): 351-360
6. Ignarro L.J., G. Cirino, A. Casini, C. Napoli. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999. Dec; 34 (6):879-886
7. Vallance P. Nitric oxide. *Biologist (London)* 2001. Aug; 48 (4):153-158
8. Bian K., F. Murad. Nitric oxide (NO)--biogenesis, regulation, and relevance to human diseases. *Front Biosci.* 2003. Jan 1; 8:d264-278
9. Ignarro L.J., J.M. Fukuto, J.M. Griscavage, N.E. Rogers, R.E. Byrns. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993. 90 (17): 8103-8107
10. McKnight D.M., C.W. Duncan, C. Leifert, M.H. Golden. Dietary nitrate in man: friend or foe? *Br J Nutr* 1999. May; 81 (5):349-358
11. Toprakci M., D. Ozmen, I. Mutaf, N. Turgan, Z. Parildar, S. Habif, I. Guner, O. Bayindir. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30 (2):83-85
12. Thomas S.R., K. Chen, J.F. Keaney Jr. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal* 2003. Apr; 5 (2):181-194
13. Huige L., U. Forstermann. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000. Feb; 190 (3):244-254

14. Kelm M., B.E. Strauer. Endotheliale Dysfunktion. *Der Internist* 1999. 40:1300-1307
15. Llorens S., J. Jordan, E. Nava. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *J Physiol Biochem* 2002. Sep; 58 (3):179-188
16. Schulz K., S. Kerber, M. Kelm. Reevaluation of the Griess method for determining NO/NO₂⁻ in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 1999. 3(3): 225-234
17. Preik-Steinhoff H., M. Kelm. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with high-performance anion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996. Oct 25; 685 (2):348-352
18. Denninger J.W., M.A. Marletta. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999. May 5; 1411 (2-3):334-350
19. Moncada S., R.M. Palmer, E.A. Higgs. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988. Oct; 12 (4):365-372
20. Kosaka H. Nitric oxide and hemoglobin interactions in the vasculature. *Biochim Biophys Acta* 1999. May 5; 1411 (2-3):370-377
21. Gow A.J., B.P. Luchsinger, J.R. Pawloski, D.J. Singel, J.S. Stamler. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. Aug 3; 96 (16):9027-9032
22. Gow A.J., J.S. Stamler. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 1998. Jan 8; 391 (6663):169-173
23. Schechter A.N., M.T. Gladwin. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Engl J Med* 2003. Apr 10; 348 (15):1483-1485
24. El-Farra N.H., P.D. Christofides, J.C. Liao. Analysis of nitric oxide consumption by erythrocytes in blood vessels using a distributed multicellular model. *Ann Biomed Eng* 2003. Mar; 31 (3):294-309
25. Pannala A.S., A.R. Mani, J.P. Spencer, V. Skinner, K.R. Bruckdorfer, K.P. Moore, C.A. Rice-Evans. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radic Biol Med* 2003. Mar 1; 34 (5):576-584
26. Ferlito S., M. Gallina. Nitrite plasma levels after an oral fat meal in normolipemic subjects. *Panminerva Med* 1999. Sep; 41 (3):217-219

27. Lauer T., M. Preik, T. Rassaf, B.E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch, M. Kelm. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. Oct 23; 98 (22):12814-12819
28. Curtis N.E., N.M. Gude, R.G. King, P.J. Marriott, T.J. Rook, S.P. Brennecke. Nitric oxide metabolites in normal human pregnancy and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1995. 14 (3):339-349
29. Michigami Y., Y. Yamamoto, K. Ueda. Determination of nitrite, sulphate, bromide and nitrate in human serum by ion chromatography. *Analyst* 1989. 114 (10):1201-1205
30. Huang Z., Louderback J.G., M. Goyal, F. Azizi, S.B. King, D.B. Kim-Shapiro. Nitric oxide binding to oxygenated haemoglobin under physiological conditions. *Biochim Biophys Acta* 2001. Dec 19; 1568 (3):252-260
31. Meulemans A., F. Delsenne. Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994. Oct 14; 660 (2):401-404
32. Leone A.M., P.L. Francis, P. Rhodes, S. Moncada. A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994. Apr 29; 200 (2):951-957
33. Tsikas D., R.H. Boger, S.M. Bode-Boger, F.M. Gutzki, J.C. Frolich. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labelled analogs. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994. Nov 18; 661 (2):185-191
34. Furchgott R.F. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 1987. Dec; 23 (6):435-440
35. Ueda T., T. Maekawa, D. Sadamitsu, S. Oshita, K. Ogino, K. Nakamura. The determination of nitrite and nitrate in human blood plasma by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis* 1995. Jun; 16 (6):1002-1004
36. Furchgott R.F., J.V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980. Nov 27; 288 (5789):373-376
37. Monaghan J.M., K. Cook, D. Gara, D. Crowther. Determination of nitrite and nitrate in human serum. *J Chromatogr A* 1997. May 16; 770 (1-2):143-149

