

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

# **Experimentelle und klinische Untersuchungen zum oxidativen und nitrosativen Abbau und Transport von Stickstoffmonoxid im Plasma**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Julia Erckenbrecht

2004

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

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

Referent: Prof. Dr. M. Kelm

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Schrader

## Liste der Abkürzungen

$\beta$ -Cys <sup>93</sup>	Cystein 93 der $\beta$ -Kette des Hämoglobins
ARDS	Akute respiratorische Insuffizienz (adult respiratory distress syndrome)
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cu <sup>+</sup>	Kupferion (I)
FAD	Flavin-Adenosin-Dinucleotid
FBF	Unterarmblutfluss (Forearm blood flow)
FMN	Flavin-Mononucleotid
GSNO	S-Nitrosoglutathion
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
Hb	Deoxyhämoglobin
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
KOH	Kaliumhydroxid
MetHb	Methämoglobin
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Distickstofftrioxid
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NADPH	Reduziertes Nicotinamiddinucleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NO <sup>-</sup>	Nitroxylion
NO <sup>+</sup>	Nitrosoniumion
NO <sup>·</sup>	Stickstoffmonoxid (*)
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOHb	Nitrosylhämoglobin
NOS	NO-Synthase (EC 1.14.13.39)
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>3</sub>	Ozon
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RSNO	S-Nitrososthiole
SNOAlbumin	S-Nitrosoalbumin
SNOHb	S-Nitrosooxyhämoglobin
VVP	Venenverschlußplethysmographie

(\*) im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Blut</b>	<b>10</b>
1.2.1	Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Erythrozyten	11
1.2.2	Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma	13
<b>1.3</b>	<b>Ziele</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Biochemische Methoden zur Bestimmung der oxidativen und nitrosativen Produkte des Metabolismus von NO</b>	<b>18</b>
2.1.1	Gasphasen-Chemilumineszenz	18
2.1.2	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie	22
2.1.3	Herstellung und Eichung von Standards wässriger NO-Lösung	23
2.1.4	Aufbereitung plasmatischer Proben	25
<b>2.2</b>	<b>Angiologische Untersuchungsmethoden zur Bestimmung hämodynamischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid</b>	<b>26</b>
2.2.1	Venenverschußplethysmographie	27
2.2.2	Hochauflösende digitalisierte Duplexsonographie	28
2.2.3	Nichtinvasive Bestimmung des Blutdrucks	29
<b>2.3</b>	<b>Aufbau und Anordnung des angiologischen Messplatzes</b>	<b>30</b>
2.3.1	Studienprotokoll zur intraarteriellen Applikation von NO	31
2.3.2	Studienprotokoll zur intravenösen Applikation von NO	33
<b>2.4</b>	<b>Mathematisch-statistische Methoden</b>	<b>35</b>

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung und Validierung einer Gasphasen-Chemilumineszenz-Methode zur Bestimmung von Nitrit und S-Nitrosothiolen</b>	<b>37</b>
3.1.1	Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Linearität	40
3.1.2	Wiederfindungsraten für Nitrit und S-Nitrosothiolen in wässriger Lösung und im Plasma	40
<b>3.2</b>	<b>Metabolismus von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma</b>	<b>42</b>
3.2.1	Bildung von S-Nitrosothiolen, Nitrit und Nitrat nach Inkubation von Plasma mit NO-Standards	42
3.2.2	Fehlende Interaktion verschiedener Plasmakomponenten bei der Bildung von S-Nitrosothiolen	46
<b>3.3</b>	<b>Intravasale Applikation von authentischen NO-Standards in den humanen Kreislauf</b>	<b>48</b>
3.3.1	Wirkung intraarteriell applizierter NO-Standards	49
3.3.1.1	Hämodynamische lokale Effekte intravasal applizierten NOs	49
3.3.1.2	Biochemische Veränderungen in humanem Plasma durch intraarterielle Applikation von NO	51
3.3.2	Wirkung intravenös applizierter NO-Standards	53
3.3.2.1	Hämodynamische systemische Effekte intravasal applizierten NOs	53
3.3.2.2	Biochemische Veränderungen in humanem Plasma durch intravenöse Applikation von NO	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Methodenkritik der reduktiven Bestimmung von S-Nitrosothiolen mittels Chemilumineszenz</b>	<b>58</b>
<b>4.2</b>	<b>Oxidative und nitrosative Konversion von NO in humanem Plasma</b>	<b>60</b>
<b>4.3</b>	<b>Biologische Wirkung von NO und biochemischer Nachweis der Bildung plasmatischer S-Nitrosothiolen <i>in vivo</i></b>	<b>62</b>

4.3.1	Lokale und systemische vasodilatatorische Wirkung von NO <i>in vivo</i>	62
4.3.2	Lokale und systemische gefäßrelaxierende Wirkung von S- Nitrosoglutathion <i>in vivo</i>	65
4.3.3	Bildung von S-Nitrosothiolen <i>in vivo</i>	67
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Synthese und Funktion von Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein intra- und interzellulärer Botenstoff, der an einer Vielzahl von physiologischen Regulationsmechanismen beteiligt ist. Das farblose Gas besitzt hohe Reaktivität und Radikaleigenschaften<sup>45;50;150</sup>. Es spielt eine Rolle in der Regulation des Herz-Kreislaufsystems, im zentralen und peripheren Nervensystem sowie im Immunsystem<sup>97;103;133</sup>. Im kardiovaskulären System wird NO kontinuierlich und unter Stimulation durch vasoaktive Mediatoren von Zellen des Gefäßendothels produziert. Es gelangt durch passive Diffusion in die umgebende glatte Muskulatur sowie nach luminal. In der glatten Muskelzelle nitrosyliert NO Häm-Eisen der Guanylatcyclase und löst so eine Akkumulation von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus<sup>29;151</sup>. Durch eine Senkung der freien zytoplasmatischen Calciumkonzentration kommt es zu einer nachfolgenden Relaxation der glatten Muskelzelle und zur Dilatation des Gefäßes. Das Endothel übt durch die Synthese von NO einen wesentlichen Einfluss auf den Gefäßtonus und somit auf die Regulation des Blutdruckes aus<sup>119</sup>. Nach luminal freigesetztes NO nimmt ferner Einfluß auf die Gerinnung durch Hemmung der Plättchenaggregation<sup>107</sup>. NO hemmt die Adhäsion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten an die Gefäßwand<sup>98;114;125;126</sup>. Schließlich scheint NO auch die myokardiale Funktion zu beeinflussen<sup>8;16;19;21;51</sup>. Neben seinen Effekten auf benachbarte Zellen beeinflusst NO auch den Stoffwechsel der Endothelzelle selbst. So werden vaskuläre Permeabilität, die Angiogenese und die Expression von Adhäsionsmolekülen durch NO reguliert. Auch die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen unterliegt der Regulation durch NO<sup>87;128</sup>. NO wirkt auf diese Weise bedeutend an der

Aufrechterhaltung der Homeostase des Gefäßes<sup>39;46;70;87;119</sup> und damit der Funktion zahlreicher Organe mit<sup>23</sup>.

Neben seiner Bedeutung für das kardiovaskuläre System ist NO auch in anderen Organsystemen an regulativen Prozessen beteiligt. Im zentralen Nervensystem hat NO die Funktion eines Transmitters, der kognitive Funktionen beeinflusst. Im peripheren Nervensystem wirkt es zusätzlich bei der Vermittlung von Schmerzreizen mit<sup>72</sup>. NO nimmt weitere Funktionen bei der Signalübertragung nicht-adrenerger und nicht-cholinerges Nerven in Teilen des Gastrointestinaltraktes, in den Atemwegen und im Urogenitaltrakt ein<sup>97</sup>. Auch kann NO durch neutrophile Granulozyten<sup>159</sup> und Makrophagen gebildet werden<sup>143</sup> und übernimmt damit Funktionen in der unspezifischen Immunabwehr sowie in der Pathophysiologie der Sepsis<sup>55;74;98;104;133</sup>. Auch bei der Regulation von Genexpression und Apoptose sind Funktionen von NO bekannt<sup>75</sup>.

Stickstoffmonoxid wird im Endothel durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Beteiligung von Kofaktoren und molekularem Sauerstoff enzymatisch gebildet<sup>55;97</sup>. L-Arginin wird mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper aus L-Citrullin gebildet, insbesondere im proximalen Konvolut der Niere<sup>156</sup>. Kofaktoren der Bildung von NO aus Arginin durch die NO-Synthase sind NADPH, Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavin-Adenosin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN). Ebenso ist molekularer Sauerstoff für die Reaktion nötig<sup>82</sup>. Mehrere Isoformen der NO-Synthase sind mittlerweile bekannt, welche je Produkte bestimmter Genorte auf unterschiedlichen Chromosomen sind<sup>92;101;129</sup>. Diese Isoformen wurden unterschieden in konstitutive und induzierbare Formen. Die konstitutiven Formen der NO-Synthase sind abhängig von intrazellulärem Calcium und Calmodulin. Während Calmodulin auch bei normaler intrazellulärer Konzentration des Calciums an die induzierbare NO-Synthase gebunden ist, geschieht dies bei der konstitutiven Form erst bei einem Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels. Die Konzentration des intrazellulären Calciums steigt



abhängig von extrazellulären Signalen wie zum Beispiel durch die Freisetzung von Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, Substanz P und Serotonin<sup>10</sup>. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass in bestimmten Zelltypen auch eine konstante Expression der iNOS stattfindet<sup>103</sup>. Auch konnten zwei unterschiedliche konstitutive Formen unterschieden werden, so dass die Isoenzyme der NOS zusätzlich nach den Geweben benannt wurden, in denen sie zuerst nachgewiesen werden konnten. Inzwischen sind sie jedoch auch in anderen Geweben identifiziert worden (vgl. Tabelle 1). Die neuronale konstitutive NO-Synthase (ncNOS oder auch Typ I) kommt in Neuronen aber ebenso im Skelettmuskel<sup>102</sup> und in pulmonalen Epithelzellen<sup>5</sup> vor. Die endotheliale konstitutive NO-Synthase (ecNOS oder Typ III) wurde außer im Endothel zusätzlich in Thrombozyten, Kardiomyozyten und renalen und pulmonalen Epithelzellen<sup>130</sup> sowie in Neuronen<sup>132</sup> gefunden. Dagegen ist die induzierbare NO-Synthase (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 (vgl. Tabelle 1). Eine neue Isoform des Enzyms wurde in jüngerer Zeit in Mitochondrien identifiziert<sup>35;36</sup>. Diese NOS ist calciumabhängig und scheint eine Rolle in der Aufrechterhaltung des pHs, des transmembranösen Potentials und in der Atmung des Mitochondriums zu spielen<sup>35</sup>.

<b>Nomenklatur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Typ I</b> oder neuronale konstitutive NOS (ncNOS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Typ II</b> oder induzierbare NOS (iNOS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Typ III</b> oder Endotheliale konstitutive NOS (ecNOS)</li> </ul>
<b>Calcium- und Calmodulin-abhängigkeit</b>	+	-	+
<b>Vorkommen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ZNS</li> <li>▪ Periphere Nerven</li> <li>▪ Skelettmuskel</li> <li>▪ Pulmonale Endothel- und Epithelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Makrophagen</li> <li>▪ Epithelzellen</li> <li>▪ Glatte Muskelzellen</li> <li>▪ Kardiomyozyten</li> <li>▪ Hepatozyten</li> <li>▪ Mikrovaskuläre Endothelzellen</li> <li>▪ Mesangiale Zellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Endothelzellen</li> <li>▪ Thrombozyten</li> <li>▪ Kardiomyozyten</li> <li>▪ Renale Epithelzellen</li> <li>▪ Pulmonale Epithelzellen</li> <li>▪ Neurone</li> </ul>

**Tabelle 1:** Lokalisation und Charakteristika der Isoenzyme der NO-Synthase

## 1.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Blut

Die biologische Wirkung von NO wird durch die Synthese im Endothel sowie durch seinen Abbau bestimmt. Es handelt sich dabei um komplexe Mechanismen, die von vielen Faktoren abhängig sind. Hierzu zählen unter anderem die Diffusion vom Endothel zum Ort des Metabolismus sowie die verschiedenen biochemischen Reaktionen von NO in den einzelnen Kompartimenten des Blutes. Die beiden wichtigsten Bestandteile für Reaktionen mit NO im humanen Gefäßsystem sind Blutplasma und Blutzellen, wobei insbesondere Erythrozyten eine entscheidende Rolle zukommt. Die verschiedenen Reaktionen sind u.a. abhängig vom pH-Wert, dem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), der Anwesenheit eisenhaltiger Moleküle (zum Beispiel Hämoglobin) und der Aktivität verschiedener Enzyme. Aber auch innerhalb des Gefäßsystems ist der Metabolismus von Stickstoffmonoxid nicht einheitlich, da sich das

Verhältnis der Blutbestandteile, Flusseigenschaften und Scherkräfte entlang des Gefäßbettes ändern. Auch variiert der Diffusionsweg vom Endothel zu den Erythrozyten entlang des Gefäßbettes. In der Mikrostrombahn ist der Diffusionsweg zu den Erythrozyten wesentlich geringer als in der Makrostrombahn. Dort befinden sich die Erythrozyten in der Mitte des Gefäßes umgeben von einem erythrozytenfreien Randsaum bestehend aus Plasma<sup>11;84;85;148</sup>. So kann sich der Anteil des Stickstoffmonoxids, der durch Diffusion von der Gefäßwand in den Erythrozyten gelangen kann, in den verschiedenen Abschnitten des Gefäßbettes ändern.

Die Reaktionen von NO sind in Plasma und Erythrozyten sehr unterschiedlich. Im Folgenden werden daher die Abbauege von NO im Erythrozyten sowie im Blutplasma vorgestellt.

#### 1.2.1 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Erythrozyten

Erythrozyten bilden 40 bis 50 % des Blutvolumens und stellen durch die Reaktionen von NO mit Hämoglobin einen wichtigen Abbauort für NO dar<sup>79</sup>. Es sind drei bedeutende Abbauege von NO innerhalb des Erythrozyten bekannt (Abbildung 1). Die rasch ablaufende Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>) führt zur Bildung von Methämoglobin (MetHb) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sup>22;65;118</sup> (vgl. Abbildung 1). Alternativ kann NO bei Abwesenheit von Sauerstoff an die Häm-Gruppe des Deoxyhämoglobins (Hb) binden und damit Nitrosylhämoglobin (NOHb) bilden<sup>14;152</sup> (vgl. Abbildung 1). Dieses kann intraerythrozytär zu S-Nitrosooxyhämoglobin (SNOHb) konvertiert werden<sup>57;95</sup>. Da die Reaktion mit Deoxyhämoglobin unter anaeroben Bedingungen abläuft, hängt der Anteil des gebildeten Nitrats und Methämoglobins beziehungsweise Nitrosylhämoglobins von der Sauerstoffsättigung des Blutes ab<sup>153</sup>. Die Reaktionen von NO mit Oxyhämoglobin oder Deoxyhämoglobin laufen sehr schnell ab. Die Umsatzkonstanten für die Reaktionen zweiter Ordnung von NO mit HbO<sub>2</sub> und Hb liegen zwischen 3 und 5×10<sup>7</sup>·M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>

<sup>22</sup>. Die Reaktion von NO mit HbO<sub>2</sub> ist damit einerseits durch die Diffusion von NO in den Erythrozyten limitiert<sup>85</sup>, andererseits durch die Quartärstruktur des HbO<sub>2</sub> bestimmt. Innerhalb des Erythrozyten ist die Reaktion von NO oder eines höheren Oxidationsproduktes wie Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) oder Distickstofftrioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) mit dem Cystein-93 der β-Kette (β-Cys<sup>93</sup>) des Hämoglobins möglich (Abbildung 1). Diese ebenfalls sauerstoffabhängige Reaktion führt zur Bildung von S-Nitrosooxyhämoglobin<sup>57</sup>. Es existieren zwei interkonvertierbare Quartärstrukturen des Hämoglobins, eine R-Konformation mit hoher Sauerstoffaffinität sowie eine T-Konformation mit niedriger Sauerstoffaffinität<sup>108</sup>. Nach der Hypothese von Jia et al.<sup>57</sup> erfolgt die Anlagerung von NO am β-Cystein-93 am zuvor oxygeniertes Hämoglobin, das sich in der R-Konfiguration befindet. In Verbindung mit Abgabe des Sauerstoffs in der Peripherie kommt es zu einer Konformationsänderung des Hämoglobins in die T-Form und dadurch zu einer Abspaltung des NO. Diese Freisetzung von NO führt lokal durch eine Relaxation der glatten Muskulatur des Gefäßes zu einer Vasodilatation. Diese Theorie bietet auf molekularer Ebene eine Erklärung für die physiologische Anpassung des Blutflusses durch Vasodilatation abhängig von der Sauerstoffsättigung des Blutes. Damit fände ein selektiver Transport des bioaktiven NO in Gewebe mit erhöhtem O<sub>2</sub>-Bedarf statt<sup>138</sup>. Jüngst konnte die β-Cys<sup>93</sup>-Nitrosierung des Hämoglobins als Umwandlung von NOHb zu SNOHb abhängig von pO<sub>2</sub> des Blutes auch beim Menschen nachgewiesen werden<sup>95</sup>. Über die an den O<sub>2</sub>-Bedarf angepasste Blutflussregulation hinaus wirkt SNOHb auch hemmend auf die Thrombozytenaggregation<sup>107</sup>. Da innerhalb des hydrophoben Milieus der Zellmembran der Erythrozyten die Reaktion von NO mit Sauerstoff etwa um den Faktor 300 höher ist als im umgebenden Medium<sup>86</sup>, können auch biologische Membranen der Erythrozyten im Metabolismus von NO eine weitere wichtige Rolle

spielen. Für das Membranprotein AE1/Band-3 der Erythrozytenmembran konnte so eine Nitrosierung via Hämoglobin nachgewiesen werden<sup>106</sup>.

### 1.2.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma

Auf Grund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit beim Abbau von NO innerhalb des Erythrozyten wurden alternative Reaktionen von NO mit Bestandteilen des Plasmas lange Zeit für unwahrscheinlich gehalten. Jüngst konnte gezeigt werden, dass die Reaktion mit Erythrozyten etwa um den Faktor 1000 langsamer abläuft als mit freiem Hämoglobin<sup>49</sup>. Plasma stellt damit möglicherweise ein wichtiges Kompartiment für den NO-Transport dar<sup>65</sup>. Es existiert unmittelbar an der Gefäßwand ein erythrozytenfreier Randstrom, den das endothelial gebildete NO passieren muss, bevor es mit Erythrozyten reagieren kann<sup>11;84;85;148</sup>. So besteht die Möglichkeit, dass Blutplasma neben der vorübergehenden Bildung von SNOHb oder NOHb im Erythrozyten<sup>57</sup> eine Rolle im Transport und Abbau des endothelialen Stickstoffmonoxids einnimmt. Damit käme dem Plasma die Funktion der Vermittlung und Modulation des NO Transportes zwischen Endothel und Erythrozyten sowie eine blutflussregulierende Aufgabe zu<sup>64</sup>.

Das in den Endothelzellen gebildete und nach luminal diffundierte NO wird im Plasma fast vollständig über Distickstofftrioxid zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) oxidiert, welches in isolierten Plasma für einige Stunden stabil bleibt<sup>47;68</sup>. Im Vollblut jedoch wird das im Plasma vorliegende  $\text{NO}_2^-$  mit einer Halbwertszeit von 110 Sekunden<sup>112</sup> durch Oxidation mit Oxyhämoglobin zu Nitrat umgewandelt. Dieses weist eine Halbwertszeit von 5-8 Stunden auf (vgl. Abbildung 1).

NO kann im Plasma mit Thiolen in der Gegenwart von Elektronenakzeptoren wie redoxaktivierte Thiole zu S-Nitrosothiolen (RSNO) reagieren. Diese stellen möglicherweise eine Speicher- und Transportform des NO dar<sup>28;134;139;140</sup>. Im Plasma liegt als wichtigstes Plasmaprotein Albumin in einer Konzentration zwischen 0,5 und 1 mM

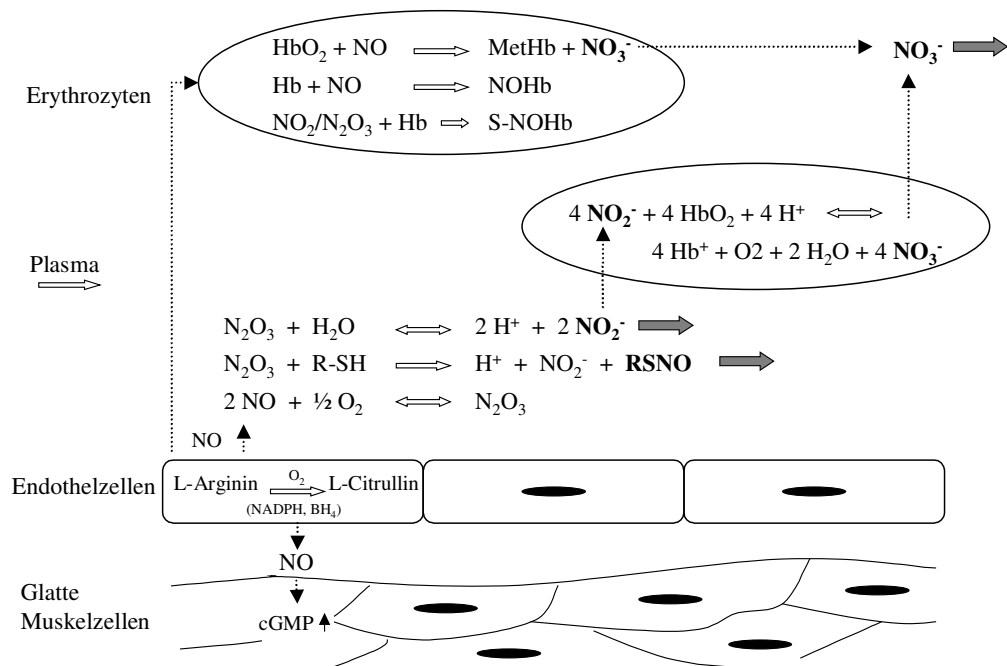
vor<sup>54;58;62;91;137;142</sup>. Daneben findet man 4  $\mu\text{M}$  Glutathion<sup>73</sup> und 200  $\mu\text{M}$  Cystein<sup>141</sup>. Ein Teil dieser Thiole ist in der Lage NO an Schwefelgruppen zu binden. Humanes Albumin besitzt eine einzelne freie Sulfhydrylgruppe am Cys-34, das zu dieser Nitrosierung bereit steht. Der Großteil der im Plasma gebildeten S-Nitrosothiole stellt so S-Nitrosoalbumin (SNO-Albumin) dar<sup>12;62;90;137;140</sup>. Nitrosothiole wurden zunächst im humanen Plasma in Konzentrationen von 7 $\mu\text{M}$  gemessen<sup>137</sup>. Neuere Studien legen jedoch nahe, dass die Nitrosothiolkonzentrationen im humanen Plasma eher im nanomolaren Bereich liegen<sup>62;90</sup>. Neben der Messung von Nitrosothiolen im Plasma des Kaninchens und des Menschen wurden Nitrosothiole auch im Bronchialsekret des Menschen und in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Über den Ablauf der Nitrosierungsreaktion herrscht jedoch noch Unklarheit. Ob eine direkte Interaktion von NO und Plasmathiolen unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors stattfindet<sup>41</sup> oder ob Zwischenprodukte wie Distickstofftrioxid<sup>158</sup>, Nitrosiumionen ( $\text{NO}^+$ )<sup>7</sup> oder Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ )<sup>99;147</sup> eine Rolle spielen, ist derzeit nicht klar.

