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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

Etablierung einer sensitiven Nitratanalyse zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels *in vitro* und *in vivo*

Dissertation

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

vorgelegt von

Putrika Prastuti Ratna Gharini

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: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
MetHb	Methämoglobin
MW	Mittelwert
NaCl	Kochsalzlösung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NR	Nitrat Reduktase
NR-FIA	Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion über Nitrat Reduktase zum Nitrit mit anschließender Bestimmung von Nitrit durch die Fluss-Injektions-Analyse
$NO^{\cdot}$	Stickstoffmonoxid *
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS-KO	Defizienz beider Allele des eNOS-Genes
iNOS	induzierbare NO-Synthase
iNOS-TG	Überexprimierung des iNOS-Genes
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
L-NAME	N^G-Nitro-L-Arginin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
RSNO	S-Nitrosothiole
RNNO	Nitrosamine
SAV	Standardadditionsverfahren
SE	Standardfehler (Standarderror)
UV-HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektor
VCl-FIA	Nitratanalyse durch chemische Reduktion über Vanadium(III)-Chlorid zu Nitrit und anschließender Messung von Nitrit mittels der Fluss-Injektions-Analyse
VCl_3	Vanadium(III)-Chlorid
WT	Wildtyp

(*): Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons.

Inhaltsverzeichnis

1.	**Einleitung**	**05**
1.1.	Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid	05
1.2.	Metabolismus von Stickstoffmonoxid	06
1.3.	Quantifizierung von Nitrat in biologischen Matrizes	09
1.4.	Ziele	13
2.	**Material und Methoden**	**14**
2.1.	Methoden zur Bestimmung von Nitrit	14
2.1.1.	Fluss-Injektions-Analyse (FIA)	14
2.1.2.	Modifizierung der Methode zur Nitritmessung über FIA: Messung ohne Standard-Additions-Verfahren	16
2.2.	Methoden zur Bestimmung von Nitrat	16
2.2.1.	Kolorimetrische Bestimmung zur Nitratanalyse	17
2.2.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Nitratmessung	17
2.3.	Etablierung neuer Methoden zur Nitratmessung	18
2.3.1.	Nitratmessung über Nitrat-Reduktase-FIA (NR-FIA)	18
2.3.2.	Nitratmessmethode über Vanadium(III)-Chlorid-FIA (VCl-FIA)	20
2.3.3.	Validierung der neu etablierten Methoden	21
2.4.	Optimierung der Probenaufarbeitung zur anschließenden Nitratanalyse	21
2.4.1.	Probenaufarbeitung zur Nitratanalyse via NR-FIA und VCl-FIA	21
2.4.2.	Lagerungsmöglichkeit der nitrit- und nitrathaltigen Proben	22
2.5.	Untersuchungen zur Charakterisierung des L-Arginin-Stoffwechselweges	22
2.5.1.	Aufarbeitung der Proben aus Urin, Plasma und Vollblut	22
2.5.2.	Quantifizierung von Nitrat im Plasma und Urin von Mäusen	23
2.5.3.	*In vitro*-Untersuchungen zur hämatogenen Nitratbildung	24
2.6.	Mathematisch-statistische Methoden	24
3.	**Ergebnisse**	**25**
3.1.	Methodeneigenschaften der vorhandenen Methoden zur Nitrit- und Nitratanalyse	25
3.2.	Etablierung der Nitritmessmethode: Modifikation der Nitritmessung über die FIA	27
3.3.	Etablierung neuer Methoden zur sensitiven Nitratmessung	28

3.3.1. Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion zu Nitrit mit anschließender Bestimmung durch die Fluss-Injektions-Analyse (NR-FIA) 29
3.3.2. Nitratanalyse durch chemische Reduktion zu Nitrit mit anschließender Messung von Nitrit mittels der Fluss-Injektions-Analyse (VCl-FIA) 30
3.3.3. Validierung der neu etablierten Methoden 33

3.4. Optimierung der Probenaufarbeitung zur anschließenden Nitratanalyse 35
3.4.1. Probenaufarbeitung zur Nitratanalyse via NR-FIA und VCl-FIA 35
3.4.2. Lagerung der Proben 36

3.5. Anwendung der etablierten Methoden zur Nitratanalyse: Die Rolle von Nitrat im L-Arginin-Stoffwechselweg 38
3.5.1. Bestimmung der Nitratkonzentration in humanem Blut und Urin 38
3.5.2. Nitrat in Urin und Plasma von Wildtyp- und eNOS-knock-out-Mäusen sowie transgenen iNOS-überexprimierenden Mäusen 39
3.5.3. Nitrat im zellulären Überstand bei *in vitro*-Untersuchungen zur hämatogenen Nitratbildung 41

4. Diskussion 43

4.1. Sensitive Bestimmung von Nitrat in biologischen Proben 43
4.1.1. Analytische Verfahren zur sensitiven Messung von Nitrat 43
4.1.2. Entwicklung der Probenbehandlung und Probenlagerung 45
4.1.3. Bestimmung der Nitratkonzentration im humanen Blut und Urin 47

4.2. Nitrat zur Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges 47
4.2.1. Nitrat in Abhängigkeit vom NO-Metabolismus *in vivo* 47
4.2.2. *In vitro*-Untersuchungen zur hämatogenen NO-Bildung 48

4.3. Ausblick 49

5. Zusammenfassung 50

6. Literaturverzeichnis 51

7. Veröffentlichungen 57

8. Danksagung 59

9. Lebenslauf 60

10. Anhang 62

1. Einleitung

1.1. Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger intra- und interzellulärer Botenstoff [113] mit hoher Reaktivität und Radikaleigenschaften [45;82;114]. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche biologische Effekte von NO in verschiedenen Zellsystemen und Organen nachgewiesen. Die Signalübertragung nicht-adrenerger und nicht-cholinerger Nerven des peripheren Nervensystems wird durch NO moduliert [81]. Im zentralen Nervensystem stellt NO einen wichtigen Neurotransmitter dar [111]. Ebenso reguliert NO Funktionen des spezifischen und unspezifischen Immunsystems [47;80;89;102]. Durch die NO-Freisetzung in der Gefäßwand wird der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur beeinflusst. NO hemmt die Adhäsion von Thrombozyten und Monozyten an die Gefäßwand [80;93;98;99].

Stickstoffmonoxid wird durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Beteiligung von Kofaktoren und molekularem Sauerstoff[71] enzymatisch gebildet [79]. L-Arginin wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper durch den Harnstoffzyklus aus L-Citrullin gebildet [31]. Die zur Bildung von NO aus Arginin durch die NOS benötigten Kofaktoren sind Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN). Ebenso ist molekularer Sauerstoff für die Reaktion notwendig [71].

Zur Zeit sind mehrere verschiedene Formen der NOS bekannt. Zunächst wurden die NOS-Enzyme in eine konstitutive (cNOS) und eine induzierbare Form (iNOS) eingeteilt. Diese Einteilung beruht auf der Calcium- und Calmodulinabhängigkeit der konstitutiven NOS. Während Calmodulin auch bei normalem intrazellulären Kalziumgehalt an die iNOS gebunden ist, geschieht dies bei der konstitutiven Form erst bei einem Anstieg des intrazellulären Kalzium-Spiegels. Dies findet abhängig von extrazellulären Signalen wie zum Beispiel durch die Freisetzung von Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, Substanz P und Serotonin statt [12]. Mittlerweile wird jedoch angenommen, dass in bestimmten Zelltypen auch eine konstante Expression der iNOS stattfindet [86]. Aus diesem Grunde wurde die Einteilung in eine konstitutive, calmodulinabhängige (cNOS) und eine induzierbare, calmodulinunabhängige (iNOS) Form der NOS abgelöst durch eine Einteilung, die molekulare Strukturen des Enzyms stärker berücksichtigt [8;86].

Nach dieser neuen Einteilung werden bislang drei Isoformen der NOS unterschieden: die neuronale konstitutive NOS (nNOS oder Typ I), die endotheliale konstitutive NOS (eNOS oder Typ III) und die induzierbare NOS der Makrophagen (iNOS oder Typ II). Diese Isoenzyme wurden zunächst nach den Geweben benannt, in denen sie zuerst nachgewiesen werden konnten. Inzwischen sind sie jedoch auch in anderen Geweben identifiziert worden. Die nNOS (Typ I) kommt ebenso im Skelettmuskel[85] und in pulmonalen Epithelzellen[1] vor.

Die eNOS (Typ III) wurde außer im Endothel zusätzlich in Thrombozyten, Kardiomyozyten und renalen und pulmonalen Epithelzellen [100] sowie in Neuronen [104] gefunden. Dagegen ist die iNOS (Typ II), die im Rahmen immunologischer und inflammatorischer Prozesse akut exprimiert wird, insbesondere in Makrophagen zu finden. Daneben ist sie aber auch in Epithelzellen, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Hepatozyten, mikrovaskulären Endothelzellen und mesangialen Zellen nachgewiesen worden.

Die basale Rate der Bildung von Stickstoffmonoxid durch endotheliale Zellen des Gefäßes in situ oder in Kultur wurde mit etwa 4 pmol/min/mg Protein bestimmt [55;58]. Die stärkste NO-Bildung wird während der Stimulation des Immunsystems induziert und kann sowohl eine Gewebezerstörung als auch einen Zellschutz auslösen. Die iNOS bildet wesentlich mehr NO (im mikromolaren Bereich) als die konstitutive NOS (im nanomolaren Bereich). Sie wird nur nach Aktivierung der Zellen mit Infektionsprodukten einschließlich Bakterien-Endotoxin oder gewisser Entzündungsvermittler exprimiert. Die Bildung von NO durch iNOS (nachgewiesen z.B. an aktivierten Ratten-Makrophagen[111]) ist ein wichtiger Abwehrmechanismus.

Im Gefäßsystem wird NO unter basalen Bedingungen kontinuierlich aus dem Endothel der Gefäßwand freigesetzt. NO beeinflusst maßgeblich den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Des Weiteren wirkt NO vasoprotektiv, da endothelial gebildetes NO die Mitogenese und Proliferation der vaskularen glatten Muskelzellen hemmt und die Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten an die Gefäßwand unterdrückt[80;93;98;99].

1.2. Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Die Besonderheiten im Stoffwechsel von NO resultieren zum großen Teil aus seinen chemischen Eigenschaften. NO ist ein farbloses Gas, welches in wässrigen Phasen bis zu Konzentrationen von 2mM löslich ist [54]. NO kann durch die Reaktion mit Sauerstoff entweder zu Nitroxylanionen (NO^-) reduziert oder zu Nitrosyl-Ionen (NO^+) oxidiert werden [45]. Das Hauptabbauprodukt von NO in wässriger Lösung ist Nitrit, wobei die Kinetik der Autoxidation von NO von der Ausgangskonzentration abhängt [29]. Somit ist die Halbwertszeit von NO umgekehrt proportional zur NO-Konzentration und kein konstanter Wert.

Im biologischen System hängt der NO-Metabolismus von der Diffusionsgeschwindigkeit über biologische Membranen und von der jeweiligen Konzentration von NO, Sauerstoff und anderen möglichen Reaktionspartnern ab. Die Diffusionskonstante von NO in der Gefäßwand beträgt 3300μm^2/sec [75]. Somit diffundiert NO in kurzer Zeit durch mehrere benachbarte Zellen. Die Wirkung von NO selbst ist hierdurch nicht nur auf den direkten Ort der Bildung beschränkt. der parakrine Mediator kann vielmehr signifikante Entfernungen vom Ort der Bildung bis zur Zielzelle zurücklegen.

Einer der Reaktionspartner von NO während der Diffusion ist molekularer Sauerstoff. Es kommt hierbei zur Bildung höherer Stickoxide, z.B. Stickstoffdioxid und Distickstofftrioxid. Diese Stickoxide können entweder mit anderen Molekülen wie z.B. Thiolen oder Aminen reagieren oder zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) hydrolysieren. Ferner reagiert NO mit Hämproteinen und Sauerstoffradikalen. Das Ausmaß jeder dieser Reaktionen ist abhängig von den Bedingungen unter denen NO freigesetzt wird und von der Konzentration der jeweiligen Reaktionspartner [9;66]. Dies erklärt teilweise die Unterschiede in den Angaben bezüglich der Halbwertszeit von NO, die von Sekunden bis zu Minuten reichen [38;58;66]. Zum Beispiel ist die Reaktionsgeschwindigkeit von NO mit Sauerstoff innerhalb der hydrophoben Membranregion um den Faktor 300 höher als die im umgebenden wässrigen Medium [74]. Die umgebenden Bedingungen sind somit von entscheidender Bedeutung im Metabolismus von NO. Wichtige, am Abbau von NO beteiligte Komponenten sind Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale, die in unterschiedlichen Konzentrationen und in verschiedenen Zellen und Organen vorkommen [4;5;46]. Hieraus resultieren verschiedene Reaktionskinetiken von NO *in vivo*. Die sauerstoffabhängigen Radikale werden im Gefäßsystem überwiegend von Endothelzellen und Makrophagen gebildet. Die Superoxidanionen sind hierbei hervorzuheben. NO reagiert mit Superoxidanionen nahezu diffusionslimitiert ($6{,}7 \times 10^9$ mol/l/s) zu Peroxynitrit. Dieses wird von Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und dem Endothel produziert [48]. Es ist ein starkes Oxidanz, welches mit einer Vielzahl anderer Moleküle reagiert und Zellschäden verursachen kann [6;91;101].

In Blutzellen kann NO gebunden und oxidativ abgebaut werden. Hierbei nehmen die Erythrozyten die entscheidende Rolle ein. Diese zellorganellfreien Blutzellen, die lediglich durch eine Plasmamembran vom Blutplasma abgegrenzt sind, enthalten vor allem das Protein Hämoglobin. Erythrozyten bilden 40 bis 50% des Blutvolumens und gelten durch die Reaktionen von NO mit Hämoglobin als ein großer Abbauort für Stickstoffmonoxid [67] (siehe Abbildung 3). Erreicht endothelial gebildetes NO den Erythrozyten, so kann es mit dem Hämoglobin prinzipiell drei verschiedene Reaktionen eingehen. Die rasch ablaufende Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin führt zur Bildung von Methämoglobin und Nitrat [23;95]. 90% des gebildeten NO wird durch diese Reaktion zu Nitrat umgewandelt. Die zweite Reaktion ist die Bildung von Nitrosylhämoglobin durch die Reaktion von NO mit dem Eisen des Deoxyhämoglobins. Die dritte Reaktion ist die Bildung von S-nitroso-Hämoglobin (SNO-Hb), das sich nach der Oxygenierung des Hämoglobins in der Lunge durch eine Nitrosierungsreaktion von NO an das Cys-93 der β-Kette des Hämoglobins bildet [37].

Unmittelbar an der Gefäßwand existiert ein Scherkraft-induzierter, erythrozytenfreier Plasmarandstrom [13;72;73;112]. Das hat zur Folge, dass das in den Endothelzellen gebildete NO nicht nur innerhalb des Erythrozyten reagieren kann, sondern auch im Plasma. NO bildet

(bzw. NO^+ in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren) durch die nitrosative Reaktion mit plasmatischen Thiolgruppen (Albumin, Glutathion, Cystein) sogenannte S-Nitrosothiole (RSNOs). RSNOs können entlang des Gefäßbettes transportiert werden und spielen eine Rolle als Speicherform für NO [42;71;103;115]. Neben Thiolen im Plasma kann NO auch mit Aminen reagieren. Neue Befunde haben gezeigt, dass Nitrosamine (RNNOs) ein physiologischer Bestandteil des humanen Plasmas sind [94] und nicht nur in entzündlichen Prozessen gebildet werden. Welche Funktion RNNOs haben und ob auch sie NO freisetzen können, ist noch nicht klar.

Nitrit ist das primäre Oxidationsprodukt von Stickstoffmonoxid. NO wird im Plasma über Distickstofftrioxid zu Nitrit (NO_2^-) umgewandelt [38;56]. Es wurde gezeigt, dass 70-90% des im Blut zirkulierenden Nitrits aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel stammt und Nitrit als spezifischer und sensitiver Marker für akute Veränderungen der NOS-Aktivität angesehen werden kann [62;96]. Gladwin et al. [33] und Demoncheaux et al. [21] haben nachgewiesen, dass Nitrit im Plasma unter ischämischen und hypoxischen Bedingungen vasodilatatorisch wirken kann. Die neuesten Befunde zeigen, dass auch unter basalen Bedingungen Nitrit durch Deoxyhämoglobin zu NO reduziert wird und vasodilatatorisch wirken kann[18].

Der größte Anteil des intravaskulär gebildeten NOs wird durch die Reaktion mit Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert (siehe oben). Außerdem wird das im Plasma vorliegende Nitrit rasch durch Oxidation mit Oxyhämoglobin zu Nitrat umgewandelt. Bei diesem Mechanismus scheinen Superoxidanionen, Peroxynitritanionen oder ein freies Radikal des Methämoglobin involviert zu sein [22;24;64;65]. Somit stellt Nitrat ein stabiles Abbauprodukt von NO *in vivo* dar. Nitrat bleibt im Blut bis zu seiner Ausscheidung über die Nieren stabil und hat eine Halbwertszeit von 5-8 Stunden [108;116]. Die Konzentration des Nitrates im Blut wird jedoch in großem Maß von NO-Stoffwechsel-unabhängigen Faktoren beeinflusst: die Aufnahme von Nitrat durch die Nahrung, der Metabolismus durch den Harnstoffzyklus [118], die Absorption durch den Verdauungstrakt [14] und die Inhalation aus der Luft [70] (siehe Abbildung 3).

Im Urin ist der Hauptmetabolit des NO-Stoffwechsels Nitrat. Durch Applikation von ^{15}N-markiertem Stickstoff per Inhalation sowie per Injektion konnte gezeigt werden, dass das markierte NO in die Erythrozyten gelangt, dort zu Nitrat oxidiert und wieder ins Plasma abgegeben wird [77]. Das gebildete Nitrat wird via Plasma im Urin ausgeschieden [119]. Nitrat wird in den Glomeruli gefiltert und im Nierentubulus reabsorbiert.

Trotz der zahlreichen Einflussfaktoren, welche unabhängig vom L-Arginin-NO-Stoffwechsel sind (siehe Abbildung 3), kann Nitrat im Urin einen Marker für die erhöhte iNOS Aktivität darstellen. Am Tiermodell konnte nachgewiesen werden, dass der Nitratlevel im Blut und seine Ausscheidung im Urin nach der Applikation von Lipopolysacchariden anstieg, und die aktivierten Makrophagen zeigten eine erhöhte Bildung von Nitrit und Nitrat *in vitro*. Dies deutet darauf hin, dass als Konsequenz der Aktivierung des reticuloendothelialen Systems

die Nitratkonzentration im Urin ein Marker der gesteigerten NO-Bildung ist [105]. Bei Menschen mit Diarrhö wurde ebenso ein signifikanter Anstieg der Nitratausscheidung im Urin beobachtet [44]. Untersuchungen von Jungersten et al. zeigten, dass der Anstieg von Nitrat im Plasma die NO-Bildung durch Makrophagen widerspiegeln könnte[52]. Diese Untersuchungen belegten, dass Nitrat ein nützlicher Marker von cytotoxischer Aktivität während des immunologischen Prozesses ist. Durch eine Induktion der iNOS-Expression z.B. im septischen Schock, der Endotoxinämie, sowie anderen Entzündungszuständen, kommt es zu einer massiven Ausschüttung und Exkretion von NO und seinen oxidativen Abbauprodukten im Urin [27]. Die Bestimmung der Nitratkonzentration könnte somit als ein nützlicher Marker, z.B. als Verlaufsparameter entzündlicher Erkrankungen dienen und durch den Einsatz zuverlässiger und empfindlicher analytischer Verfahren für die Quantifizierung der Gesamt-NO-Bildung und -NOS-Aktivität interessant sein.

Der Einfluss der konstitutiven NOS auf die Nitratkonzentration ist weitgehend ungeklärt. Untersuchungen von Nava et al. [87] zeigten, dass Nitrat in Ratten durch akute Stimulation der eNOS modulierbar ist. Jedoch konnte bisher in mehreren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, dass Nitrat durch akute Veränderungen der eNOS-Aktivität beeinflusst wird [57;69]. Inwieweit diese Differenz durch den unterschiedlichen Stoffwechsel der untersuchten Spezies oder den möglichen Einfluss exogener Faktoren (z.B. Nahrung, Inhalation) bedingt ist, ist zur Zeit ungeklärt. Nitrat hat im Vergleich zu Nitrit eine längere Halbwertszeit im Blut. Geringe Veränderungen der Nitratkonzentration sind bei einer hohen basalen Konzentration durch die Veränderung der NO-Bildung zu erwarten. Die basalen Konzentrationen in der Literatur differieren stark. Die Nitratkonzentration wurde im Urin mit 250 – 2000 µmol/l [36] und im Plasma mit 0,8 - 95 µmol/l [16;50;110] angegeben. Als Grund hierfür wurden bisher die externen Einflussfaktoren (siehe Abbildung 3) benannt. Es könnte jedoch maßgeblich daran liegen, dass die Nitratkonzentration durch die bisherigen Analyseverfahren nicht sensitiv bzw. valide bestimmt wurde.

Die Charakterisierung der Veränderung der Nitratkonzentration durch den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg scheiterte bisher vor allem an der unzureichenden minimalen Auflösung und auch an dem hohen Zeit- und Kostenaufwand der zur Verfügung stehenden Analysemethoden. Um die Relevanz des oxidativen Metaboliten im L-Arginin-NO-Stoffwechselweg zu untersuchen, muss zunächst eine Methode zur sensitiven, schnellen und kostengünstigen Nitratbestimmung etabliert werden.