38. Gentiloni Silveri N., M. Mazzone, G. Portale, L. Carbone. Nitric oxide. A general review about the different roles of this innocent radical. *Minerva Med* 2001. Jun; 92 (3):167-171
39. Behrendt D., P. Ganz. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 2002. Nov 21; 90 (10c):40L-48L
40. Titheradge M.A. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1999. May 5; 1411 (2-3):437-455
41. Arnal J.F., A.T. Dinh-Xuan, M. Pueyo, B. Darblade, and J. Rami. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sciences* 1999. Jul; 55 (8-9):1078-1087
42. Kelm M., M. Feelisch, R. Gube, W. Motz, B.E. Strauer. In Moncada, S., M.A. Marletta, J.B. Hibbs Jr., E.A. Higgs (eds.). *The Biology of Nitric Oxide. Physiological and Clinical Aspects*, Portland Press, London, 1992.:319-322
43. Nims R.W., J.F. Darbyshire, J.E. Saavedra. Colorimetric methods for the determination of nitric oxide concentration in neutral aqueous solutions. *Methods* 1995. Jul; 7 (1):48-54
44. Green L.C., D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982. Oct; 126 (1):131-138
45. Radisavljevic Z., M. George, D.J. Dries, R.L. Gamelli. Determination of intracellular and extracellular nitrite and nitrate by anion chromatography. *J Liq Chromatogr Rel Techn* 1996. Nov; 19 (7):1061-1079
46. Laroia S.T., A.K. Ganti, A.T. Laroia, K.K. Tendulkar. Endothelium and the lipid metabolism: the current understanding. *Int J Cardiol* 2003. Mar; 88 (1):1-9
47. Maria G.U. di, L. Spicuzza, A. Mistretta, G. Mazzarella. Role of endogenous nitric oxide in asthma. *Allergy* 2000; 55 Suppl 61:31-35
48. Chowdhary S., J.N. Townsend. Nitric oxide and hypertension: not just an endothelium derived relaxing factor! *J Hum Hypertens* 2001. Apr; 15 (4):219-227
49. Brown G.C., V. Borutaite. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med*. 2002. Dec 1; 33 (11):1440-1450
50. Cartledge J., S. Minhas, I. Eardley. The role of nitric oxide in penile erection. *Expert Opin Pharmacother* 2001. Jan; 2 (1):95-107

VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank allen Mitarbeitern der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Direktor Professor Dr. med. B. E. Strauer, sowie den Mitarbeitern des Kardiologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität ausdrücken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit fertigzustellen. Des weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Blutbank und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf unter der Leitung von Professor Dr. med. R. E. Scharf für ihre freundliche Kooperation und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. M. Kelm für die Überlassung des Themas und seiner steten Diskussionsbereitschaft sowie für die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen

Herrn Dr. med. S. Perings, Herrn Dipl. Biologen K. Schulz und Herrn Dr. med. S. Kerber für die umfangreiche Betreuung in der Laborarbeit sowie für kritische Diskussionen und Anregungen

Herrn Dr. Willers vom Rechenzentrum für die ausgiebige und kompetente Beratung bezüglich der statistischen Fragen

Frau C. Ferfers für die Mitarbeit im Kardiologischen Labor

Meinen Eltern und meiner Schwester für die familiäre Unterstützung während meines Medizinstudiums und meiner Zeit als Doktorand

VII. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jörn Christian Siemer
Geburtsdatum	10. Oktober 1972
Geburtsort	Herdecke
Familienstand	ledig

Allgemeine Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule Sandberg in Monheim
1983 – 1989	Otto-Hahn-Gymnasium in Monheim
1989 – 1990	Joplin-High-School in Joplin, Missouri, USA
1990 – 1993	Otto-Hahn-Gymnasium in Monheim

Medizinische Ausbildung

Oktober 1993	Immatrikulation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
April 1999	Praktisches Jahr im Marien Hospital, Düsseldorf und King Edward VIII Hospital, Durban, Südafrika
September 2000	Beginn des Arzt im Praktikum an der Universitätsfrauenklinik Ulm
März 2002	Beginn der Assistenzarztzeit and der Universitätsfrauenklinik Ulm
August 2002	Achtmonatiger Auslandsaufenthalt am Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, Ghana zur Weiterbildung und Forschungszwecken
Mai 2003	Fortführung meiner Assistenzarztzeit an der Universitätsfrauenklinik Ulm
Januar 2004	Fortführung meiner Assistenzarztzeit an der Universitätsfrauenklinik Erlangen

VIII. Zusammenfassung

Untersuchung des Nitritgehalts im Blutplasma von Normalpersonen mit der Flow-Injection-Analyse

vorgelegt von Jörn Siemer

Stickstoffmonoxid (NO) stellt einen wesentlichen Faktor bei der Regulation des Gefäßtonus dar. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO bedient man sich der Messung der Produkte des Stoffwechselweges des Stickstoffmonoxids im Blut. Dabei ist Nitrit im Blutplasma ein spezifischer und sensitiver Marker für den NO-Stoffwechsel.

In dieser Studie wurde zum erstenmal bei einem großen Kollektiv von gesunden Personen der Nitritgehalt im Blutplasma mit Hilfe der Flow-Injection-Analyse gemessen.

Die Nitritwerte wurden mit klinischen und laborchemischen Routineparametern sowie dem Nitratgehalt im Blutplasma auf Beeinflussungen und Korrelationen untersucht. Anschließend wurde ein Referenzbereich für Nitrit im Blutplasma bei gesunden Personen ermittelt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Der durch diese Studie ermittelte Referenzbereich für die Nitritkonzentration im Blutplasma bei gesunden Personen betrug 35 – 657 nmol/L (SEM: $271 \pm 10,7$ nmol/L).
2. Die Nitritkonzentration im Blutplasma bei Normalpersonen korrelierte signifikant mit dem systolischen Blutdruck und dem Hämoglobinwert. Allerdings war dieser Zusammenhang in seiner Effektgröße gering.
3. Die Nitritkonzentration im Blutplasma korrelierte signifikant mit der Nitratkonzentration im Blutplasma.

genehmigt:

(Professor Dr. med. M. Kelm)