Es wird vermutet, dass beim heterolytischen oder homolytischen Abbau der S-Nitrosothiole  $\text{NO}^+$ , NO oder Nitroxylionen ( $\text{NO}^-$ ) frei werden können. Diese könnten dann biologisch aktiv werden und die oben beschriebenen Effekte des NO auf Gefäßtonus und Aggregabilität hervorrufen<sup>57;141</sup>. Nitrosothiole können damit als metastabiles Produkt des Stickstoffmonoxid einen Puffer oder Träger von NO darstellen.

Die Halbwertszeiten der Nitrosothiole sind stark abhängig von den Reaktionsbedingungen und liegen nach Untersuchungen *in vitro* zwischen 15-40 Minuten (S-Nitrosoalbumin)<sup>6;12;27;137;140</sup>, 8 Minuten (S-Nitrosoglutathion)<sup>12;27</sup> und unter einer Minute (S-Nitrosocystein)<sup>12;124</sup>.

Zu einem Zerfall der S-Nitrosothiole kommt es *in vitro* durch mehrere Mechanismen. Übergangsmetalle wie Kupfer ( $\text{Cu}^+$ ) führen zu einem schnellen Zerfall von Nitrosothiolen<sup>1</sup> und zur Bildung von NO und Disulfiden. Der Abbau von S-Nitrosothiolen wird ebenfalls durch die

Anwesenheit von Ascorbinsäure beschleunigt. Dies geschieht auf zwei Wegen. Einerseits reduziert Ascorbinsäure  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  und fördert damit die oben beschriebene Spaltung der Nitrosothiole. Andererseits agiert Ascorbinsäure als Nukleophil, welches die Stickstoffgruppe angreift und somit NO direkt freisetzt<sup>53</sup>. Ein weiterer Abbauweg für Nitrosothiole stellen Transnitrosierungsvorgänge dar, bei denen NO von Nitrosothiolen auf andere Thiole übertragen wird. Ein direkter Transfer von NO von Albumin an L-Cystein wurde in Untersuchungen an Tieren beobachtet. So stellt möglicherweise das stabilere SNO-Albumin ein Reservoir an Stickstoffmonoxid für niedrigmolekulare Nitrosothiole dar, die dann durch Reduktion von Übergangsmetallen NO abgeben können oder selbst intrazellulär an der Zielzelle wirken<sup>62;124;140</sup>. Auf diese Weise können S-Nitrosothiole ähnliche Wirkungen wie NO auf Vasotonus<sup>33</sup>, glatte Muskulatur<sup>56</sup> und Plättchenaggregation<sup>131</sup> aufweisen. Der Mechanismus der Bildung von Nitrosothiolen und der Freisetzung von NO aus Nitrosothiolen sind jedoch noch weitgehend unbekannt<sup>135</sup>.



**Abbildung 1:** Metabolismus von NO im Blut. Nach Freisetzung von NO ins Gefäßlumen wird es rasch zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und S-Nitrosothiolen (RSNO) abgebaut. Nitrit reagiert mit Oxyhämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) weiter. Im Erythrozyten entsteht abhängig von der Sauerstoffsättigung entweder Nitrosylhämoglobin (NOHb) oder S-Nitrosooxyhämoglobin (SNOHb). Alternativ oxidiert NO durch Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin (MetHb).

Auf Grund des oben beschriebenen schnellen und komplexen Metabolismus von Stickstoffmonoxid in Erythrozyten und Plasma wurde eine Halbwertszeit von NO im Vollblut von 0,05 bis 1,8 ms bestimmt<sup>9;78;85;148</sup>. Nach diesen Ergebnissen musste man davon ausgehen, dass NO durch schnelle Inaktivierung in biologisch unwirksame Metabolite ausschließlich autokrine und parakrine Wirkung in der Gefäßwand entfalten kann. Diese schnelle Konversion von NO im humanen Blut bildete die Grundlage für die therapeutische Anwendung von authentischem NO-Gas zur Inhalation, insbesondere bei respiratorischen Erkrankungen wie ARDS (adult respiratory distress syndrom)<sup>120</sup>. Die kurze Halbwertszeit von NO im Blut legte nahe, dass durch NO-Inhalation nur lokale vasodilatatorische Effekte innerhalb des pulmonalen Kreislaufes ausgelöst werden können, ohne dass auf die



systemische Zirkulation Einfluss genommen wird. Jedoch zeigten neuere experimentelle Untersuchungen, dass hohe Dosen inhalierten NOs Effekte jenseits der pulmonalen Zirkulation hervorrufen können<sup>13;31;81</sup>. So steigt die Zahl der klinischen Untersuchungen zu Nebenwirkungen der Inhalationstherapie, bei der unter anderem eine Hemmung der Thrombozytenaggregation beobachtet wurde<sup>34;52</sup>. Auch bei Infusion von NO-Donatoren wurden systemische Effekte in Form einer prolongierten Vasodilatation und Hypotension festgestellt<sup>96</sup>.

Trotz der extrem kurzen chemischen Halbwertszeit von NO im Blut konnten so langandauernde und systemische Effekte beobachtet werden. Diese systemischen Effekte können möglicherweise durch die Bildung längerlebiger vasoaktiver Intermediate wie S-Nitrosothiole erklärt werden. Diese könnten als Speicherformen von NO fungieren und bioaktives Stickstoffmonoxid freisetzen.

### 1.3 Ziele

Einblicke in den Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma sind eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Physiologie zirkulierender NO-Addukte im Blut. Mit dieser Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Weiterentwicklung und Validierung einer Methode zur sensitiven und spezifischen Bestimmung der Metabolite von Stickstoffmonoxid - Nitrit und S-Nitrosothiole - im humanen Plasma.
2. Untersuchung des Metabolismus von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma.
3. Untersuchung des Einflusses *in vivo* applizierter wässriger NO-Standards auf lokale und systemische Leitungs- und Widerstandsgefäße des humanen Kreislaufes unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Rolle von S-Nitrosothiolen bei der Vermittlung einer dilatatorischen Wirkung.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Biochemische Methoden zur Bestimmung der oxidativen und nitrosativen Produkte des Metabolismus von NO**

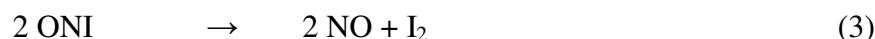
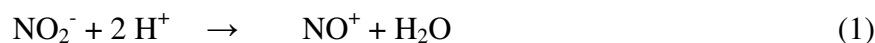
Zur Untersuchung des oxidativen und nitrosativen Abbaus von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma kamen mehrere Methoden zum Einsatz. Zur Messung von Nitrit und S-Nitrosothiolen im Plasma wurde eine reduktive Methode unter Anwendung der Gasphasen-Chemilumineszenz verbessert und validiert. Die Konzentration von Nitrat im humanen Plasma wurde mittels der hochsensitiven Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC = high performance liquid chromatography) bestimmt. Zur Untersuchung der Konversion von NO im humanen Plasma wurde Plasma mit definierten Konzentrationen exogenen Stickstoffmonoxids inkubiert. Dazu war ein Verfahren zur reproduzierbaren Herstellung wässriger NO-Standards nötig.

#### **2.1.1 Gasphasen-Chemilumineszenz**

Die Gasphasen-Chemilumineszenz zählt zu den Methoden mit der höchsten Sensitivität<sup>18</sup> und Spezifität für Stickstoffmonoxid<sup>48</sup> in flüssigen oder gasförmigen Proben. Die Methode beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Ozon frei werden. Die Messungen wurden an einer Chemilumineszenz-Anlage der Firma Sievers (Boulder, CO, USA) durchgeführt.

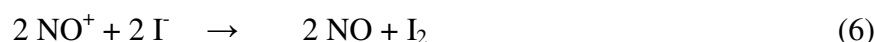
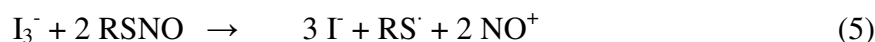
Zur Bestimmung des NO-Gehalts einer flüssigen Probe wurde diese zunächst mit einer gasdichten Glasspritze (Hamilton Company, Reno, NV, USA) durch eine Kunststoffmembran in die Lösungskammer (Radical Purger, Sievers, Boulder, CO, USA) der Anlage injiziert (vgl. Abbildung 2). Diese enthielt 3,5 - 5,5 ml einer iodhaltigen, reduktiven Reaktionslösung.

Diese Reaktionslösung zur Freisetzung von NO aus Nitrit und Nitrosothiolen bestand aus 0,2 M Iod (Sigma, St.Louis, MO, USA) sowie 0,6 M Kaliumiodid (Merck, Darmstadt, Deutschland), gelöst in 1 ml hochreinem Wasser für die Chromatographie. Zugesezt wurden 8 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland), die sich für die Lösung von Halogenen besonders eignet. Die denitrosierende Lösung setzt aus in der Probe enthaltenem Nitrit zunächst Nitrosoniumionen frei (Gleichung 1). Die Nitrosoniumionen reagieren mit Jodid (I<sup>-</sup>) weiter zu NO (Gleichungen 2 und 3).



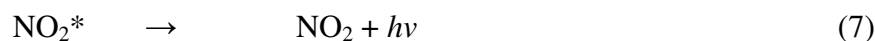
Das auf diese Weise äquimolar aus Nitrit gebildete NO kann im NO-Analysator mittels Photoreaktion gemessen werden.

Die Vermessung von Nitrosothiolen im Plasma durch Chemilumineszenz-Detektion erforderte eine besondere Probenaufbereitung. Der Probe wurde nach Aliquotierung 0,5%iges Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 0,1 M HCl zugesezt. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein stabiles Diazoniumsalz, welches durch die Reaktionslösung nicht reduziert wird. Allein das aus Nitrosothiolen freigesetzte NO wird nach Zusatz von Sulfanilamid gemessen<sup>90</sup>. Durch die beschriebene Reaktionslösung aus Iod (I<sub>2</sub>) und Iodid (I<sup>-</sup>) wird NO vermutlich über Nitrosoniumionen aus der Thiolbindung freigesetzt (Gleichungen 4 bis 6)<sup>90</sup>.



Die Proben wurden zur Messung je dreifach in die Reaktionslösung injiziert. Das Reaktionsgefäß war ummantelt von einem Wasserbad, welches auf 95°C erhitzt wurde. Es wurde von unten durch eine Glasfritte konstant mit dem Inertgas Helium durchströmt. In der Probe befindliches NO trat auf Grund des hohen Löslichkeitskoeffizienten (~20) rasch von

der Flüssigkeits- in die Gasphase über. Durch den konstanten Fluss des Heliumgases durch die Probe wurde der Übertritt des NO in die Gasphase erleichtert<sup>3</sup> und das Gas in die Reaktionskammer des NO-Analysators transportiert. Zum Schutz der Anlage strömte das Gas dabei zunächst durch einen Kühlungsbereich und darauffolgend durch eine mit 1 molarer Natriumhydroxidlösung gefüllte Waschflasche (vgl. Abbildung 2). In der Reaktionskammer des NO-Analysators (Sievers NO-Analyser 280, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA) wurde NO dann mittels einer Photoreaktion gemessen. Der Reaktionskammer wurde aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>) generiertes Ozon (O<sub>3</sub>) zugeleitet. Ozon reagiert spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid, das sich zu einem Teil in einem angeregten Zustand befindet (NO<sub>2</sub>\*). Die überschüssige Energie dieses angeregten Zustandes kann durch Interaktion mit anderen Gasmolekülen oder aber als ein Photon ( $h\nu$ ) abgegeben werden (Gleichung 7)<sup>48</sup>.



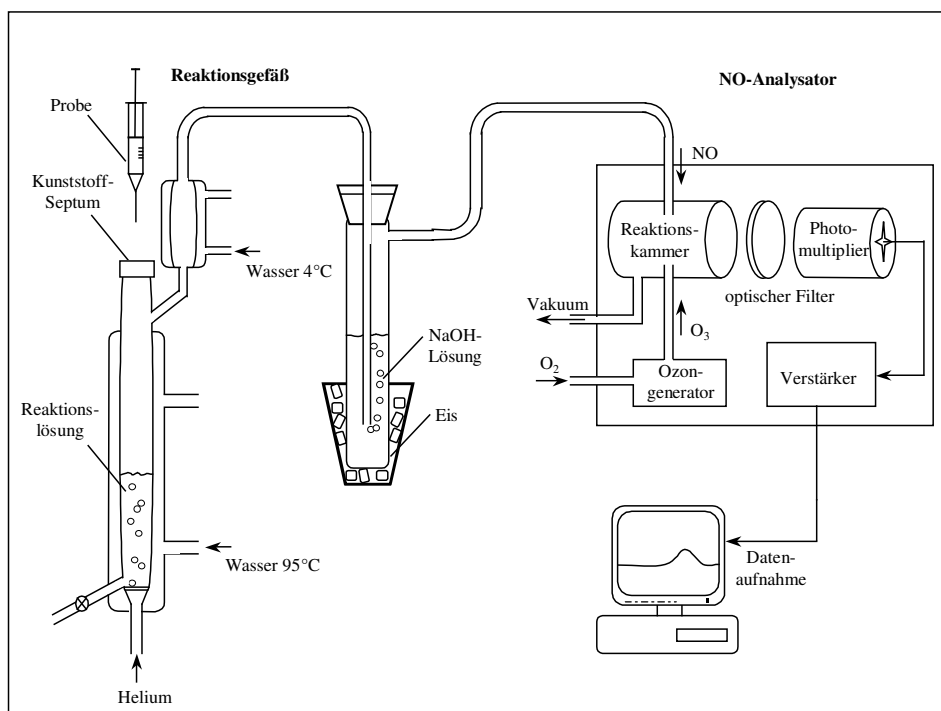
Das emittierte Licht befindet sich im Rot- und Infrarotbereich (~640-3000nm). Durch eine Absenkung des Druckes in der Reaktionskammer auf 7–8 mmHg wurde die Konzentration an Gasmolekülen verringert, die mit angeregtem Stickstoffdioxid reagieren und dadurch die Messung stören.

Die Reaktion zwischen NO und O<sub>3</sub> läuft sehr schnell ab ( $10^{-7} \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  bei Raumtemperatur)<sup>48</sup> und ermöglicht damit die Erfassung schneller Änderungen der NO-Konzentration. Höhere Stickoxide hingegen reagieren mit O<sub>3</sub> wesentlich langsamer und benötigen eine höhere Aktivierungsenergie<sup>59</sup>, so dass die Reaktion selbst durch hohe Konzentrationen anderer Stickoxide nicht gestört wurde<sup>30</sup>. Das emittierte Licht ist damit für einen großen Konzentrationsbereich linear proportional zum NO-Gehalt der Probe<sup>30</sup>.

Die schwache Rotlichtemission wurde durch einen Photoverstärker erfasst, der von der Reaktionskammer durch einen Rotlichtfilter getrennt war (vgl. Abbildung 2). Dieser verhinderte die Verstärkung von Licht

anderer Wellenlängen, zum Beispiel von ultravioletten Emissionen durch Reaktionen von Alkenen und schwefelhaltigen Verbindungen<sup>4</sup>. Das Dunkelsignal des Analysators stieg mit erhöhter Temperatur an<sup>145</sup>, so dass eine konstante Kühlung auf etwa -15°C Störrauschen reduzierte. Zusätzlich wurde die Temperatur des Photoverstärkers konstant gehalten, da die Lichtemission der Chemilumineszenzreaktion zwischen Ozon und NO temperaturabhängig ist<sup>40</sup>. Ebenso musste der Helium- und der Ozongasfluss konstant gehalten werden<sup>145</sup>.

Die Größe des Signals wurde als Fläche unter der Kurve bestimmt. Diese gibt exakter die NO-Konzentration der Probe wieder als die Höhe des Signals, die durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird<sup>90</sup>. Zur Datenaufnahme und Integration durch einen Computer diente das Programm NoaWin32<sup>®</sup> (DeMeTec, Hannover, Deutschland).



**Abbildung 2:** Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage. Die zu untersuchende Probe wird in ein Reaktionsgefäß injiziert. NO tritt in die Gasphase über und gelangt mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators, wo die Lichtreaktion mit O<sub>3</sub> stattfindet.

### 2.1.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Messung von Nitrat als Endprodukt des oxidativen Stoffwechsels von Stickstoffmonoxid<sup>157</sup> erfolgte durch eine hochempfindliche HPLC-Methode. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Auftrennung einer Probe durch die unterschiedliche Adhäsion von Anionen an die stationäre Phase. Nach Aufbereitung der plasmatischen Probe (vgl. Absatz 2.1.4) wurde diese durch einen Autoinjektor (Jasco 851-AS, Großzimmern, Deutschland) durch ein Injektionsventil und einer Infektionsschleife mit 40µl Volumen (Rheodyne injection valve 9010, Cotati, CA, USA) in die Anlage injiziert. Als stationäre Phase fungierte eine Anionenaustausch-Säule (LC A08 125×4,6 mm I.D., Sykam, Gilchingen, Deutschland) mit Vorsäule. Die Elution des Anions Nitrat von der stationären Phase erfolgte durch eine Elutionslösung bestehend aus Acetonitril, Methanol (beides Riedel de Haën, Seelze, Deutschland) und hochreinem Wasser für die Chromatographie (Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 70:10:20 sowie aus 40mM Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Elutionslösung wurde nach Entgasung und Filtration (0,5µm Membranfilter, FHLP, Millipore, Eschborn, Deutschland) durch eine Doppelhubpumpe (Sykam S1000, Gilching, Deutschland) rezirkulierend bei einer Flußrate von 1,0 ml/min eingesetzt. Zur analytischen Säule wurde ein UV-Detektor (UVIS 204, Linear Instruments, Reno, NE, USA) zur photometrischen Bestimmung von Nitrat im mikromolaren Bereich in Serie geschaltet. Die Aufzeichnung der UV-Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 220$  nm. Vor Analyse der Proben erfolgte durch Aufgabe wässriger Nitratstandards eine Eichung der Anlage. Zur Datenakquisition und Integration fand das Computerprogramm ChromGate<sup>®</sup> (Dr. Ing. Herbert Kauer GmbH, Scientific Instruments, Berlin, Deutschland) Anwendung. Durch diese Methode wurde ein Detektionslimit von 3 nmol/l in wässrigen Proben und 60 nmol/l im humanem Plasma erreicht<sup>112</sup>. Die Linearität wurde für den

Bereich von 10 bis 1000 nmol/l mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 festgestellt.

### 2.1.3 Herstellung und Eichung von Standards wässriger NO-Lösung

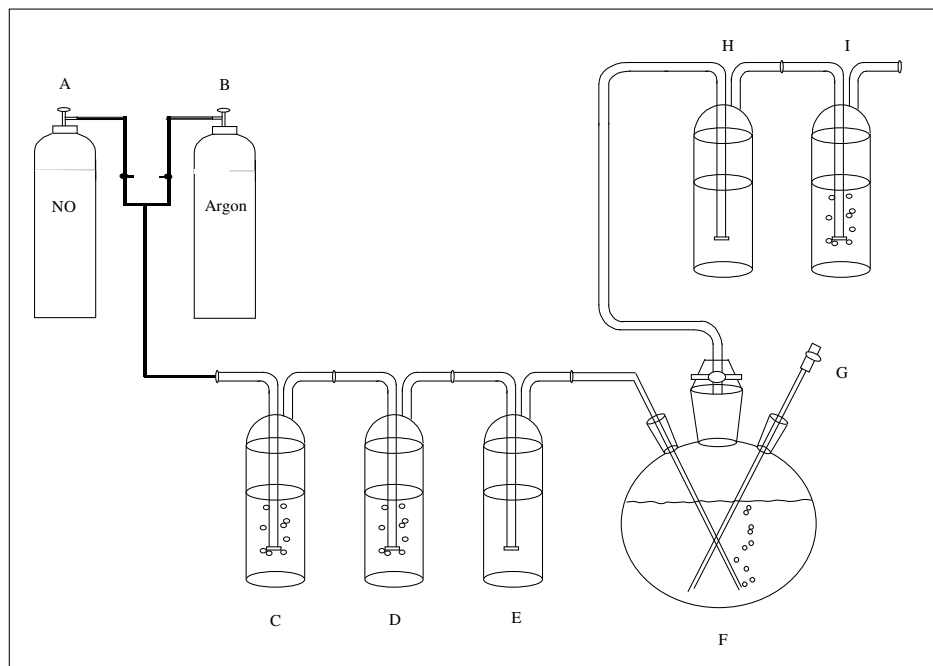
Zur Untersuchungen des Metabolismus von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma sind wässrige NO-Standards von großer Bedeutung. Durch Sättigung physiologischer Kochsalzlösung mit NO-Gas wurde die reproduzierbare Herstellung steriler NO-Standards erreicht<sup>70</sup>.