1.3. Quantifizierung von Nitrat in biologischen Matrizes

Nitrit und Nitrat können durch zahlreiche Verfahren in wässrigen und proteinhaltigen Matrizes bestimmt werden. Dazu zählen der spektrophotometrische Assay durch Griess-Reaktion bzw. Diaminonaphthalen [76], die Kapillarelektrophorese [11], die Gas-Chromatographische

Massen-Spektrometrie [109], die Hochdruckflüssigkeits-Chromatograhie [57] und die Chemilumineszenzdetektion [2]. (siehe Abbildung 1)

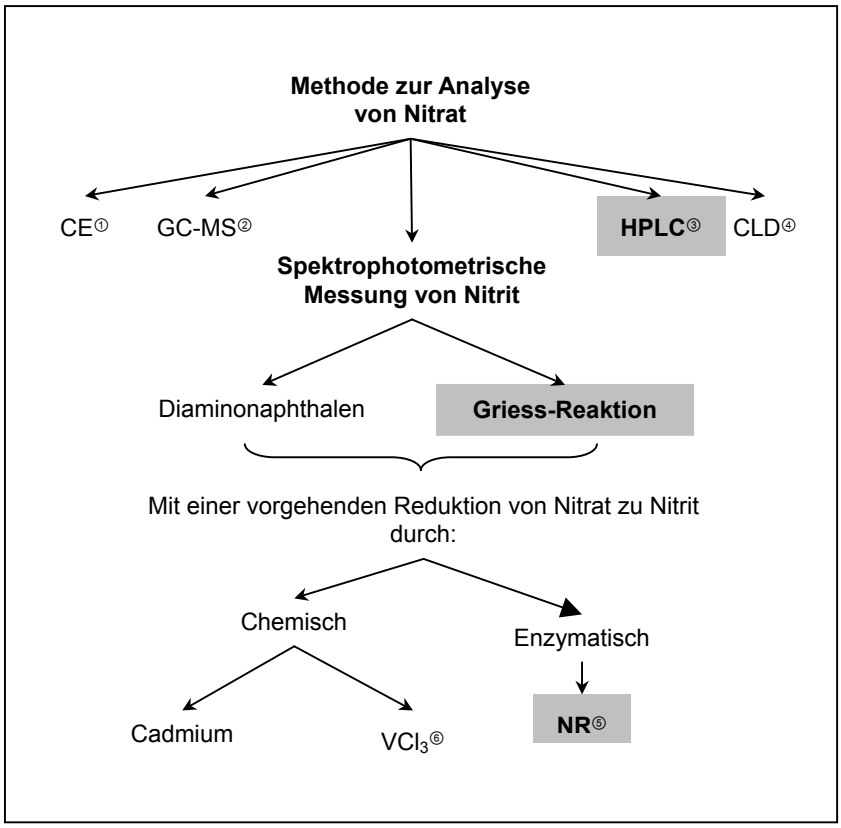

Abbildung 1. Analyseverfahren zur Bestimmung von Nitrat in wässrigen und proteinhaltigen Matrizes. Die grau unterlegte Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit als Referenzmethoden zur Etablierung neuer Analyseverfahren verwendet (siehe Abschnitt 3.)

①: Kapillarelektrophorese
②: Gas-Chromatographische Massen-Spektrometrie
③: Hochdruckflüssigkeitschromatograhie
④: Chemilumineszenzdetektion
⑤: Nitrat Reduktase
⑥: Vanadium(III)-Chlorid

Die einfachste und meist verwendete Methode ist der spektrophotometrische Assay über die Griess-Reaktion zur Nitritanalyse, dem die Reduktion von Nitrat zu Nitrit vorgeschaltet ist (siehe unten). Das Messprinzip der Nitritmessung beruht auf einer Azokupplung von Nitrit an ein Naphthylethylendiamin und der photometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 540 nm (siehe Abbildung 2). Die Sensitivität der Nitritmessung durch die Griess-Reaktion, gemessen über ein herkömmliches Spektrophotometer, liegt im mikromolaren Bereich. Da sich die Nitritkonzentration im Plasma im nanomolarem Bereich befindet, reicht die Sensitivität dieser Messung nicht aus. Deshalb wurde zur Nitritanalyse die Spektrophotometrie mit der Fluss-Injektions-Analyse kombiniert. Durch die Modifizierung konnte die Sensitivität in den nanomolaren Konzentrationsbereich erweitert und durch die Automatisierung der Anlage ein hoher Probendurchsatz ermöglicht werden [41;63].

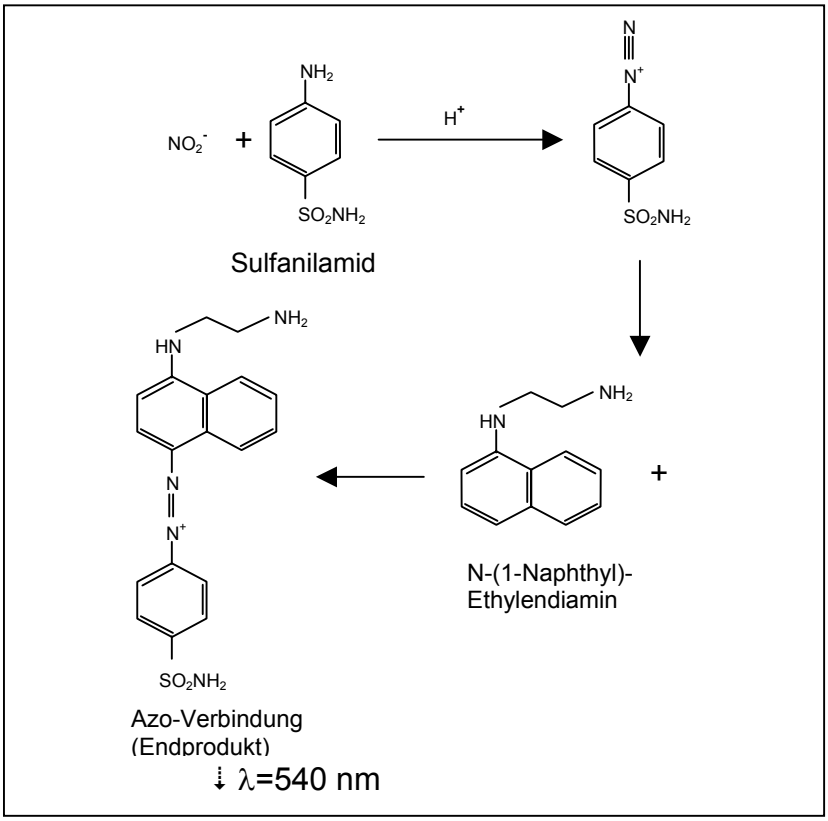

Abbildung 2. Reaktionsmechanismus zur Bestimmung von Nitrit über Griess-Reaktion. Nitrit reagiert in Anwesendheit von Säure mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, der durch die Reaktion mit N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin eine Azo-Verbindung bildet.

Für die Nitratmessung ist eine vorhergehende Reduktion von Nitrat zu Nitrit notwendig, um das Nitrat indirekt ebenfalls über die Griess-Reaktion detektieren zu können. Nitrat kann entweder mit Cadmium [17;36], Nitrat-Reduktase (NR) [35;39;83] oder Vanadium(III)-Chlorid (Vanadiumtrichlorid, VCl_3) [78] zu Nitrit konvertiert werden. Die Sensitivität der vorhandenen Nitratanalyseverfahren liegt im mikromolaren Bereich [10;17;32;40]. Die im Verhältnis zur Nitritanalyse wesentlich geringere Sensitivität der Nitratdetektion liegt einerseits an der nach der Nitratreduktion durchgeführten Nitritanalyse oder an der Reduktionsreaktion und deren methodischen Charakteristika. Die Bestimmung von Nitrat über die UV-HPLC ist eine im Vergleich zu anderen Methoden sehr sensitive Methode, die jedoch mit höherem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden ist.

Um den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg valide zu untersuchen, sind verlässliche Analyseverfahren ein bedeutender Faktor. Falsche Probenbehandlung oder falsche analytische Methoden könnten zuden nicht validen Ergebnissen führen. Laborglaswaren sind ohne mehrmaliges Vorspülen meistens kontaminiert [27;35;49]. Proteine können mit der Nitritmessung über Griess-Reaktion [60] bzw. Diaminonaphthalen [28] interagieren. Eine Proteinsubtraktion ist somit maßgeblich erforderlich. Das Verfahren zur Deproteinisierung sollte jedoch ebenfalls gut überdacht werden, da z.B. die Proteinfällung über Zinksulfat mit

der Nitritmessung über Griess interagiert [39]. Zugabe von Natronlauge in Blutproben könnte zur Hämolyse führen, und das Hämoglobin interagiert mit der Nitritmessung über verschiedenste Verfahren [3;63]. Die Ultrafiltration von proteinhaltigen Proben zur Entfernung der Proteine scheint optimal zu sein [63]. Die neu etablierten Methoden sollen mit den vorhandenen validen Methoden verglichen werden. Eine nicht valide Meßmethode könnte ebenfalls zu falsch positiven oder negativen Werten [25;26] führen.

In mehreren Studien über den NO-Metabolismus wurden die Proben vor der Messung von Nitrat oder Nitrit gelagert. Allerdings wurde die Stabilität der Substanzen nur wenig berücksichtigt. Nitrat in Gewebeproben wird durch Einfrieren abgebaut [41]. Nitrat und Nitrit werden in Zerebrospinalflüssigkeit während der Lagerung bei -20°C zu 63% bzw. 58% abgebaut. Die Wiederfindungsrate von Nitrat bzw. Nitrit im Plasma nach der Lagerung ist 88% bzw. 89% [83]. Wird der prozentuelle Wert mit der Nitratkonzentration im Plasma berechnet, ergibt sich ein Nitratabbau von ca. 2,5 – 4 µmol/l. Durch diesen Verlust kann eine kleine Veränderungen der Nitratkonzentration im Rahmen der Charakterisierung des NO-Metabolismus nicht nachgewiesen werden.

Die Etablierung einer Methode zur Nitratmessung inklusive einer geeigneten Probenbehandlung und Lagerung mit einer Punkt-zu-Punkt Auflösung im submikromolaren Bereich, die automatisierbar und somit für den klinischen Routinebetrieb einsetzbar ist, ist somit noch nicht etabliert und zur vollständigen Charakterisierung des oxidativen NO-Stoffwechsels notwendig.

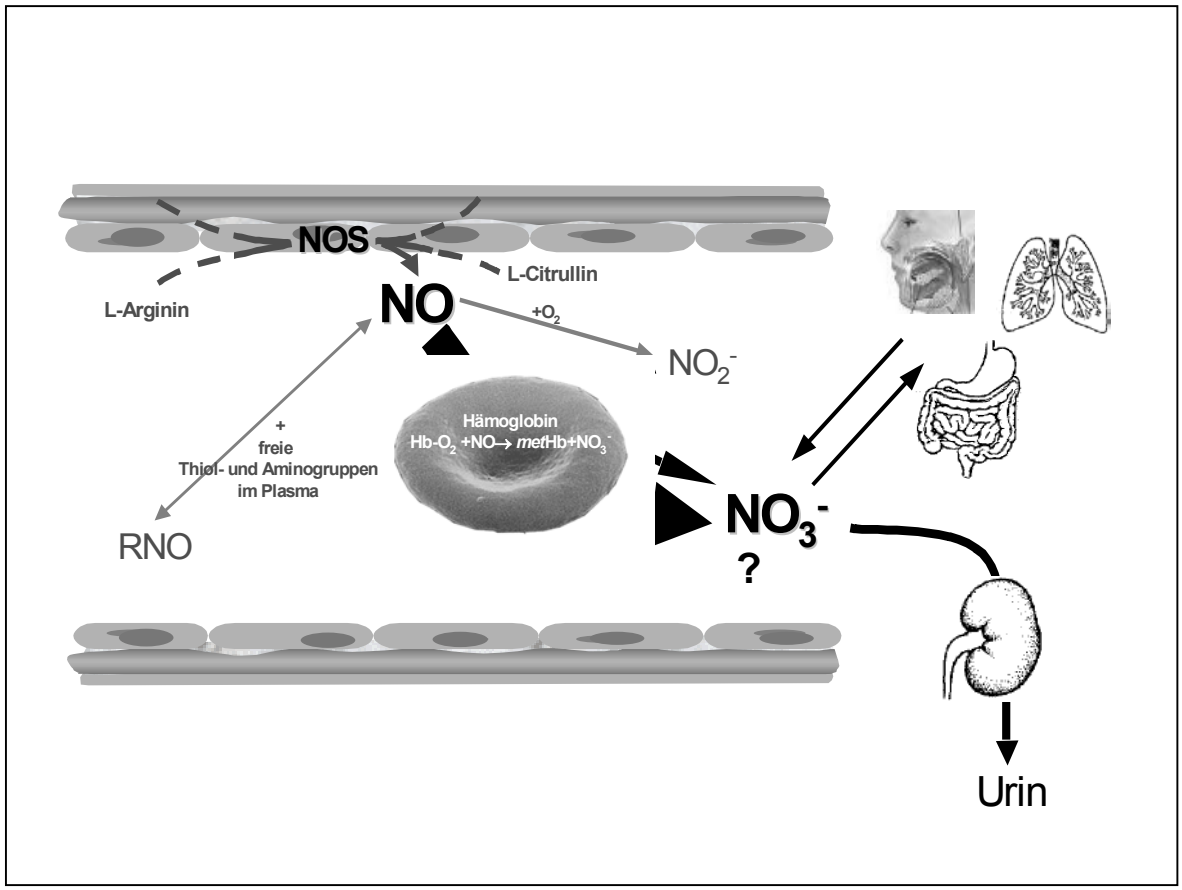

Abbildung 3. Schematische Abbildung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges im Kreislaufsystem.

1.4. Ziele

Ziel dieser Arbeit war es daher, die obengenannten Fragestellungen zu untersuchen:

1. Entwicklung valider, sensitiver, jedoch einfacher und kostengünstiger analytischer Verfahren zur Bestimmung von Nitrat
2. Entwicklung einer geeigneten Probenbehandlung zur Optimierung der Analyse und der Einbindung in die Routinediagnostik
3. Charakterisierung der Rolle von Nitrat im L-Arginin-NO-Stoffwechselweg.

2. Material und Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die spezifischen Methoden zur Quantifizierung von Nitrit und Nitrat in biologischen Matrizes erläutert. Im ersten Abschnitt wird zunächst auf die bereits etablierten Methoden zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat eingegangen. Dann folgen Abschnitte über die Etablierung der neuen Methoden zur Nitrit- und Nitratmessung und über die Aufarbeitung der Proben in unterschiedlichen Matrizes.
Es wurden alle Chemikalien, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen.
Analysenzeit und Kosten der Methoden wurden anhand von 10 bis 30 Proben berechnet. Die Analysenzeit beinhaltet die Aufarbeitung und Vermessung exklusive Ultrazentrifugationszeit bzw. Inkubationszeit. Die Kosten setzen sich zusammen aus den benötigten Materialien zur Aufarbeitung und Vermessung ausgenommen Ultrazentrifugationsröhrchen.

2.1. Methoden zur Bestimmung von Nitrit

Nitrit kann durch unterschiedliche Analyseverfahren bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde die Fluss-Injektions-Analyse (FIA) in Kombination mit der Griess-Reaktion, einem kolorimetrischen Verfahren zur Bestimmung der Nitritkonzentration, eingesetzt.

2.1.1. Fluss-Injektions-Analyse (FIA)

Das Prinzip der FIA beruht auf der spektrophotometrischen Bestimmung von Nitrit mittels der Griess-Reaktion und der durchflussspektrophotometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion. Das Griess-Reagenz dient als Laufmittel der Proben.
Das Griess-Reagenz besteht zu gleichen Teilen aus 10 g Sulfanilamid gelöst in 1% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 g N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin gelöst in hochreinem HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland). Das Griess-Reagenz wird mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min über eine HPLC-Pumpe (Sunflow 100, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) gepumpt und durch einen Entgaser (2-Kanal Degaser Populair, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) entgast (siehe Abbildung 4). Die aufgearbeiteten Proben werden mittels eines automatischen Probenaufnehmers (Thriathlon, Spark Holland, Niederlande) in das fließende Griess-Reagenz injiziert. In der Kapillare zwischen dem Autoinjektor und dem nachgeschalteten Detektor findet die Farbreaktion statt, die in einer Meßzelle (6 mm, 9µL, Kel-F, Linear Instrument, Reno, NE, USA) bei einer Wellenlänge von 545 nm detektiert wird. Die detektierte Absorptionseinheit wird durch einen Datenumwandler transformiert. Die Datenaufnahme erfolgt mit Hilfe einer Chromatographie-

Software (Chromgate 2.55, Knauer, Berlin, Deutschland). Die Konzentration von Nitrit wird über die Peakhöhe bestimmt.

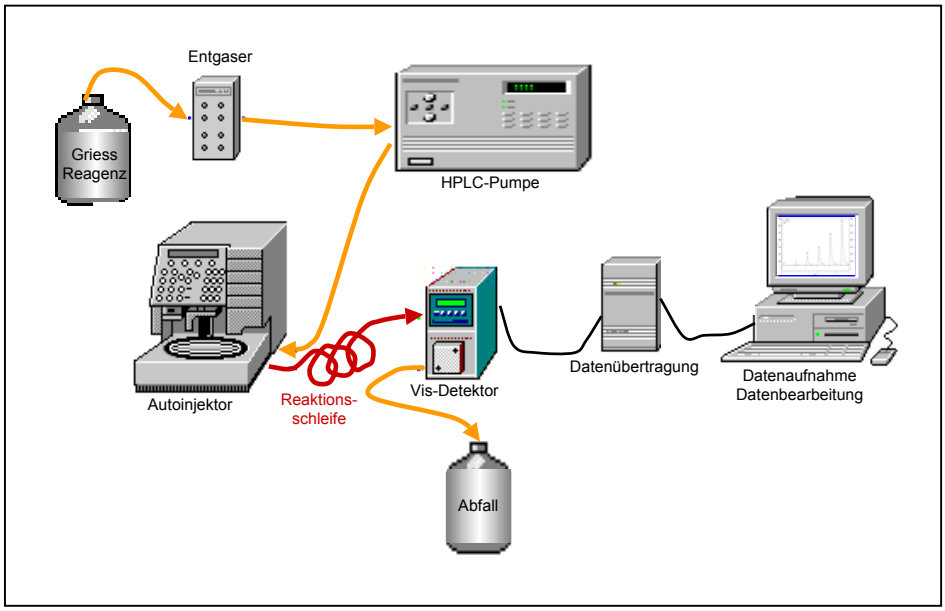

Abbildung 4. Aufbau einer Fluss Injektions Analyse zur Bestimmung von Nitrit.[63]

Um die Beeinflussung des Probensignals durch unterschiedliches Probenmaterial ausschließen zu können, wird das Standardadditionsverfahren (SAV) verwendet. Hierfür werden die Proben in fünf Aliquots zu jeweils 190µL aufgeteilt, um dann externes Nitrit in Endkonzentrationen von 0, 100, 200, 400, bzw. 600 nmol/l hinzugegeben.

Um die Nitritkonzentrationen in den Proben zu analysieren, dienen die fünf Peakhöhen als Grundlage für eine lineare Regression. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der x-Achse (y=0) entspricht der in der Probe aufgegebenen Nitritkonzentration (Abbildung 5B). Nach Korrektur der Verdünnungsfaktoren und Subtraktion der Leerwerte ergibt sich die Ausgangskonzentration der Probe.

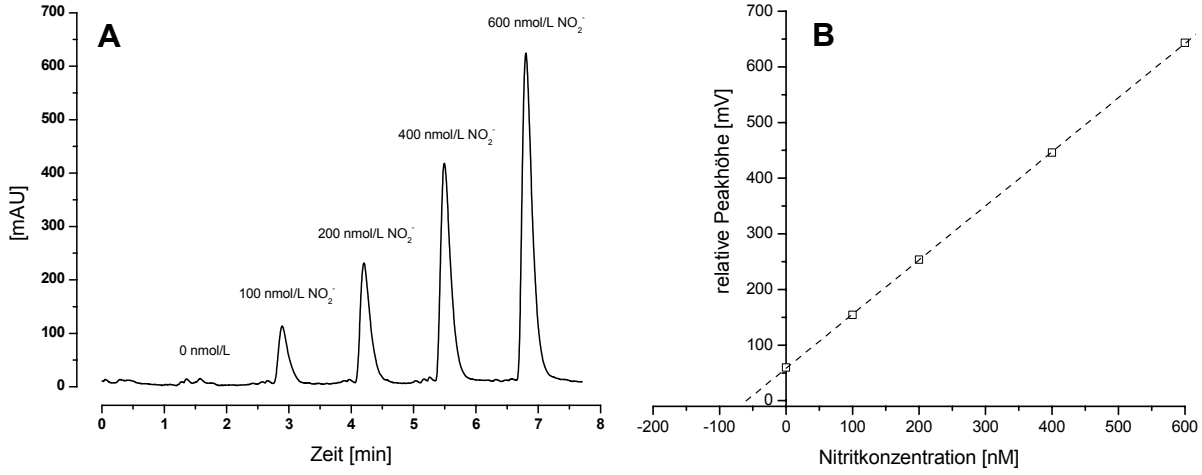

Abbildung 5. A. Originalchromatogramm eines Probenlaufs zur Bestimmung von Nitrit über FIA. B. Die fünf durch den Integrator analysierten Peakhöhen dienen als Grundlage einer Regressionsgeraden. Bei Anwendung des Standardadditionsverfahrens ergibt der Schnittpunkt mit der Y-Achse die Nitritkonzentration in der Probe.

2.1.2. Modifizierung der Methode zur Nitritmessung über FIA: Messung ohne Standard-Additions-Verfahren

Bisher wurde die Nitritkonzentration über die FIA mittels SAV gemessen. Die Anwendung des SAV benötigt ein hohes Probenvolumen und eine verlängerte Aufarbeitungs- wie auch Analysenzeit. Diese Bestimmung der Nitritkonzentration wurde modifiziert und die FIA ohne Standardadditionsverfahren (FIA ohne SAV) etabliert. Hierbei werden die Proben ohne externe Nitritzugabe direkt nach der Aufarbeitung vermessen. Die Auswertung erfolgt über die Peakhöhe anhand der Eichgerade.

Zur Validierung wurde die modifizierte FIA-Methode (FIA ohne SAV) mit der FIA-Methode mit SAV verglichen. Es wurde die Nitritkonzentration in humanem Plasma mit beiden Methoden gemessen und verglichen.

Diese modifizierte Methode dient als Basis der anschließenden Methoden zur Nitratmessung über Nitrat-Reduktase - FIA (NR-FIA) und Vanadium(III)-Chlorid - FIA (VCl-FIA).