Hierzu diente ein gasdichtes System, welches aus je einer NO- und Argongasflasche, fünf Waschflaschen und einem Dreihalsrundkolben bestand (vgl. Abbildung 3). Die Gasflaschen waren über Stahlkapillaren mit einer Waschflasche (C) verbunden, die Pyrogallol (5%, Merck, Darmstadt, Deutschland) in gesättigter Kaliumhydroxidlösung (KOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt. Dieses musste aufgrund seiner Lichtempfindlichkeit durch Abschirmung gegen Lichteinfall geschützt werden. Das Durchströmen der mit Pyrogallol gefüllten Waschflasche diente der Entfernung von Sauerstoffresten aus Argon. Durch eine zweite Waschflasche (D) mit 20%iger Kaliumhydroxidlösung wurde die Lösung höherer Stickoxide erreicht. Zur Vermeidung eines Übertrittes der Kaliumhydroxidlösung bei höherem Druck in den Rundkolben wurde eine dritte leere Waschflasche (E) angeschlossen. In dem folgenden Dreihalsrundkolben fand der eigentliche Lösungsvorgang von NO in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl, 0,9%) mit einem pH-Wert von 7,4 statt. Über ein Steigrohr (G) mit einem Dreiwegehahn mit Luer-Lock-Anschluß konnte die gesättigte Lösung entnommen werden. Zwei weitere wassergefüllte Waschflaschen (H, I) schützten das System nach der Begasung vor Lufteintritt und dienten zudem dem Aufbau eines geringen Überdrucks im System. Nach sorgfältiger Spülung aller Glasgeräte mit Natriumhydroxid, hochreinem Wasser für die Chromatographie und schließlich mit physiologischer Kochsalzlösung wurde das System zunächst zur Entfernung von Sauerstoff für 60 Minuten mit Argon

(99.998%; N5.0, Linde, Düsseldorf, Deutschland) begast. Daran schloß sich die 60minütige Begasung mit NO-Gas (99.5%; N3.0, Linde, Düsseldorf, Deutschland) zur Sättigung der im Rundkolben befindlichen Kochsalzlösung an. Die Abnahme der gesättigten NO-Lösung erfolgte sodann aus dem Rundkolben über einen Sterilfilter (0.2µm Filter, Millipore, Eschborn, Deutschland) in zuvor mit Argon begaste gasdichte Spritzen.

Die Stickstoffmonoxid-Konzentration der Lösung wurde mittels Gasphasen-Chemilumineszenz bestimmt. Sie lag bei  $1.5 \pm 0.2$  mM. Die Lösung wurde innerhalb 1-3 Stunden benutzt.





**Abbildung 3:** Anlage zur Herstellung wässriger NO-Standards. Die Anlage bestand aus je einer NO- (A) und Argongasflasche (B), drei Waschflaschen (C, D, E), einem Dreihalsrundkolben (F) sowie zwei weiteren Waschflaschen (H, I). Die Waschflasche (C) war mit Pyrogallol in gesättigter KOH-Lösung, die Waschflasche (D) mit 20%iger KOH-Lösung gefüllt. Die Waschflasche (E) verhinderte den Übertritt von KOH in den Rundkolben (F), in dem die Lösung des NO-Gases in 0,9% NaCl (pH 7,4) bis zur Sättigung stattfand.

#### 2.1.4 Aufbereitung plasmatischer Proben

Zur Gewinnung von Plasmaproben erfolgte die Blutabnahme an einer antekubitalen Vene von gesunden Probanden. Das entnommene Blut wurde unmittelbar nach Entnahme in ein heparinisiertes Röhrchen überführt (Heparin: 10IE/ml; Liquimin N5000, Wirkstoff: Heparinnatrium, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach Wyhlen, Deutschland; PP-Röhrchen 50ml, steril: Cellstar<sup>®</sup>, Greiner Labortechnik, Deutschland). Durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 800 g und 37°C wurde das Plasma separiert. Je nach Versuch erfolgte dann die Zugabe wässriger NO-Standards und die Inkubation bei 37°C. Zur Beendigung der Inkubation wurde das Plasma in einer auf 4°C gekühlten

Kochsalzlösung mit 5mM N-Ethylmaleinimid (NEM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Da NEM Sulphydrylgruppen der Thiole alkyliert, stehen diese nicht mehr für die Bildung von S-Nitrosothiolen zur Verfügung. Dadurch wurden sowohl Transnitrosierungsreaktionen und damit der Abbau von gebildeten Nitrosothiolen als auch artifizielle Nitrosierungsreaktionen verhindert<sup>90;127</sup>. Bei Versuchen zum Metabolismus von NO *in vivo* erfolgte sofort nach Entnahme der Proben die Verdünnung durch die 5mM NEM-Lösung (Verhältnis 1:5) und nachfolgend die Plasmaseparation bei 4°C.

Nach Aliquotierung wurden die lichtgeschützten und eisgekühlten Proben zur Bestimmung von Nitrit und S-Nitrosothiolen sofort mittels Chemilumineszenz vermessen.

Die Bestimmung des Nitratgehaltes der Proben mittels HPLC erfolgte im Ultrafiltrat des Plasmas. Dazu wurden die Proben nach der Separation des Plasmas, der Inkubation mit NO-Standards und der Verdünnung mit NEM ultrazentrifugiert. Dazu wurde Plasma in Ultrazentrifugationsröhrchen (Centrisart 1, cut-off 20 kD, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) 30 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Ultrafiltrat wurde darauf der Analytik zugeführt oder aber bei -80°C für maximal vier Wochen tiefgefroren.

## **2.2 Angiologische Untersuchungsmethoden zur Bestimmung hämodynamischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid**

Nach der Gewinnung der Daten zum Metabolismus von authentischem NO *in vitro* schlossen sich Versuche zum Abbau von NO *in vivo* an. Es wurde der oxidative und nitrosative Metabolismus von authentischen NO-Standards im Plasma des Menschen innerhalb des Gefäßbettes und damit auch unter Anwesenheit von Erythrozyten untersucht. Dazu wurden NO-Standards intravasal appliziert und anschließend entnommene Blutproben der Analytik zugeführt. Gleichzeitig erfolgte die Messung einer biologischen vasodilatatorischen Wirkung von NO und seiner Metabolite

bei intravasaler Applikation. Dies wurde an großen Leitungsgefäßen durch sonographische Messung des Diameters der Arterie, an Widerstandsgefäßen der Mikrozirkulation durch die Bestimmung von Veränderungen des Unterarmblutflusses bestimmt.

Die Messungen zur glattmuskulär vermittelten Gefäßdilataion durch NO erfolgten am Modell der Unterarmzirkulation an einem angiologischen Messplatz. Es wurden zunächst lokale Effekte an der Unterarmzirkulation untersucht. Schließlich folgten Untersuchungen zu systemischen Wirkungen von NO, bei denen Veränderungen von Blutfluss und plasmatischer Konzentration der NO-Metabolite am kontralateralen Arm untersucht wurden.

Die Quantifizierung des Unterarmblutflusses als Ausdruck der Tonusänderung der antebrachialen Widerstandsgefäße erfolgte durch die nachfolgend beschriebene Untersuchungsmethode der Venenverschlußplethysmographie (VVP). Der enddiastolische Diameter der Arteria brachialis beziehungsweise radialis wurde stellvertretend für die Dilatation der Makrostrombahn sonographisch gemessen.

### 2.2.1 Venenverschlußplethysmographie

Die Dilatation arterieller Widerstandsgefäße äußert sich in einer Zunahme des Unterarmblutflusses (Forearm blood flow = FBF in ml/min/100ml Gewebe). Dieser wurde mittels Venenverschlußplethysmographie gemessen.

Dazu wurden im Bereich des größten Umfanges des Unterarmes quecksilberhaltige Dehnungsmessstreifen leicht verschieblich angelegt. Der Arm wurde im Bereich des Handgelenkes und des Ellenbogens in gestreckter Position hochgelagert, um ein Aufliegen der Messstreifen zu vermeiden. Am Oberarm wurde eine Druckmanschette angebracht, die alle 10 Sekunden für die Dauer von 5 Sekunden einen Druck von 40 mmHg aufbaute. Bei erhaltenem arteriellen Einstrom wurde auf diese Weise der venöse Rückstrom unterbunden. Die dadurch entstehende

Umfangzunahme des Unterarmes wurde durch die Dehnungsmessstreifen erfasst. Der angeschlossene Plethysmograph (Periquant 3800, Guttman-Medizinelektronik, Eurasburg, Deutschland) berechnete aus der Umfangszunahme durch einen Algorithmus den Unterarmblutfluss<sup>43;44</sup>. Die FBF-Messwerte wurden nach Datenglättung mit der Methode des gleitenden Mittels als Abweichungen vom Basalwert bestimmt<sup>66</sup>. Bereits zuvor durchgeführte methodische Untersuchungen erwiesen eine Intra- und Interobservervariabilität von <10% des Mittelwertes auf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen zwei Untersuchern nachgewiesen werden.

### 2.2.2 Hochauflösende digitalisierte Duplexsonographie

Dilatative Effekte von Stickstoffmonoxid auf die großen Leitungsgefäße des humanen Kreislaufs äußerten sich in der Änderung des Diameters der Arterien. Dieser wurde duplexsonographisch an der Arteria brachialis beziehungsweise radialis bestimmt (Ultraschallgerät: Agilent Sonos 5500, Agilent Technologies, Andover, MA, USA). Mit einem 15 MHz Schallkopf wurde bei Versuchen zur lokalen Wirkung von NO die Arteria radialis des nicht dominanten Armes im B-Modus längs etwa 2 bis 10 cm distal der Ellenbeuge dargestellt. Bei Versuchen zur systemischen Wirkung erfolgte die Messung an der Arteria brachialis des dominanten Armes etwa 2 bis 7 cm proximal der Ellenbeuge. Die Eindringtiefe des Ultraschalls wurde auf 3 cm festgelegt. Die Bestimmung des Gefäßdiameters erfolgte an einem Segment der Arterie, das auf Grund anatomischer Marker wie zum Beispiel Faszien reproduzierbar sonographiert werden konnte und sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand gut vom Lumen abgrenzbar waren. Der Kontrast des Übergangs zwischen Arterienlumen und Arterienwand wurde durch Veränderung der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen ebenso optimiert wie der Bildausschnitt. Nach Markierung der Schallkopfposition am Arm, wurden weder die Position des Schallkopfes

noch die Geräteeinstellungen während der gesamten Untersuchung verändert. Der Arterien Durchmesser wurde zwischen der anterioren und posterioren „M“-Linie, die den Übergang von Media und Adventitia des Gefäßes markiert, bestimmt. Alle Messungen wurden auf optomagnetischen Platten (MOD) gespeichert, an einen PC übertragen und in ein Standard-TIFF-Format konvertiert. Der Arterien Durchmesser wurde sodann durch ein automatisches PC-gestütztes Analysesystem (Brachial Analyzer 3.1, Medical Imaging Applications, Iowa City, IA, USA) enddiastolisch bestimmt<sup>83</sup>. In vorausgegangenen Untersuchungen wurde für dieses PC-gestützte Analysesystem eine niedrigere Variabilität im Vergleich zur manuellen Auswertung erwiesen. Die mittlere Inter-Observer-Differenz lag bei  $0,8 \pm 0,4\%$ , die Intra-Observer-Differenz bei  $0,8 \pm 0,6\%$  und die Tag-zu-Tag-Differenz bei  $1,3 \pm 0,9\%$ <sup>111</sup>.

### 2.2.3 Nichtinvasive Bestimmung des Blutdrucks

Bei Versuchen, die eine Anlage eines arteriellen Katheters erforderten, erfolgte die Bestimmung des Blutdruckes und der Herzfrequenz über den angeschlossenen Druckwandler (Sirecast 380, Siemens, Stuttgart, Deutschland). War kein arterieller Katheter erforderlich, so wurde der Blutdruck und die Herzfrequenz nichtinvasiv mittels eines Finapres-Gerätes bestimmt (Finapres<sup>®</sup>, TNO Biomedical Instrumentation, Amsterdam, Niederlande). Der Blutdruck der digitalen Arterien wurde hierbei nach der Volumen-Klemm-Methode nach Peñáz<sup>105;110;154;155</sup> gemessen. Um den Mittelfinger und Ringfinger der dominanten Hand wurde dem Probanden je eine Druckmanschette gelegt. Ein in die Druckmanschette eingelassener photoelektrischer Transmissions-Plethysmograph erfasste die Größe der digitalen Arterien. Bei Größenzunahme der Arterien durch einen Blutdruckanstieg wurde durch eine größere Blutmenge im Gefäß mehr Licht absorbiert und weniger Licht erreichte die Photodiode. Ein Servosystem reagierte bei dieser Abweichung von einem zuvor eingestellten Basalwert durch Steigerung

des Manschettendruckes, der auf diese Weise das vermehrte Blut innerhalb der Arterie wieder auspresste. So wurden Blutvolumen und Arterien Durchmesser konstant gehalten, wohingegen der Manschettendruck dem arteriellen Blutdruck des Fingers folgte. Die Differenz zwischen Blutdruck und Manschettendruck, der transmurale Druck, wurde demnach bei null gehalten. In diesem Zustand war die Arterienwand nicht gedehnt. Die Einstellung des Eichpunktes, an dem der Blutdruck dem extravasalen Druck entsprach, erfolgte automatisch. Der Manschettendruck verharrte dazu bei einem Wert zwischen diastolischem und systolischem Blutdruck. Durch die arterielle Druckwelle veränderten sich Blutvolumen und transmuraler Druck weiterhin. Diese Änderung wurde durch den Plethysmographen erfasst, durch einen geräteeigenen Algorithmus bewertet und anhand der Amplitude und Form des Plethysmogramms ein Basalwert errechnet. Diese Eichung erfolgte alle 70 Herzschläge automatisch erneut, da Änderungen in Tonus der glatten Muskulatur der Gefäße eine Änderung des Basalwertes bewirken können. Die Blutdruckmessung erfolgte abwechselnd an Mittel- und Ringfinger.

### **2.3 Aufbau und Anordnung des angiologischen Messplatzes**

In zwei verschiedenen Versuchsaufbauten wurden gefäßrelaxierende Wirkungen von NO auf Makro- und Mikrostrombahn ebenso wie die biochemische Konversion von NO im Plasma *in vivo* beim Menschen untersucht.

Ein Versuchsaufbau galt der Untersuchung lokaler Effekte von NO auf Leitungs- und Widerstandsgefäße. Hierbei wurde NO intraarteriell beim Menschen infundiert. Neben NO wurden auch die oxidativen und nitrosativen Abbauprodukte von NO, Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiole, sowie saline Kontrollen randomisiert doppelblind infundiert. Die vasodilatatorischen Effekte wurden lokal am ipsilateralen Arm durch Messung von Unterarmblutfluss und Diameter der Arteria radialis

bestimmt. Die Konversion von NO im Plasma wurde durch biochemische Analyse des venös am selben Arm abgenommenen Blutes untersucht.

Durch venöse Applikation und Bestimmung biochemischer und angiologischer Parameter am kontralateralen Arm wurden in einem weiteren Versuchsaufbau systemische Veränderungen durch Gabe von NO und seiner Konversionsprodukte untersucht.

Die Untersuchungen wurden an gesunden Probanden durchgeführt. Diese waren Nichtraucher und boten in klinischer Untersuchung und Routinelabormessung keine Hinweise auf bestehende oder frühere kardiovaskuläre Erkrankungen oder akute Infektionen. Die Probanden waren zum Zeitpunkt der Untersuchung nüchtern und hatten in den vorangehenden 12 Stunden keine koffeinhaltigen Getränke zu sich genommen. Die Versuche fanden vormittags in einem klimatisierten Raum bei 21°C statt.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethik-Kommission der Heinrich-Heine-Universität geprüft und alle Personen gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

### 2.3.1 Studienprotokoll zur intraarteriellen Applikation von NO

Am Modell der Unterarmzirkulation wurden die lokalen dilatatorischen Effekte von NO auf das Gefäßsystem untersucht. Nach Überprüfung des Palmarkreislaufes durch den Allen-Test<sup>32;122</sup> wurde die Arteria brachialis am nichtdominanten Armes der Probanden steril punktiert. Die Punktion erfolgte in Lokalanästhesie durch 2%ige Lidocain-Lösung unter Verwendung eines 2F-Katheters (Typ 115.09 Vygon, Écouen, Frankreich). An den Katheter angeschlossen wurde ein Injektionszwischenstück (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und ein Dreiwegehahn (Discofix-3, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) (vgl. Abbildung 4). Letzterer diente der kontinuierlichen Durchspülung des Kathetersystems mit heparinisierter 0,9%iger Kochsalzlösung (1000 I.E. Heparinnatrium auf 100 ml 0,9%ige

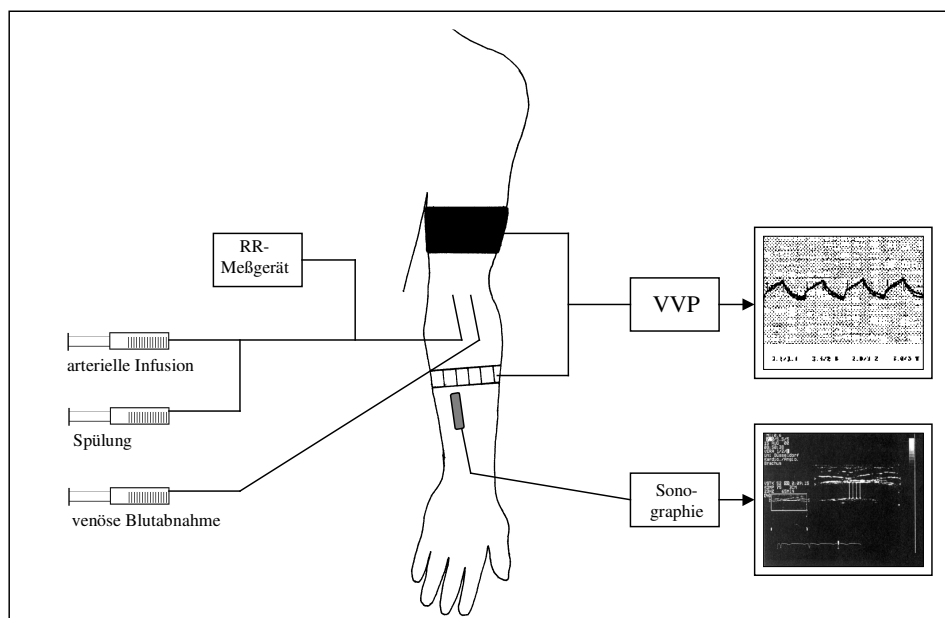
NaCl-Lösung) mit einem Fluss von 1,0 ml/min. Das Injektionszwischenstück diente der intraarteriellen Infusion von NO und seinen nitrosativen und oxidativen Abbauprodukten mittels eines Perfusors (Graseby Medical, Watford, England). An den verbliebenen freien Schenkel des Drei-Wege-Hahnes wurde ein Druckwandler (Sirecast 380, Siemens, Stuttgart, Deutschland) angeschlossen, der Blutdruck und Herzfrequenz erfasste.

Ipsilateral wurde während der Infusion der Diameter der Arteria radialis distal des Katheters kontinuierlich mittels digitalisierter hochauflösender Duplexsonographie gemessen. Ebenfalls am ipsilateralen Arm erfolgte die Bestimmung der lokalen Veränderungen des Unterarmblutflusses mittels Venenverschlußplethysmographie. Zur Untersuchung des intravasalen Metabolismus von NO in der lokalen Zirkulation wurden am ipsilateralen Arm venöse Blutproben entnommen. Dies erfolgte aus einer Venenverweilkanüle (Venflou<sup>®</sup> 2,  $\varnothing$  1,2 mm, Ohmeda, Erlangen, Deutschland) aus der Vena mediana cubiti. Die Blutentnahmen erfolgten vor Beginn der Infusion sowie 15, 30, 45 und 60 Sekunden nach Beginn der einminütigen Infusion.

In die Arteria brachialis wurden bei drei Probanden wässrige Standards von NO in einer Dosis von  $36\mu\text{mol}/\text{min}$  über eine Minute appliziert. Um vasodilatatorische Effekte der Abbauprodukte von NO auszuschließen, wurde Nitrit und Nitrat (je  $36\mu\text{mol}/\text{min}$ ), nach dem selben Schema infundiert und ihr Effekt auf Leitungs- und Widerstandsgefäße vermessen. Desweiteren wurde S-Nitrosoglutathion (GSNO), ein exogenes niedrigmolekulares Nitrosothiol, appliziert. Es wurden  $5\text{nmol}/\text{min}$  GSNO über fünf Minuten infundiert. Diese Dosis konnte in Voruntersuchungen ohne systemische Nebenwirkungen hervorzurufen appliziert werden<sup>20</sup>. Ebenso wurden volumenangepasste Mengen physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle appliziert. Bei allen Applikationen wurden hämodynamische Veränderungen in gleicher



Weise ipsilateral erfasst. Alle Applikationen und Auswertungen erfolgten doppelblind und randomisiert.



**Abbildung 4:** Aufbau des angiologischen Messplatzes bei intraarterieller Infusion zur Untersuchung lokaler angiologischer und biochemischer Veränderungen durch NO. Bei intaktem Palmarkreislauf wurde die Arteria brachiales punktiert. Am selben Arm erfolgte die Messung des Unterarmblutflusses, des Diameters der Arteria radialis sowie die venöse Blutabnahme aus der Vena mediana cubiti.