2.2. Methoden zur Bestimmung von Nitrat

Nitrat wurde bisher kolorimetrisch auf Basis der Griess-Reaktion und der Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektor (UV-HPLC) bestimmt.

2.2.1. Kolorimetrische Bestimmung zur Nitratanalyse

Das Prinzip des kommerziell erhältlichen Nitrat-Nitrit-kolorimetrischen Assays (Cayman Kit®, Alexis, Grünberg, Deutschland) beruht ebenfalls auf der Griess-Reaktion (siehe Abbildung 2). Hierbei wurden die Proben in zwei Schritten bestimmt. Beim ersten Schritt findet die enzymatische Umwandlung von Nitrat zu Nitrit mittels der Nitrat-Reduktase (NR) statt. Im zweiten Schritt wird Nitrit über das Griess-Reagenz bestimmt. Die photometrische Absorptionsmessung des Azofarbstoffes lässt auf die gesamte Nitrat-Nitrit-Konzentration (in der Summe als NOx bezeichnet) schließen. Hierzu wird ein Plattenspektrophotometer (iEMS Reader MF, Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland) verwendet. Die Auswertung erfolgt nach der detektierten Absorptionseinheit bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Konzentration wird, entsprechend der Anleitung des Assays, nach Abzug der Blanks mit der Standardkurve berechnet.

2.2.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie zur Nitratmessung

Der Gehalt an Nitrat, sowohl in wässriger Lösung als auch im Plasma, kann mittels einer UV-HPLC gemessen werden. Das HPLC-System besteht aus einem Entgaser (2-Kanal Degasser Populair, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland), einer HPLC-Pumpe (Typ S1100, Sykam, Gilching, Deutschland), einem automatisierten Probenaufnehmer (Thriathlon, Spark Holland, Niederlande) und einem UV-Detektor (Typ UVIS204, Linear, Reno, NE, USA).

Als stationäre Phase wird eine Anionenaustausch-Säule auf Silicagelbasis (LCA A08, Sykam, Gilching, Deutschland) mit einer SAX-Vorsäule (5µm, Grom, Herrenberg-Rhey, Deutschland) und als mobile Phase ein Puffer unter isokratischen Bedingungen mit einem Fluss von 1 ml/min verwendet. Die Zusammensetzung der mobilen Phase ist wie folgt: 70% Acetonitril, 10% Methanol (Reagenzien von Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) versetzt mit 40mM Kochsalz in hochreinem Wasser für HPLC (Reagenzien von Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die Aufzeichnung der UV-Absorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 220 nm. Die detektierte Absorptionseinheit wird durch einen Datenumwandler für den Datenaufnehmer transformiert. Mit Hilfe einer Chromatographie-Software (Chromgate 2.55, Knauer, Berlin, Deutschland) erfolgt die Datenaufnahme. Die Auswertung der Peaks erfolgt anhand Fläche und wird mit einer Standardeichkurve verglichen.

2.3. Etablierung neuer Methoden zur Nitratmessung

Aufgrund geringer Sensitivität bei hohem Zeit-, Kosten- und Arbeitsaufwand der vorhandenen Methoden zur Nitratmessung (UV-HPLC und Cayman Kit®) wurden zwei neue, auf unterschiedlichen Reaktionswegen basierende Nitratmessmethoden etabliert und verglichen. Das Prinzip dieser Methoden beruht auf einer Reduktion von Nitrat zu Nitrit und einer anschließenden Nitritmessung basierend auf der Griess-Reaktion mittels FIA (siehe Kapitel 2.1.1.). Zur Umwandlung von Nitrat zu Nitrit kommt NR bzw. VCl_3 zum Einsatz. Die Methodencharakteristika der jeweiligen etablierten Methode wurden im Anschluss an die Etablierung verglichen.

2.3.1. Nitratmessung über Nitrat Reduktase-FIA (NR-FIA)

Zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch NR wurde das Protokoll von Granger modifiziert [35] (siehe Abbildung 6). Zur Reaktion wird die NR und ihr Kofaktor, NADPH, verwendet. Über die NR und NADPH wird Nitrat zu Nitrit reduziert. Parallel dazu wird NADPH zu $NADP^+$ oxidiert. $NADP^+$ wiederum wird durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) zu NADPH umgesetzt, das bei der Reduktion von Nitrat zu Nitrit wieder zugeführt werden kann.
Zur Optimierung des Arbeitschrittes werden alle benötigten Substanzen bis auf NADPH 10-fach konzentriert, vermischt und als eine Basislösung eingefroren. Diese ist bis zu 4 Monaten haltbar. Am Messtag wird die Basislösung verdünnt und mit frisch angesetztem NADPH vermischt. NADPH ist aufgrund fehlender Stabilität vor jeder Messung frisch anzusetzen. Es ergeben sich folgende Endkonzentrationen der jeweiligen Substanzen in der Probe: 70 mmol/l Trispuffer pH 7,4, 0,1 IE/ml NR, 1 mmol/l Glukose-6-Phosphat (G6P), 0,3 IE/ml G6PDH und 2 µmol/l NADPH. NR, G6P und G6PDH sind bei Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland erworben worden.

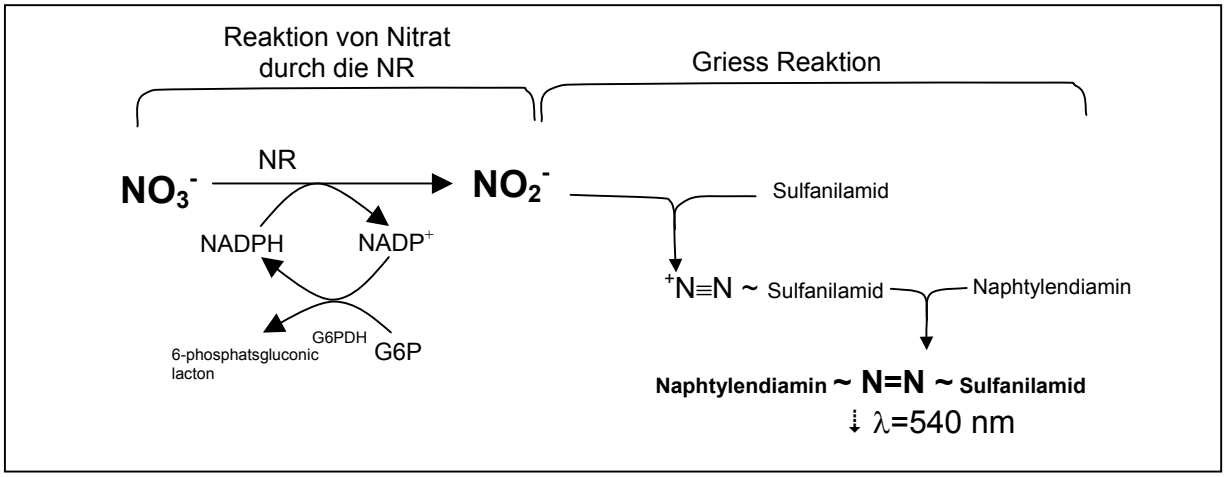

Abbildung 6. Reaktionsmechanismus der neu etablierten Methode (NR-FIA) zur Analyse von Nitrat. Im ersten Schritt wird Nitrat mittels Nitrat Reduktase (NR) zu Nitrit reduziert. Parallel dazu wird NADPH zu $NADP^+$ umgewandelt. $NADP^+$ wird mittels G6P und G6PDH zu NADPH. Im zweiten Schritt reagiert Nitrit mit Sulfanilamid und Naphthylethylendiamin zu einer Azo-Verbindung. Diese wird bei einer Wellenlänge von 540nm detektiert (siehe Abbildung 2).

Nach Zugabe von NR und ihren Kofaktoren in die Probe erfolgt eine lichtgeschützte Inkubation bei einer Temperatur von 25°C für 60 min. In der Zeit wird Nitrat vollständig zu Nitrit umgewandelt. Das gesamte NOx in den Proben wird mittels der FIA mit Griess-Reaktion als Laufmittel gemessen. Die Arbeitschritte der Messung sind in Abbildung 7 dargestellt.

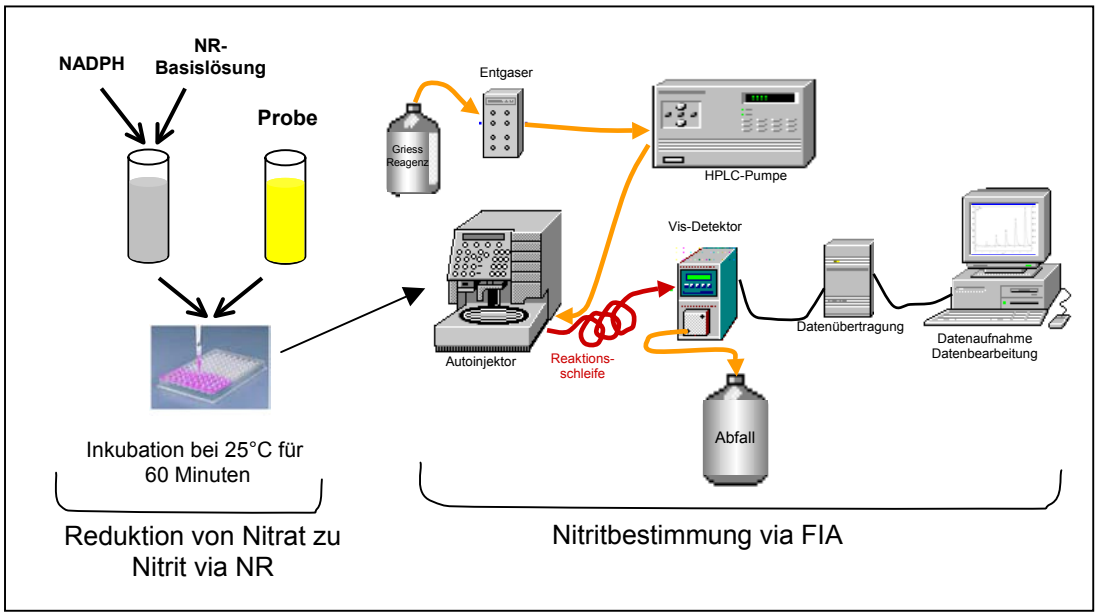

Abbildung 7. Arbeitschritte der NR-FIA. Diese Methode besteht aus zwei Arbeitschritten. Der erste Schritt ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit via NR (siehe Abbildung 6). Die NR-Basislösung wird mit frisch angesetztem NADPH vermischt und den Proben zugegeben. Nach der lichtgeschützten Inkubation bei 25°C für 60 min erfolgt der zweite Schritt, die Nitritmessung über FIA (siehe Abbildung 4).

2.3.2. Nitratmessmethode über Vanadium(III)-Chlorid-FIA (VCl-FIA)

Es wurde eine neue Methode etabliert, die auf den Vorarbeiten von Miranda et al.[78] basiert. Bei dieser Methode wird Nitrat chemisch durch VCl_3 zu Nitrit reduziert. 50 mmol/l VCl_3 wird in 1M Salzsäure gelöst und über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße (RC 25, Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Die VCl_3-Lösung ist lichtgeschützt bei 4°C für 2 Wochen haltbar. Die Proben werden mit VCl_3-Lösung und Griess-Reagenz versetzt, bei 37°C lichtgeschützt für 30 min inkubiert und bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

a) Modifikation der Reagenzkomposition

Ursprünglich wurden die Reagenzien und die Probe in gleichen Anteilen zum Reaktionsgemisch hinzugegeben (Probe: VCl_3-Lösung: Griess-Reagenz = 1:1:1) [78]. Zur Verbesserung der Sensitivität und minimalen Auflösung der Messung wurde die Griess-Lösung 4-fach konzentriert und 25% mehr VCl_3-Lösung den Proben hinzugegeben. Somit veränderte sich das Verhältnis im Reaktionsgemisch zu: 6:5:1 (Probe: VCl_3-Lösung: Griess-Reagenz). Die detektierte Absorption unter Zugabe der gleichen Nitratkonzentration wurde bei Verwendung der neuen Rezeptur mit der ursprünglichen Rezeptur verglichen.

Hierzu wurde Nitrat in Konzentrationen von 0 - 30 µmol/l angesetzt. Das Reaktionsgemisch von VCl_3-Griess wurde in der ursprünglichen bzw. der neuen Zusammensetzung den Proben in einer Mikrotiterplatte hinzugegeben. Nach einer lichtgeschützten Inkubation bei 37°C für 30 min wurde die Absorption der Proben bei der Wellenlänge von 540 nm detektiert. Die Absorptionseinheit der Proben beider Methoden wurde verglichen.

b) Kinetik der Nitratreduktion via VCl_3 und Automatisierung der Messung (Anschließen mit Fluss-Injektions-Analyse)

Nach Reduktion von Nitrat zu Nitrit kann die Nitritmessung spektrophotometrisch über ein Plattenphotometer oder über die FIA bestimmt werden. Die FIA kann mit Hilfe des Vis-Detektors Absorptionsänderungen sensitiver detektieren als das Plattenphotometer. Bei der Nitratanalyse via VCl-FIA ist eine gleichzeitige Messung aller Proben nicht möglich und somit eine vollständige Nitratreduktion notwendig. Deshalb wurde die Kinetik der Nitratreduktion mittels VCl_3 ermittelt. Dabei wurde Nitrat in Konzentration von 0 - 40 µmol/l bei einer Temperatur von 37°C für 120 min mit VCl_3-Griess inkubiert. Alle 10 min wurde die Reduktionskapazität von VCl_3 bestimmt. Die optimale Inkubationszeit zum Erreichen einer vollständigen Nitratreduktion konnte bei diesen Untersuchungen ermittelt werden.

Um die Sensitivität und die Punkt zu Punkt Diskriminierung zu erhöhen und gleichzeitig den Vorgang zu automatisieren, wurde die Nitratreduktion über VCl_3 mit der Nitritmessung mittels FIA kombiniert (siehe Abbildung 8).

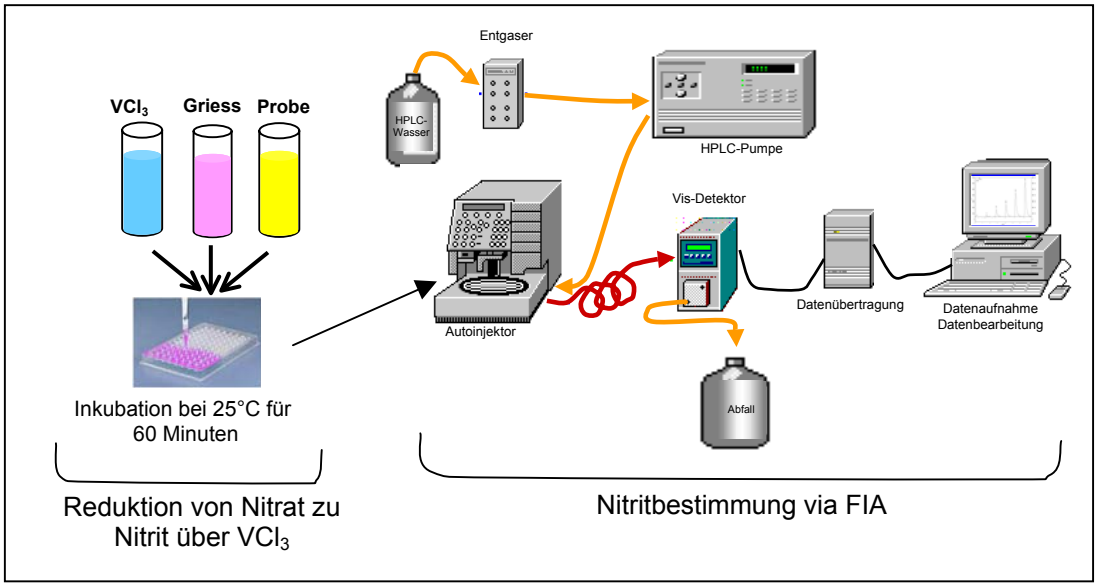

Abbildung 8. Arbeitschritte der VCl-FIA. Diese Methode besteht aus zwei Arbeitschritten. Der erste Schritt ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit via Vanadium(III)-Chlorid (VCl_3). Die Griess Reaktion wird ebenfalls gleichzeitig den Probe zugegeben. Nach der lichtgeschützten Inkubation bei 37°C für 90 min erfolgt der zweite Schritt, die photometrische Absorptionsmessung über die FIA (siehe Abbildung 4).

2.3.3. Validierung der neu etablierten Methoden

Das Ziel der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Etablierung der Methoden war der Vergleich zwischen der neuen Methode, NR-FIA, und den bereits etablierten Methoden UV-HPLC und Cayman Kit. Hierbei wurde Nitrat in Endkonzentrationen von 0 - 15 µmol/l zu einer NaCl-Lösung 0,9% (diente als wässrige Lösung,) und zum Plasma hinzugegeben. Die Proben wurden am gleichen Tag mittels der NR-FIA, UV-HPLC und Cayman Kit vermessen und die Konzentrationen verglichen.

2.4. Optimierung der Probenaufarbeitung zur anschließenden Nitratanalyse

2.4.1. Probenaufarbeitung zur Nitratanalyse via NR-FIA und VCl-FIA

Eine geeignete Probenaufarbeitung zur Vereinfachung der Analyse des NO-Metabolismus wurde untersucht. Die Anwendung der NR-FIA und der VCl-FIA wurde mit der herkömmlichen UV-HPLC verglichen. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Vollblut mit Heparin 20 IE/ml bzw. 2,5 mmol/l EDTA und 10 mmol/l N-Ethylmaleimid (NEM) versetzt und zentrifugiert. Nitrat wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0-30 µmol/l) zu den Proben zugegeben. Die Proben wurden über die UV-HPLC, NR-FIA und VCl-FIA analysiert.

2.4.2. Lagerungsmöglichkeit der nitrit- und nitrathaltigen Proben

Bisher wurden Proben zur Nitritmessung am Abnahmetag vermessen, da das Nitrit in den Proben nach der Abnahme schnell abgebaut wird [59]. Die Wiederfindungsrate von Nitrat nach der Lagerung von Proben liegt trotz seiner Stabilität nur bei 88% [11;83]. Um jedoch Proben lagern zu können, mussten Untersuchungen zur Haltbarkeit durchgeführt werden.
Nitrit bzw. Nitrat wurde zu verschiedenen Matrizes (PBS, Ultrafiltrat, 4 g% Albuminlösung oder Plasma) in aufsteigender Konzentration hinzugefügt. Nitrit wurde im submikromolaren bis mikromolaren Bereich (0,2; 0,5; 1; 5 und 10 µmol/l) zu den Proben gegeben. Nitrat wurde im mikromolaren Bereich (0; 10; 20 und 30 µmol/l) den Proben hinzugegeben. Die Messungen wurden am gleichen Tag sowie zwei Tage später durchgeführt. Um den Einfluss der Temperatur während der Lagerung oder des Einfrierprozesses auf die Stabilität der Nitrit- bzw. Nitratkonzentration zu untersuchen, wurden die Proben mit vorherigem Schockgefrieren oder ohne vorheriges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C und -20°C gelagert. Zur Nitrit- und Nitratmessung diente die FIA bzw. NR-FIA. Die Stabilität von Nitrit und Nitrat wurde durch die Wiederfindungsrate nach der Lagerung im Vergleich zu der Konzentration vor der Lagerung evaluiert.

2.5. Untersuchungen zur Charakterisierung des L-Arginin-Stoffwechselweges

2.5.1. Aufarbeitung der Proben aus Urin, Plasma und Vollblut

Wässrige Proben (z.B. Urin) können unmittelbar gemessen werden, wobei proteinhaltige Proben (z.B. Blut) speziell aufgearbeitet werden müssen.
Urin von 12 gesunden Freiwilligen wurde in sterilen Urinbechern gesammelt und bei 3000xg zentrifugiert. Urin von Mäusen wurde mit Hilfe eines Stoffwechselkäfigs gesammelt. Urinproben werden aufgrund der hohen Nitratkonzentration mit 0,9% NaCl (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis 1:25 für die Nitritmessung und 1:50 für die Nitratmessung verdünnt. Nitrit und Nitrat im Urin wurden mittels der Griess-Reaktion bzw. VCl-Griess in einer Mikrotiterplatte vermessen.
Humanes Vollblut von gesunden Freiwilligen wurde über eine venöse Punktionskanüle (Butterfly, Ø 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo, Irland) unter Vermeidung einer Hämolyse entnommen.
Vor der Blutentnahme der Mäuse wurden diese mit einer intraperitonealen Gabe von Ketavet (80 mg / kg Körpergewicht; Wirkstoff Ketaminhydrochlorid; Pharmacia & Upjohn Erlangen) und Rompun (10 mg/Kg Körpergewicht; Wirkstoff Xylazinhydrochlorid; BayerVital,

Leverkusen) anästhesiert und die Bauchhöhle eröffnet. Unter Darstellung der unteren Hohlvene wird das Blut unter leichter Aspiration entnommen.

Die entnommenen Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 0,9% NaCl und dem Antikoagulanz Heparin 20 IE/ml (Liquemin N5000, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Bei einem Teil der Proben wurde statt Heparin wegen der Optimierung der Probenaufarbeitung 2,5 mmol/l EDTA (siehe Abschnitt 2.4.1) verwendet. Nach der Verdünnung des Vollblutes erfolgte die Plasmaseparation durch Zentrifugation bei 800xg und 4°C für 30 min. Zur Aufbereitung der Vollblutproben wird das Aqua-Injectabilia (Delta Select, Pfullingen, Deutschland) anstatt 0,9% NaCl zur Verdünnung im Verhältnis 1:10 verwendet um die Erythrozyten zu lysieren. Aufgrund des hohen Proteingehaltes wird das mit der o.g. Lösung versetzte Plasma oder Vollblut in die Ultrazentrifugationsröhrchen (Centricon YM 10, cut off 10 kDa, Millipore, Eschborn, Deutschland) für 60 min bei 4000xg und 4°C ultrafiltriert. Das Ultrafiltrat wird unmittelbar oder nach Lagerung bei –80°C vermessen.