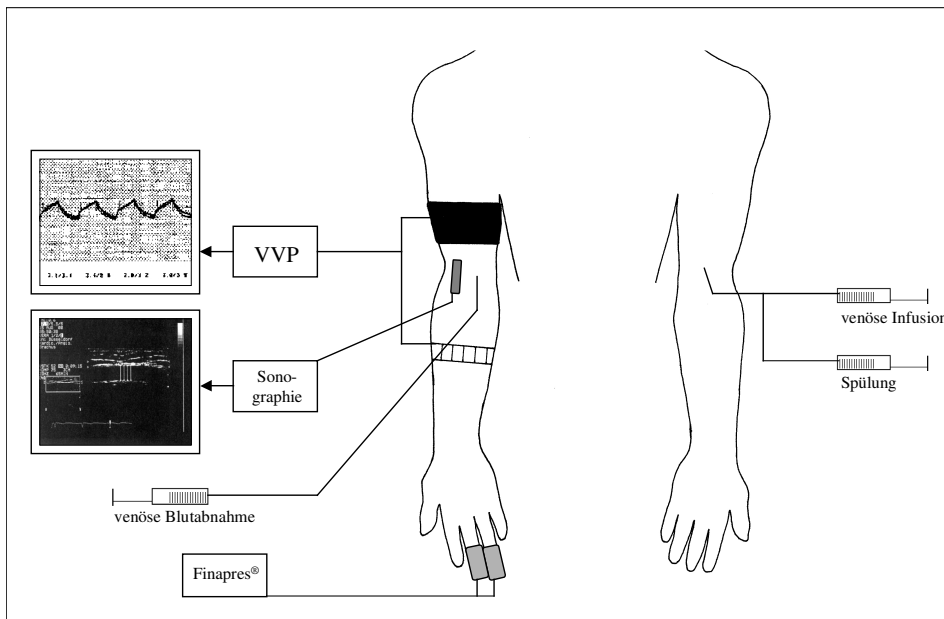
### 2.3.2 Studienprotokoll zur intravenösen Applikation von NO

Nach der beschriebenen Untersuchung lokaler biochemischer und hämodynamischer Effekte von NO und seiner Konversionsprodukte an der arteriovenösen Gefäßpassage des Unterarms schlossen sich Untersuchungen zu einer möglichen systemischen Wirkung von Stickstoffmonoxid an. Bei venöser Gabe von NO erfolgte erst nach Verteilung der applizierten Substanz im Körperkreislauf die Bestimmung angiologischer und biochemischer Veränderungen am kontralateralen Unterarm. Für die Applikation von NO wurde die Vena mediana cubiti des nichtdominanten Armes des Probanden mit einer Venenverweilkanüle (Venflou<sup>®</sup> 2,  $\varnothing$  1,2 mm, Ohmeda, Erlangen, Deutschland) punktiert. An

die Verweilkanüle wurde ein Injektionszwischenstück zur Infusion und ein Dreiwegehahn zur Spülung mit heparinierter physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen.

Es wurden je 30  $\mu\text{mol}$  (entsprechend einer Dosis von 0,4-0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  KG) an NO (n=6), Nitrit und Nitrat (je n=3) sowie 1  $\mu\text{mol}$  GSNO (n=6) intravenös neben salinen Kontrollen als Bolus randomisiert und doppelblind appliziert.

Nach der Verteilung einer der applizierten Substanzen im Gefäßsystem erfolgte am kontralateralen, dominanten Arm die venöse Blutabnahme. Die Blutproben wurden durch eine in einer antekubitalen Vene liegenden Butterfly-Kanüle ( $\varnothing$  0,8 mm, Abbott, Sligo, Irland) entnommen. Die Entnahme venöser Blutproben zur biochemischen Analyse erfolgte ebenfalls kontralateral vor der Bolusgabe sowie nach 2, 5 und 10 Minuten. Am kontralateralen Arm wurden mögliche hämodynamische Veränderungen durch die Gabe von NO-Standards und der Metabolite des NO erfasst. Es erfolgte die kontinuierliche Bestimmung des Diameters der Arteria brachialis sowie des FBF. Herzfrequenz und Blutdruck wurden mittels der beschriebenen Finapres-Methode an diesem Arm bestimmt.



**Abbildung 5:** Aufbau des angiologischen Messplatzes bei intravenöser Infusion zur Untersuchung systemischer angiologischer und biochemischer Veränderungen durch NO. Am nichtdominanten Arm erfolgte die Applikation von NO in die Vena mediana cubiti. Nach systemischer Verteilung erfolgte die Messung des Unterarmblutflusses, des Diameters der Arteria radialis sowie die venöse Blutabnahme aus der Vena mediana cubiti am kontralateralen Arm.

## 2.4 Mathematisch-statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Versuchsdaten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Willers, Universitätsrechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität. Alle statistischen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Änderungen im Diameter der Arteria brachialis, im Unterarmblutfluß, in Herzfrequenz und Blutdruck wurden mit dem nicht parametrischen Wilcoxon-Test analysiert. Änderungen der Plasmakonzentration von Nitrosothiolen, Nitrit und Nitrat wurden durch den Mann-Whitney-U-Test ausgewertet. Als statistisch relevant galt im zweiseitigen Test ein p-Wert  $\leq 0,05$ . Zur Analyse diente das Computerprogramm SPSS® 10.0 für Windows.

Die graphische Darstellung der Daten und die lineare Regression, insbesondere zur Erstellung der Eichgeraden der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion und des HPLC-Systems wurden mit Hilfe des Computerprogramms MicroCal Origin<sup>®</sup> (Version 6.0, MircoCal Software Inc., Northampton, MA, USA) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Entwicklung und Validierung einer Gasphasen-Chemilumineszenz-Methode zur Bestimmung von Nitrit und S-Nitrosothiolen

S-Nitrosothiolen kommt als Speicher- und Transportform von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma möglicherweise eine Rolle in der Vermittlung der biologischen Wirkung von NO zu<sup>124</sup>.

Die zunächst von Stamler et al.<sup>137</sup> 1992 beschriebenen basalen Konzentrationen von Nitrosothiolen im Plasma des Kaninchens lagen bei etwa 7  $\mu\text{M}$ . Neuere Studien belegten hingegen eine Plasmakonzentration von endogenen Nitrosothiolen im nanomolaren Bereich<sup>13;90;123;146</sup>. Diese Diskrepanz gründet einerseits eventuell in Speziesunterschieden, wahrscheinlicher jedoch ist sie durch die verschiedenen angewandten, teils nicht für Nitrosothiole spezifischen Methoden zur Bestimmung der niedrigen Nitrosothiolkonzentration im Plasma zu erklären.

Eine sensitive Methode zur Messung der niedrigen Konzentrationen von S-Nitrosothiolen in biologischen, plasmatischen Proben wurde von der Arbeitsgruppe Marley et al. im Jahre 2000 beschrieben<sup>90</sup>. Durch ein reduzierendes Agens als Reaktionslösung wird mit dieser Methode sowohl aus Nitrit<sup>18</sup> als auch aus Nitrosothiolen stöchiometrisch NO freigesetzt. Das freigesetzte NO kann mittels der in Abschnitt 2.1.1 beschriebenen Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion gemessen werden. Diese von Marley et al. beschriebene Methode wurde weiterentwickelt und etabliert. In der Herstellung der Reaktionslösung sowie im Vorgehen bei der Probenaufgabe wurden Veränderungen vorgenommen. So wurde die Zusammensetzung der iodhaltigen Reaktionslösung verändert. Die 2000 beschriebene Reaktionslösung enthielt 100 mg Kaliumiodid gelöst in 8 ml Essigsäure. Die zugesetzte Essigsäure wurde reduziert auf 5,5 ml, zusätzlich jedoch 0,2 M  $\text{I}_2$  zugesetzt. Nach der Methode nach Marley musste eine Minute vor

Aufgabe der Probe 200 mM Kupfer(II)sulfat in die auf 70°C erwärmte Reaktionslösung injiziert werden. Bei der Validierung der Methode erwies sich jedoch mit der veränderten Reaktionslösung die Zugabe von Kupfer(II)sulfat als nicht nötig, da weder Spezifität, Sensitivität oder Wiederfindung durch Verzicht auf die Kupfer(II)sulfat-Zugabe verändert wurden. Hingegen verbesserte die Erhitzung der Reaktionslösung auf 95°C statt 70°C die Wiederfindung von Nitrit und S-Nitrosothiolen. Auch ein Zusatz von schaumreduzierenden Reagenzien, wie von Marley beschrieben, war bei Verwendung der veränderten Reaktionslösung nicht nötig. Ebenso war kein Wechsel der Reaktionslösung nach jeder Probeninjektion nötig, sondern es konnten etwa 15 wässrige Proben eines Volumens von 100 – 110 µl aufgegeben werden, ohne dass es zu einer Veränderung der Form des Ausschlags oder der Wiederfindung kam. Plasmaproben führten jedoch durch redoxaktive Bestandteile schneller zu einem Verbrauch der reduzierenden Lösung, so dass diese nach Aufgabe von etwa 10 Proben ausgewechselt werden musste. Proben mit Hämoglobinbestandteilen führten zu einer Abflachung des Signals nicht jedoch zu einer Veränderung der Fläche unter der Kurve, die zur Bestimmung von Nitrit- und S-Nitrosothiolgehalt herangezogen wurde, so dass auch hämoglobinhaltige Proben zuverlässig vermessen werden konnten. Jedoch war für diese Proben ein Wechsel der Reaktionslösung nach dreimaliger Aufgabe nötig. Die Messgenauigkeit wurde nicht durch vorherige Injektion größerer Mengen von Nitrit oder S-Nitrosoalbumin beeinflusst.

Sowohl für Nitrit als auch für Nitrosothiole war das gemessene Signal direkt proportional zur injizierten Menge, wobei die Anlage sowohl für Volumen als auch für Konzentration sensibel war. Es wurde keine Abweichung von der Linearität für den Bereich von 0 bis 1200 nM beobachtet.

Die Fläche unter der Kurve, nicht jedoch die Höhe des Ausschlags korrelierte mit der injizierten Menge von Nitrit und Nitrosothiolen, da die

Höhe des Ausschlags von der Geschwindigkeit der Injektion, der Mischung mit dem denitrosierenden Reagens und der Geschwindigkeit der Reduktion abhängig ist.

Durch Reinigung aller Glasbestandteile, Plastikschläuche und anderer Bestandteile der Anlage mit Ethanol und demineralisiertem Wasser für die Chromatographie konnte eine geringe gemessenen Basalkonzentration an Nitrit weiter reduziert werden. Der Durchfluss des Heliumgases, welches das Reaktionsgefäß durchströmt, musste konstant gehalten werden. Ein Fluss von 100 – 200 ml/min erwies sich als guter Kompromiss zwischen optimaler Sensitivität (niedriger Gasfluss) und schneller Analyse (hoher Gasfluss). Etwa 20 – 30 Proben konnten mit dieser Methode pro Stunde gemessen werden.

Um eine artifizielle Nitrosierung von reduzierten Sulfhydrylgruppen der Plasmaproteine durch Nitrit und damit eine artifizielle Nitrosierung zu verhindern, wurde allen Proben wie in Abschnitt 2.1.4 beschrieben unmittelbar nach Entnahme beziehungsweise Inkubation N-Ethylmaleimid zugesetzt<sup>136</sup>. Um die Effektivität dieser Probenaufbereitung zu überprüfen, wurden Proben vor Inkubation mit authentischen NO-Standards mit 10 mM NEM versetzt. Die Inkubation erfolgte anschließend bei 37°C für 5 Minuten mit NO-Standard einer Endkonzentration von 65µM. Die Bildung von S-Nitrosothiolen konnte durch die Alkylierung der Sulfhydrylgruppe der Plasmathiole durch NEM zu 95% verhindert werden.

Vorangegangene Studien<sup>64</sup> legten nahe, dass es sich bei dem größten Teil der nitrosierten Substanzen in humanem Plasma um S-nitrosiertes Serumalbumin handelt. Es wurden daher keine weiteren Untersuchungen zur positiven Identifizierung von S-Nitrosoalbumin als Hauptanteil der gemessenen Nitrosothiole unternommen. In den folgenden Untersuchungen konnte jedoch auch gezeigt werden, dass sich die gemessenen Nitrosothiole hauptsächlich in den Plasmabestandteilen mit

hohem Molekülgewicht (>20kD) befinden (Abschnitt 3.2.2), welche zum größten Teil aus Albumin bestehen.

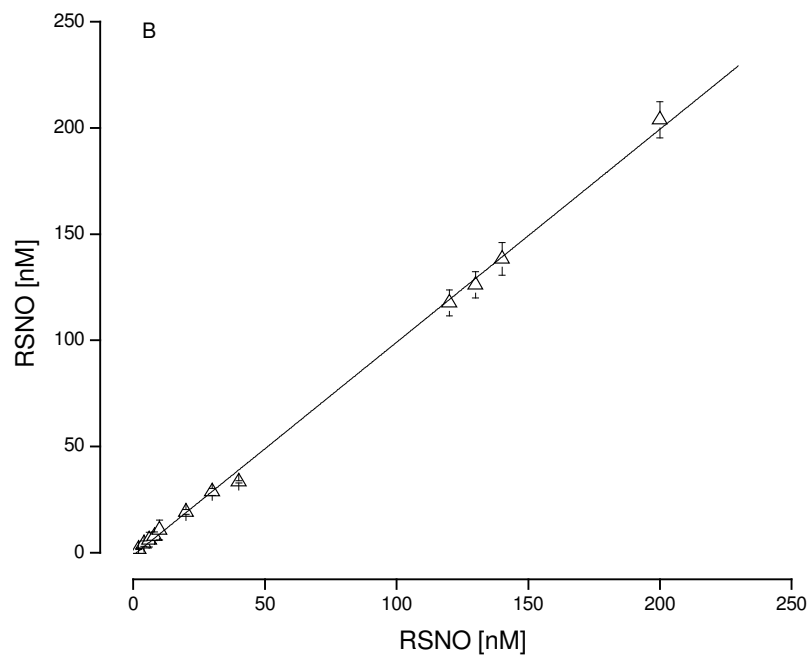
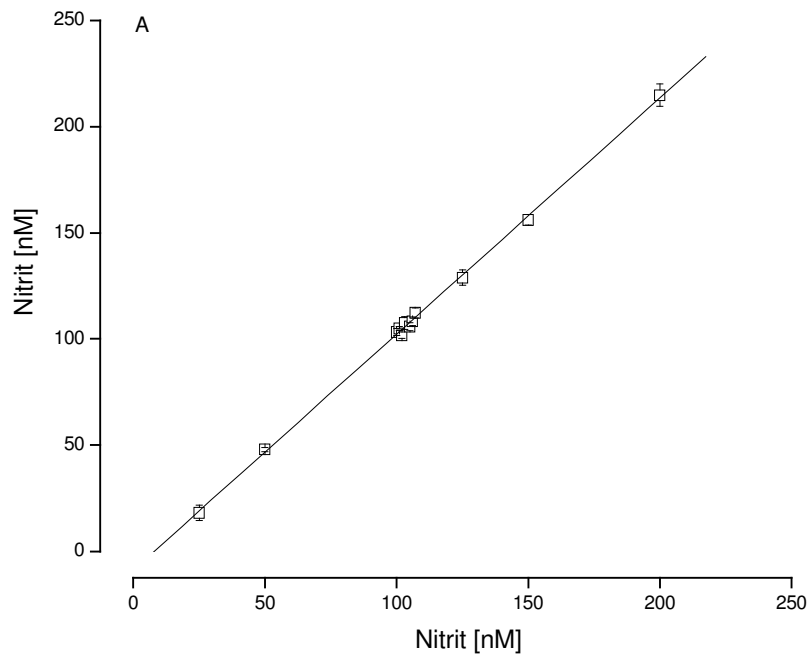
### 3.1.1 Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Linearität

Die Methode der Chemilumineszenz-Detektion ist besonders sensitiv für Nitrit und S-Nitrosothiole in physiologisch relevanten niedrigen nanomolaren Konzentrationen. Eine Linearität für die Messung von Nitrit und S-Nitrosothiolen konnte mit der beschriebenen Methode für den Konzentrationsbereich von 0 bis 1200 nM mit einem Korrelationskoeffizienten von >0,998 in wässrigen und plasmatischen Proben nachgewiesen werden. Die Sensitivität betrug für wässrige Proben 2 nM, für Plasmaproben 10 nM. Der Variationskoeffizient lag im Wässrigen für Konzentrationen über 100 nM bei 3%, für Konzentrationen unter 100 nM bei 6%. Für plasmatische Proben sind die entsprechenden Werte 6 beziehungsweise 10%.

### 3.1.2 Wiederfindungsraten für Nitrit und S-Nitrosothiole in wässriger Lösung und im Plasma

Die Wiederfindungsraten von Nitrit und Nitrosothiolen für wässrige Proben sind in Abbildung 6 dargestellt. In wässrigen Proben wurden  $100 \pm 10\%$  der aufgegebenen Konzentrationen von Nitrit wiedergefunden. In plasmatischen Proben waren es  $100 \pm 15\%$  (n=8). Die Wiederfindungsraten der Nitrosothiole lagen für wässrige Proben bei  $95 \pm 10\%$  und für biologische, proteinreiche Proben bei  $90 \pm 10\%$ .





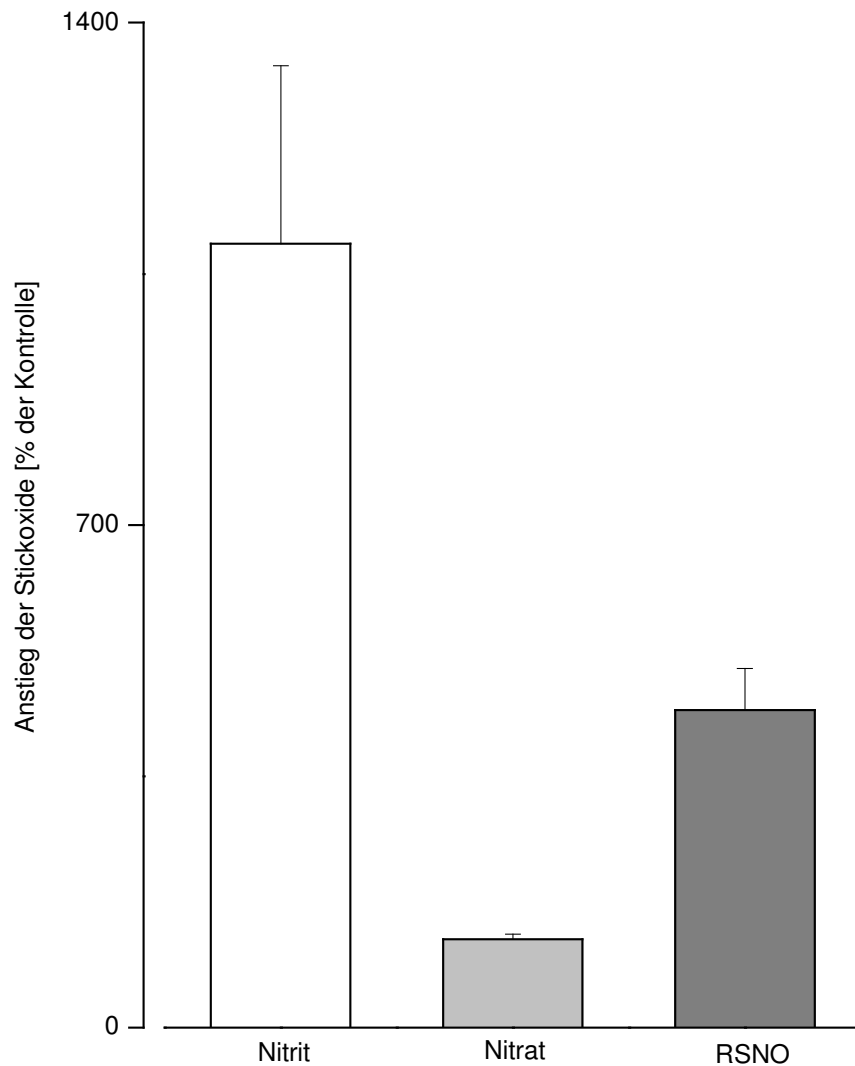
**Abbildung 6:** Wiederfindung von Nitrit und S-Nitrosothiolen (RSNO) in wässriger Lösung. Die ermittelten Parameter der Korrelation sind für Nitrit (Abb. A)  $a=-8,8834$ ,  $b=1,11187$  und  $r=0,99936$ . Für die Wiederfindung von Nitrosothiolen (Abb. B) sind diese Parameter  $a=-1,12935$ ,  $b=1,00282$  und  $r=0,99932$ .

## 3.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im humanen Plasma

### 3.2.1 Bildung von S-Nitrosothiolen, Nitrit und Nitrat nach Inkubation von Plasma mit NO-Standards

Durch die zuvor beschriebenen Methoden wurde frisch isoliertes humanes Plasma von nüchternen gesunden Probanden auf die Konzentrationen an Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen untersucht. Es wurden basale Werte von  $166 \pm 48$  nM Nitrit,  $16,4 \pm 2,3$   $\mu$ M Nitrat und  $12 \pm 4$  nM S-Nitrosothiole im humanen Plasma gemessen (n=7).

Lokale Stickstoffmonoxidkonzentrationen, die durch das Gefäßendothel freigesetzt werden, liegen nach neueren Studien im Bereich niedriger mikromolarer Konzentrationen<sup>67;69;89</sup>. Daher wurde humanes Plasma mit Endkonzentrationen von  $2\mu$ M NO-Lösung für 5 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  (n=7) inkubiert. NO wurde dabei zum größten Teil zu Nitrit abgebaut. Unter gleichen Bedingungen kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration der plasmatischen S-Nitrosothiole. Diese stieg signifikant auf  $242 \pm 58\%$  der Kontrolle (von  $12,14 \pm 0,933$  nM auf  $34,86 \pm 1,12$  nM). Die Nitritkonzentration stieg auf  $991 \pm 248\%$  des Basalwertes (von  $165,8 \pm 47,8$  nM auf  $869,4 \pm 137,6$  nM). Die Konzentration des Nitrats im Plasma stieg nicht signifikant (p=0,198) auf  $123 \pm 7\%$  der Kontrolle ( von  $16,3 \pm 2,7$  auf  $20,3 \pm 3,35$   $\mu$ M) (vgl. Abbildung 7).