Um die Nitratkonzentration in Erythrozyten zu ermitteln, wird die Nitratkonzentration im Vollblut unter Berücksichtigung des Hämatokrits durch folgende Formel berechnet:

$$[NO_3^-]\ \text{Ery} = \frac{[NO_3^-]\ \text{Vollblut} - (((1 - (\text{Hämatokrit}/100)) \times [NO_3^-]\ \text{Plasma})}{\text{Hämatokrit}/100}$$

2.5.2. Quantifizierung von Nitrat im Plasma und Urin von Mäusen

Um die Nitratkonzentration im Plasma und Urin von Mäusen in Abhängigkeit des L-Arginin-NO-Stoffwechsels zu untersuchen, wurden 19 eNOS-Wildtyp (eNOS-WT; C57BL/b6) und 13 homozygote eNOS-knock-out Mäuse (eNOS-KO-Mäuse; genetischer Hintergrund C57BL/b6) [34], 4 iNOS-Wildtyp- (iNOS-WT; FVB/N) und 6 transgene-iNOS überexprimierenden Mäuse (iNOS-TG-Mäuse; genetischer Hintergrund FVB/N) [43] untersucht. Die WT-, eNOS-KO-, und iNOS-TG-Mäuse wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen bei konstanten Bedingungen mit Nitrit- und Nitratreduziertem Futter (Altromin) gehalten.

In einem Subkollektiv von 7 eNOS-WT-Mäusen wurde die Plasmanitratkonzentration vor und nach der Inhibition der eNOS gemessen. Dazu wurde L-NAME (10mg/kg Köpergewicht) über einen Zeitraum von 5 Tagen dem Trinkwasser hinzugefügt. Es wurden Blutproben von 12 eNOS-WT-, 4 iNOS-WT-, 7 eNOS-WT- mit LNAME, 13 eNOS-KO- und 6 iNOS-TG-Mäusen entnommen. Das Nitrat im Plasma wurde mittels UV-HPLC bzw. VCl-FIA gemessen.

Bei einem Subkollektiv von 2 eNOS-WT, 3 eNOS-KO, 4 iNOS-WT und 6 iNOS-TG-Mäuse wurde die Nitratkonzentration im Urin gemessen.

2.5.3. *In vitro* Untersuchungen zur hämatogenen Nitratbildung

Humanes Vollblut wurde für 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad mit 3 mmol/l L-Arginin (dient der NOS als Substrat) bzw. mit PBS (als Kontrolle) inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurde Nitrat im zellfreien, plasmatischen Überstand, nach Zentrifugation des Vollblutes bei 800xg, 4°C für 10 min, bestimmt. Zur Nitratmessung dienten die UV-HPLC (n=4), NR-FIA (n=3) und VCl-FIA (n=6) nach entsprechender Probenaufarbeitung.

2.6. Mathematisch-statistische Methoden

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler (MW ± SE) angegeben. Gruppenmittelwerte der Änderungen der Nitratkonzentration in Mäusen in Abhängigkeit von NO-Metabolismus (Abschnitt 3.5.2.) wurden durch die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Im konsekutiven Post-Hoc Test (Bonferroni) erfolgte der Einzelgruppenvergleich. Bei direktem Gruppenvergleich (Abschnitt 3.4.2. Lagerung der Proben und Abschnitt 3.5.3. Untersuchungen zur hämatogenen Nitratbildung) wurde der Student's t-Test von ungepaarten Daten durchgeführt. Als statistisch relevant galt ein p-Wert ≤ 0,05. Zur Analyse diente das Computerprogramm SPSS® 11.0 für Windows (Chicago Ill., USA).
Die graphische Darstellung der Daten und die lineare Regression insbesondere zur Erstellung der Eichgeraden der Nitrit- bzw. Nitratstandards wurde mit Hilfe des Computerprogramms MicroCal Origin® (Version 7.0, MicroCal Software Inc., Northhampton, MA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit neu entwickelten Methoden und die bereits vorhandenen Methoden, die als Referenz der neu entwickelten Methoden angewendet wurden, sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Aufstellung der in vorliegender Arbeit verwendeten Methoden zur Analyse von Nitrit und Nitrat. Die vorhandenen Methoden wurden zur Validierung der neu etablierten Methoden verwendet.

	Nitrit	**Nitrat**
Vorhandene Methode	FIA (mit SAV)①	Cayman Kit③
		UV-HPLC④
Neu entwickelte Methode	FIA ohne SAV②	NR-FIA⑤
		VCl-FIA⑥

①: Nitritmessung über Fluss-Injektions-Analyse mit Standardadditionsverfahren

②: Nitritmessung über Fluss-Injektions-Analyse ohne Standardadditionsverfahren, eine Voraussetzung für die anschliessende Bestimmung von Nitrat

③: Kommerzielle Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion von Nitrat über Nitrat-Reduktase zu Nitrit mit anschließender Bestimmung von Nitrit durch die Griess-Reaktion

④: Nitratanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektor

⑤: Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion von Nitrat über Nitrat-Reduktase zu Nitrit mit anschließender Bestimmung von Nitrit durch die FIA ohne SAV

⑥: Nitratanalyse durch chemische Reduktion von Nitrat über Vanadium(III)-Chlorid zu Nitrit und anschließender Messung von Nitrit mittels der FIA ohne SAV

3.1. Methodeneigenschaften der vorhandenen Methoden zur Nitrit- und Nitratanalyse

Zur Nitritmessung diente die FIA Methode. Die Sensitivität der FIA beträgt 10 nmol/l bei einer minimalen Auflösung von 10 nmol/l. Weitere Eckdaten der FIA sind in folgender Tabelle beschrieben.

Tabelle 2 . Methodencharakteristika der Nitritbestimmung über die FIA

Matrizes	Plasma (1:5 verdünnt) und wässrige Lösung
Getestete Linearität [µmol/l]	0 - 20
Korrelationskoeffizient	> 0,997
Sensitivität [nmol/l	10
Minimale Auflösung [nmol/l]	10
Variationskoeffizient [%]	0 - 8
Wiederfindungsrate [%]	100 ± 10
Analysenzeit pro Einfachbestimmung [min]	10
Probenvolumen pro Einfachbestimmung [µl]	1000

Zur Nitratmessung diente bisher der kommerzielle Cayman Kit und die herkömmliche UV-HPLC. Die Nitratmessung über das Cayman Kit ist in jedem Labor anwendbar. Jedoch ist dieses Kit in der klinischen Routine kostspielig und nicht sensitiv genug. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 0,5 µmol/l und die minimale Auflösung im 1:5 verdünnten Plasma bei 0,5 µmol/l. Die Messung pro Einfachbestimmung dauert 3 min, die Kosten betragen 8 €. Die Sensitivität der Nitratmessung über die UV-HPLC liegt bei 0,5 µmol/l und die minimale Auflösung im 1:5 verdünnten Plasma bei 0,2 µmol/l. Die Analysezeit beträgt 20 min und die Kosten 4,50 € pro Einfachbestimmung.
Weitere Eigenschaften der Messmethoden sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Charakteristika des Cayman Kits und der UV-HPLC

Eigenschaften	Cayman Kit	UV-HPLC
Getestete Linearität [µmol/l]	0 - 35	0 - 30
Minimale Auflösung [µmol/l]	0,5	0,2
Sensitivität [µmol/l]	0,5	0,2
Variationskoeffizient [%]	0 - 7	0 - 9
Wiederfindungsrate [%]	100 ± 10	100 ± 5
Spezifität	Nitrat, Nitrit	Nitrat
Analysenzeit pro Einfachbestimmung [min]	3	20
Probenvolumen pro Einfachbestimmung [µl]	80	100
Kosten pro Einfachbestimmung [€]	8	4,50

3.2. Etablierung der Nitritmessmethode: Modifikation der Nitritmessung über die FIA

Die als Basis verwendete Nitritanalytik ist für die Bestimmung von Nitritkonzentrationen im nanomolaren Bereich und in proteinhaltigen Matrizes entwickelt worden. Es wird eine hohe Sensitivität durch die Kombination aus Griess-Reaktion und der FIA inklusive des SAV erreicht. Die Anwendung des SAV bedingt ein hohes Probenvolumen und eine verlängerte Aufarbeitungs- wie auch Analysenzeit. Im Rahmen dieser Arbeit soll die FIA als nachgeschaltetes Verfahren zur Nitritbestimmung nach Nitratreduktion verwendet werden. Die Modifikation der Nitritmessung über die FIA ohne das SAV verringert die oben erwähnten zeitintensiven und kostensteigernden Eigenschaften der Analyse. Die Proben wurden ohne externe Nitritzugabe über die FIA gemessen. Die Analysenzeit der Messung von Nitrit durch FIA ohne das SAV beträgt 2,5 min pro Einfachbestimmung. Ohne das SAV beträgt die minimale Auflösung der FIA 5 nmol/l in wässriger und plasmatischer Lösung mit einer Sensitivität von 10 nmol/l (siehe Abbildung 9). Weitere Eigenschaften der Methode sind in Tabelle 4 aufgelistet.

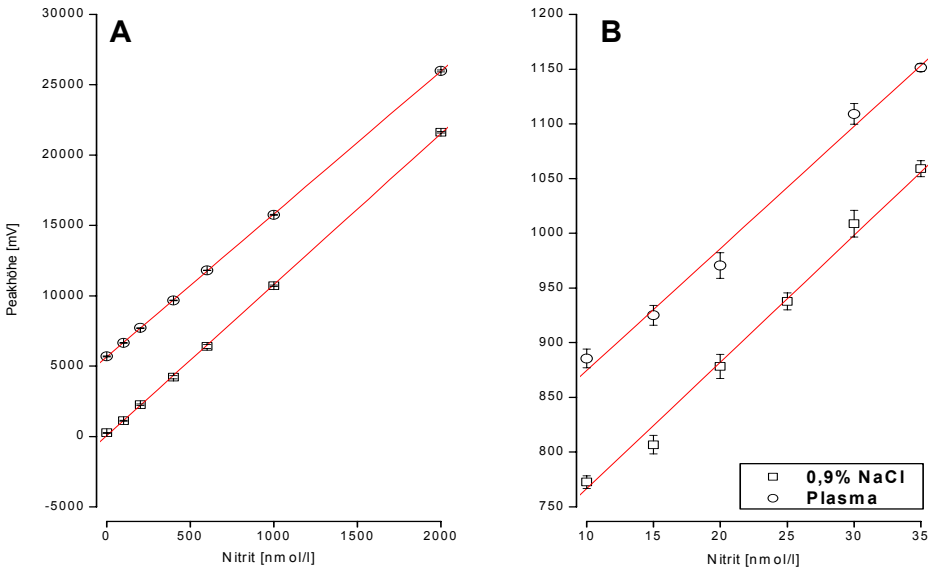

Abbildung 9. Die Linearität und minimale Auflösung der Nitritmesssung über FIA ohne SAV. (A) Die Messung ist linear im Bereich von 0-20 µmol/l in wässriger und plasmatischer Lösung. (B) Die minimale Auflösung liegt bei 5 nmol/l. Das Ergebnis ist als MW ± SE der Dreifachbestimmung dargestellt.

Tabelle 4. Methodencharakteristika der Nitritbestimmung über FIA ohne SAV

Matrizes	Plasma (1:5 verdünnt) und wässrige Lösung
Linearität [µmol/l]	0 - 20
Korrelationskoeffizient	> 0,997
Sensitivität [nmol/l]	10
Minimale Auflösung [nmol/l]	5
Variationskoeffizient [%]	0 - 6
Wiederfindungsrate [%]	100 ± 10
Probenvolumen pro Einfachbestimmung [µl]	120
Analysenzeit pro Einfachbestimmung [min]	2,5

Durch diese Modifikation konnte die Analysendauer im Vergleich zur Nitritmessung über FIA mit SAV um 50% verkürzt und das Probenvolumen um 80% verringert werden. Die modifizierte FIA-Messung wurde mit der Messung über die FIA mit dem SAV validiert. Hierbei wurden 6 Plasmaproben über FIA sowohl mit dem SAV als auch ohne das SAV gemessen. Die Nitritwiederfindungsrate der einzelnen Analysen liegt bei 94 ± 1% (MW ± SE). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 10 dargestellt.

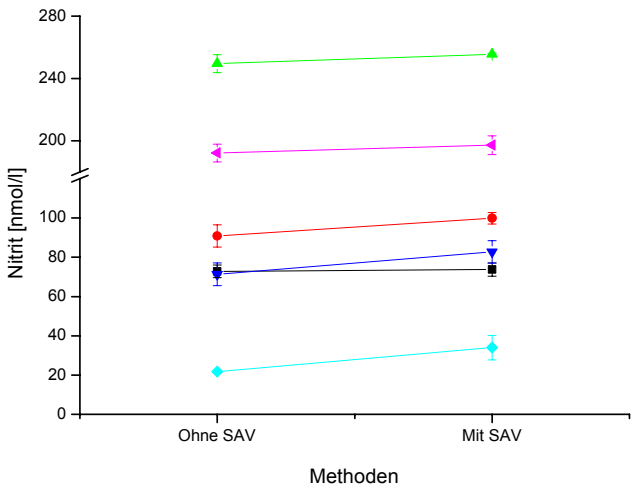

Abbildung 10. Vergleich der Nitritmessung über FIA ohne und mit SAV. Nitrit wurde in Plasmaproben (n=6) mittels FIA mit und ohne SAV gemessen. Das Ergebnis ist als MW ± SE (der Dreifachbestimmung) dargestellt.

3.3. Etablierung neuer Methoden zur sensitiven Nitratmessung

Zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Einerseits wurde Nitrat enzymatisch und andererseits chemisch reduziert. Die anschließende Nitritanalyse basiert auf der oben beschriebenen modifizierten Methode (siehe Abschnitt

3.2.). Die in dieser Arbeit etablierten Methoden sollten jedoch mit den vorhandenen Methoden verglichen werden.

3.3.1. Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion zum Nitrit mit anschließender Bestimmung durch die Fluss-Injektions-Analyse (NR-FIA)

Durch die Kombination von Nitrat-Reduktion über die NR und anschließender Nitritmessung über die FIA kann die Nitratkonzentration im nanomolaren Bereich gemessen werden. Die Linearität der modifizierten Nitratbestimmung liegt bei 0-30 µmol/l Nitrat. Die Sensitivität dieser Messmethode beträgt 100 nmol/l bei einer minimalen Auflösung von 100 nmol/l in wässriger und plasmatischer Lösung (siehe Abbildung 11). Die Messung dauert 3 min und die Kosten betragen 1,28 € pro Einfachbestimmung. Weitere Eigenschaften sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

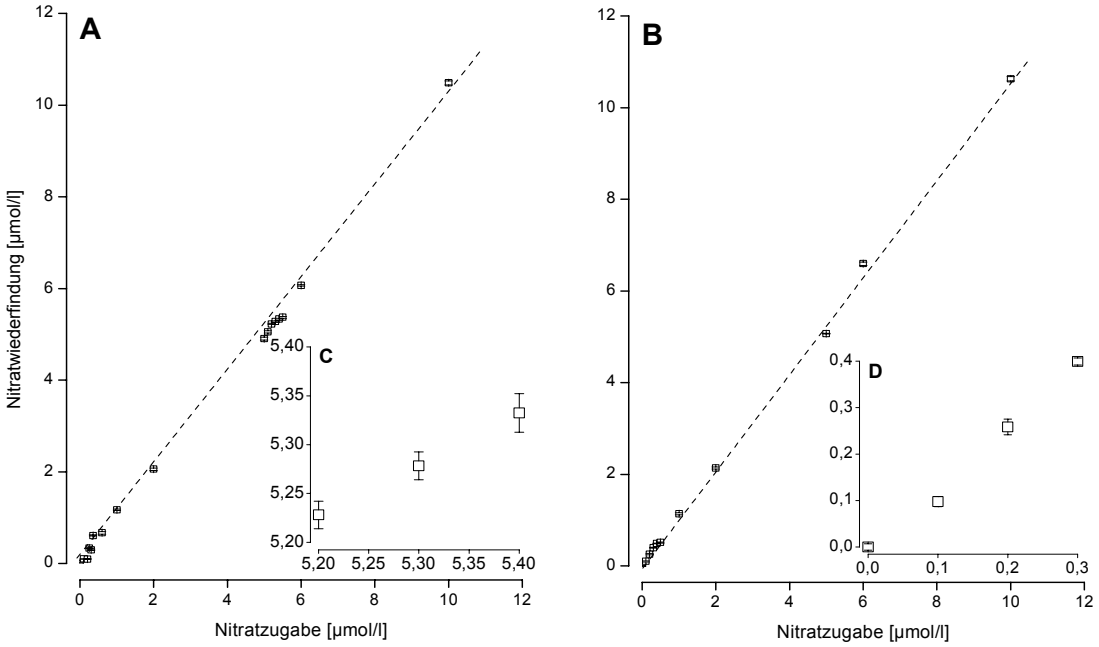

Abbildung 11. Linearität der Nitratmessung im Konzentrationsbereich von 0-12 µmol/l in wässrigen Proben (A) und Plasmaproben (B) gemessen über die NR-FIA. Die minimale Auflösung der Nitratmessung liegt bei 100 nmol/l sowohl in wässrigen Proben (C) als auch in Plasmaproben (D). Die Werte sind als MW ± SE dargestellt.

Tabelle 5. Methodeneigenschaften der NR-FIA.

Parameter	Plasma (1:5 verdünnt) und wässrige Lösung
Linearität [µmol/l]	0 - 30
Korrelationskoeffizient	> 0,997
Sensitivität [nmol/l]	100
Minimale Auflösung [nmol/l]	100
Variationskoeffizient [%]	0 - 5
Wiederfindungsrate [%]	100 ± 7
Analysenzeit pro Einfachbestimmung [min]	3
Probenvolumen pro Einfachbestimmung [µl]	90
Kosten pro Einfachbestimmung [€]	1,28

3.3.2. Nitratanalyse durch chemische Reduktion zu Nitrit mit anschließender Messung von Nitrit mittels der Fluss-Injektions-Analyse (VCl-FIA)

Eine Alternative zur enzymatischen Reduktion von Nitrat zu Nitrit stellt eine chemische Reduktion von Nitrat über VCl_3 dar.

a) Modifikation der Reagenzkomposition

Die Konzentrierung der Griess-Lösung und somit die Veränderung der Reagenzkomposition führte zu einer Verbesserung des Variationskoeffizienten der Analyse. Die detektierte Absorption unter Zugabe der gleichen Nitratkonzentration ist bei Verwendung der neuen im Vergleich zur ursprünglichen Rezeptur erhöht (Steigung der Regressionsgeraden) (siehe Abbildung 12). Durch diese Modifikation erreicht die Methode in wässriger und plasmatischer Lösung eine Sensitivität von 0,5 µmol/l und eine minimale Auflösung von 0,5 µmol/l. Die Messung ist linear im Bereich von 0-150 µmol/l (siehe Abbildung 13). Diese Messmethode ist zur Bestimmung der Nitratkonzentration z.B. in Urinproben geeignet.

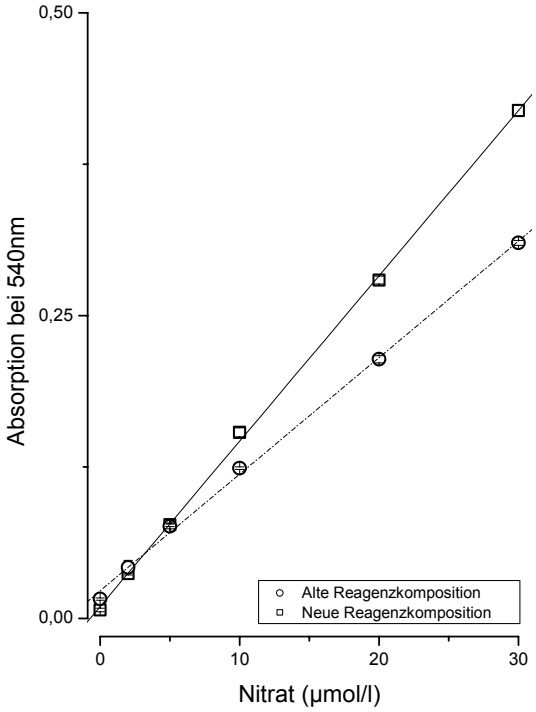

Abbildung 12. Vergleich der Rezeptur zwischen der nicht konzentrierten (alte Reagenzkomposition) und konzentrierten Griess-Lösung (neue Reagenzkomposition). Nitrat wurde durch Vanadium(III)-Chlorid (VCl_3) zu Nitrit reduziert. Im Anschluss wurde das Nitrit über die nicht konzentrierte Griess-Lösung bzw. die konzentrierte Griess-Lösung gemessen. Die Konzentrierung der Lösung und die damit mögliche Vergrößerung des Probenvolumens erhöht die Steigung der Absorption. Dadurch wurde die minimale Auflösung der Messung verbessert.

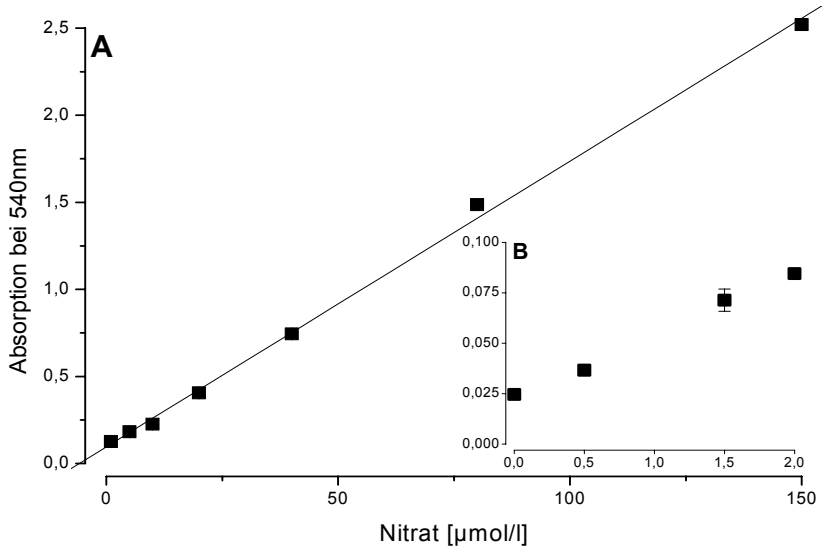

Abbildung 13. Die Linearität und minimale Auflösung der Nitratmessung über VCl_3-Griess mittels eines Plattenspektrophotometers. Die Messung ist linear von 0 - 150 µmol/l (A). Die minimale Auflösung liegt bei 500 nmol/l (B). Das Ergebnis ist als MW ± SE einer dreifachen Bestimmung dargestellt.

b) Kinetik der Nitratreduktion via VCl_3 und Automatisierung der Messung durch Fluss-Injektions-Analyse

Das Ziel des Versuchs war es die Kinetik der Nitratreduktion mittels VCl_3 zu ermitteln, um eine vollständige Reduktion zu bestimmen. Zwischen 90-100 min ist die Reduktion abgeschlossen (siehe Abbildung 14).

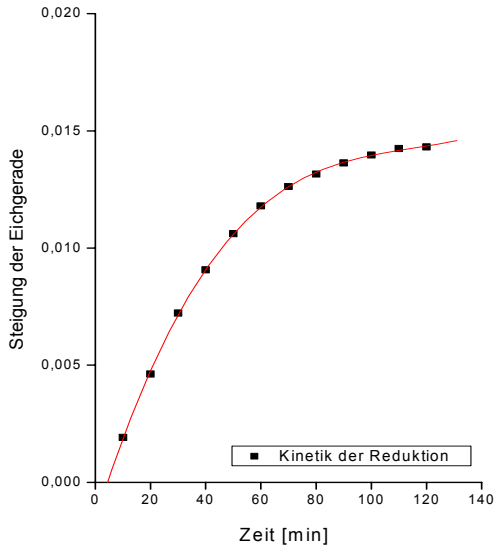

Abbildung 14. Kinetik der Nitratreduktion via VCl_3. Um die Reduktionskapazität von VCl_3 zu bestimmen, wurde Nitrat für 120 min mit VCl_3 inkubiert. Alle 10 min wurde die Reduktionskapazität von VCl_3 bestimmt. Nach 90 min war das Maximum der Reduktionkapazität der VCl_3 für Nitrat erreicht.

Um sowohl die Sensitivität als auch die Punkt-zu-Punkt-Diskriminierung zu erhöhen und gleichzeitig den Vorgang zu automatisieren, wurde die Nitratreduktion über VCl_3 mit der Nitritmessung mittels FIA kombiniert. Durch diese Methode kann Nitrat im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 20 µmol/l sowohl in wässriger als auch in plasmatischer Lösung linear gemessen werden. Die Sensitivität liegt bei 500 nmol/l und die minimale Auflösung bei 200 nmol/l. (siehe Abbildung 15). Eine Einfachbestimmung dauert 2 min. Die Kosten pro Einfachbestimmung betragen 0,20 €. Weitere Eigenschaften der VCl-FIA sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

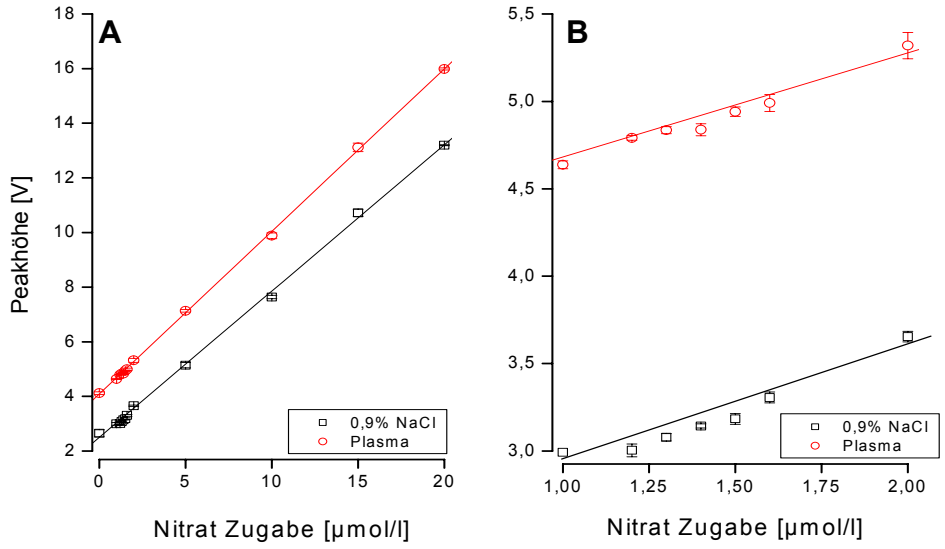

Abbildung 15. Die Linearität und minimale Auflösung der Nitratmessung über VCl_3-FIA. In wässriger und plasmatischer Lösung ist die Messung 0-20 µmol/l linear (A). Die minimale Auflösung liegt bei 200 nmol/l in wässriger als auch in plasmatischer Lösung (B). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt.

Tabelle 6. Methodencharakteristika der VCl-FIA

Matrizes	Plasma (1:5 verdünnt) und wässrige Lösung
Linearität [µmol/l]	0 - 25
Korrelationskoeffizient	> 0,997
Sensitivität [nmol/l]	200
Minimale Auflösung [nmol/l]	200
Variationskoeffizient [%]	0 - 7
Wiederfindungsrate [%]	100 ± 10
Analysendauer pro Einfachbestimmung [min]	2
Probenvolumen pro Einfachbestimmung [µl]	50
Kosten pro Einfachbestimmung [€]	0,20

3.3.3. Validierung der neu etablierten Methoden

Die neu etablierten Methoden wurden mit den bereits etablierten Verfahren zur Nitratanalyse, der UV-HPLC und Cayman Kit, verglichen.

Zunächst wurde die Nitratmessung in wässriger und plasmatischer Lösung über NR-FIA, UV-HPLC und Cayman Kit verglichen. Die Wiederfindungsrate aller Methoden liegt bei ± 100%. (siehe Abbildung 16).

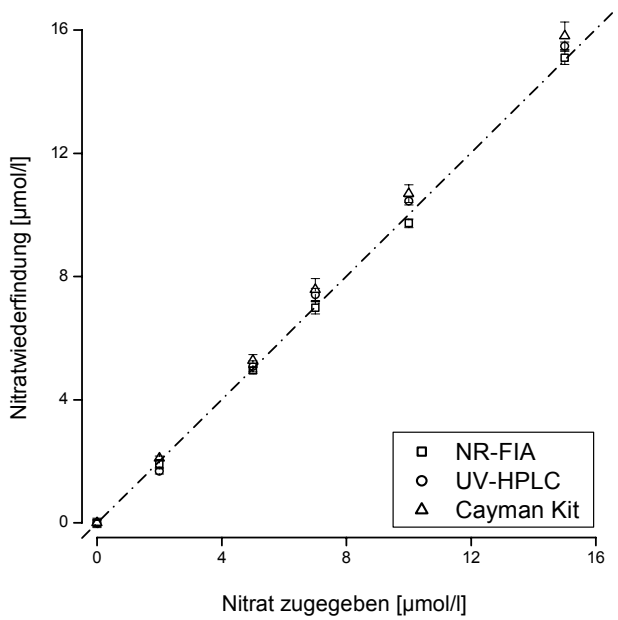

Abbildung 16. Vergleich der Nitratwiederfindung in wässriger und plasmatischer Lösung durch NR-FIA (□), UV-HPLC (◯), und Cayman Kit (Δ). Nitrat wurde in Endkonzentrationen von 0 – 15 µmol/l zugegeben. Die Wiederfindungsrate liegt bei allen Methoden um 100 ± 10%. Die Werte sind als MW ± SE dargestellt.

Nach der Etablierung der VCl-FIA wurden die neu etablierten Methoden validiert. Die Nitratkonzentration in humanem Plasma (n=14) wurde parallel über VCl-FIA und NR-FIA gemessen. Die Nitratwiederfindungsrate mittels der VCl_3-FIA beträgt 98 ± 1% (MW ± SE, n=14) im Vergleich zur Wiederfindung via NR-FIA (siehe Abbildung 17).

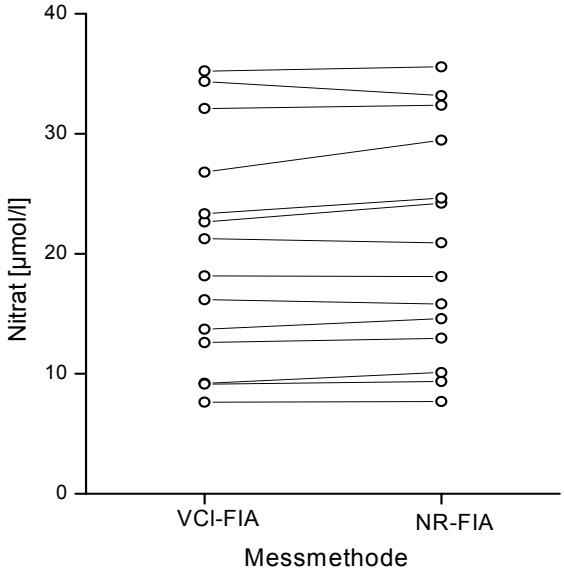

Abbildung 17. Vergleich der Nitratmessung über die VCl_3-FIA und NR-FIA. Nitrat wurde in mehreren Plasmaproben (n=14) über VCl_3-FIA und über NR-FIA gemessen. Die Wiederfindungsrate über VCl-FIA beträgt 98 ± 1% (MW ± SE) im Vergleich zur Wiederfindung über NR-FIA.

3.4. Optimierung der Probenaufarbeitung zur anschließenden Nitratanalyse

3.4.1. Probenaufarbeitung zur Nitratanalyse via NR-FIA und VCl-FIA

Das Ziel dieser Untersuchung war es, die Bestimmung aller NO-Produkte aus nur einer Blutprobe zu ermöglichen, und so die Anwendung der Analyse bei aufwendigen experimentellen Protokollen oder großen klinischen Studien zur Analyse des L-Arginin-NO-Stoffwechsels stark zu vereinfachen. Zur Bestimmung von gebundenem NO im Plasma ist die Zugabe von NEM und EDTA zur Probe notwendig. Es wurde untersucht, ob sich die Probenaufarbeitung durch Zugabe von NEM und EDTA auch zur Nitratanalyse eignet. Hierzu wurden Untersuchungen zur Nitratbestimmung durch verschiedene Methoden bei unterschiedlicher Probenaufarbeitung, durch Zugabe von Heparin bzw. NEM und EDTA, durchgeführt. Die Nitratmessung via UV-HPLC interagiert mit diesem Analyseverfahren. Die minimale Auflösung der Nitrat-Messung über die UV-HPLC verschlechterte sich aufgrund des großen NEM-Peaks, der unmittelbar neben dem Nitrat-Peak lag (siehe Abbildung 18). Darüber hinaus war zu klären, ob NEM mit den neuen Messmethoden, NR-FIA und VCl-FIA, interagiert. Das Plasma wurde mit und ohne NEM-Zusatz aufgearbeitet und anschließend die Nitratkonzentration über NR-FIA bzw. VCl_3-FIA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

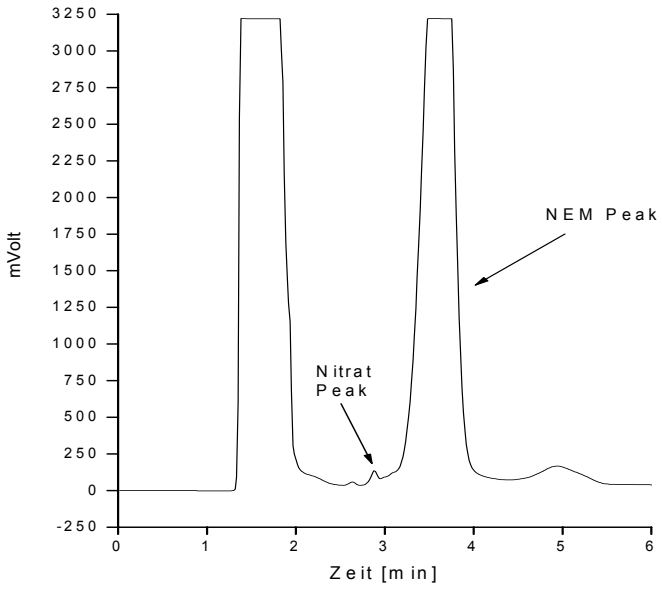

Abbildung 18. Original-Chromatogram einer Messung von Nitrat aus Plasma, das mit NEM versetzt wurde, detektiert über die UV-HPLC. Der große, durch NEM verursachte Peak von NEM lag in unmittelbarer Nähe zum Nitrat-Peak. Somit verschlechterte sich die minimale Auflösung der Messung von Nitrat in Anwesenheit von NEM über die UV-HPLC.

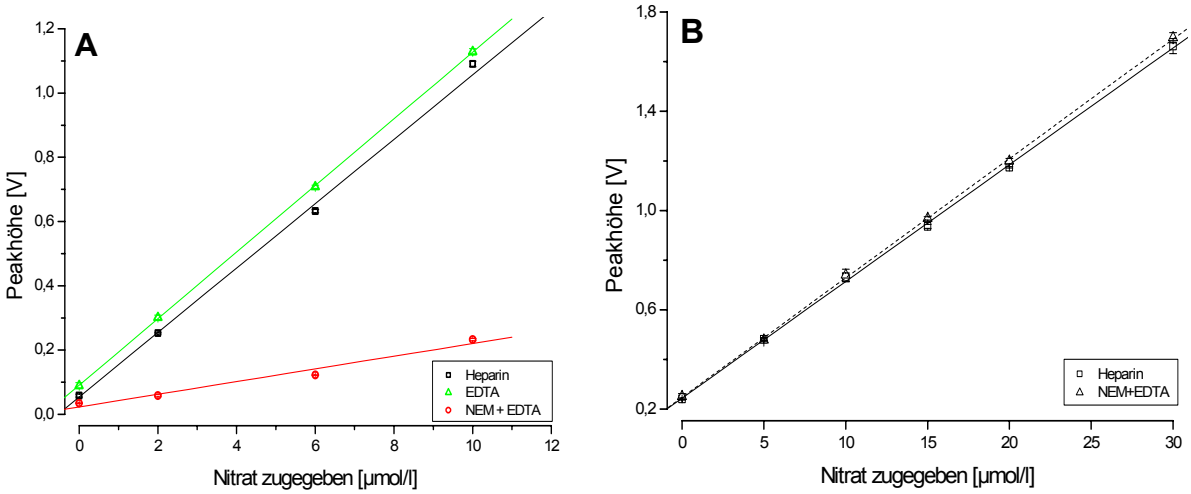

Abbildung 19. Vergleich der Nitratmessung über NR-FIA und VCl-FIA von Proben, die mit Heparin bzw. NEM und EDTA versetzt wurden. (A) Einfluss von NEM auf die NR-FIA. NEM führt zu falsch negativen Werten. Daher kann NEM-haltige Lösung für die Nitratmessung mittels NR-FIA nicht eingesetzt werden. (B) Nitratmessung von NEM-EDTA-haltigen-Proben im Vergleich zur Messung von Heparin-haltigen Proben über VCl-FIA. Die Zugabe von NEM hatte keinen Einfluss auf diese Messung. Die Werte sind als MW ± SE dargestellt.

NEM inhibiert wahrscheinlich die Aktivität der NR, da die Reduktion von Nitrat zu Nitrit verhindert wird. Daher können die NEM-haltigen Proben weder zur Nitratmessung über NR-FIA noch zur Messung mittels UV-HPLC genutzt werden. Im Gegensatz dazu war die durch die VCl-FIA ermittelte Nitratkonzentration unabhängig von der Aufarbeitung und konnte in den Proben mit NEM bestimmt werden.

3.4.2. Lagerung der Proben

a) Lagerung von Nitrit in wässrigen und proteinhaltigen Proben

Die Nitritwiederfindungsrate nach Lagerung für 2 Tage bei -80°C ist 79 ± 6% im Ultrafiltrat, 72 ± 10% in Albumin-haltiger Lösung, und 92 ± 8% in Phosphatpuffer (siehe Abbildung 20). Nach der Lagerung von unbehandeltem Plasma hat Nitrit eine maximale Wiederfindungsrate (100,0 ± 10%).

Nach Lagerung bei -20°C sind die Wiederfindungsraten von Nitrit im Phosphatpuffer, im Ultrafiltrat und in Albumin-haltiger Lösung geringer als die im Plasma (86 ± 5%, bzw. 78 ± 11%, bzw. 85 ± 15%). Die Nitritwiederfindung war im Plasma am höchsten (105 ± 8%). Die Wiederfindungsrate von Nitrit in allen biologischen Matrizes war höher nach Lagerung bei -80°C mit vorherigem Schockgefrieren (93 ± 3% im Phosphatpuffer, 86 ± 5% im Ultrafiltrat, 90 ± 5% in Albumin-haltiger Lösung und 109 ± 12% im Plasma). Die absoluten Werte der Nitritkonzentration der Proben sind als Anhang aufgelistet.

Die Nitritwiederfindungsraten im Plasma im mikromolaren Bereich sind mit der im submikromolaren Bereich vergleichbar.

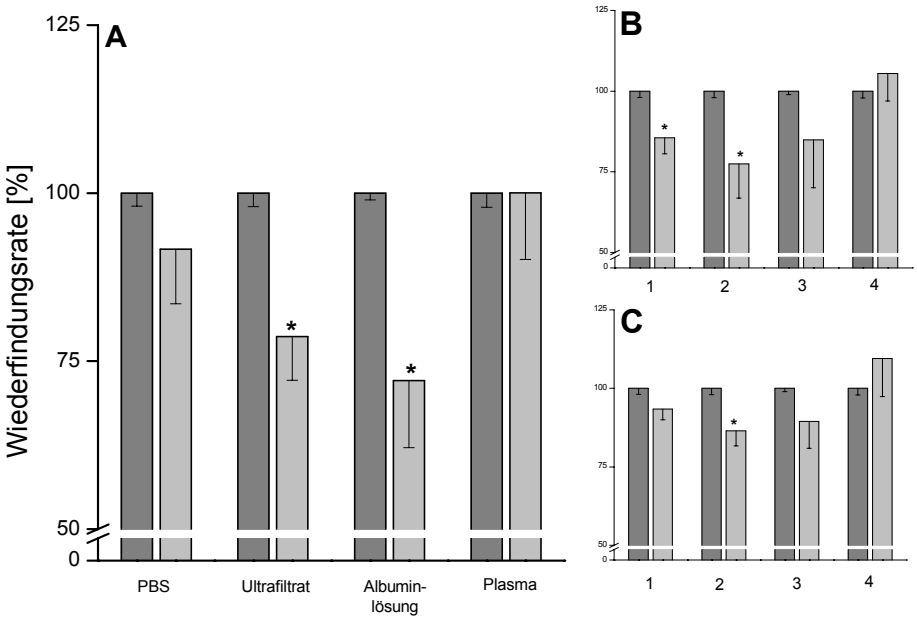

Abbildung 20. Nitritwiederfindungsrate nach Lagerung. Nitrit wurde im submikromolaren Bereich (0, 200, 500 und 1000 nmol/l) in Phosphatpuffer (1), Ultrafiltrat (2), Albuminlösung (3) und Plasma (4) zugegeben. Die Proben wurden bei -80°C (A), bei -20°C (B) und bei -80°C mit vorherigem Schockgefrieren (C) gelagert. Die Ergebnisse sind als Wiederfindungsraten der Nitritkonzentration nach 2-tägiger Lagerung (□) im Vergleich zur Nitritkonzentration vor Lagerung (100%) (■) dargestellt. Die Nitritwiederfindungsrate im Phosphatpuffer, Ultrafiltrat und Albuminlösung ist niedriger als die im Plasma. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler (n=3-4) dargestellt. (* = $p<0,05$)

b) Lagerung von Nitrat in wässrigen und proteinhaltigen Lösungen

Im Gegensatz dazu sind die Nitratwiederfindungsraten nach Lagerung über 2 Tage bei -80°C in wässrigen Lösungen, dem Phosphatpuffer und sowie dem Ultrafiltrat höher (104 ± 6% bzw. 96 ± 2%) als in proteinhaltiger Lösung. Die Wiederfindungsrate von Nitrat in Albuminlösung und im Plasma ist niedriger (86 ± 5% bzw. 90 ± 1%). Nach Lagerung bei -20°C sind die Wiederfindungsraten in Phosphatpuffer, Ultrafiltrat, Albumin und im Plasma folgende: 99 ± 2%, 94 ± 3 %, 79 ± 7% und 90 ± 1%. Die Ergebnisse bei -80°C mit vorherigem Schockgefrieren sind vergleichbar (siehe Abbildung 21). Die absoluten Werte der Nitratkonzentration der Proben sind als Anhang aufgelistet.

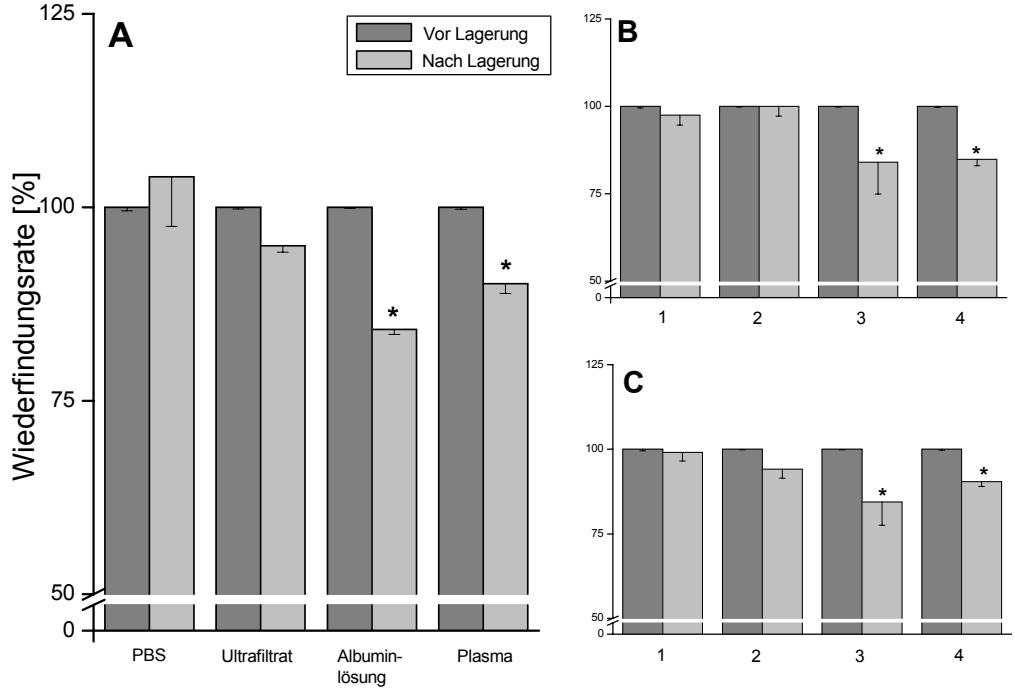

Abbildung 21. Nitratwiederfindungsrate nach der Lagerung. Nitrat wurde in PBS (1), Ultrafiltrat (2), Albumin-Lösung (3) oder Plasma (4) hinzugefügt. Die Proben wurden entweder bei -80°C (A), -20°C (B) und bei -80°C mit vorherigen Schockgefrieren über flüssigem Stickstoff (C) gelagert. Die Ergebnisse sind als Wiederfindungsrate [%] der Nitratkonzentration nach 2-tägiger Lagerung im Vergleich zur Konzentration vor der Lagerung dargestellt. Die Wiederfindungsrate bei proteinhaltigen Lösungen (Plasma) ist niedriger als die in wässrigen Lösungen (Phosphatpuffer und Ultrafiltrat). Die Ergebnisse werden als MW $\pm$ SE (n=3) gegeben. (* = $p<0,05$)

3.5. Anwendung der etablierten Methoden zur Nitratanalyse: Die Rolle von Nitrat im L-Arginin-Stoffwechselweg

3.5.1. Bestimmung der Nitratkonzentration in humanem Blut und Urin

Zur Anwendung der neu etablierten Methoden wurde im Rahmen der klinischen Studien Nitrat im Urin, im Plasma sowie in Erythrozyten in Menschen bestimmt. Hierbei wurde die basale Nitratkonzentration im Plasma und in Erythrozyten über NR-FIA bzw. VCl-FIA gemessen (siehe Tabelle 7 und 8).