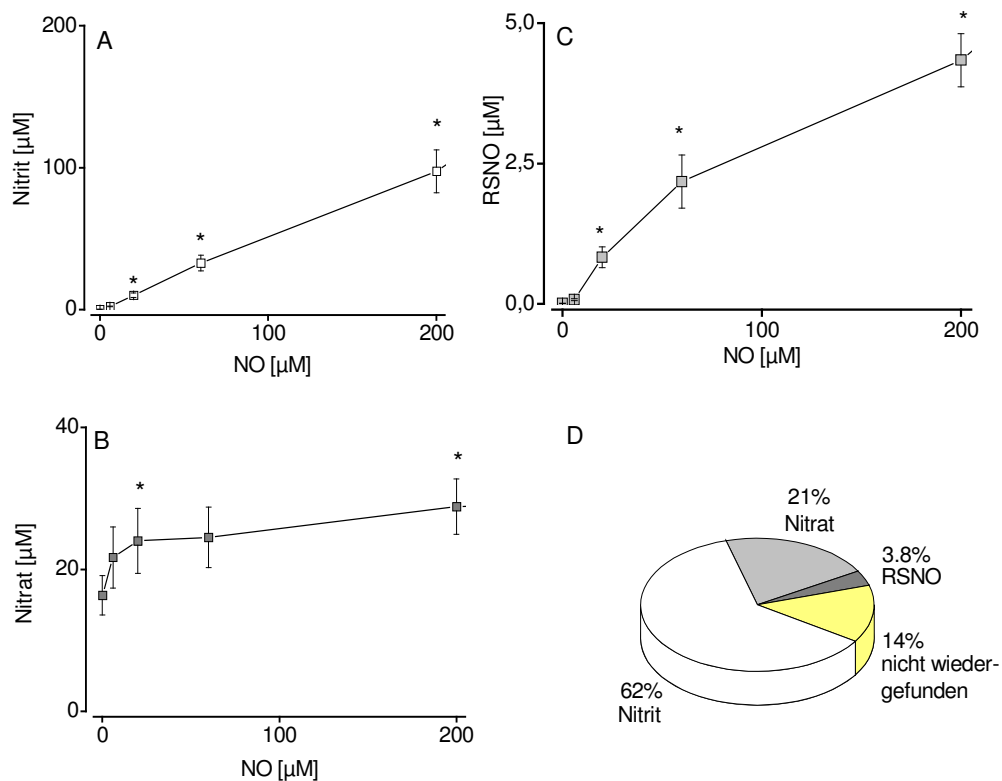


**Abbildung 7:** Inkubation von frischem humanem Plasma mit Endkonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$  NO führte zu einem signifikanten Anstieg der Konzentration der S-Nitrosothiole (RSNO) und des Nitrits sowie zu einem nicht signifikanten Anstieg ( $p=0,198$ ) der Nitratkonzentration ( $n=7$ ). Die Konzentrationen wurden unmittelbar nach fünfminütiger Inkubation mit wässrigen NO-Standards bestimmt.

Die Konversion von NO im humanen Plasma wurde unter verschiedenen Endkonzentrationen von zugesetzten NO-Standards untersucht. Dazu wurde humanes Plasma mit ansteigenden Konzentrationen von 6  $\mu\text{M}$  bis zu Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  inkubiert, welche weit über physiologischen Konzentrationen liegen ( $n=5$ ). Die Ergebnisse zeigen,

dass der Großteil des zugefügten Stickstoffmonoxids zu Nitrit oxidiert wird (vgl. Abbildung 8). Ein geringerer Anteil des applizierten NOs wurde zu Nitrat metabolisiert und etwa 4% des NOs führten durch Nitrosierung von Plasmathiolen zu einem signifikanten Anstieg der S-Nitrosothiolkonzentration (vgl. Abbildung 8C). Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten niedrigen Konzentrationen konnten jetzt in höheren Konzentrationen 8-25% des applizierten NOs nicht wiedergefunden werden.

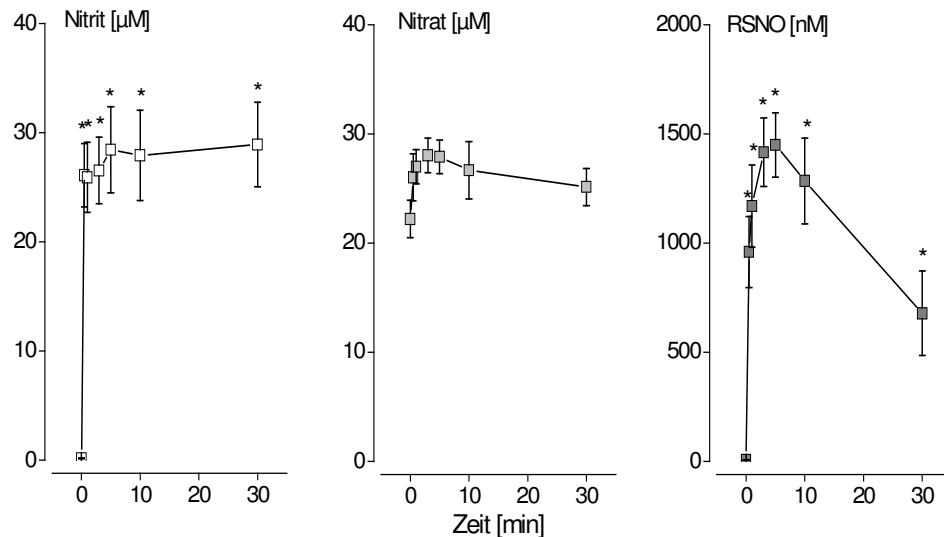
Nitrit zeigte bei Zugabe hoher NO-Konzentrationen einen linearen Anstieg (vgl. Abbildung 8A) wohingegen Nitrat und Nitrosothiole hyperbolisch anstiegen (vgl. Abbildung 8B und C). Auch in Konzentrationen, die weit über den physiologischen lagen, war der Pool der zur Bildung von S-Nitrosothiolen bereitstehenden Bindungsstellen im Plasma nicht sättigbar.



**Abbildung 8:** Konzentrationsabhängige Konversion von NO zu Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen (RSNO). Inkubation von Plasma mit ansteigenden Konzentrationen von NO (6-200  $\mu\text{M}$ ) für 5 Minuten führte zu konzentrationsabhängiger Bildung von Nitrit (Abb. A), Nitrat (Abb. B) und RSNO (Abb. C) ( $n=7$ ). Abbildung D zeigt die Aufteilung des applizierten NO auf die einzelnen Konversionsprodukte exemplarisch nach Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  NO und ist repräsentativ für den gesamten Konzentrationsbereich der Abb. A-C. \* markiert signifikante Änderungen vom Basalwert

Zur Darstellung der Dynamik der Konversion von NO zu den einzelnen Stickoxiden und Nitrosoverbindungen wurde ein Zeitverlauf von Bildung und Abbau der Metabolite erstellt. In fünf unabhängigen Versuchen wurde frisches humanes Plasma mit einer Konzentration von NO (40  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und die Bildung von Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen bei 37°C über einen Zeitraum von 30 Minuten bestimmt. Die Untersuchungen zeigten eine Zeitabhängigkeit der Nitrosothiolbildung (Abbildung 9). Zwar bildete sich der Großteil der S-Nitrosothiolen unmittelbar nach Zugabe des NO, ein Maximum wurde allerdings erst nach einer Inkubationszeit von etwa 5 Minuten erreicht. Darauf fiel die

Konzentration der Nitrosothiole um etwa 50% des Maximums im Verlaufe von 30 Minuten.

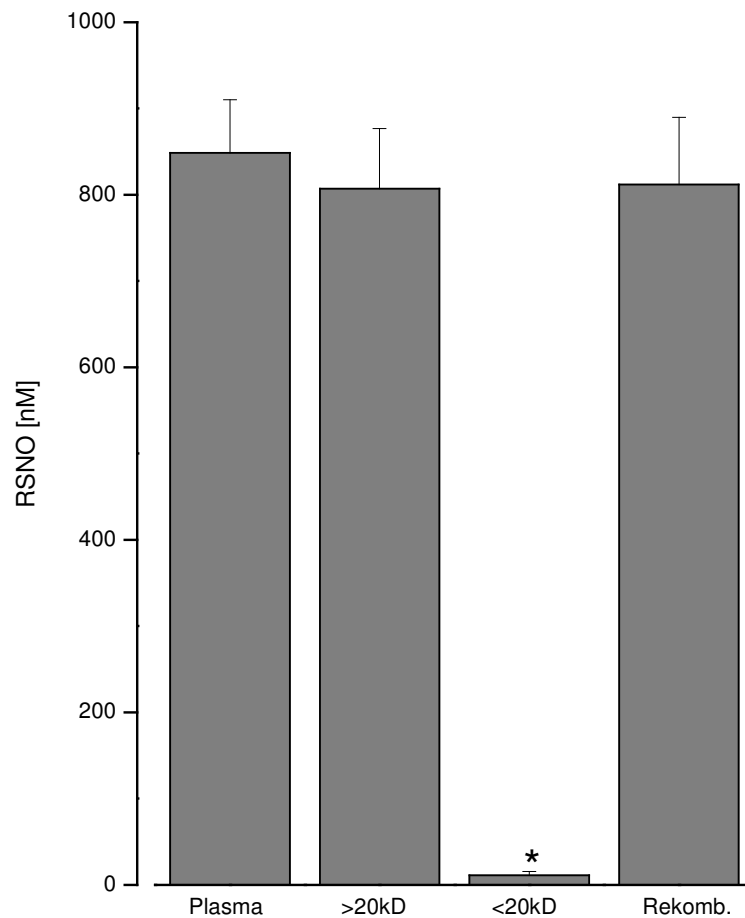


**Abbildung 9:** Zeitverlauf des Metabolismus von NO im humanen Plasma. Die Inkubation von Plasma mit NO (40 µM) führte zu einer raschen Bildung von Nitrit (links), Nitrat (Mitte) und S-Nitrosothiolen (rechts). Bei 37°C erreichte die RSNO Konzentration jedoch erst nach 5 Minuten Inkubationszeit ein Maximum, gefolgt von einem Abfall der Konzentration (n=5). \* markiert signifikante Änderungen vom Basalwert.

### 3.2.2 Fehlende Interaktion verschiedener Plasmakomponenten bei der Bildung von S-Nitrosothiolen

Weitere Untersuchungen zielten darauf ab, eine mögliche Interaktion zwischen niedrig- und hochmolekularen Plasmakomponenten bei der Bildung von S-Nitrosothiolen aufzuzeigen. Durch Ultrafiltration wurde Plasma in ein 20 kD Ultrafiltrat sowie eine Fraktion bestehend aus Proteinen mit einer Molekülmasse > 20kD aufgetrennt. Diese letztgenannte Fraktion setzt sich vornehmlich aus Albumin zusammen. Dem nativen Plasma, den beiden aufgetrennten Plasmafraktionen und den wiedervermengten Fraktionen wurde NO-Lösung in einer Endkonzentration von 16µM zugesetzt und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert (n=3). 95% der Nitrosoverbindungen, die im nativen Plasma

gemessen wurden, bildeten sich in der hochmolekularen Fraktion des Plasmas. Nur ein sehr geringer Anteil wurde im Ultrafiltrat gemessen (vgl. Abbildung 10). Der Gesamtanteil an Nitrosothiolen in den beiden Fraktionen belief sich auf  $96 \pm 8\%$  der Konzentration des nativen Plasmas. Bei Wiedervermischung der Fraktionen vor Inkubation mit NO, konnten annähernd die gleichen RSNO Konzentrationen wie im Nativplasma gemessen werden. Da auch in Abwesenheit der Proteine des Ultrafiltrats ein identischer Anteil der Nitrosothiole in der Fraktion des Plasmas mit einer relativen Molekülmasse  $> 20$  kD gebildet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Interaktion oder kooperativer katalytischer Effekt zwischen den verschiedenen Plasmaanteilen bei der Bildung von S-Nitrosothiolen besteht.



**Abbildung 10:** Fehlende Interaktion verschiedener Plasmakomponenten bei der Bildung von S-Nitrosothiolen im humanen Plasma. Humanes Plasma wurde durch Ultrafiltration mit einem 20 kD cut-off Filter aufgetrennt in eine Fraktion mit hoher Molekülmasse (>20kD) und ein Ultrafiltrat (<20kD). Das native Plasma, die beiden Fraktionen und die rekombinierten Plasmafraktionen (Rekomb.) wurden mit wässriger NO-Lösung inkubiert. Maximale RSNO Konzentrationen unterschieden sich in der Fraktion > 20kD und den rekombinierten Fraktionen nicht signifikant von denen des nativen Plasmas. (n=3) \* markiert signifikante Änderungen vom Basalwert.

### 3.3 Intravasale Applikation von authentischen NO-Standards in den humanen Kreislauf

Die Versuche zum Metabolismus von NO *in vivo* erfolgten an neun gesunden Probanden im Alter zwischen 23 und 31 Jahren und einem mittleren Alter von 26,5 Jahren. Die durchschnittliche Körpergröße betrug 172,3 cm, das mittlere Gewicht 62,6 kg.



Wässrige NO-Standards konnten gefahrlos beim Menschen sowohl intravenös als auch intraarteriell appliziert werden. Bei der *in vivo* Applikation von NO traten keine unerwünschten Nebenwirkungen wie Blutungskomplikationen, allergische Reaktionen, Schmerzempfindungen oder Ödeme auf. Die Nachuntersuchungen wurden unmittelbar nach NO-Applikation sowie drei Monate später durchgeführt.

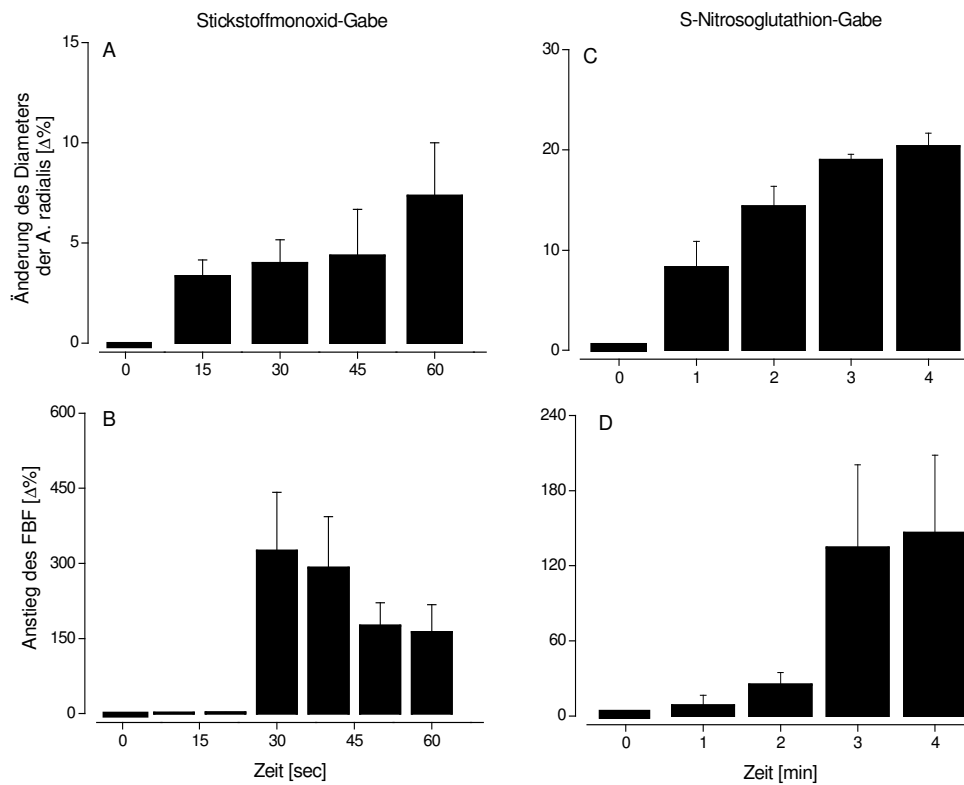
### 3.3.1 Wirkung intraarteriell applizierter NO-Standards

#### 3.3.1.1 Hämodynamische lokale Effekte intravasal applizierten NOs

Zur Untersuchung der biologischen Wirkung von NO *in vivo* auf das lokale Gefäßsystem wurden wässrige authentische NO-Standards intraarteriell appliziert (n=3). Es zeigte sich verglichen mit der Halbwertszeit von NO im Blut länger andauernde lokale Effekte auf arterielle Widerstandsgefäße und lokale Leitungsgefäße. Es kam unabhängig voneinander zu einem Anstieg des Unterarmblutflusses und zu einer Vergrößerung des Durchmessers der Arteria radialis des selben Armes (Abbildung 11A und B). Dabei trat ein Effekt auf die Leitungsgefäße früher ein und dauerte länger an im Vergleich zu der beobachteten Dilatation der Widerstandsgefäße.

S-Nitrosothiole fungieren möglicherweise als Vermittler der biologischen Wirkung des NO durch Transport und nachfolgende Freisetzung bioaktiven NOs. Daher wurde die lokale Wirkung eines gängigen niedermolekularen Nitrosothiols, S-Nitrosoglutathion, auf die Gefäße des Unterarms *in vivo* untersucht. S-Nitrosoglutathion (GSNO) wurde als exogen infundiertes Nitrosothiol ausgewählt, da GSNO ein niedrigeres Risiko immunologischer Nebenwirkungen als ein heterologes Protein wie Serumalbumin birgt. Die Dosis des applizierten GSNO war vergleichbar mit der bei einer vorangegangenen Studie verwendeten<sup>20</sup> und zeigte in Voruntersuchungen keine systemischen Nebenwirkungen.

GSNO imitierte die vasodilatative Wirkung des NO auf beide untersuchten Gefäßabschnitte (n=3). Wie auch bei Infusion von NO wurden die Makro- und Mikrogefäße des Unterarms dilatiert (vgl. Abbildung 11C und D), wobei die Dilatation auch hier in den Leitungsgefäßen früher einsetzte. Ein Vergleich der Wirkungen von NO und GSNO eine Minute nach Infusion zeigte in beiden Fällen einen Anstieg des Diameters der distalen Arterienabschnitte (um  $7,7 \pm 2,7\%$  für NO und um  $8,1 \pm 2,6\%$  für GSNO) und des Unterarmblutflusses (um  $163 \pm 55\%$  für NO und um  $9,4 \pm 8,9\%$  für GSNO). Maximale Effekte wurden jedoch bei der Applikation des Nitrosothiols in beiden Gefäßabschnitten erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt als bei Gabe von NO gemessen (Abbildung 11D). Entgegen einer These, die Nitrit als den bioaktiven Metaboliten des NO ansieht<sup>38</sup>, konnte bei Applikation von Nitrit keinerlei lokale Wirkung auf Leitungs- und Widerstandsgefäße *in vivo* beobachtet werden. Auch Nitrat rief bei intraarterieller Infusion keine Vasodilatation hervor. Weder die Applikation von NO noch von GSNO, Nitrit oder Nitrat führte zu einem Anstieg von Herzfrequenz oder zu einer Veränderung des Blutdruckes. Diese Ergebnisse sind nicht als Abbildung dargestellt.



**Abbildung 11:** Vergleich der dilatorischen Effekte auf Leitungs- und Widerstandgefäße des Unterarmes nach intraarterieller Infusion von 36 µmol/min NO über eine Minute (Abb. A und B) bzw. 5 nmol/min GSNO über fünf Minuten (Abb. C und D) (n=3). Änderungen des Durchmessers der A. brachialis und des Unterarmblutflusses (FBF) wurden gleichzeitig mittels hochauflösendem Ultraschall und Venenverschußplethysmographie über eine Minute verfolgt.

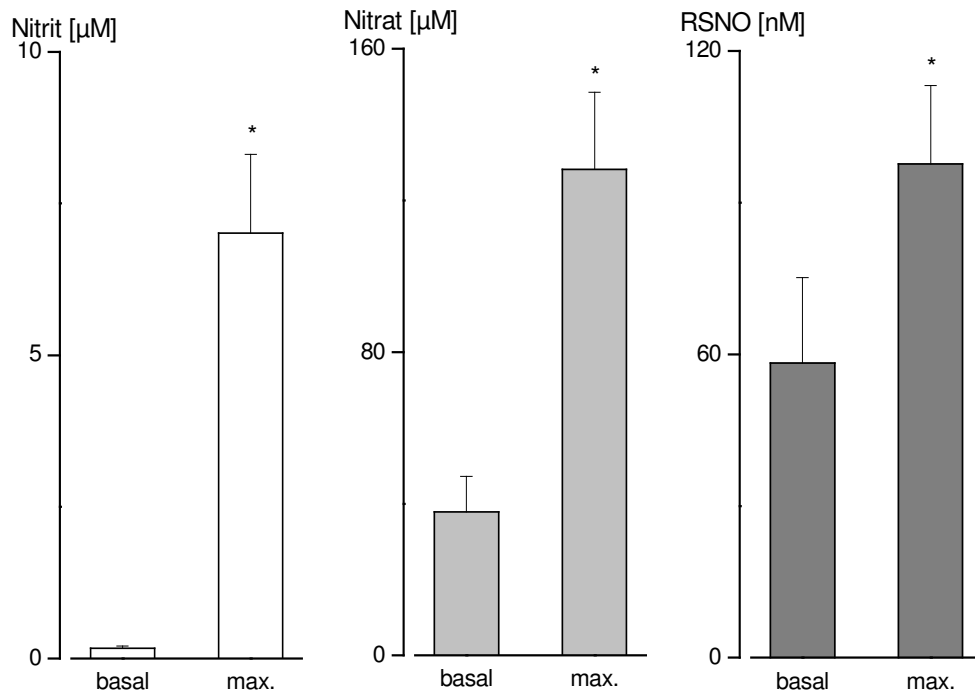
### 3.3.1.2 Biochemische Veränderungen in humanem Plasma durch intraarterielle Applikation von NO

Durch Zugabe von NO-gesättigter Lösung zum Plasma ließ sich *in vitro* ein Anstieg nitrosierter Plasmaproteine erzielen. Ziel war es, den Einfluss authentischen NOs auf die Nitrosothiolspiegel bei gleichzeitig beobachteter Vasodilatation *in vivo* zu untersuchen.

Während intraarterieller NO-Infusion wurden nach dem in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Protokoll venöse Plasmaproben an der antekubitalen Vene des selben Armes entnommen.

Für drei Probanden wurden basale Werte der NO-zugehörigen Metabolite im venösen Plasma von  $40 \pm 7$  nmol/l S-Nitrosothiolen,  $172 \pm 35$  nmol/l Nitrit und  $38 \pm 9$   $\mu$ mol/l Nitrat vor Infusion des Stickstoffmonoxids gemessen. Nach Beginn der intraarteriellen NO-Gabe wurden zu den Zeitpunkten 15, 30, 45 und 60 Sekunden venöse Plasmaproben am ipsilateralen Arm entnommen und auf die Metabolite des NO untersucht. Es kam im Vergleich zum Basalwert zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-S-Nitrosothiole um mehr als 50% (auf  $97,6 \pm 15,5$  nmol/l) zum Zeitpunkt der jeweils maximalen dilatatorischen Reaktion der arteriellen Widerstandsgefäße (vgl. Abbildung 12). Parallel stiegen die venösen Plasmaspiegel für Nitrit und Nitrat um das 40- bzw. 3fache bei maximaler Dilatation der Leitungs- und Widerstandsgefäße (auf  $7,014 \pm 1,29$   $\mu$ mol/l bzw.  $128,2 \pm 20,3$   $\mu$ mol/l) (n=3).

Bei der Infusion von Nitrit und Nitrat kam es hingegen nicht zu einem nachweisbaren Anstieg der Konzentration der Plasmanitrosothiole.



**Abbildung 12:** Biochemische Analyse der NO-Metabolite im Plasma während der Passage des Blutgefäßsystems des Unterarms. Bei intraarterieller Infusion von  $36\mu\text{M}$  NO über eine Minute stiegen die Plasmakonzentrationen von Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiolen in venösen Blutproben der Vena mediana cubiti. Abgebildet sind basale Konzentrationen (basal) sowie bei maximaler dilatatorischer Reaktion (max.) (n=3). \* markiert signifikante Änderungen vom Basalwert

### 3.3.2 Wirkung intravenös applizierter NO-Standards

#### 3.3.2.1 Hämodynamische systemische Effekte intravasal applizierten NOs

Zur Untersuchung eines möglichen systemischen Effektes von Stickstoffmonoxid und S-Nitrosothiolen auf den humanen Kreislauf wurden NO und Nitrosothiole intravenös appliziert. Nach Verteilung im Kreislauf wurden wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben am kontralateralen Arm die Veränderung des Tonus von Makro- und Mikrostrombahn gemessen. Wie in Abbildung 13A und B dargestellt, konnte bei sechs Versuchspersonen ein systemischer vasodilatatorischer Effekt durch die intravenöse Bolusgabe von NO-Lösung beobachtet werden. Es kam durch

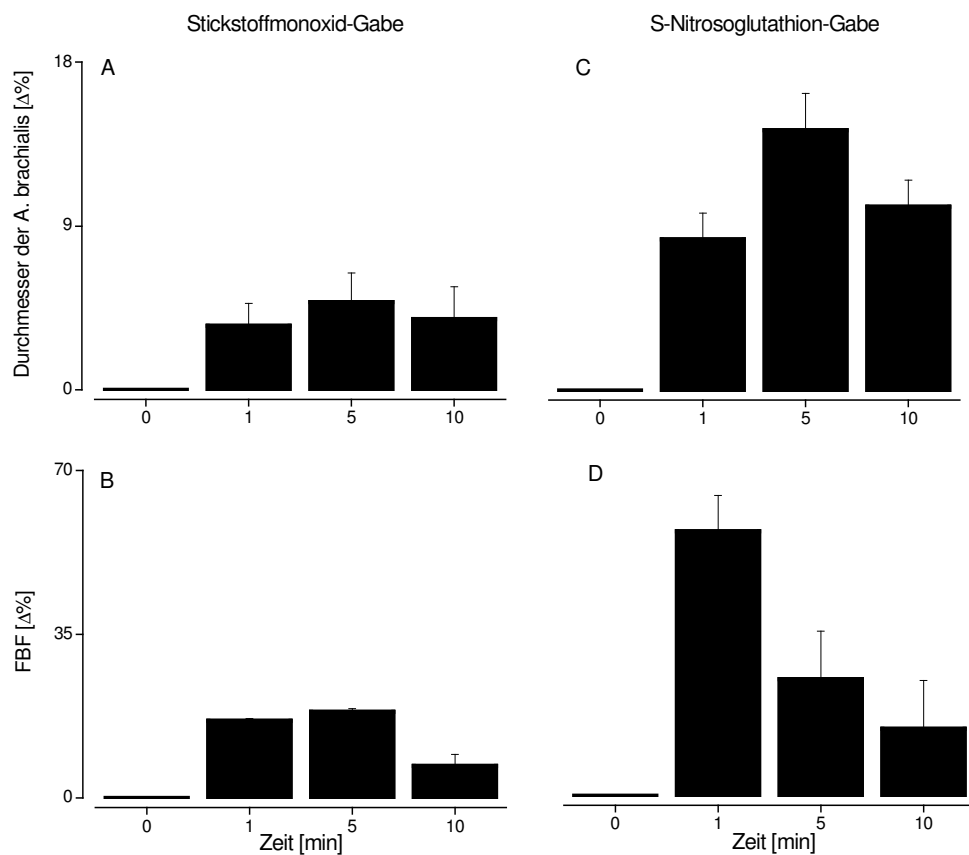
NO zu einer Dilatation der Arteria brachialis und auch der Widerstandsgefäße am kontralateralen Arm. Der Diameter der Arteria brachialis stieg von einem Basalwert von  $4,24 \pm 0,26$  mm auf einen maximalen Diameter von  $4,43 \pm 0,24$  mm an. Der Unterarmblutfluss des kontralateralen Armes stieg signifikant von  $1,58 \pm 0,16$  ml/100ml Gewebe/min basal auf ein Maximum von  $2,18 \pm 0,24$  ml/100ml Gewebe/min zeigte die Dilatation systemischer Widerstandsgefäße. Maximale dilatatorische Effekte traten 1 bis 5 Minuten nach Bolusinjektion von  $30 \mu\text{mol NO}$  auf. Die Wirkung auf den Diameter der Arteria brachialis hielt dabei länger an als die Wirkung auf die Widerstandsgefäße. Ebenfalls kam es zu einem signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (von  $93 \pm 3$  mmHg auf  $88 \pm 1$  mmHg) ohne signifikante Veränderung der Herzfrequenz (basal:  $66 \pm 5$ /min; 5 Minuten:  $67 \pm 5$ /min). Alle Parameter erreichten innerhalb von 45 bis 60 Minuten wieder basale Werte. Die Gabe von physiologischer Kochsalzlösung in gleichem Volumen als Kontrolle zeigte keine Änderung der Gefäßweite.

Zur Untersuchung der Wirkung von Nitrosothiolen auf die systemische Makro- und Mikrostrombahn wurde GSNO infundiert und kontralateral eine mögliche Veränderung des Gefäßdiamters gemessen (n=6).

Wie auch bei der Gabe von NO konnte eine signifikante systemische Dilatation von Widerstands- und Leitungsgefäßen beobachtet werden (vgl. Abbildung 13C und D). GSNO führte zu einer Vergrößerung des Arterienmessers (Basal:  $4,03 \pm 0,57$  mm; Maximum:  $4,59 \pm 0,47$  mm) und einer Erhöhung des Unterarmblutflusses (Basal:  $2,11 \pm 0,61$  ml/100ml Gewebe/min; Maximum:  $3,18 \pm 0,14$  ml/100ml Gewebe/min). Diese Effekte traten 1 bis 5 Minuten nach Bolusgabe auf. Wie auch bei der Applikation von NO waren diese Effekte begleitet von einem Abfall des Blutdruckes und auch einem zusätzlichen Anstieg der Herzfrequenz. Der mittlere arterielle Blutdruck sank von  $82 \pm 4$  mmHg auf  $72 \pm 4$  mmHg, die Herzfrequenz stieg von  $62 \pm 4$ /min auf  $81 \pm 4$ /min. Die

systemische relaxierende Wirkung auf die Makrostrombahn hielt, wie auch bei NO-Infusion, länger an als die Wirkung auf die Widerstandsarterien (vgl. Abbildung 13).

Bei intravenöser Bolusgabe von Nitrit und Nitrat konnte hingegen, wie auch bei arterieller Applikation, bei keinem der Stickoxide ein systemischer gefäßrelaxierender Effekt beobachtet werden (n=3).



**Abbildung 13:** Systemische Wirkung bei intravenöser Applikation von NO-Lösung (30  $\mu\text{mol}$ ) auf Leitungs- und Widerstandsgefäße (n=6) (Abb. A und B). 1  $\mu\text{mol}$  GSNO führte zu ähnlicher systemischer Dilatation (Abb. C und D). Der Effekt auf die Brachialarterie dauerte jeweils länger an als die Wirkung auf die Widerstandsgefäße.

### 3.3.2.2 Biochemische Veränderungen in humanem Plasma durch intravenöse Applikation von NO

Bei systemischer Gabe von Stickstoffmonoxid sollte ebenso wie auch im Versuchsaufbau zu lokalen Effekten, während der beobachteten

Vasodilatation die Bildung von S-Nitrosothiolen *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde Plasma vor sowie 2, 5 und 10 Minuten nach venöser Bolusgabe von NO am kontralateralen Arm entnommen und der biochemischen Analyse zugeführt.

Zwei Minuten nach Bolusgabe stieg die Konzentration der Plasma-S-Nitrosothiole signifikant von  $38 \pm 6$  auf  $59 \pm 8$  nmol/l an (n=6).



## 4 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Es gelang, eine hochsensitive und -spezifische Methode auf Basis der Chemilumineszenz-Detektion weiterzuentwickeln und zu etablieren. Die Methode erlaubt mit einer Sensitivität von 2 nM die Bestimmung von Nitrit und S-Nitrosothiolen in wässrigen und biologischen Proben.
2. Mit Hilfe dieser Methode konnte der Metabolismus von NO im humanen Plasma wie folgt charakterisiert werden: Basale plasmatische Konzentrationen von S-Nitrosothiolen lagen entgegen früheren Untersuchungen im nanomolaren Bereich. Physiologische und supraphysiologische Konzentrationen von zugesetztem NO unterlagen im Plasma nicht nur einem oxidativen Abbau, sondern auch einem nitrosativen Metabolismus unter Bildung von S-Nitrosothiolen ohne Erreichen einer Sättigungsgrenze. Die Bildung der Nitrosothiole erfolgte nahezu ausschließlich an hochmolekularen Proteinen und folgte einer zeitabhängigen Kinetik.
3. *In-vivo*-Applikation von NO-gesättigter Lösung führte sowohl lokal wie auch systemisch zur Bildung plasmatischer S-Nitrosothiole und gleichzeitig zu einer Dilatation von Leitungs- und Widerstandsgefäßen. Die Applikation exogener S-Nitrosothiole führte zu ähnlichen dilatatorischen Effekten, wohingegen die Infusion der oxidativen Metabolite des NO (Nitrit und Nitrat) sich unter den gegebenen Bedingungen als biologisch inaktiv erwiesen.

Im folgenden Abschnitt wird zunächst auf die Vor- und Nachteile der verwendeten Chemilumineszenz-Methode im Vergleich zu anderen bereits etablierten Methoden zur Bestimmung der Nitrosothiole eingegangen. Im Abschnitt 4.2 werden die Ergebnisse zum Metabolismus

authentischen NOs diskutiert. Die Erkenntnisse zur lokalen und systemischen vasodilatatorischen Wirkung von NO und seiner Metabolite werden dann in Abschnitt 4.3 diskutiert und die besondere Rolle der S-Nitrosothiole an der Vermittlung dieser Wirkung beleuchtet.

#### **4.1 Methodenkritik der reduktiven Bestimmung von S-Nitrosothiolen mittels Chemilumineszenz**

Für die zuverlässige Messung niedriger Konzentrationen von S-Nitrosothiolen in biologischen Proben wurde eine sensitive Methode auf Basis der Chemilumineszenz-Detektion etabliert. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Bestimmung von RSNO zeichnete sie sich durch eine hohe Sensitivität für Nitrosothiole aus. Mehrere Methoden sind zur Bestimmung von Nitrosothiolen beschrieben, die im folgenden vorgestellt und beurteilt werden sollen.

Die Arbeitsgruppe Samouilov/Zweier<sup>123</sup> beschrieb 1998 eine Methode zur Messung von Nitrosothiolen, die ebenfalls auf einer Chemilumineszenz-Reaktion basiert. Die verwendete Reaktionslösung bestand aus Hydroquinon (0,1mM) und Quinon (0,01 mM) in 1M Trispuffer (pH 10). Zwar ist mit dieser Methode eine Bestimmung des Nitrosothiolgehalts einer Probe möglich, eine Messung des Nitritgehaltes jedoch nicht. Durch starke Schaumbildung in Anwesenheit hoher Proteinkonzentrationen ist zudem die Zugabe von relativ hohen Mengen von 2-Oktanol, Silikon oder anderen schaumreduzierenden Reagenzien zu biologischen, proteinreichen Proben nötig<sup>26</sup>.

Eine weitere in der Literatur beschriebene Methode basierend auf der Chemilumineszenz-Detektion ist die reduktive Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen durch eine Lösung aus 1 mM L-Cystein und 100 µM Kupferchlorid nach Fang/Gaston et al.<sup>25</sup>. Diese Methode eignet sich zur Quantifizierung von Nitrosothiolen in wässriger Lösung. Auch diese Methode erlaubt keine Bestimmung von Nitrit. Der entscheidende Nachteil der Methode nach Fang/Gaston liegt jedoch in der Tatsache, dass

eine Messung von Nitrosothiolen in biologischen Proben bei physiologischem pH-Wert nicht möglich ist. Lediglich im Serum und unter sauren Bedingungen (pH 3,5) erlaubt die Methode die Bestimmung von Nitrosothiolen. Unter diesen Bedingungen kann es jedoch durch Reduktion des Nitrits zu NO zu einer artifiziellen S-Nitrosierung kommen und damit zu falsch positiven Ergebnissen<sup>26</sup>.

Ebenso auf Chemilumineszenz fußt die Methode zur Bestimmung von RSNO nach der Arbeitsgruppe Ewing et al.<sup>24</sup>. Sie stellt eine Modifikation des klassischen Saville-Verfahrens dar<sup>71</sup>. Nitrosoniumionen werden dabei zunächst quecksilberkatalysiert aus Nitrosothiolen freigesetzt und reagieren weiter zu Nitrit. Dieses wird durch eine Reaktionslösung bestehend aus Vanadium (III) (0,1 VCl<sub>3</sub> in 2M HCl) zu NO rückreduziert. NO wird dann mittels Chemilumineszenz bestimmt. Geringe Konzentrationen von Nitrosothiolen heben sich bei diesem Verfahren nur wenig von einem hohen Grundspiegel des Nitrits ab. Neben starkem Schäumen der Probe beschreiben andere Arbeiten falsch positive Ergebnisse für Nitrit bei Anwendung dieser Methode<sup>26</sup>. Denn durch die angewendete Reaktionslösung werden auch 50-70% des in der Probe enthaltenen Nitrats zu NO reduziert. Die Saville-Methode führt zudem nicht zu einer stöchiometrischen Freisetzung von Nitrit aus Nitrosothiolen. Nur etwa 80% werden in wässriger Lösung und sogar ein geringerer Anteil in biologischen Proben zu Nitrit umgesetzt. Dies führt zu falsch negativen Ergebnissen für die Nitrosothiolkonzentration<sup>17</sup>.

Stamler et al. beschrieben 1992 eine basale Nitrosothiolkonzentration von etwa 7 µM im Plasma des Kaninchens<sup>137</sup>. Dieser Wert wurde bestimmt mittels einer Photolyse-Reaktion. Dabei wird photolytisch die S-NO Bindung der Nitrosothiole gespalten. Freigesetztes NO wird dann mittels Chemilumineszenz gemessen. Die durch die Arbeitsgruppe berichtete basale Konzentration der Nitrosothiole im Plasma liegt etwa um den Faktor 100 höher als durch nachfolgende Arbeiten beschrieben<sup>91;123</sup>. Die Photolysereaktion erwies sich als nicht spezifisch für Nitrosothiole, da

NO nicht nur aus Nitrosothiolen freigesetzt wird, sondern auch aus Nitrit, Nitrosaminen und Dinitrosyl-Eisen-Komplexen<sup>2</sup>. Zusätzlich führt die Photolyse und anschließende Erhitzung zu einem Abbau von Nitrit<sup>93</sup>.

Im Vergleich zu den vorgestellten Methoden erweist sich die hier beschriebene Chemilumineszenz-Methode auf der Basis einer Iodid enthaltenden Reaktionslösung als überlegen. Die zunächst von Marley et al. beschriebene Methode<sup>90</sup> konnte weiter verbessert werden durch eine Modifikation der verwendeten Reaktionslösung. Es war keine Zugabe von Kupfer(II)sulfat vor der Probenaufgabe mehr nötig. Auch mussten keine schaumreduzierenden Reagenzien verwendet werden. Ein Austausch der Reaktionslösung war erst nach 15, 10 bzw. 3 aufgegebenen Proben bei wässrigen, plasmatischen bzw. hämoglobinhaltigen Proben nötig. So erwies sich die Methode als besonders schnell und wenig störanfällig. Sowohl Nitrit als auch Nitrosothiole können in wässrigen und auch in biologischen, proteinhaltigen Proben bei physiologischem pH mit hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit bestimmt werden. Keine Extraktion oder Deproteinierung war notwendig. Durch das hier beschriebenen Vorgehen konnte zwischen Nitrit und S-Nitrosothiolen unterschieden werden. Es fand jedoch durch das Vorgehen keine Unterscheidung der einzelnen Nitrosthiole (S-Nitrosoalbumin, S-Nitrosocystein und S-Nitrosoglutathion) und möglicher N-, O- oder C-Nitrosoverbindungen statt.

#### **4.2 Oxidative und nitrosative Konversion von NO in humanem Plasma**

Die mittels der verbesserten und validierten Chemilumineszenz-Methode gemessene basale Konzentration von S-Nitrosothiolen im humanen Plasma lag im niedrigen nanomolaren Bereich ( $12 \pm 4$  nM). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit aktuellen Studien<sup>91;121</sup>. Die bereits früh von Stamler et al. publizierten Konzentrationen von RSNO im Plasma des Kaninchens lagen hingegen im mikromolaren Bereich<sup>124;137</sup>. Angaben über die basalen Werte der S-Nitrosothiole beim Menschen schwanken

zwischen  $24 \pm 9 \text{ nmol/l}^{13}$  und  $9,2 \pm 1,6 \text{ } \mu\text{mol/l}^{146}$ . Diese große Differenz zwischen den Studien lässt sich einerseits möglicherweise durch Speziesunterschiede erklären. Andererseits wurden die Daten von Stamler et al. unter Anwendung der oben beschriebenen Photolyse-Methode gewonnen, die sich als nicht spezifisch für Nitrosothiole erwiesen hat (vgl. Abschnitt 4.1).

Bei Inkubation von humanem Plasma mit authentischer Stickstoffmonoxid-Lösung unterlag dieses einem raschen Abbau, der zu größten Anteilen durch Oxidation zu Nitrit führte<sup>65;80</sup>. Geringere Anteile des zugefügten NOs wurden zu Nitrat abgebaut, was ebenfalls durch vorangegangene Studien belegt wurde<sup>47</sup>. Daneben konnte aber auch die Bildung von S-Nitrosothiolen im humanen Plasma gezeigt werden, wobei etwa 4% des applizierten NOs der Bildung von Nitrosothiolen dienten (vgl. Abbildung 7). Ein ähnlicher Anteil von RSNOs wurde auch bei der S-Nitrosothiolbildung durch Gabe von NO-Donatoren in anderen Studien erreicht<sup>90</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass die physiologischen Konzentrationen von S-Nitrosothiolen durch NO-Exposition um ein Vielfaches gesteigert werden konnten. Selbst bei Zugabe von Endkonzentrationen von  $200 \text{ } \mu\text{M}$  NO waren die Proteinbindungsstellen für NO nicht sättigbar, womit das therapeutische Potential der endogenen physiologischen NO-Speicher aufgezeigt wird (vgl. Abbildung 8). Jedoch auch bei Applikation physiologischer Konzentrationen von NO, entsprechend den an der Oberfläche von Endothelzellen gemessenen Konzentrationen<sup>89</sup>, konnte eine Bildung von RSNO festgestellt werden.

Weitere *in vitro* Untersuchungen ergaben eine Zeitabhängigkeit der S-Nitrosothiolbildung. Zugabe von NO zum Plasma führte zur sofortigen Bildung von Nitrosothiolen. Ein Maximum der Konzentration der Nitrosothiole wurde jedoch erst nach fünfminütiger Inkubation erreicht (vgl. Abbildung 9). Diese Ergebnisse können nicht durch eine einfache Autoxidation und nachfolgende Nitrosierung der Thiole erklärt werden,

sondern lassen einen komplexen Mechanismus der Nitrosothiolbildung vermuten. Eine positive kooperative Interaktion bei der Bildung von S-Nitrosothiolen zwischen Thiolen hohen (>20kD) und niedrigen (<20kD) molekularen Gewichts konnte jedoch unter den vorhandenen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Obgleich die Konzentrationen von reduzierten niedrigmolekularen Thiolen im Plasma etwa 10  $\mu\text{M}$  beträgt<sup>60</sup>, scheint der Nitrosierung dieser Thiole geringere Bedeutung zuzukommen, da kein signifikanter Anstieg der Nitrosothiole in der Fraktion des Plasmas mit niedrigem Molekulargewicht beobachtet werden konnte (vgl. Abbildung 10). Vielmehr scheinen Nitrosothiole mit niedrigem Molekulargewicht, wie zum Beispiel GSNO, durch Transnitrosierung und Abgabe von NO durch Nitrosothiole hoher molekularer Masse wie Nitrosoalbumin zu entstehen. Diese niedrigmolekularen Thiole haben eine kurze Halbwertszeit und können rasch biologisch aktives NO freisetzen<sup>124</sup>.