Tabelle 7. Nitratkonzentration im Plasma und im Vollblut gemessen über NR-FIA bzw. VCl_3-FIA. Alle Proben wurden 3-fach bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt.

Proben	Nitratkonzentration [µmol/l] durch NR-FIA	Nitratkonzentration [µmol/l] durch VCl_3-FIA
Plasma	28,82 ± 1,16 (n=15)	27,21 ± 1,67 (n=15)
Vollblut	31,29 ± 3,97 (n=15)	32,76 ± 1,8 (n=15)

Durch Berechnung unter Berücksichtigung des Hämatokrits (siehe Formel im Abschnitt 2.5.1) ergibt die entsprechende Nitratkonzentration in Erythrozyten in folgender Tabelle.

Tabelle 8. Nitratkonzentration in Erythrozyten berechnet aus der Nitratkonzentration im Vollblut (Tabelle 7) unter Berücksichtigung des Hämatokrits. Die Werte sind als MW ± SE dargestellt.

Proben	Nitratkonzentration [µmol/l] durch NR-FIA	Nitratkonzentration [µmol/l] durch VCl_3-FIA
Erythrozyten	38,81 ± 2,34 (n=15)	36,18 ± 4,97 (n=15)

Im Urin von 12 gesunden Probanden wurde Nitrat über VCl_3-Griess mittels Plattenspektrophotometer gemessen. Die Konzentration liegt zwischen 400-1680 µmol/l (878 ± 139 µmol/l, MW ± SE).

3.5.2. Nitrat in Urin und Plasma von Wildtyp- und eNOS-knock-out-Mäusen sowie transgenen iNOS-überexprimierenden Mäusen

Zur Charakterisierung des Einflusses der NO-Bildung durch eNOS und iNOS auf die NO-Metabolite wurde Nitrat bestimmt. Nitrat wurde im Plasma von WT- und eNOS-KO-Mäusen sowie iNOS-TG-Mäusen und von WT-Mäusen nach NOS-Inhibition mit L-NAME vermessen.
Die Nitratkonzentration im Plasma wurde über eine herkömmliche UV-HPLC und die neu etablierte VCl-FIA bestimmt. Die Analyse durch die UV-HPLC zeigte keinen Unterschied der Nitratkonzentration zwischen WT- und eNOS-KO-Mäusen unter basalen Bedingungen und WT-Mäusen unter Inhibition über L-NAME (siehe Abbildung 22A). Durch die Bestimmung mittels VCl-FIA, der sensitiveren Messmethode, konnte ein signifikanter Unterschied der Nitratkonzentration im Plasma von WT-, eNOS-KO-, und iNOS-TG-Mäusen sowie von

eNOS-WT-Mäusen nach Zugabe von L-NAME gezeigt werden (p<0,05, n=4-6) (siehe Abbildung 22B).

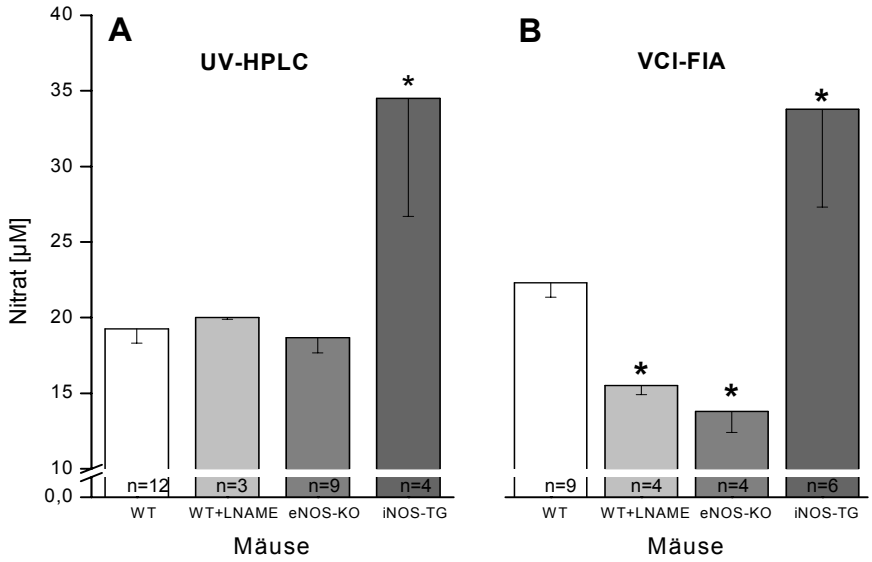

Abbildung 22. Bestimmung von Nitrat im Plasma zur Charakterisierung des Einflusses von NO-Bildung auf Nitrat. Nitratkonzentration im Plasma von WT-, eNOS-KO- und iNOS-TG-Mäusen und von WT-Mäusen nach NOS-Inhibition durch L-NAME (WT+L-NAME), gemessen mittels UV-HPLC (A) und VCl-FIA (B). Durch die Analyse über die UV-HPLC konnte kein signifikanter Unterschied der Nitratkonzentration im Plasma zwischen den WT-, WT+L-NAME-, und eNOS-KO-, mit Ausnahme der iNOS-TG-Mäusen, nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Nitratkonzentration im Plasma via VCl-FIA wurde ein Unterschied zwischen WT-, WT+L-NAME-, eNOS-KO- und iNOS-TG-Mäusen detektiert (p<0,05, n=4-6).

Im Urin war die Nitratkonzentration von iNOS-TG-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant höher (p<0,05, n=5-6). Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Nitratkonzentration im Urin von WT- und eNOS-KO-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 23).

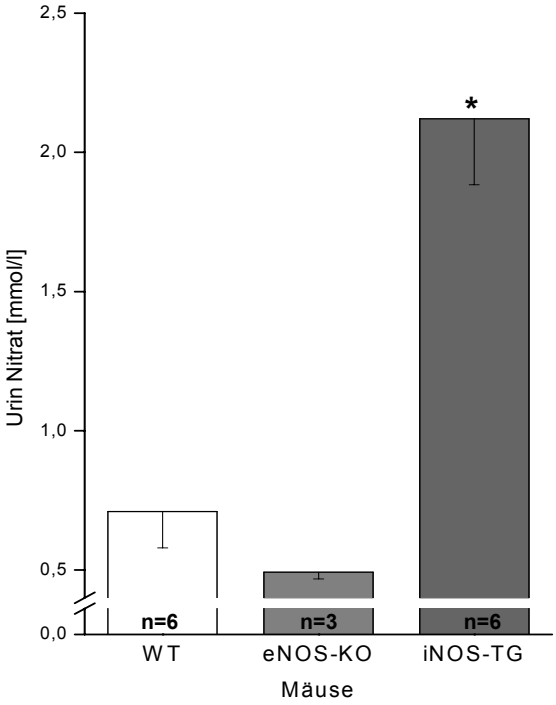

Abbildung 23. Analyse von Nitrat im Urin in Abhängigkeit des NO-Metabolismus. Nitratkonzentration im Urin von WT-, eNOS-KO- und iNOS-TG- Mäusen gemessen über VCl-Griess. Es konnte kein Unterschied zwischen der Nitratkonzentration im Urin von eNOS-KO- und WT-Mäusen festgestellt werden. Nach der Stimulation der iNOS konnte ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$, n=3-6) zwischen der Nitratkonzentration im Urin von iNOS-TG- und WT-Mäusen gezeigt werden.

3.5.3. Nitrat im zellulären Überstand bei *in vitro*-Untersuchungen zur hämatogenen Nitratbildung

Die Nitratkonzentration im zellulären Überstand, detektiert über UV-HPLC, zeigte nach der Inkubation mit L-Arginin, dem Substrat der NOS, keine signifikante Differenz im Vergleich zur Kontrolle. Die Zunahme der Nitratkonzentration [Δ%] nach der Inkubation mit L-Arginin (substratvermittelte Stimulation der NOS) im Vergleich zur Kontrolle war 1,6 ± 2,0%. Durch den Einsatz der hochsensitiven Methode über NR-FIA bzw. VCl-FIA konnte eine Nitratbildung detektiert werden. Eine signifikante Zunahme der Nitratkonzentration nach der Inkubation mit L-Arginin im Vergleich zur Kontrolle, detektiert über NR-FIA bzw. VCl-FIA, war 5,8 ± 0,3% bzw. 7,8 ± 0,7% (siehe Abbildung 24).

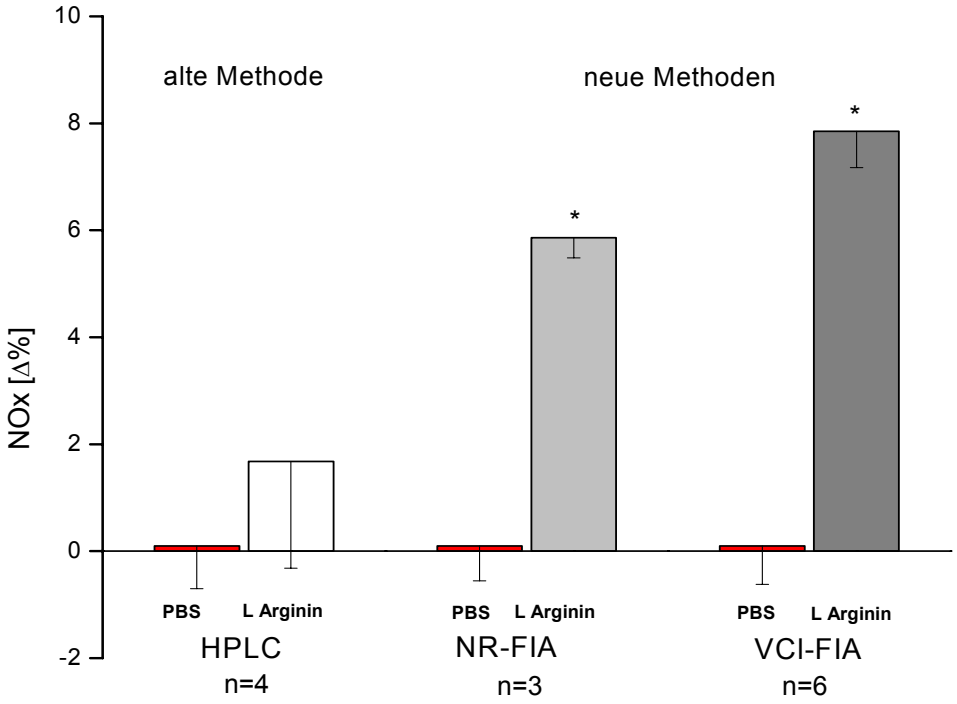

Abbildung 24. Bestimmung von Nitrat zur Charakterisierung der hämatogenen NO-Bildung. Nitratkonzentration im Plasma nach der Inkubation mit L-Arginin bzw. PBS (als Kontrolle) im Vollblut, gemessen durch drei unterschiedliche Messmethoden (UV-HPLC, NR-FIA bzw. VCl-FIA). Durch Anwendung von NR-FIA bzw. VCl-FIA konnte eine signifikante Zunahme der Nitratkonzentration nach der Inkubation von Vollblut mit L-Arginin gezeigt werden. Die Messmethode über UV-HPLC versäumte, die Zunahme von Nitratkonzentration nach Inkubation des Vollblutes mit L-Arginin zu zeigen. ($p<0,05$, n=3-6). Die Ergebnisse sind als MW $\pm$ SE dargestellt.

4. Diskussion

Die Ziele der vorliegenden Doktorarbeit waren 1. die Entwicklung valider, sensitiver, jedoch einfacher und kostengünstiger analytischer Verfahren zur Bestimmung von Nitrat, 2. die Entwicklung einer geeigneten Probenbehandlung zur Optimierung der Analyse und der Einbindung in die Routinediagnostik und 3. die Charakterisierung der Rolle von Nitrat im L-Arginin-NO-Stoffwechselweg.

In den folgenden Abschnitten werden die Charakteristika, Vor- und Nachteile der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methoden im Vergleich zu anderen Messmethoden diskutiert. Der Abschnitt 4.1. geht auf die Grundlagen und den Vergleich der vorhandenen und neu etablierten Meßmethoden, sowie auf die Entwicklung einer geeigneten Probenbehandlung und die Anwendung der Methoden zur Nitrat-Messung in unterschiedlichen Matrizes ein. Im Abschnitt 4.2. werden die Bedeutung von Nitrat im L-Arginin-NO-Stoffwechselweg und die zukünftigen Anwendungsmöglichkeiten der neuen Messmethoden zusammengefasst.

4.1. Sensitive Bestimmung von Nitrat in biologischen Proben

Durch die Etablierung der Messmethode und die Optimierung der Probenaufarbeitung kann die Qualität der Nitratanalyse verbessert werden. Eine sensitive, schnelle, einfache und automatisierte Methode zur Nitratmessung über VCl-FIA steht zur Verfügung. Diese Methode eignet sich für klinische Studien und experimentelle Studien mit zahlreichen Proben. Wenn eine hochsensitive Analyse nötig ist, kommt die NR-FIA zum Einsatz. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, die Proben zu lagern, um erst zu einem späteren Zeitpunkt zu messen bzw. um sie zu transportieren. Dies ermöglicht, die Rolle von Nitrat im NO-Metabolismus gründlicher zu untersuchen.

4.1.1. Analytische Verfahren zur sensitiven Messung von Nitrat

Die Messung von Nitrat über den kommerziellen kolorimetrischen Assay, Cayman Kit, zur Nitratbestimmung ist durch die mögliche Anwendung eines Plattenphotometers zeitsparend. Diese Methode ist allerdings unsensitiv, nicht valide und kostspielig. Mögliche Interaktionen der Probe mit dem Cayman Kit sind nicht auszuschließen. Eine weitere bisher vorhandene Alternative zur Nitratmessung ist die herkömmliche UV-HPLC. Diese Methode kann Nitrat 2-fach sensitiver messen als der Cayman Kit (siehe Kapitel 3.1.). Allerdings ist die Sensitivität weiterhin unzureichend, um die mögliche Modulation von Nitrat im NO-Metabolismus zu untersuchen, da die Konzentrationsveränderungen im submikromolaren Bereich zu erwarten sind. Die Messung über die UV-HPLC ist spezifisch und mögliche Interaktionen sind auszuschließen. Die Analysenzeit ist bei der HPLC-Methode jedoch enorm und 8-fach länger

als die des Cayman-Kits, dadurch sehr zeitaufwendig. Diese Methode ist ebenfalls kompliziert. Eine Nitratanalyse mit hohem Probenansatz, z.B. in klinischen Studien, ist daher über die UV-HPLC nahezu unmöglich. Die UV-HPLC eignet sich nur für detaillierte, kleine Untersuchungsserien und wurde im Rahmen dieser Arbeit nur zur Validierung der neuen etablierten Methoden herangezogen.

Die Nitritmessung über die Griess-Reaktion in Kombination mit der durchflussspektrophometrischen Detektion über FIA ermöglicht, Nitrit in nanomolarem Bereich zu messen. Die FIA-Methode zur sensitiven Nitritanalyse ist von Kleinbongard et al.[68] etabliert und durch den Vergleich mit zwei anderen Methoden validiert worden. Mit dieser Methode kann Nitrit sensitiv gemessen werden. Jedoch benötigt das im Rahmen der beschriebenen Analytik verwendete SAV ein großes Probenvolumen und eine längere Analysenzeit. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nitritanalytik über die FIA modifiziert, indem die Proben ohne SAV vermessen wurden (siehe Kapitel 3.2). Zur Validierung wurde die FIA ohne SAV mit der FIA mit SAV verglichen. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass Nitrit sowohl über die FIA mit SAV als auch über die FIA ohne SAV valide gemessen werden kann. Durch die Modifikation können bei vergleichbarer Sensitivität die Analysenzeiten und die Probenvolumina bis zu 80% reduziert werden. Um die möglicherweise auftretenden Interaktionen vor den Untersuchungen auszuschließen, werden die Substanzen mit extern zugeführtem Nitrit in aufsteigender Konzentration angereichert. Die Steigungsgeraden der Nitriteichreihen in unterschiedlichen, zu vergleichenden Matrizes werden verglichen und müssen gleich sein, um eine Interaktion auszuschließen. Ist dies nicht der Fall, sollte im weiteren Vorgehen die Quelle der Interaktion gesucht und ausgeschlossen werden. Interaktionen mit einigen Substanzen, z.B. Hämoglobin und Plasmaproteinen sind bekannt und können durch Ultrafiltration der Proben verhindert werden [68]. Diese modifizierte Nitritmessung (FIA ohne SAV) gilt als Basis für die neu entwickelte Nitratmessung.

Zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit wurden zwei neue, auf unterschiedlichen Reaktionswegen basierende Methoden verwendet. Einerseits wurde Nitrat enzymatisch (NR-FIA) und andererseits chemisch (VCl-FIA) reduziert. Die anschließende Nitritanalyse basiert auf der oben beschriebenen modifizierten Methode.

Zur enzymatischen Reduktion wurde das Protokoll von Granger [35] modifiziert. Durch Zusammensetzung und Konzentrierung der Basislösung konnte die Anzahl der Arbeitschritte verringert werden. Mit der anschließenden Nitritmessung über die FIA konnte die Sensitivität der Messung verbessert werden (siehe Kapitel 3.3.1). Die NR-FIA kann durch die Modifikationen Nitrat bis zu 5-fach schneller und preiswerter, aber vor allem bis zu 5-fach sensitiver im Vergleich zur Messung über die UV-HPLC bzw. dem Cayman Kit messen.

Die Verwendung von VCl_3 zur chemischen Reduktion von Nitrat basierte auf den Vorarbeiten von Miranda et al. [78]. Ursprünglich wurden die Proben mittels eines Plattenphotometers gemessen. Die Sensitivität der Messung liegt bei 1,6 µmol/l. Die Reagenzkomposition und die Inkubationszeit wurden modifiziert und die anschließende Nitritmessung über die FIA wurde durchgeführt, um eine höhere Sensitivität zu erreichen (siehe Kapitel 3.3.2.). Die modifizierte Methode VCl-FIA kann Nitrat bis zu 2-fach sensitiver und 10-fach schneller und vor allem 40-fach preiswerter bestimmen im Vergleich zur Messung über die UV-HPLC bzw. den Cayman Kit.

Zwei neue verschiedene Methoden zur Nitratmessung wurden etabliert. Diese Methoden sind valide, sensitiv, kostengünstig, schnell und automatisiert. Deshalb sind sie in den meisten Laboratorien anwendbar. Jede Methode hat ihre eigenen Vor- und Nachteile. Die Messung über NR-FIA ist sensitiver, jedoch kosten- und arbeitsaufwändiger als die VCl-FIA (siehe 3.3.1.). Diese Messung interagiert allerdings mit NEM (siehe 3.4.1.). Die Messung über VCl-FIA ist einfacher, schneller und kostengünstiger als die NR-FIA (siehe 3.3.2.). Wird eine hohe Sensitivität der Messung gefordert, ist die Messung über NR-FIA vorzuziehen. Sollen zahlreiche Proben gemessen werden, oder sind die Proben mit NEM versetzt, ist die Messung über VCl-FIA die bessere Alternative.

In der Literatur werden ebenfalls Methoden zur Nitratmessung mit anschließender Nitritmessung über die FIA von Yokoi et al. [117] und von Pratt et al. [90] etabliert. Zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit kam eine Cadmiumsäule zum Einsatz. Die Methode von Yokoi et al. hat eine Sensitivität von 500 nmol/l, 5-fach niedriger als die etablierte Methode in der vorliegenden Arbeit. Die Methode von Pratt et al. ist durch Anwendung der Multikanal-Injektions-Analyse sensitiver als die NR-FIA und VCl-FIA. Allerdings wurde zum Aufbau der Anlage ein hoch komplexes System aus mehreren Pumpen, Detektoren und Reaktionskapillaren verwendet. Dadurch entsteht ein größerer Arbeitsaufwand und wesentlich höhere Kosten. Beide Methoden wurden nicht mit den etablierten Methoden verglichen. Da die Nitratkonzentration in anderen Matrizes bestimmt wurde, ist es zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich die Validität der zitierten Analytiken einzuschätzen.

4.1.2. Entwicklung der Probenbehandlung und Probenlagerung

Um unterschiedliche NO-Addukte aus einer Probe zu bestimmen, wurde die Probenaufarbeitung mit dem Ziel ein einheitliches Protokoll zu etablieren untersucht. Die Zugabe von NEM und EDTA ist zur Analyse von gebundenem NO notwendig, um freie SH-Gruppen zu alkylieren und somit Transnitrosierungsprozesse und Thiolat und Askorbat-vermittelte Degradation von Nitrosothiolen zu vermeiden [94]. NEM und EDTA interagieren jedoch bei der Analyse von Nitrat über UV-HPLC und Cayman Kit. Somit war es bisher

notwendig, Proben, die mit diesen Verfahren bestimmt werden sollen, separat zu entnehmen. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Zugabe von NEM jedoch nicht die VCl-FIA beeinflusst(siehe Kapitel 3.4.1). Für die Nitratanalyse über VCl-FIA müssen die Proben somit nicht separat entnommen werden. Dadurch ist dieses Verfahren in z.B. klinischen Studien anwendbar, da nur wenig Probenvolumen und Arbeitsschritte benötigt und die Kontaminationsgefahr geringer ist.

Um die Nitrit/Nitratanalytik zu vereinfachen, ist es notwendig, die Proben lagern zu können. Damit Proben ohne signifikante Veränderung der Konzentration gelagert werden können, mussten Untersuchungen zur Haltbarkeit durchgeführt werden. Interessant könnte die Lagerungsmöglichkeit von Nitrit/Nitrat-haltigen Proben für Multicenterstudien sein.

Wie oben beschrieben (siehe Kapitel 1.3.), könnte die Lagerung der Proben zum Abbau von Nitrit und Nitrat führen. Daiber et al. zeigten, dass Nitrit in biologischen Matrizes während des Einfrierprozesses transnitrosyliert wird [19]. In eigenen Vorarbeiten [59] wurde festgestellt, dass Nitrit in ultrafiltriertem Plasma während der Lagerung abgebaut wird (siehe Kapitel 3.4.2.). Die Wiederfindungsrate von Nitrat nach Lagerung der Proben liegt trotz seiner Stabilität, nach Untersuchungen von Moshage et al. [83] und Bories et al. [11], bei 88%.

Ob der Nitratabbau signifikant ist, konnte über die bisher vorhandenen Methoden durch die unzureichende Sensitivität der verwendeten Methoden nicht nachgewiesen werden. Die Veränderungen der Nitratkonzentration während der Lagerung ist allerdings durch die neuen im Rahmen dieser Arbeit etablierten, sensitiven Methoden zu detektieren:

Unsere Ergebnisse zeigten, dass Nitrit sowohl im wässrigen Puffer als auch in Albumin-haltiger Lösung während der Lagerung abgebaut wird (siehe Kapitel 3.4.1.a). Lagert man Nitrit im wässrigen Puffer bzw. in Albumin-haltiger Lösung, ist die Nitritkonzentration um 9-32% verringert. Takenaka et al. [106;107] und Betterton et al. [7] konnten nachweisen, dass Nitrit durch das Einfrieren in wässriger Lösung zu Nitrat oxidiert wird. Diese Autoxidation-Reaktion ist während des Einfrierprozesses schneller als die analoge Reaktion bei Raumtemperatur. Dies ist dadurch zu erklären, dass der pH-Wert während des Einfrierens sinkt und Nitrit im Sauren zur Salpetrigen Säure umgewandelt wird. Salpetrige Säure wird in Anwesenheit von gelöstem Sauerstoff zu Nitrat oxidiert. Enthält die Lösung Salze, z.B. Natriumchlorid oder Kaliumchlorid, wird der Nitritabbau vermindert [7]. Nitrit im Plasma wird langsamer abgebaut als in den anderen untersuchten Matrizes. Plasma enthält zahlreiche Proteine, Phosphat, Bicarbonat und Elektrolyte, die zur Stabilisierung des pH-Wertes führen und damit zu der Stabilisierung des Nitrits während der Lagerung.

Im Gegensatz zu Nitrit kann Nitrat optimal als Ultrafiltrat gelagert werden. Lagert man Nitrat in proteinhaltiger Lösung, ist die Nitratkonzentration um 9-22% verringert. Wird Nitrat in wässriger Lösung, z.B. im Ultrafiltrat oder im Puffer gelagert, ist die Nitratkonzentration bis zu 7% abgebaut (siehe Kapitel 3.4.2.b).

Indem man die Proben als reines Plasma bzw. als Ultrafiltrat einfriert, hat man die Möglichkeit, Plasma ohne signifikante Veränderung der Nitrit- und Nitratkonzentration zu lagern. Dieser Befund stellt eine Erleichterung für zahlreiche experimentelle und klinische Studien im Rahmen des NO-Stoffwechsels dar.

4.1.3. Bestimmung der Nitratkonzentration im humanen Blut und Urin

Die neue sensitive Methode zur Nitratmessung wurde angewendet um Nitrat in biologischen Matrizes zu messen. Hierfür wurde Nitrat im humanen Plasma, in Erythrozyten und im Urin unter physiologischen Bedingungen mittels NR-FIA und VCl-FIA untersucht. Die mittels NR-FIA und VCl-FIA gemessenen Werte sind vergleichbar (siehe Kapitel 3.5.1). Die Nitratkonzentration im humanen Plasma liegt bei 28 µmol/l (18 – 40 µmol/l). Die Nitratkonzentration in Erythrozyten war um 30-40% höher als die im Plasma. Die gemessenen Basalwerte von Nitrat im Plasma sind mit den Werten von anderen Untersuchungen durch verschiedene Methoden [32;36;39;88] vergleichbar. Im Urin lag die Nitratkonzentration im sub- bis millimomolarem Bereich. Die Werte sind ebenfalls mit den Konzentrationen anderer Untersuchungen [30;39;84] vergleichbar.
Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die neu etablierten Methoden Nitrat in biologischen Matrizes valide messen und die ermittelten Konzentrationen, innerhalb der hier verwendeten Methoden und im Vergleich mit denen in der Literatur beschriebenen, vergleichbar sind.

4.2. Nitrat zur Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

Die erste Voraussetzung, die Etablierung einer sensitiven Methode zur Nitratmessung, zur Untersuchung der Rolle von Nitrat als Marker des NO-Metabolismus, wurde geschaffen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle von Nitrat als Marker der NO-Bildung einschätzen zu können.

4.2.1. Nitrat in Abhängigkeit vom NO-Metabolismus *in vivo*

Bisher ist bekannt, dass Nitrat ein Marker für die iNOS-Aktivität ist (siehe Kapitel 1.2.). Nach der Überexprimierung der iNOS-Aktivität bei iNOS-TG-Mäusen konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Zunahme der Nitratkonzentration sowohl im Urin als auch im Plasma gemessen werden (siehe Kapitel 3.5.2.). Im Urin der TG-Tiere konnte eine um das 3-fache erhöhte Nitratkonzentration im Vergleich zu WT-Mäusen nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine bis 45% erhöhte Nitratkonzentration im Plasma der iNOS-TG-Mäuse detektiert werden. Durch die Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Methoden zuverlässig und sensitiv endogene Veränderungen der plasmatischen

Nitratkonzentration detektieren können und zur Quantifizierung der NO-Bildung in Abhängigkeit der iNOS-Aktivität verwendbar sind.

Nach der chronischen Inhibition (über 5 Tage) der eNOS in WT-Mäusen durch L-NAME konnte eine Abnahme der plasmatischen Nitratkonzentration (30%), gemessen über VCl-FIA, nachgewiesen werden. Bei den eNOS-KO-Mäusen konnte ebenfalls eine Nitratabnahme bis zu 38% im Vergleich zu den nicht behandelten WT-Mäusen detektiert werden (siehe 3.5.2.). Somit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass Nitrat durch eine sensitive Analyse chronische Veränderungen (Inhibition) der eNOS-Aktivität im Plasma widerspiegelt.

Die Bestimmung von Nitrat bei akuter Inhibition der eNOS *in vivo* ist allerdings nicht sinnvoll, da sich selbst unter Verwendung sensitiver Analytik keine Veränderung nachweisen lässt [62]. Dies kann durch die Nitrat-Halbwertszeit von 5-8 Stunden erklärt werden. Um die basale Nitratkonzentration zu senken, ist wahrscheinlich ein Zeitraum, der dem Vielfachen der Halbwertzeit entspricht, notwendig.

4.2.2. *In vitro*-Untersuchungen zur hämatogenen NO-Bildung

Im Gefäßsystem wird NO nicht ausschließlich von Endothelzellen synthetisiert, sondern ebenfalls von Blutzellen. In Leukozyten wird die iNOS durch Entzündungsprozesse stimuliert [97]. In einigen Studien wird eine NOS in Thrombozyten beschrieben, die bei der Thrombozytenaggregation hemmend eingreift. Die NOS des nicht stimulierten Thrombozyten wird jedoch kontrovers diskutiert [92]. Eine basale hämatogene NO-Produktion könnte eine physiologische Rolle bei der Regulation des basalen Gefäßtonus, sowie der Interaktion von Blutzellen spielen. Einige Untersuchungen deuteten auf das Vorkommen einer NOS innerhalb der Erythrozyten hin [15;51]. Die Aktivität dieser NOS wurde lange kontrovers diskutiert [53]. Kürzlich konnte die Aktivität der erythrozytären NOS nachgewiesen werden [61]. Die Aktivität wurde über einen Anstieg der Nitritkonzentration nachgewiesen. Das von Erythrozyten synthetisierte NO wurde hier lediglich als erhöhte Nitritkonzentration detektiert. Anzunehmen ist jedoch, dass das NO durch die Anwesenheit von Hämoglobin nicht nur zu Nitrit, sondern ebenfalls zu Nitrat abgebaut wird. Ein Anstieg der Nitratkonzentration durch Substratstimulation der erythrozytären NOS konnte jedoch durch die herkömmlichen Verfahren nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig durch die sensitive Nitratanalyse eine signifikante Zunahme der Nitratkonzentration nachgewiesen werden. Die Nitratzunahme lag bei 6-8% der basalen Werte. Berechnet man die absolute Zunahme der Nitratkonzentration, ist die Nitratbildung (93 pmol/ml/min) 4-fach höher als die erythrozytäre Nitritbildung (23 pmol/ml/min) [61].

In einem isolierten System, in dem exogene Einflüsse (siehe 1.2.) auf die Nitratkonzentration ausgeschlossen werden können, ist die Veränderung der Nitratkonzentration NOS-

spezifisch. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals mit der *in vitro*-Inkubation ein spezifischer Nitratkonzentrationsanstieg aufgrund akuter Veränderungen der erythrozytären NOS-Aktivität nachgewiesen werden.
Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Nitrat ein sensitiver Marker der NO-Bildung sein kann. Die Bestimmung von Nitrat in isolierten, Hämoglobin enthaltenden, Systemen sollte als weitere Möglichkeit der Quantifizierung des NO-Stoffwechsels genutzt werden.

4.3. Ausblick

Diagnostik: Durch die Etablierung einer automatisierten, einfachen, kostengünstigen und sensitiven Methode zur Bestimmung von Nitrat wurde die Voraussetzung geschaffen, den L-Arginin-NO-Stoffwechsel von Patienten in der klinischen Routine in Blut und Urin zu untersuchen. Entzündliche Prozesse im Körper führen zu einer Stimulation der induzierbaren NOS (iNOS), welche eine massive NO-Ausschüttung zur Folge hat. Die Nitratkonzentration in Blut und Urin eignet sich als Marker des Ausmaßes der iNOS-Aktivität und somit des Entzündungsgeschehens. Die Bestimmung von Nitrat in Urin und Blut könnte somit eine Abschätzung der Prognose von Sepsispatienten ermöglichen.
In der vorliegenden Arbeit konnte ein spezifischer Nitratkonzentrationsanstieg im Plasma aufgrund chronischer Veränderungen der NOS-Aktivität *in vivo* und akuter Veränderungen der hämatogenen NOS-Aktivität bei *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen werden. So erscheint es sinnvoll in der Zukunft, akute und langfristige Veränderungen der konstitutiven NOS-Aktivität nicht ausschließlich durch die Nitritkonzentration zu charakterisieren. Zusätzlich hierzu sollte die Nitratkonzentration durch ein sensitives Verfahren bestimmt werden. Die Einschätzung der NO-Bildung nur durch die Bestimmung von Nitrit und gebundenem NO, ohne Nitrat, führt sehr wahrscheinlich zu einer unvollständigen Charakterisierung des L-Arginin-Stoffwechselweges.
Therapie: Medikamentöse Interventionen in der Kardiologie zielen auf eine Verbesserung der Endothelfunktion ab. Die Verbesserung einer Endothelfunktion führt zu einer Erhöhung der NO-Synthese sowie NO-Verfügbarkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Nitrat im Plasma bei chronischer Inhibition der eNOS signifikant abnahm. Somit hätte die Nitratkonzentration im Plasma nicht nur eine diagnostische/prognostische Bedeutung, sondern könnte auch für eine langfristige Therapiekontrolle herangezogen werden.
Physiologie / Pathophysiologie: Bisher war bekannt, dass Nitrat ein inaktiver NO-Metabolit war. Vor kurzem wurde nachgewiesen, dass Nitrat durch die Photolyse bioaktiv sein könnte [20]. Somit könnte die Quantifizierung von Nitrat, als einer der bioaktiven NO-Metabolite, eine große Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Etablierung einer sensitiven Nitratanalyse zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels *in vitro* und *in vivo*

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine große Rolle bei physiologischen Regulationsmechanismen im Herz-Kreislaufsystem, im zentralen und peripheren Nervensystem und im Immunsystem. Nach der Synthese von NO kann NO rasch oxidativ zu Nitrit und Nitrat verstoffwechselt werden. Das intravaskuläre NO wird zum größten Teil über seine Reaktion mit Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert. Aufgrund des hohen basalen Nitratspiegels können geringere Veränderungen der NOS-Aktivität nur schwer als Veränderung der Nitratkonzentration detektiert werden. Nitrat spiegelt somit nicht sensitiv die Änderungen von NO-Bildung wieder. Die Bestimmung der Differenz scheiterte an der unzureichenden minimalen Auflösung bzw. an hohem Zeit- und Kostenaufwand der zur Verfügung stehenden Analysemethoden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von geeigneten Analyseverfahren zur Bestimmung des oxidativen Stoffwechselproduktes Nitrat in biologischen Matrizes zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt: 1. Die Etablierung valider, sensitiver, einfacher und kostengünstiger analytischer Verfahren, 2. die Entwicklung einer geeigneten Probenbehandlung, inklusive Lagerung, zur Optimierung der Analyse und der Einbindung in die Routinediagnostik, und 3. die biochemische Phänotypisierung von Nitrat in Abhängigkeit des NO-Metabolismus.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Analyseverfahren, NR-FIA und VCl-FIA, erlauben erstmals die gleichzeitig sensitive und automatisierte Bestimmung von Nitrat in biologischen Matrizes. Somit ist es möglich, zahlreiche Proben im Rahmen von z.B. klinischen Studien zu messen.
2. Eine geeignete Probenaufarbeitung zur simultanen Bestimmung unterschiedlicher NO-Addukte aus nur einer Blutprobe wurde entwickelt.
3. Nach Ausschluss artifizieller Abbaureaktionen der oxidativen NO-Metabolite, Nitrit und Nitrat, wurde die Lagerung der nitrit- und nitrathaltigen Proben ermöglicht.
4. Nitrat konnte über die neu etablierten Analyseverfahren bei Mäusen und Menschen in verschiedenen Matrizes bestimmt werden.
5. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Nitratkonzentration *in vivo* bei der Überexprimierung der iNOS und während chronischer Inhibition der eNOS signifikant verändert war. Ein spezifischer Anstieg der Nitratkonzentration konnte erstmalig *in vitro* aufgrund akuter Veränderungen der eNOS-Aktivität nachgewiesen werden.

Daraus ergibt sich die Schlußfolgerung, dass durch sensitive und valide Analyseverfahren von Nitrat die Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges *in vivo* und *in vitro* vervollständigt werden kann. Die Bestimmung von Nitrat könnte zur Diagnostik, als Marker der NO-Bildung, zur Prognostik, durch Abschätzung von Entzündungsprozessen, und für eine langfristige Therapiekontrolle herangezogen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10089-10093.
2. Bateman RM, Ellis CG, Freeman DJ. Optimization of nitric oxide chemiluminescence operating conditions for measurement of plasma nitrite and nitrate. *Clin Chem*. 2002;48:570-573.
3. Bateman RM, Ellis CG, Sharpe MD, Metha S, Freemann DJ. Effect of hemolyzed plasma on the batch measurement of nitrate by nitric oxide chemiluminescence. *Clin Chem*. 2001;47:1847-1851.
4. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:1620-1624.
5. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxinitrite. *Nature*. 1993;364:584.
6. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996;271:C1424-C1437.
7. Betterton EA, Anderson DJ. Autoxidation of N(III), S(IV), and other species in frozen solution - A possible pathway for enhanced chemical transformation in freezing systems. *J Atmospher Chem*. 2001;40:171-189.
8. Blitzer ML, Loh E, Roddy MA, Stamler JS, Creager MA. Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28(3):591-596.
9. Bonner FT, Stedman G. The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler J, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
10. Borcherding H, Leikefeld S, Frey C, Diekmann S, Steinrucke P. Enzymatic microtiter plate-based nitrate detection in environmental and medical analysis. *Anal Biochem*. 2000;282:1-9.
11. Bories PN, Scherman E, Dziedzic L. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by capillary electrophoresis. *Clin Biochem*. 1999;32:9-14.
12. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*. 1995;27:331-340.
13. Butler AR, Megson IL, Wright PG. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1425:168-176.
14. Castillo L, DeRojas TC, Chapman TE, Vogt J, Burke JF, Tannenbaum SR, Young VR. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:193-197.
15. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:57-61.
16. Cicinelli E, Ignarro LJ, Schonauer LM, Matteo MG, Galantino P, Falco N. Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood. *Clin Physiol*. 1999;19:440-442.
17. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*. 1990;36:1440-1443.
18. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003.
19. Daiber A, Bachschmid M, Kavakli C, Frein D, Wendt M, Ullrich V, Munzel T. A new pitfall in in detecting biological end products of nitric oxide-nitration, nitros(y)lation and nitrite/nitrate artefacts during freezing. *Nitric Oxide*. 2003;9:44-52.

20. Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, Hamada S, Gharini P, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:im Druck.
21. Demoncheaux EAG, Higenbottam TW, Foster PJ, Borland CDR, Smith APL, Marriott HM, Bee D, Akamine S, Davies MB. Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide. *Clin Sci*. 2002;102:77-83.
22. Doyle MP, Herman JG, Dykstra RL. Autocatalytic oxidation of hemoglobin induced by nitrite: activation and chemical inhibition. *Free Radic Biol Med*. 1985;1:145-153.
23. Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem*. 1981;14:351-358.
24. Doyle MP, Pickering RA, Dykstra RL, Nelson CL, Boyer RF. Involvement of peroxide and superoxide in the oxidation of hemoglobin by nitrite. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;105:127-132.
25. El-Menyawi I, Looareesuwan S, Knapp S, Thalhammer F, Stoiser B, Burgmann H. Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;706:347-351.
26. El-Menyawi I, Wögerbauer M, Stoiser B, Burgmann H. Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1998;715:445-448.
27. Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem*. 1998;31:195-220.
28. Fernandez-Cancio M, Fernandez-Vitos EM, Centelles JJ, Imperial S. Sources of interference in the use of 2,3-diaminonaphthalene for the fluorimetric determination of nitric oxide synthase activity in biological samples. *Clin Chim Acta*. 2001;312:205-212.
29. Ford PC, Wink DA, Stanbury DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett*. 1993;326:1-3.
30. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-376.
31. Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10378-10383.
32. Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJR. Adaption of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem*. 1997;34:193-198.
33. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon III RO. Role of circulation nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:11482-11487.
34. Gödecke A, Decking UKM, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon H-J, Gödecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998;82:186-194.
35. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol*. 1999;301:49-61.
36. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126:131-138.
37. Gross SS, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9967-9969.
38. Grube R, Kelm M, Motz W, Strauer BE. Measurement of oxides of nitrogen in biological fluids: implication for studies *in vivo*. In: The biology of nitric oxide. 4 Enzymology, biochemistry and immunology. Moncada S, Feelisch M, Busse R, Higgs EA, eds. 1994. Portland Press, London.
39. Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kiec A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Golabek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in

human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta*. 1998;274:177-188.
40. Gutman SI, Hollywood CA. Simple, rapid method for determining nitrates and nitrites in biological fluids. *Clin Chem*. 1992;38:2152.
41. Habu H, Yokoi I, Kabuto H, Mori A. Application of automated flow injection analysis to determine nitrite and nitrate in mouse brain. *Neuroreport*. 1994;5:1571-1573.
42. Hamada S, Nishiue T, Nakamura S, Sugiura T, Kamihata H, Miyoshi H, Imuro Y, Iwasaka T. TIMI frame count immediately after primary coronary angioplasty as a predictor of functional recovery in patients with TIMI 3 reperfused acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:666-671.
43. Heger J, Gödecke A, Flögel U, Merx MW, Molojavyi A, Kühn-Velten N, Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunktion. *Circ Res*. 2002;90:93-99.
44. Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta*. 1982;125:107-115.
45. Heslop RB, Jones K. Inorganic chemistry. 1976. Elsevier, Amsterdam.
46. Hughes MN, Nicklin HG. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J Chem Soc*. 1968;450-452.
47. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990;30:535-560.
48. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298:446-451.
49. Ishibashi T, Himeno M, Imaizumi N, Maejima K, Nakano S, Uchida K, Yoshida J, Nishio M. NO(x) contamination in laboratory ware and effect of countermeasures. *Nitric Oxide*. 2000;4:516-525.
50. Ishibashi T, Matsubara T, Ida T, Hori T, Yamazoe M, Aizawa Y, Yoshida J, Nishio M. Negative NO_3^- difference in human coronary circulation with severe atherosclerotic stenosis. *Life Sci*. 2000;66:173-184.
51. Jubelin BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens*. 1996;9:1214-1219.
52. Jungersten L, Edlund A, Hafstrom LO, Karlsson L, Petersson AS, Wennmalm A. Plasma nitrate as an index of immune system activation in animals and man. *J Clin Lab Immunol*. 1993;40:1-4.
53. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang Y-B, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med*. 2000;135:444-451.
54. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:273-289.
55. Kelm M, Feelisch M, Deussen A, Strauer BE, Schrader J. Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow. *Cardiovasc Res*. 1991;25:831-836.
56. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects. Moncada S, Marletta MA, Hibbs JB, Jr., Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
57. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res*. 1999;41:765-772.
58. Kelm M, Schrader J. Comparison of nitric oxide formation in cultured endothelial cells and isolated guinea-pig hearts. In: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Moncada S, Higgs EA, eds. 1990. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Amsterdam.
59. Kelm M, Schulz K, Kerber S, Ladda S. Pitfalls in biochemical analysis of plasma nitrite: a marker of endothelial derived nitric oxide. *Circulation*. 1999;100:I-49.

60. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999;43:275-288.
61. Kleinbongard, P. Physiologische Relevanz des L-Arginin-NO-Stoffwechsels im Blut der Säugetiere. 2003. Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
62. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:790-796.
63. Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein containing sample. *Methods Enzymol*. 2002;359:158-168.
64. Kosaka H, Imaizumi K, Imai K, Tyuma I. Stoichiometry of the reaction of oxyhemoglobin with nitrite. *Biochim Biophys Acta*. 1979;581:184-188.
65. Kosaka H, Uozumi M, Tyuma I. The interaction between nitrogen oxides and hemoglobin and endothelium-derived relaxing factor. *Free Radic Biol Med*. 1989;7:653-658.
66. Lancaster JR, Jr. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:8137-8141.
67. Lancaster JR, Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997;1:18-30.
68. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO-bioavailibility in human blood. *News Physiol Sci*. 2002;17:251-255.
69. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12814-12819.
70. Lee K, Greger JL, Consaul JR, Graham KL, Chinn BL. Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate in humans consuming cured meats. *Am J Clin Nutr*. 1986;44:188-194.
71. Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem*. 1991;266:23790-23795.
72. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang K-T, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8757-8761.
73. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster jr JR. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*. 1998;273:18709-18713.
74. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR. Accelerated reaction of nitric oxide with O_2 within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:2175-2179.
75. Malinski T, Taha Z, Grunfeld S, Patton S, Kapturczak M, Tomboulian P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193:1076-1082.
76. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM, Brückner UB. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite , nitrate, and s-nitrosothiols. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 1997;1:177-189.
77. May JM, Qu Z-C, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:C1946-C1954.
78. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5:62-71.
79. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-2012.
80. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*. 1995;9:1319-1330.

81. Moncada S, Higgs EA, Hodson HF, Knowles RG, Lopez-Jaramillo P, McCall T, Palmer RMJ, Radomski MW, Rees DD, Schulz R. The L-arginine: Nitric oxide pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991;17:1-9.
82. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol*. 1989;38:1709-1715.
83. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*. 1995;41:892-896.
84. Moshage H, Stegeman CA, Jansen PLM. Determination of nitrite and nitrate in stored urine. *Clin Chem*. 1998;44:1780-1781.
85. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1993;316:175-180.
86. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78:915-918.
87. Nava E, Wiklund NP, Salazar FJ. Changes in nitric oxide release *in vivo* in response to vasoactive substances. *Br J Pharmacol*. 1996;119:1211-1216.
88. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*. 1991;214:621-626.
89. Palmer RM. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg*. 1993;128:396-401.
90. Pratt PF, Nithipatikom K, Cambell WB. Simultaneous determination of nitrate and nitrite in biological samples by multichannel flow injection analysis. *Analytic Biochemistry*. 1995;231:383-386.
91. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1995;268:L699-L722.
92. Radomski M, Herbaczynska CK, Ceremuzynski L. Increased activity of circulating polymorphonuclear leukocytes in acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 1990;27:392-393.
93. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost*. 1993;70:36-41.
94. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1590-1596.
95. Recchia FA, Vogel TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H852-H856.
96. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;209:590-596.
97. Richter N, Peterson AS, Wennmalm A, Schimke I. Detection of a ~100 kD protein with strong immunoreactivity to antibodies specific for inducible nitric oxide synthase (iNOS) but without NOS activity in neutrophils of patients suffering from sepsis: results of preliminary study. *Inflamm Res*. 1999;48:651-656.
98. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80:3-6.
99. Schrör K. Organische Nitrate. I. Wirkmechanismen und neue therapeutische Ansätze bei Myokardischämie. *Internist*. 1995;36:392-403.
100. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*. 1994;94:2231-2236.
101. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91:31S-38S.
102. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am*. 1992;266 (5):68-77.
103. Stamler JS. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78:931-936.

104. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:444-448.
105. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:7738-7742.
106. Takenaka N, Daimon T, Ueda A, Sato K, Kitano M, Bandow H, Maeda Y. Fast oxidation reaction of nitrite by dissolved oxygen in the freezing process in the tropospheric aqueous phase. *J Atmospher Chem*. 1998;29:135-150.
107. Takenaka N, Ueda A, Daimon T, Bandow H, Dohmaru T, Maeda Y. Acceleration mechanism of chemical reaction by freezing: the reaction of nitrous acid with dissolved oxygen. *J Atmospher Chem*. 1996;100:13874-13884.
108. Tannenbaum SR, Witter JP, Gatley SJ, Balish E. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science*. 1979;205:1333-1337.
109. Tesch JW, Rehg WR, Sievers RE. Microdetermination of nitrates and nitrites in saliva, blood, water, and suspended particulates in air by gas chromatography. *J Chromatogr*. 1976;126:743-755.
110. Toprakci M, Ozmen D, Mutaf I, Turgan N, Parildar Z, Habif S, Guner I, Bayindir O. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. *Int J Clin Lab Res*. 2000;30:83-85.
111. Vallance P, Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ*. 1994;309:453-457.
112. Vaughn MW, Huang K-T, Kuo L, Liao JC. Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem*. 2000;275:2342-2348.
113. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest*. 1996;56:577-581.
114. Vosper AJ. Nitrogen oxides and oxyacids. In: International Review of Science. Inorganic Chemistry, Series 2. Sowerby DB, ed. 1975. Butterworth University Pork Press.
115. Wagner DA, Moldawer LL, Pomposelli JJ, Tannenbaum SR, Young VR. Nitrate biosynthesis in the rat. Precursor-product relationships with respect to ammonia. *Biochem J*. 1985;232:547-551.
116. Wagner DA, Young VR, Tannenbaum SR. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of $^{15}NH_3$ into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:4518-4521.
117. Yokoi I, Habu H, Kabuto H, Mori A. Analysis of nitrite, nitrate, and nitric oxide synthase activity in brain tissue by automated flow injection technique. *Methods Enzymol*. 1996;268:152-159.
118. Yoshida K, Kasama K, Kitabatake M, Imai M. Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate. *Int Arch Occup Environ Health*. 1983;52:103-115.
119. Yoshida K, Kasama K, Kitabatake M, Okuda M, Imai M. Metabolic fate of nitric oxide. *Int Arch Occup Environ Health*. 1980;46:71-77.

7. Veröffentlichungen

A. Publikationen:

Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, **Gharini P**, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. Circ. Res. 2002; 91: 470-477.

Gharini P, Preik-Steinhoff H, Kleinbongard P, Lauer T, Kelm M. Nitritbestimmung in Plasmaproben mit FIA. Labor Praxis 2003;27: 24-25

Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, Hamada S, **Gharini P**, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis. Free Radic Biol Med. 2003;35:1551-1559.

B. Buchbeitrag:

Gharini P, Dejam A, Lauer T, Matern S, Kelm M, Kleinbongard P. A simple method to measure nitrite and nitrate in urine: measurement of the end product in urine through vanadium chloride and Griess. In: Proceedings of International Seminar and Conference on “Technology and policy on Indonesian resources utilization”. Indonesian Specialist Academician Association in Germany, ed. 2002. AOL Verlag, Marburg.

C. Abstracts:

Gharini P, Kleinbongard P., Rassaf T., Feelisch M, Kelm M. Methodenvergleich zur Nitratbestimmung in wässrigen und plasmatischen Lösungen. In: Gesellschaft für NO-Forschung: *7. NO-Forum der deutschsprachigen Länder*. Magdeburg, 2001, P31.

Kleinbongard P, Rassaf T, **Gharini P**, Gessmann A, Albach K, Feelisch M, Kelm M. L-arginine: NO metabolism in human blood. Basic Res. Cardiol. 2001;96 (Suppl): 107.

Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, **Gharini I**, Feelisch M, Kelm M. Comparative evaluation of analytical methods for the measurement of nitrite in plasma. Nitric Oxide, 2002;6: 379.

Gharini P, Kleinbongard P, Dejam A, Kelm M. Reevaluation der Nitratmessung mit der Griess Reaktion. In: Gesellschaft für NO-Forschung: *8.NO-Forum der deutschsprachigen Länder*. Frankfurt a.M, 2002, P29.

Kelm M, Kleinbongard P, Albach K, Gessmann A, **Gharini P**, Rassaf T, Feelisch M. Transfer von gebundenem Stickstoffmonoxid zwischen Erythrozyten und Plasma im menschlichen Blut. Z Kardiol.2002;91 (Suppl I): P360

Kelm M, Preik M, Rassaf T, Kleinbongard P, **Gharini P**, Erckenbrecht J, Feelisch M. Metabolismus und Transport von authentischem NO im menschlichen Plasma. Z Kardiol. 2002;91 (Suppl I): P361

Kelm M, Rassaf T, Kleinbongard P, Lauer T, **Gharini P**, Preik M, Feelisch M. Vasodilatatorische Effekte von intraarteriell applizierten Lösungen mit NO Gas in der systemischen Zirkulation: Evidenz für biologisch relevante S-Nitrosierung im menschlichen Kreislauf. Z Kardiol. 2002;91 (Suppl I): P353

Kleinbongard P, Rassaf T, Preik M, Dejam A, **Gharini P**, Lauer T, Erckenbrecht J, Feelisch M, Kelm M. Decompensation and transport of nitric oxide in human plasma. Nitric Oxide. 2002; 6: 411.

Gharini, P., Kleinbongard, P., Dejam, A., Kelm, M. Stability of plasma nitrite during storage of samples. In: Gesellschaft für NO-Forschung and Club NO Francais.*1st Joint French-German NO-Meeting, NO: from Chemistry to Therapeutics*. Strasbourg, 2003, 34.

8. Danksagung

Als erstes möchte ich mich beim Deutschen Akademischen Austauschdienst , der mir mit der Vergabe eines Stipendiums überhaupt ermöglicht hat in Deutschland zu promovieren, bedanken, sowie für die freundliche Unterstützung der DAAD-Mitarbeiter während meiner Promotion.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich herzlich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes, die Überlassung des Themas, sowie für die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten bei ihm zu erlernen. Seine fachliche Kompetenz, sein Engagement, und seine Faszination für die Forschung haben bei mir einen großen Eindruck hinterlassen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. V. Suschek danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard für ihre äußerst intensive Betreuung, ihren unermüdlichen Einsatz, ihre Diskussionbereitschaft und ihre uneingeschränkte Unterstützung. Sie gab mir vom ersten Tag meiner Tätigkeit im Labor an das Gefühl in einem Team zu arbeiten und übertrug die Begeisterung zur wissenschaftlichen Tätigkeit auf mich.

Herrn. Dr. med. Thomas Lauer danke ich recht herzlich für sein eifriges und kritisches Korrekturlesen. Herrn Dr. med. Tienush Rassaf und Herrn. Dr. med. A. Dejam bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ihre dauernde Unterstützung, ihre Geduld, sowie ihre konstruktiven Vorschläge, Kritik und Ideen waren mir eine große Hilfe.

Frau MTA G. Dömer, Frau BTA C. Ferfers und Frau MTA S. Matern danke ich für die durchgehende Unterstützung beim Erlernen der Weiterentwicklung und Validierung der Methoden im Kardiologischen Labor. Ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung haben zur Lösung mancher Probleme beigetragen.

Meinem Mann Intan Kumara danke ich für die unendliche Geduld, Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit, sowie für die Begleitung während meines Aufenthaltes in Deutschland.

Mein spezieller Dank gilt allen - aktuellen und ehemaligen - Mitarbeitern des Kardiologischen Labors für die herzliche Zusammenarbeit, die kreative Atmosphäre, sowie alle anstrengenden, hoch konzentrierten und lehrreichen, aber auch schönen und lustigen Stunden.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Putrika Prastuti Ratna Gharini
Geburtsdatum:	27. Mai 1973
Geburtsort:	Sleman, Indonesien
Nationalität:	indonesisch
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	dr. H. Sungsang Rochadi, DSBU
	Sri Hastoeti (†)
Geschwister:	dr. Calcarina Fitriani Retno Wisudarti
	dr. Tantri Dwi Kaniya Retno Hapsari
	dr. Tanaya Ghinorawa
	Manohara Ratna Maruti

Schulischer Werdegang

1979 - 1985	Grundschule: SD Negeri Purwobinangun Kalasan Yogyakarta
1985 -1988	Mittelschule: SMP Negeri 1 Yogyakarta
1988 – 1991	Oberschule: SMA Negeri 3 Yogyakarta

Hochschulausbildung

August 1991	Beginn des humanmedizinischen Studiums an der Universität Gadjah Mada Yogyakarta, Indonesien
August 1995	Ärztliche Vorklinische Prüfung
September 1995	Beginn des klinischen Studiums
Februar 1998	Staatliche Ärztliche Prüfung

Ausführungsrelevante Tätigkeiten zusätzlich zum Medizinstudium

1993-1995	Tätigkeit als Assistentin im Labor der Anatomie
1994-1995	Tätigkeit als Assistentin im Labor der Pathologie

Akademische Auszeichnung

1995	Die zweitbeste Studentin an der Medizinischen Fakultät der Universität Gadjah Mada Yogyakarta

Organisatorische Erfahrungen

1993	Wissenschaftliches Treffen der Indonesischen Medizinstudent Gemeinschaft, als Präsentatorin
1994	Wissenschaftliches Treffen der Indonesischen Medizinstudent Gemeinschaft, als Präsentatorin

Berufliche Erfahrungen

seit August 1998	Lehrtätigkeit im Kardiologischen Labor, Abt. Innere Medizin, "Dr. Sardjito" Lehrkrankenhaus/Medizinische Fakultät, Universität Gadjah Mada
Nov 1998 - Juni 1999	Ärztin auf der "Pringsurat" Krankenstation, Temanggung, Indonesien.
Okt. 1999-Okt. 2000	Deutschkurs am Goethe Institut in Jakarta und Mannheim zur Vorbereitung der wissenschaftlichen Arbeit im Rahmen des DAAD Stipendiums
Seit Okt 2000	Beginn der wissenschaftlichen Arbeit im Kardiologischen Labor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Betreuer: Prof. Dr. med. M. Kelm) im Rahmen des DAAD Stipendiums

Düsseldorf, den 12. Januar 2004

Putrika PR Gharini

10. Anhang

Tabelle 1. Die Stabilität von Nitrit in unterschiedlichen Matrizes während der Lagerung. Vor Lagerung wurde den Matrizes externes Nitrit (0-10 µmol/l) zugegeben. Nitrit wurde in den Proben vor und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Stabilität von Nitrit wurde als Wiederfindungsrate berechnet.

Matrizes	Nitrit-zugabe [nmol/l]	Nitritkonzentration [nmol/l]				Wiederfindungsrate [%]			Mittelwert+ Standardfehler der Wiederfindungsrate		
		Vor Lagerung	Nach Lagerung								
			bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren	bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren	bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren
Submikromolarer Bereich [0-1 µmol/l]											
PBS	200	530	506	555	459	95	105	87	**86 ± 5**	**92 ± 8**	**93 ± 3**
	500	794	643	742	766	82	93	97			
	1000	1295	1038	994	1258	80	77	97			
Ultrafiltrat	200	322	304	253	210	94	79	65	**78 ± 11**	**79 ± 6**	**86 ± 5**
	500	650	375	550	602	58	85	93			
	1000	1100	880	1045	850	80	95	77			
Albumin	200	1071	1214	759	948	113,29	70,84	88,50	**85 ± 15**	**72 ± 10**	**90 ± 5**
	500	1230	957	682	1006	77,81	55,45	81,75			
	1000	1578	1002	1420	1552	63,50	89,95	98,37			
Plasma	200	505	695	592	630	137,52	117,14	124,75	**105 ±8**	**100, ± 10**	**109 ± 12**
	500	747	866	748	796	115,94	100,09	106,52			
	1000	1414	1344	1172	1275	95,06	82,89	90,22			
Mikromolarer Bereich [1-10µmol/l]											
PBS	1000	1407	924	1203	1317	65,71	85,50	93,58	**74 ± 10**	**78 ± 6**	**93 ±2**
	5000	5684	5340	3,797	5499	93,96	66,81	96,75			
	10000	12297	7559	10178	10955	61,47	82,77	89,08			
Albumin	1000	2047	1758	1,903	1775	85,89	92,99	86,74	**90 ± 3**	**97 ± 3**	**90 ± 2**
	5000	6688	5,816	6,382	6,132	86,96	95,42	91,68			
	10000	12107	11,586	12,581	11,208	95,70	103,91	92,57			
Plasma	1000	,221	,234	1223	1143	101,04	100,16	93,65	**99 ± 1**	**98 ± 2**	**95 ± 1**
	5000	5490	5386	5134	5207	98,11	93,52	94,85			
	10000	10459	10299	10283	10125	98,47	98,32	96,80			

Tabelle 2. Die Stabilität von Nitrat in unterschiedlichen Matrizes während der Lagerung. Vor Lagerung wurde den Matrizes externes Nitrat (0-30 µmol/l) zugegeben. Nitrat wurde in den Proben vor und nach Lagerung bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Die Stabilität von Nitrit wurde als Wiederfindungsrate berechnet.

Matrizes	Nitrat-zugabe	Nitratkonzentration [µmol/l]				Wiederfindungsrate [%]			Mittelwert+ Standardfehler der Wiederfindungsrate		
		Vor Lagerung	Nach Lagerung								
Matrizes		Vor Lagerung	bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren	bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren	bei -20°C	bei -80°C	bei -80°C mit Schock-gefrieren
PBS	10	9,78	10,07	11,19	9,77	102,99	114,38	99,91	**99 ± 2**	**104 ± 6**	**97 ± 3**
	20	20,08	18,92	18,56	18,40	94,22	92,41	91,63			
	30	27,27	27,15	28,38	27,33	99,56	104,09	100,25			
Ultrafiltrat	0	24,37	24,19	24,66	25,69	99,28	101,22	105,42	**94 ± 3**	**96 ± 2**	**102 ± 3**
	10	34,14	32,80	31,74	32,85	96,07	92,96	96,20			
	20	44,55	39,18	42,75	47,89	87,96	95,97	107,49			
	30	54,81	51,23	52,34	54,02	93,47	95,49	98,56			
Albumin	10	13,58	9,02	10,57	8,48	66,43	77,85	62,43	**79 ± 7**	**86 ± 5**	**82 ± 10**
	20	19,12	17,24	17,20	18,15	90,17	89,92	94,88			
	30	33,10	26,46	37,48	29,15	79,92	113,23	88,05			
Plasma	0	25,62	25,31	23,25	22,34	98,78	90,74	87,21	**90± 1**	**90 ± 1**	**85 ± 2**
	10	35,96	30,55	32,80	30,79	84,97	91,24	85,64			
	20	46,41	41,03	40,36	37,16	88,39	86,96	80,07			
	30	56,05	50,37	51,47	48,50	89,87	91,82	86,53			

Etablierung einer sensitiven Nitratanalyse zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels *in vitro* und *in vivo*

-Putrika P.R. Gharini-

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine große Rolle bei physiologischen Regulationsmechanismen im Herz-Kreislaufsystem, im zentralen und peripheren Nervensystem und im Immunsystem. Nach der Synthese von NO kann NO rasch oxidativ zu Nitrit und Nitrat verstoffwechselt werden. Das intravaskuläre NO wird zum größten Teil über seine Reaktion mit Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert. Aufgrund des hohen basalen Nitratspiegels können geringere Veränderungen der NOS-Aktivität nur schwer als Veränderung der Nitratkonzentration detektiert werden. Nitrat spiegelt somit nicht sensitiv die Änderungen von NO-Bildung wieder. Die Bestimmung der Differenz scheiterte an der unzureichenden minimalen Auflösung bzw. an hohem Zeit- und Kostenaufwand der zur Verfügung stehenden Analysemethoden. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von geeigneten Analyseverfahren zur Bestimmung des oxidativen Stoffwechselproduktes Nitrat in biologischen Matrizes zur vollständigen Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels. Folgende Vorgehensweise wurde gewählt: 1. Die Etablierung valider, sensitiver, einfacher und kostengünstiger analytischer Verfahren, 2. die Entwicklung einer geeigneten Probenbehandlung, inklusive Lagerung, zur Optimierung der Analyse und der Einbindung in die Routinediagnostik, und 3. die biochemische Phänotypisierung von Nitrat in Abhängigkeit des NO-Metabolismus.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Analyseverfahren, NR-FIA und VCl-FIA, erlauben erstmals die gleichzeitig sensitive und automatisierte Bestimmung von Nitrat in biologischen Matrizes. Somit ist es möglich, zahlreiche Proben im Rahmen von z.B. klinischen Studien zu messen.
2. Eine geeignete Probenaufarbeitung zur simultanen Bestimmung unterschiedlicher NO-Addukte aus nur einer Blutprobe wurde entwickelt.
3. Nach Ausschluss artifizieller Abbaureaktionen der oxidativen NO-Metabolite, Nitrit und Nitrat, wurde die Lagerung der nitrit- und nitrathaltigen Proben ermöglicht.
4. Nitrat konnte über die neu etablierten Analyseverfahren bei Mäusen und Menschen in verschiedenen Matrizes bestimmt werden.
5. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Nitratkonzentration *in vivo* bei der Überexprimierung der iNOS und während chronischer Inhibition der eNOS signifikant verändert war. Ein spezifischer Anstieg der Nitratkonzentration konnte erstmalig *in vitro* aufgrund akuter Veränderungen der eNOS-Aktivität nachgewiesen werden.

Daraus ergab sich die Schlußfolgerung, dass durch sensitive und valide Analyseverfahren von Nitrat die Charakterisierung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges *in vivo* und *in vitro* vervollständigt werden kann. Die Bestimmung von Nitrat könnte zur Diagnostik, als Marker der NO-Bildung, zur Prognostik, durch Abschätzung von Entzündungsprozessen, und für eine langfristige Therapiekontrolle herangezogen werden.

Genehmigt am _____

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