### **4.3 Biologische Wirkung von NO und biochemischer Nachweis der Bildung plasmatischer S-Nitrosothiole *in vivo***

#### **4.3.1 Lokale und systemische vasodilatatorische Wirkung von NO *in vivo***

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Zugabe von gelöstem NO zum Plasma zu einem Anstieg der Konzentration der Nitrosothiole führt. Ob diese Beobachtung auch auf die *in vivo* Situation übertragen werden konnte, war bislang unklar. *In vivo* spielen unter anderem Reaktionen mit Erythrozyten eine wichtige Rolle. Innerhalb der roten Blutkörperchen wird NO schnell entweder zu Nitrosylhämoglobin, zu S-Nitrosohämoglobin oder zu Methämoglobin und Nitrat metabolisiert<sup>42</sup>. Der rasche Abbau im Erythrozyten wirft besonders die Frage auf, ob appliziertes NO *in vivo* zur Bildung plasmatischer

Nitrosothiole dienen kann und so gespeichert vasodilatatorische Wirkungen auf die lokale und systemische Zirkulation ausübt.

Bei der *in vivo* Gabe von NO zur Untersuchung möglicher lokaler und systemischer dilatativer Eigenschaften wurden niedrigere Dosen appliziert als Intensivpatienten während Inhalationstherapie erhalten. Diese Patienten inhalieren über längere Zeit etwa 25-35 ppm NO pro Minute. 1 ppm entsprechen 41 nmoles NO, so dass es bei einem Atemminutenvolumen von 6 l/min und einer Resorption von 90% zu einer NO-Aufnahme von 5,5-7,7  $\mu\text{mol}/\text{min}$  durch Inhalation kommt. In Studien zu systemischen Wirkungen der Inhalationstherapie wurden diese Dosen über 60 bis 80 Minuten inhaliert, so dass deutlich höhere Mengen appliziert wurden als in den vorliegenden Versuchen<sup>13</sup>.

Bei der intraarteriellen Applikation von gelöstem NO kam es zu einer lokalen am selben Arm beobachteten Vasodilatation arterieller Leitungs- und Widerstandsgefäße. Die Dilatation in diesen Gefäßabschnitten trat unabhängig von einander auf. Die Dauer des lokalen Flussanstiegs war deutlich länger als durch vorangegangene biochemische Studien zur Halbwertszeit von NO im Blut zu erwarten war<sup>9;85;148</sup>. Für diese verlängerte Wirkung von NO gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Einerseits könnte eine länger andauernde Aktivierung von Signalkaskaden in distalen Gefäßabschnitten vorliegen. Andererseits mag die Bildung von bioaktiven NO-Speicherstoffen stattfinden, die NO verzögert wieder freisetzen können.

Die lokale Dilatation der Arteria radialis als Beispiel eines Leitungsgefäßes trat in dieser Versuchsreihe früher als die Dilatation der Widerstandsgefäße auf (vgl. Abbildung 11A und B). Dies spricht dafür, dass dieser Effekt tatsächlich auf das applizierte NO zurückzuführen ist und nicht auf eine gesteigerte endotheliale NO-Bildung durch erhöhte Scherkräfte bei einem Flussanstieg in der Mikrostrombahn. Für die deutlich länger anhaltende Dilatation der Leitungsgefäße kann ein zusätzlicher flussmediierter Mechanismus als Erklärung dienen. Weitere

mögliche Erklärungen für die lang anhaltende Antwort der Arteria radialis kann auch eine Variation der Intensität und Dauer der Guanylatcyklaseaktivität des glatten Muskels entlang des Gefäßbettes sein. Ebenso könnte eine Gegenregulation durch Signalkaskaden die NO induzierte Dilatation der Widerstandsarterien aufheben. Diese ist unter anderem auch durch den Nährstoffbedarf des Gewebes beeinflusst. Leitungsgefäße hingegen sind weniger sensibel für diese gegenregulatorischen Mechanismen. Zusätzlich können Unterschiede in weiteren Transnitrosierungsreaktionen von Thiolen oder in der Höhe des oxidativen Stresses zwischen Widerstands- und Leitungsgefäßen bestehen.

Durch die folgende venöse Applikation von NO konnte eine systemische Wirkung von NO beobachtet werden. Obwohl Stickstoffmonoxid im Blut innerhalb von Millisekunden abgebaut wird, konnten nach Verteilung des applizierten Stickoxids im gesamten Blutvolumen systemische und minuten andauernde Effekte auf die glatte Muskulatur der Gefäße beobachtet werden (vgl. Abbildung 13A und B). Durch NO, dem bisher nur autokrine und parakrine Wirkungen zugeschrieben wurde, konnte eine Dilatation der Widerstands- und Leitungsgefäße des kontralateralen Armes hervorgerufen werden. Die Erweiterung der Leitungsgefäße dauerte wie auch bei der lokal beobachteten Wirkung von NO länger an als die der Mikrozirkulation. Die Kinetik der hämodynamischen Veränderungen entsprach mit einem Maximum bei etwa 5 Minuten der *in vitro* beobachteten Kinetik der S-Nitrosothiolbildung und der Halbwertszeit der Nitrosothiole im Plasma. Dies unterstützt die These, dass die systemische Wirkung von NO durch die Bildung metastabiler Nitrosothiole vermittelt wird. Ähnlich wie klinische Studien, die Nebenwirkungen der NO-Inhalationstherapie zum Beispiel auf die Thrombozytenaggregation belegen, konnte eine systemische Wirkung des Stickstoffmonoxids gezeigt werden. Dieses kann eventuell neue



therapeutische Felder in der Therapie vaskulärer Erkrankungen, die in Verbindung mit endothelialer Dysfunktion stehen, aufzeigen.

#### 4.3.2 Lokale und systemische gefäßrelaxierende Wirkung von S-Nitrosoglutathion *in vivo*

Zur Identifizierung eines an der biologischen Wirkung von Stickstoffmonoxid beteiligten Metaboliten, wurden Nitrit und Nitrat sowie ein niedrigmolekulares Nitrosothiol, S-Nitrosoglutathion, lokal und systemisch in das Kreislaufsystem des Menschen appliziert.

Das infundierte S-Nitrosoglutathion rief bei arterieller Gabe lokale Effekte hervor, welche den Wirkungen des Stickstoffmonoxids auf den Gefäßtonus ähnlich waren. Wie bei Gabe von Stickstoffmonoxid erfolgte auch unter Gabe des Nitrosothiols eine vorübergehende lokale Weitung der Widerstands- und Leitungsgefäße. Die Dilatation der Arteria radialis erschien nach GSNO-Infusion deutlicher und auch länger anhaltend als durch Applikation von NO (vgl. Abbildung 11C und D). Eine Erklärung hierfür kann eine direkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus GSNO darstellen. Authentisches exogenes NO reagiert im Gegensatz dazu zunächst mit Albumin zu Nitrosoalbumin. Nur etwa 4% des applizierten Stickstoffmonoxids dienen nach den Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen der Bindung an Plasmaproteine und damit Bildung von Nitrosoalbumin. Erst nach Transnitrosierung von Nitrosoalbumin zu GSNO kann biologisch aktives NO freigesetzt werden<sup>91;124</sup>.

Auch bei systemischer Gabe von S-Nitrosoglutathion konnten gefäßrelaxierende Effekte beobachtet werden. Die gefäßdilatorische Wirkung von 1 µmol GSNO erwies sich als zwei bis dreifach so stark wie die durch Bolusgabe von 30 µmol NO ausgelöste. Die Tatsache, dass die Wirkung *in vivo* von NO und GSNO sich nicht 1:1 entsprachen, ist im Einklang mit den vorgestellten *in vitro* Daten, nach denen nur etwa 4% des dem Plasma zugesetzten NOs zu Nitrosothiolen umgewandelt wird. Dabei entsteht zunächst vor allem SNO-Albumin, welches wesentlich

stabiler ist als S-Nitrosoglutathion. Bei gleichem verzögertem Einsetzen der Dilatation nach NO oder GSNO-Gabe scheint die *in vivo* Transnitrosierungsreaktion kein geschwindigkeitsbeschränkender Schritt zu sein<sup>115</sup>.

Entgegen der bestehenden These, dass Nitrit das eigentlich bioaktive Konversionsprodukt des Stickstoffmonoxids darstellt<sup>38</sup>, konnte weder Nitrit noch Nitrat eine vasoaktive Wirkung hervorrufen.

Bei der Betrachtung der Daten zur vasoaktiven Wirkung von NO im Gefäßsystem muss bedacht werden, dass nach neuesten Untersuchungen durch eine Bolusinjektion, wie sie bei den Untersuchungen zur systemischen Wirkung von NO durchgeführt wurde, eine artifizielle Nitrosierung *in vitro* beobachtet werden konnte<sup>49;61</sup>. Ob die *in vivo* Bolusinjektion im Vergleich zur Infusion ebenfalls eine Veränderung des Verhältnisses von oxidativem und nitrosativem Metabolismus herbeiführt, ist derzeit nicht klar.

Neben oxidativen und nitrosativen Reaktionen im Plasma kann NO alternative Abbauewege wie Reaktionen mit Sauerstoffabkömmlingen, Diffusion in Gewebe und Blutzellen oder Reaktionen innerhalb des Erythrozyten eingehen<sup>118</sup>. Abhängig von der Sauerstoffsättigung des Blutes kann NO wie bereits beschrieben mit Hämoglobin zu Nitrat oder aber zu Nitrosyl- oder S-Nitrosohämoglobin reagieren. Der Bildung von Nitrosohämoglobin wurde eine Rolle in der Regulation von Transport und Freisetzung von Sauerstoff im peripheren Gewebe zugesprochen<sup>57</sup>. Auch konnte in neuesten Studien gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von Erythrozyten die Bildung von Nitrosothiolen im Plasma reduziert ist<sup>116</sup>. Die Arbeitsgruppe von Liao et al. zeigte jedoch, dass der Abbau von NO durch die Erythrozyten unter Flussbedingungen sinkt<sup>84</sup>, so dass davon ausgegangen werden muss, dass rote Blutkörperchen unter diesen Bedingungen einen geringeren Anteil am Abbau des intravasalen Stickstoffmonoxids tragen. Die Möglichkeit, dass ein Teil der NO induzierten Dilatation durch SNO-Hb<sup>138</sup> oder NO-Hb<sup>37</sup> vermittelt ist,

kann derzeit nicht ausgeschlossen werden. Sie erweist sich jedoch zusätzlich durch die Tatsache als unwahrscheinlich, dass intraerythrozytäres Hämoglobin mit NO etwa 1000fach langsamer reagiert als freies Hämoglobin<sup>49</sup>.

Die *in vivo* Bildung von Nitrosothiolen kann damit wenigstens zum Teil für die lokale dilatatorische Wirkung von NO auf Widerstands- und Leistungsgefäße verantwortlich zu sein<sup>117</sup>.

#### 4.3.3 Bildung von S-Nitrosothiolen *in vivo*

Zur weiteren Stützung der These, dass plasmatische Nitrosothiole eine regulative Rolle im NO-Transport einnehmen, konnte während der beobachteten Dilatation der Unterarmgefäße die Bildung dieser Metabolite *in vivo* gezeigt werden.

Bei der Applikation von NO in die Arteria radialis wurden ipsilateral, nach einmaliger Passage durch die Mikrozirkulation des Unterarms, venöse Blutproben entnommen und biochemisch untersucht. Die intraarterielle Applikation von NO führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der Plasmakonzentrationen von Nitrit, Nitrat und von S-Nitrosothiolen (vgl. Abbildung 12). Es konnte somit die Bildung von Nitrosothiolen *in vivo* gezeigt werden.

Ebenso wurden im venösen Protokoll simultan zur auftretenden systemischen Vasodilatation venöse Blutproben entnommen. Die Infusion von NO führte dabei zu einem Anstieg des systemischen Plasmanitrits, und -nitrats sowie zu einem signifikanten Anstieg der systemischen RSNO-Konzentrationen. So konnte simultan zu einer systemischen Vasodilatation durch NO auch die Bildung der möglicherweise an der Vermittlung der prolongierten Wirkung beteiligten Metabolite des NO gezeigt werden. Zu betonen ist, dass die Nitrosothiole nach einer Zeit, die der Kreislaufzeit zum Transport an den kontralateralen Arm entspricht, gemessen werden konnten.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Plasmas als physiologischer Ort des NO-Transportes. Da trotz Anwesenheit von Erythrozyten *in vivo* die Bildung plasmatischer Nitrosothiole im Plasma beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass ein Teil des NOs dem Metabolismus im Erythrozyten entgehen können. Eventuell können Nitrosothiole jedoch auch durch die roten Blutkörperchen gebildet und ins Plasma freigesetzt werden<sup>106</sup>.

Für die beobachtete Erhöhung der Nitritkonzentration kann die Oxidation von NO im Plasma verantwortlich gemacht werden. Der Anstieg des Nitrats ist vermutlich auf die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat im Erythrozyten zurückzuführen<sup>65</sup>. Ein Teil des Nitrats, das während der Passage durch die Unterarmzirkulation gebildet wurde, entstammt möglicherweise auch der Konversion von Nitrit zu Nitrat innerhalb des Erythrozyten durch Hämoglobin. Die berichteten Kinetiken für die Aufnahme von Nitrit in die Erythrozyten und die nachfolgende Autoxidation von Nitrit und Hämoglobin sind jedoch sehr langsam<sup>94</sup>. Während der kurzen Zeit der Passage des Blutes durch die Unterarmzirkulation, die etwa 4-10 Sekunden dauert<sup>144</sup>, kommt diese Reaktion des Nitritabbaus daher nur bedingt in Frage. Daher scheint innerhalb des Erythrozyten die Inaktivierung von NO zu Nitrat der vorrangige Abbauweg zu sein.

In beiden Versuchsanordnungen konnten etwa 30 % des applizierten NO nicht in Form seiner Metabolite Nitrit, Nitrat und S-Nitrosothiole wiedergefunden werden. Eine mögliche Erklärung hierfür kann sein, dass ein Teil des applizierten NO in andere hier nicht gemessene Metabolite konvertiert wurde oder aber in Blutzellen oder Gewebe diffundierte und daher nicht detektiert wurde.

## 5 Ausblick

Neben Endothelzellen wurde auch für Thrombozyten<sup>88</sup>, Leukozyten<sup>76</sup> und Erythrozyten<sup>63</sup> die Produktion von Stickstoffmonoxid nachgewiesen. Sogar für Hämatozyten von Nichtsäugern wurde die Bildung von NO gezeigt<sup>113</sup>. Eine herabgesetzte NO-Bildung durch Endothel- und Blutzellen wurde in Zusammenhang gebracht mit kardiovaskulären Erkrankungen<sup>19</sup>, so dass eine Therapie dieser Erkrankungen durch exogenes NO möglich erscheint.

Die systemische Applikation von Standards wässrigen NOs kann der Applikation von klinisch gut bekannten NO-Donatoren überlegen sein. NO ahmt den physiologischen Verlauf des NO-Transports und Metabolismus enger nach als pharmakologische NO-Donatoren. Dies beinhaltet Aufnahme, Transport und Freisetzung von NO durch physiologische bluteigene Transporter. Dadurch werden arteriovenöse Gradienten, Sauerstoffsättigung und Sauerstoffversorgung des Gewebes, der intensive interzelluläre Kontakt von Blutzellen während der Passage durch die Mikrostrombahn und die Interaktion von transportiertem NO mit dem Endothel und dem glatten Muskel mit berücksichtigt. Bluteigenes oder im Blut transportiertes Stickstoffmonoxid hemmt die Thrombozytenaggregation<sup>15</sup> und verringert Reperfusionsschäden nach ischämischen Infarkten<sup>160</sup> sowie die Margination von Leukozyten. Auch beeinflusst NO den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Austausch und bietet Widerstand gegen hypotone Hämolyse von Erythrozyten<sup>109</sup>. Der Metabolismus und die Verteilung von NO und damit seine Wirkung mag *in vivo* große Heterogenität aufweisen, abhängig von Gefäßgröße, Hämatokrit, Flussgeschwindigkeit und Scherkräften<sup>77</sup>. Entsprechend beeinflussen diese Größen die Aufnahme und den Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Plasma des erythrozytenfreien Bereiches entlang der Gefäßwand sowie innerhalb des Erythrozyten<sup>11</sup>. Hinzu kommt, dass auch die Erythrozytenmembran einen heterogenen Konversionsort

darstellt<sup>85</sup>, der Einfluss nehmen kann auf die Effekte von NO auf die Mikrozirkulation<sup>149</sup>.

Diese physiologischen Unterschiede und Gradienten können überdeckt werden durch die intraarterielle Infusion von NO-Donatoren wohingegen authentisches Stickstoffmonoxid der physiologischen Modulation unterliegt.

Ein weiterer Nachteil der klinisch genutzten NO-Donatoren gegenüber gelöstem NO ist die Tatsache, dass sie vor der Freisetzung von Stickstoffmonoxid zunächst innerhalb der Gefäßwand bioaktiviert werden müssen. Dieser Prozess ist jedoch abhängig von endothelialer und glattmuskulärer Funktion<sup>100</sup>.

Erythrozyten und plasmatische Transporter von NO unterscheiden sich darin, dass die Bildung von plasmatischen NO-Produkten nicht abhängig ist von einem arteriovenösen Sauerstoffgradienten. Durch die Beobachtung, dass sowohl Leitungs- als auch Widerstandsgefäße bei systemischer Applikation von NO oder S-Nitrosoglutathion dilatierten, wird diese These unterstützt. Dies kann wichtige therapeutische Anwendungen aufzeigen. Kontinuierliche intravenöse Infusion von angemessenen Dosen authentischen NOs moduliert physiologische plasmatische NO-Träger und mag damit der Beeinflussung von Thrombozytenfunktion und Gefäßtonus dienen. Dies erscheint als ein attraktives Konzept bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion, welche zu Krankheitsbildern wie koronarer arterieller Erkrankung und peripherer arterieller Verschlusskrankheit führen kann. Dabei würden bluteigene Transporter genutzt und der Bioeffektor so auf physiologischem Wege zu seinem Zielgewebe gebracht. Die Ermittlung der angemessenen Dosis und geeigneten Darreichung, inhalativ oder intravenös, zur selektiven Dilatation epikardialer Gefäße, kann daher auch zur Behandlung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom von Interesse sein. Noch wesentlich niedrigere Dosen könnten nötig sein zur selektiven Modulation der Blutzell- oder der Gefäßfunktion. Auch für die Prävention

eines Reperfusionsschadens bei der Therapie des akuten Myokardinfarktes könnte NO so genutzt werden<sup>51</sup>.

## 6 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist an einer Reihe von Regulationsmechanismen im Herz-Kreislaufsystem, im zentralen und peripheren Nervensystem und im Immunsystem beteiligt. Trotz seiner mit 0,05 bis 1,8 ms extrem kurzen chemischen Halbwertszeit im Vollblut konnten nach Inhalationstherapie mit Stickstoffmonoxid systemische Effekte von NO unter anderem auf die Blutungszeit beobachtet werden. Wie es zur Auslösung dieser systemischen Effekte kommen kann, war jedoch bislang unklar. Während von Erythrozyten eine Beteiligung am Transport von NO angenommen wird, ist über die Rolle des Plasmas am NO-Transport auch wegen mangelnder sensitiver Methoden zur Bestimmung der Metabolite von NO in plasmatischen Proben wenig bekannt.

Ziel war es daher, durch Weiterentwicklung und Validierung einer sensitiven Chemilumineszenz-Methode den Metabolismus von NO im humanen Plasma zu charakterisieren. Durch intravasale Applikation wässriger NO-Lösung sollte die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Blutfluss und Gefäßtonus untersucht und die zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert werden.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch Weiterentwicklung und Etablierung einer hochempfindlichen und -spezifischen Chemilumineszenz-Methode konnten die Oxidations- und Nitrosierungsprodukte des NO (Nitrit und S-Nitrosothiole) in niedrigen nanomolaren Konzentrationen im humanen Plasma gemessen werden.
2. Stickstoffmonoxid wird im humanen Plasma rasch konvertiert. Dabei entsteht vornehmlich Nitrit und zu geringeren Anteilen Nitrat sowie in nanomolaren Konzentrationen S-Nitrosothiole. Die Bindungsstellen zur Bildung von S-Nitrosothiolen scheinen dabei nicht sättigbar zu sein. Die Bildung von Nitrosothiolen im Plasma findet fast ausschließlich an hochmolekularen Plasmabestandteilen



ohne Interaktion mit niedrigmolekularen Proteinen statt. Ein Maximum der Nitrosothiolbildung wird erst nach fünfminütiger Inkubation mit NO erreicht.

3. NO-haltige Lösungen konnten sicher intraarteriell und intravenös beim Menschen appliziert werden und führten zu einer langandauernden sowohl lokalen als auch systemischen Dilatation der Leitungs- und Widerstandsgefäße. Ähnliche lokale und systemische vasoaktive Wirkung hatte auch die intravasale Applikation eines niedrigmolekularen Nitrosothiols. Die systemische Wirkung des NO kann so durch die Bildung von Nitrosothiolen und nachfolgende Freisetzung bioaktiven NOs erklärt werden. Die Bildung dieser NO-Addukte konnte sowohl in der lokalen Zirkulation des Unterarms als auch systemisch nach Gabe wässriger NO-Standards *in vivo* gezeigt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Al Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR, Flitney FW. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol.* 1997;121:1047-1050.
2. Alport C, Ramdani N, George D, Loscalzo J. detection of S-nitrosothiols and other nitric oxide derivatives by photolytic-chemiluminescence spectrometry. *Anal Biochem.* 1997;245:1-7.
3. Aoki T. Continuous flow determination of nitrite with membrane separation/chemiluminescence detection. *Anal Biochem.* 1990;4:128-130.
4. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 1993;7:349-360.
5. 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.
6. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 1996;271:C1424-C1437.
7. Boese M, Mordvintsev PI, Vanin AF, Busse R, Mulsch A. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J Biol Chem.* 1995;270:29244-29249.
8. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1897-1918.
9. Borland C. Endothelium in control. *Br Heart J.* 1991;66:405.
10. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 1995;27:331-340.
11. Butler AR, Megson IL, Wright PG. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1425:168-176.
12. Butler AR, Rhodes P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem.* 1997;249:1-9.
13. Cannon RO, III, Schechter AN, Panza JA, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Shelhamer JH, Gladwin MT. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest.* 2001;108:279-287.
14. Cantilena LR Jr, Smith RP, Frasier S, Kruszyna H, Kruszyna R, Wilcox DE. Nitric oxide hemoglobin in patients receiving nitroglycerin as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Lab Clin Med.* 1992;120:826-827.

15. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginin-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1998;32:57-61.
16. Chilian WM, Gutterman DD. Prologue: new insights into the regulation of the coronary microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;48:H2585-H2586.
17. Cook JA, Kim SY, Teague D, Krishna MC, Pacelli R, Mitchell JB, Vodovotz Y, Nims RW, Christodoulou D, Miles AM, Grisham MB, Wink DA. Convenient colorimetric and fluorometric assays for S-nitrosothiols. *Anal Biochem*. 1996;238:150-158.
18. Cox RD. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal Chem*. 1980;52:332-335.
19. de Belder A, Radomski M, Hancock V, Brown A, Moncada S, Martin J. Megakaryocytes from patients with coronary atherosclerosis express the inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:637-641.
20. de Belder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S, Vallance PJT. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res*. 1994;28:691-694.
21. de Belder AJ, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide and the pathogenesis of heart muscle disease. *Eur J Clin Invest*. 1995;25:1-8.
22. Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem*. 1981;14:351-358.
23. Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New perspectives in hypertension research. Potentials of vascular biology. *Hypertension*. 1994;23:1132-1140.
24. Ewing JF, Janero DR. Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium(III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:621-628.
25. Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, MacDonald T, Gaston B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:535-540.
26. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdeuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J*. 2002;16:1775-1785.
27. Feelisch M, Stamler J. *Methods in nitric oxide research*. 1996. Chichester.
28. Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature*. 1994;368:62-65.
29. Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*. 1998;273:3125-3128.

30. Fontijn A, Sabadell AJ, Ronco RJ. Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Anal Chem.* 1970;42:579.
31. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, Ostrovsky L, Fairhead T, Reinhardt P, Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest.* 1998;101:2497-2505.
32. Fuhrman TM, Pippin WD, Talmage LA, Reilley TE. Evaluation of collateral circulation of the hand. *J Clin Monit.* 1992;8:28-32.
33. Gaston B. Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:323-333.
34. Gaston B, Keith JF, III. Nitric oxide and bleeding time. *Pediatrics.* 1994;94:134-135.
35. Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997;418:291-296.
36. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 1998;273:11038-11043.
37. Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH, Schechter AN. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:9943-9948.
38. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO, III. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11482-11487.
39. Gödecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res.* 1998;82:186-194.
40. Gorimar, T. S. Total nitrogen determination by chemiluminescence. Van Dyke, K. 77-93. 1985. Boca Raton, FL, CRC Press. Bioluminescence and Chemiluminescence.
41. Gow AJ, Buerk DG, Ischiropoulos HA. A novel reaction mechanism for the formation of S-Nitrosothiols *in vivo*. *J Biol Chem.* 1997;272:2841-2845.
42. Gow AJ, Luchsinger BP, Pawloski JR, Singel DJ, Stamler JS. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:9027-9032.
43. Graf K. Auswertung und Messfehler okklusionsplethysmografischer Durchblutungsregistrierungen. *Acta Physiol Scand.* 1964;60:120-135.
44. Greenfield ADM, Whitney RJ, Mowbray JF. Methods for the investigation of peripheral blood flow. *Br Med Bull.* 1963;19(2):101-109.

45. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the Elements. 1984. Pergamon Press, New York.
46. Griendling K, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 1996;10:283-292.
47. 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, Vol. 4: Enzymology, biochemistry and immunology. Moncada S, Feelisch M, Busse R, Higgs EA, eds. 1994. Portland Press, London.
48. Hampl V, Walters CL, Archer SL. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
49. Han TH, Hyduke DR, Vaughn MW, Fukuto JM, Liao JC. Nitric oxide reaktion with red blood cells an hemoglobin under heterogeneous conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:7763-7768.
50. Heslop RB, Jones K. Inorganic Chemistry. 1976. Elsevier, Amsterdam.
51. Heusch G, Post H, Michel MC, Kelm M, Schulz K. Endogenous nitric oxide and myocardialadaptation to ischemia. *Circ Res.* 2000;87:146-152.
52. Hogman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Bleeding time prolongation and NO inhalation. *Lancet.* 1993;341:1664-1665.
53. Holmes AJ, Williams DLH. Reactions of S-Nitrosothiols with ascorbat: clear evidence of two reactions. *Chem Comm.* 21998;16:1711-1712.
54. Hotchkiss JH. Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate. *Am J Clin Nutr.* 1988;47:161-162.
55. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Sci Am.* 1990;535:560.
56. Jansen A, Drazen J, Osborne JA, Brown R, Loscalzo J, Stamler JS. The relaxant properties in guinea pig airways of S-Nitrosothiols. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 1992;261:154-160.
57. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996;380:221-226.
58. Jocelyn PC. The occurence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides. *Academic Press.* 1972.
59. Johnston HS, Crosby HJ. Kinetics of the fast gas phase reactin between ozone and nitric oxide. *J Chem Phys.* 1954;22:689-692.
60. Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:625-635.
61. Joshi MS, Ferguson Jr TB, Han TH, Hyduke DR, Liao JC, Rassaf T, Bryan NS, Feelisch M. Nitric oxide ist consumed, rather than conserved by reaction with

- oxyhemoglobin under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10341-10346.
62. Jourdain D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:409-417.
  63. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang Y-B, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2000;135:444-451.
  64. Keaney JF, Jr., Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Scharfstein J, Vita JA, Loscalzo J. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest*. 1993;91:1582-1589.
  65. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:273-289.
  66. Kelm M, Dahmann R, Wink D, Feelisch M. The nitric oxide/superoxide assay. Insights into the biological chemistry of the NO/O<sub>2</sub><sup>-</sup> interaction. *J Biol Chem*. 1997;272:9922-9932.
  67. 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.
  68. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: *The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects*. Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
  69. 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.
  70. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66:1561-1575.
  71. Kern MJ, Deligonul U, Vandormael M, Labovitz A, Gudipati CV, Gabliani G, Bodet J, Shah Y, Kennedy HL. Impaired coronary vasodilator reserve in the immediate postcoronary angioplasty period: analysis of coronary artery flow velocity indexes and regional cardiac venous efflux. *J Am Coll Cardiol*. 1989;13:860-872.
  72. Kindgen-Milles D, Arndt JO. Nitric oxide as a link in the generation of pain from veins in humans. *Pain*. 1996;64:139-142.
  73. Kleinman WA, Richie JP, Jr. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol*. 2000;60:19-29.
  74. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today*. 1998;19:556-561.

75. Kroncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:1407-1420.
76. Kubes P. Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993;265:H1909-H1915.
77. Lacza Z, Erdos B, Gorlach C, Wahl M, Sandor P, Benyo Z. The cerebrocortical microcirculatory effect of nitric oxide synthase blockade is dependent upon baseline red blood cell flow in the rat. *Neuroscience Letters.* 2001;291:65-68.
78. 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.
79. Lancaster JR, Jr. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide: Biol Chem.* 1997;1:18-30.
80. 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.
81. Lee K, Adrie C, Jacob HJ, Roberts jr JD, Zapol WM, Bloch KD. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon-induced arterial injury. *Circ Res.* 1996;78:337-342.
82. 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.
83. Liang.w., Browning R, Lauer RM, Sonka M. Automated analysis of brachial ultrasound time series. *proc SPIE.* 1998;3337:108-118.
84. Liao JC, Hein W, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8757-8761.
85. Liu X, Miller MJ, 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.
86. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR, Jr. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2175-2179.
87. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001;88:756-762.
88. Malinski T, Radomski MW, Taha Z, Moncada S. Direct electrochemical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194:960-965.

89. 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.
90. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res.* 2000;32:1-9.
91. Marley R, Patel RP, Orie N, Ceaser E, Darley-Usmar V, Moore K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:688-696.
92. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993;268:17478-17488.
93. Matsunaga K, Furchgott RF. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989;248:687-695.
94. May JM, Qu Z-C, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2000;279:1946-1954.
95. McMahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med.* 2002;8:711-717.
96. Minamiyama Y, Takemura S, Inoue M. Albumin is an important vascular tonus regulator as a reservoir of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:112-115.
97. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.
98. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995;9:1319-1330.
99. Moro MA, Darley-Usmar VM, Lizasoain I, Su Y, Knowles RG, Radomski MW, Moncada S. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br J Pharmacol.* 1995;116:1999-2004.
100. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest.* 1995;95:187-194.
101. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;198:1027-1033.
102. 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.



103. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994;78:915-918.
104. Palmer RM. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg*. 1993;128:396-401.
105. Parati G, Casadei R, Groppelli A, Di Rienzo M, Mancia G. Comparison of finger and intra-arterial blood pressure monitoring at rest and during laboratory testing. *Hypertension*. 1989;13:647-655.
106. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*. 2001;409:622-626.
107. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*. 1998;97:263-267.
108. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*. 1970;228:726-739.
109. Petrov V, Lijnen P. regulation of human erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 1996;271:1556-1564.
110. Porter KB, O'Brien WF, Kiefert V, Knuppel RA. Finapres: a noninvasive device to monitor blood pressure. *Obstet Gynecol*. 1991;78:430-433.
111. Preik M, Lauer T, Heiss C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall Med*. 2000;21:195-198.
112. Preik-Steinhoff H, Kelm M. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with high-performance anion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996;685:348-352.
113. Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*). *Phil Trans R Soc Lond B*. 1991;334:129-133.
114. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thrombosis and Haemostasis*. 1993;70:36-41.
115. Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:5913-5918.
116. 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 the 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.

117. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiss C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002;109:1241-1248.
118. Recchia FA, Vogel TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonat concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H852-H856.
119. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:3375-3378.
120. Rossaint R, Falke KJ, Lopez F, Slama K, Pison U, Zapol WM. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 1993;328:399-405.
121. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, di Simplicio P. Physiological levels of s-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res.* 2001;89:E47.
122. Ruengsakulrach P, Brooks M, Hare DL, Gordon I, Buxton BF. Preoperative assessment of hand circulation by means of Doppler ultrasonography and the modified Allen test. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;121:526-531.
123. Samouilov A, Zweier JL. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal Biochem.* 1998;258:322-330.
124. Scharfstein JS, Keaney JF, Jr., Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, Loscalzo J. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest.* 1994;94:1432-1439.
125. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiolog.* 1991;80:3-6.
126. Schrör K. Organische Nitrate. I. Wirkmechanismen und neue therapeutische Ansätze bei Myokardischämie. *Internist.* 1995;36:392-403.
127. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathion in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 1997;1997:633-642.
128. Scott-Burden T, Vanhoutte PM. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation.* 1993;87:51-55.
129. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992;267:15274-15276.
130. 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.
131. Simon DI, Stamler JS, Keaney JF, Osborne JA, Francis SA, Singel DJ, Loscalzo J. Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric

- oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:791-799.
132. Snyder SH. More jobs for that molecule. *Nature.* 1994;372:504-505.
133. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992;266 (5):68-77.
134. Stamler JS. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994;78:931-936.
135. Stamler JS, Feelisch M. Biochemistry of Nitric Oxide and redox-related Species. In: *Methods in nitric oxide research.* Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
136. Stamler JS, Feelisch M. Preparation and Detection of S-Nitrosothiols. In: *Methods in nitric oxide research.* Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
137. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:7674-7677.
138. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997;276:2034-2037.
139. Stamler JS, Loscalzo J. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives. *Anal Chem.* 1992;64:779-785.
140. 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.
141. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Rev.* 1996;1:1-30.
142. Stryer L. *Biochemie.* 1996. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.
143. Stuehr DJ, Kwon NS, Gross SS, Thiel BA, Levi R, Nathan CF. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:420-426.
144. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1996;97:22-28.
145. Turner, G. K. Measurement of light from chemical and biochemical reactions. Van Dyke, K. 43-78. 1985. Boca Raton, FL, CRC Press. Bioluminescence and Chemiluminescence.

146. Tyurin VA, Liu SX, Tyurina YY, Sussman NB, Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Kagan VE. Elevated levels of S-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res.* 2001;88:1210-1215.
147. van der Vliet A, Hoen PA, Wong PS, Bast A, Cross CE. Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxyxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1998;273:30255-30262.
148. Vaughn MW, Huang KT, Kuo L, Liao JC. Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem.* 2000;275:2342-2348.
149. Vaughn MW, Kuo L, Liao JC. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1998;274:1705-1714.
150. Vosper AJ. Nitrogen oxides and oxyacids. In: International Review of Science. Inorganic Chemistry. Sowerby DB, ed. 1975. Butterworth University Press.
151. Walter U. Physiological role of cGMP and the cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1989;113:41-88.
152. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A-S, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res.* 1993;73:1121-1127.
153. Wennmalm A, Benthin G, Petersson A-S. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin. *Br J Pharmacol.* 1992;106:507-508.
154. Wesseling KH. Finapres, continuous noninvasiv finger arterial pressure based on the method of Penaz. In: Blood pressure measurements. Meyer-Sabellik, Anlauf, Gotzen, Steinfeld, eds. 1991. Steinkopf Verlag, Darmstadt.
155. Wesseling KH. Finger arterial pressure measurement with Finapres. *Z Kardiol.* 1996;85 Suppl 3:38-44.
156. Windmueller HG, Spaeth AE. Source an fate of circulating citrulline. *American Journal of Physiology.* 1981;241:473-480.
157. Wink DA, Beckman JS, Ford PC. Kinetics of nitric oxide reaction in liquid and gas phase. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler J, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
158. Wink DA, Cook JA, Kim SY, Vodovotz Y, Pacelli R, Krishna MC, Russo A, Mitchell JB, Jour'dheuil D, Miles AM, Grisham MB. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem.* 1997;272:11147-11151.
159. Wright CD, Mulsch A, Busse R, Osswald H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;160:813-819.
160. Yang BC, Nichols WW, Mehta JL. Cardioprotective effects of red blood cells on ischemia and reperfusion injury in isolated rat heart: release of nitric oxide as

a potential mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 1996;1:297-305.

## 8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1:	Metabolismus von NO im Blut	16
Abbildung 2:	Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage	21
Abbildung 3:	Anlage zur Herstellung wässriger NO-Standards	25
Abbildung 4:	Aufbau des angiologischen Messplatzes bei intraarterieller Infusion zur Untersuchung lokaler angiologischer und biochemischer Veränderungen durch NO	33
Abbildung 5:	Aufbau des angiologischen Messplatzes bei intravenöser Infusion zur Untersuchung systemischer angiologischer und biochemischer Veränderungen durch NO	35
Abbildung 6:	Wiederfindung von Nitrit und S-Nitrosothiolen (RSNO) in wässriger Lösung	41
Abbildung 7:	Inkubation von frischem humanem Plasma mit 2 $\mu$ M NO	43
Abbildung 8:	Konzentrationsabhängige Konversion von NO	45
Abbildung 9:	Zeitverlauf des Metabolismus von NO im humanen Plasma	46
Abbildung 10:	Fehlende Interaktion verschiedener Plasmakomponenten bei der Bildung von S-Nitrosothiolen im humanen Plasma	48
Abbildung 11:	Vergleich der dilatorischen Effekte auf Leitungs- und Widerstandgefäße des Unterarmes nach intraarterieller Infusion von 36 $\mu$ mol NO bzw. 5 nmol GSNO	51
Abbildung 12:	Biochemische Analyse der NO-Metabolite im Plasma während der Passage des Blutgefäßsystems des Unterarms	53
Abbildung 13:	Systemische Wirkung bei intravenöser Applikation von authentischer NO-Lösung (30 $\mu$ mol) auf Leitungs- und Widerstandsgefäße	55

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Für seinen Einsatz und seine uneingeschränkte Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement haben bei mir tiefen Eindruck hinterlassen.

Herrn Dr. med. Tienush Rassaf bin ich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten zu größtem Dank verpflichtet. Seine dauernde Unterstützung und Aufmerksamkeit, seine Ruhe und Geduld haben mir zu allen Zeiten sehr geholfen. Für sein kritisches Korrekturlesen und sein großes Engagement danke ich ihm ausgesprochen. Er beeindruckte und motivierte mich stets sehr durch seine große Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit.

Frau Petra Kleinbongard danke ich für ihre konstruktiven Vorschläge und Ideen. Für ihre freundliche Unterstützung und ständige Bereitschaft zur Diskussion bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

Frau Putrika Gharini danke ich für ihre große und bereitwillige Unterstützung beim experimentellen Arbeiten.

Frau MTA Simone Matern möchte ich sehr danken für ihre große Hilfe und Unterstützung bei den klinischen Versuchen. Ihre andauernde und große Hilfsbereitschaft war für mich sehr wertvoll.

Ebenso danke ich Frau BTA Claudia Ferfers und Frau MTA Gabi Dömer für ihre stete und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im kardiologischen Labor.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Julia Susanne Erckenbrecht  
Geburtsdatum: 05.06.1978  
Geburtsort: Düsseldorf  
Nationalität: deutsch  
Konfession: evangelisch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Prof. Dr. med. Joachim F. Erckenbrecht  
Dr. med. Elfriede E. Erckenbrecht  
Geschwister: Constantin J. Erckenbrecht

### Schulische Ausbildung

1984 – 1988 Martin-Luther-Grundschule, Düsseldorf  
1988 – 1997 Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium,  
Düsseldorf mit Erlangen der Allgemeinen  
Hochschulreife

### Hochschulausbildung

09/1997 Beginn der Studiums der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
09/1999 Ärztliche Vorprüfung  
09/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2000 Step 1 der United States Medical Licensing Examination  
09/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Praktisches Jahr:  
11/2002 – 02/2003 Klinik für Anästhesiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
02/2003 – 05/2003 Medizinische Klinik und Poliklinik der Heinrich-



Heine-Universität, Düsseldorf

05/2003 – 09/2003 Herzthoraxchirurgie, Surgical Associates of Texas,  
Texas Heart Institute, Houston, Tx, USA

12/2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

seit 03/2004 Ärztin im Praktikum bzw. Assistenzärztin an der  
Klinik für Hepatologie, Gastroenterologie und  
Endokrinologie der Charité, Campus Virchow  
Klinikum

## Abstract

Experimentelle und klinische Untersuchungen zum oxidativen und nitrosativen Abbau und Transport von Stickstoffmonoxid im Plasma

vorgelegt von Julia Erckenbrecht

**Hintergrund:** Die kontinuierliche Produktion und Freisetzung endothelialen Stickstoffmonoxids (NO) spielt eine wichtige Rolle in der vaskulären Homeostase und kardialen Funktion. Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von NO im Blut ging man bisher davon aus, dass NO ausschließlich parakrine Wirkungen entfalten kann. Klinische Studien zeigten jedoch, dass hohe Dosen inhalierten NOs Effekte jenseits des pulmonalen Kreislaufes hervorrufen können. Wie es zur Auslösung dieser systemischen Effekte kommen kann, war jedoch bislang unklar. Während von Erythrozyten eine Beteiligung am Transport von NO angenommen wird, ist über die Rolle des Plasmas am NO-Transport auch wegen mangelnder sensitiver Methoden zur Bestimmung der Metabolite von NO in plasmatischen Proben wenig bekannt.

Ziel war es daher, durch Weiterentwicklung und Validierung einer sensitiven Chemilumineszenz-Methode den Metabolismus von NO im humanen Plasma zu charakterisieren. Durch intravasale Applikation wässriger NO-Lösung sollte die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Blutfluss und Gefäßtonus untersucht und die zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert werden.

**Methoden:** Zur Inkubation von Plasma und zur intravasalen Applikation von NO wurden Standards wässriger NO-Lösung hergestellt. Die im Plasma entstehenden NO-Addukte S-Nitrosothiole und Nitrit konnten durch eine weiterentwickelte und verbesserte Methode der Gasphasen-Chemilumineszenz bestimmt werden, während Nitrat mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie gemessen wurde. Lokale und mögliche systemische Effekte von Stickstoffmonoxid auf Widerstands- und Leitungsgefäße *in vivo* wurden bei neun gesunden Probanden mittels Venenverschlussplethysmographie und hochauflösender Sonographie untersucht.

**Ergebnisse:** Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

4. Es gelang, eine hochsensitive und -spezifische Methode auf Basis der Chemilumineszenz-Detektion weiterzuentwickeln und zu etablieren. Die Methode erlaubt mit einer Sensitivität von 2 nM die Bestimmung von Nitrit und S-Nitrosothiolen in wässrigen und biologischen Proben.
5. Mit Hilfe dieser Methode konnte der Metabolismus von NO im humanen Plasma wie folgt charakterisiert werden: Basale plasmatische Konzentrationen von S-Nitrosothiolen lagen entgegen früheren Untersuchungen im nanomolaren Bereich. Physiologische und supraphysiologische Konzentrationen von zugesetztem NO unterlagen im Plasma nicht nur einem oxidativen Abbau, sondern auch einem nitrosativen Metabolismus unter Bildung von S-Nitrosothiolen ohne Erreichen einer Sättigungsgrenze. Die Bildung der S-Nitrosothiole erfolgte nahezu ausschließlich an hochmolekularen Plasmaproteinen und folgte einer zeitabhängigen Kinetik.
6. *In-vivo*-Applikation von NO-gesättigter Lösung führte sowohl lokal als auch systemisch zur Bildung plasmatischer S-Nitrosothiole und gleichzeitig zu einer Dilatation von Leitungs- und Widerstandsgefäßen. Die Applikation exogener S-Nitrosothiole führte zu ähnlichen dilatatorischen Effekten, wohingegen die Infusion der oxidativen Metabolite des NO (Nitrit und Nitrat) sich unter den gegebenen Bedingungen als biologisch inaktiv erwiesen.

**Zusammenfassung:** Stickstoffmonoxid kann im Gefäßsystem *in vivo* systemische Wirkung entfalten, an deren Vermittlung das Plasma durch Bildung von bioaktiven S-Nitrosothiolen als Speicher- und Transportstoff beteiligt ist. Die pharmakologische Applikation wässriger NO-Lösung könnte möglicherweise in der Zukunft ein Feld für neue Therapiekonzepte im Bereich kardiovaskulärer Erkrankungen bieten.

genehmigt:

---

Prof. Dr. med. M. Kelm