

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm

**Diätetisches Nitrat verbessert die Regeneration nach
Ischämie im murinen Hinterlaufmodell über Modulation des
mTOR-Signalweges**

Dissertation

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

vorgelegt von
Andreas Johannes Schicho

2014

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

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

*Referent: Univ.-Prof. Dr. med. T. Rassaf
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. S. Wesselborg*

Meinen Eltern gewidmet

*» Nicht Kunst und Wissenschaft allein,
Geduld will bei dem Werke sein. «*

Johann Wolfgang von Goethe

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kropp M., Hendgen-Cotta U., **Schicho A.**, Lüdike P., Totzeck M., Stock P., Heiss C., Niessen M., Kelm M., Rassaf T., (2011), Dietary nitrate mobilizes circulating angiogenic cells (CAC) and exerts cytoprotective and angiogenic effect in the ischemic hind-limb model in mice – P670.

Clinical Research in Cardiology. 100, Suppl 1.

Schicho A., Hendgen-Cotta U., Totzeck M., Rammos C., Goedecke A., Kelm M., Rassaf T., (2012), Nitrite influences proliferation of myoblasts via its reduction to nitric oxide in skeletal muscle tissue – P5628.

European Heart Journal. 33 (Abstract Supplement), 1051

Hendgen-Cotta, U.-B., Luedike P., Totzeck M., Kropp M., **Schicho A.**, Stock P., Rammos C., Niessen M., Heiss C., Lundberg J.O., Weitzberg E., Kelm M., Rassaf T., (2012), Dietary nitrate supplementation improves revascularization in chronic ischemia.

Circulation, 126 (16), 1983 – 92. *Impact Factor* 14,168

Zusammenfassung

Nitrit und Nitrat sind bioaktivierbare Quellen für den Stickstoffmonoxid-(NO)-Stoffwechsel. NO kann bei Minderperfusion protektiv wirken und hat direkten Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, in welchem Serin/Threonine-Protein Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) eine zentrale Rolle spielt. Ob diätetisch supplementiertes Nitrat bei einer Hinterlaufischämie *via* Nitrit und NO die Geweberegeneration unterstützt, ist bislang unklar. Dabei ist für die Regeneration die Proliferation von Myoblasten notwendig, welche von mTOR reguliert wird. Welchen Einfluss Nitrit und NO auf dieses Schlüsselenzym haben ist bisher nicht bekannt.

Naval medical research institute (NMRI)-Wildtyp Mäuse erhielten über 14 Tage entweder mit Natriumnitrat (1 g/L) oder Natriumchlorid (Kontrolle) supplementiertes Trinkwasser. An Tag 7 wurde linksseitig die A. femoralis mittels operativer Exzision entfernt um eine Ischämie zu erzeugen. Die Perfusion wurde eine Woche nach Operation durch Laser-Doppler gemessen, die Apoptose primärer, isolierter Myoblasten mittels TUNEL-Färbung sichtbar gemacht. Nitrat, Nitrit sowie S-Nitrosothiole wurden im Plasma durch reduktive Gas-Phasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD) und Hochdruckflüssigkeits-chromatographie (HPLC) bestimmt.

In einem ergänzenden *in vitro* Ansatz wurde die Nitrit- und NO-Wirkung auf kultivierte C2C12-Myoblasten untersucht. Hierbei wurden der NO-Fänger cPTIO (2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) und der sGC-Hemmer ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) eingesetzt, die intrazelluläre cGMP-Konzentration bestimmt und die mTOR-Aktivität nach Nitrit- und NO-Behandlung kolorimetrisch gemessen.

Die Perfusion des ischämischen Hinterlaufes war unter Supplementierung von Nitrat eine Woche nach Operation gegenüber der Kontrolle verbessert ($73 \pm 4\%$ vs. $59 \pm 4\%$, $p < 0,05$) und die Apoptose der Myoblasten im Hinterlaufgewebe verringert ($67 \pm 16\%$ vs. $198 \pm 19\%$, $p < 0,001$). Nitrat ($451 \pm 75 \mu\text{M}$ vs. $39,67 \pm 16,88 \mu\text{M}$), Nitrit ($5,77 \pm 1,73 \mu\text{M}$ vs. $0,46 \pm 0,06 \mu\text{M}$) und S-Nitrosothiole ($349 \pm 98 \text{ nM}$ vs. $9 \pm 2 \text{ nM}$) im Plasma waren durch diätetische Nitratsupplementierung gegenüber der Kontrolle erhöht ($p < 0,05$).

In dem *in vitro* Ansatz der Myoblasten-Zellkultur zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt von Nitrit auf die Proliferation ($114 \pm 2\%$ vs. $100 \pm 3\%$ Wachstum/24 h, $p < 0,005$). Abfangen des freien NO durch cPTIO und Unterbrechung der NO-Signaltransduktion mittels sGC-Blockade beeinflussten die Wirkung von Nitrit nicht. Auch der intrazelluläre cGMP-Gehalt stieg nach Nitritbehandlung nicht an. Dies deutet auf eine NO-unabhängige Wirkung von Nitrit hin. Als Signalweg ist dabei eine direkte Wirkung von Nitrit auf mTOR möglich. Denn nicht nur NO, sondern auch Nitrit selbst erhöhte *in vitro* die Phosphorylierungs-Aktivität von mTOR (Nitrit $1,02 \pm 0,01$, NO $1,02 \pm 0,03$, Kontrolle $0,74 \pm 0,03$; $p < 0,001$).

In einem *in vivo* Modell der Maus unterstützte diätetisches Nitrat die Gewebe- und Perfusionsregeneration nach induzierter Hinterlaufischämie. Die beobachteten anti-apoptischen Effekte *in vivo* konnten außer durch direkte NO-Wirkung auch durch eine NO-unabhängige Wirkung von Nitrit *in vitro* erklärt werden. Hierbei zeigte sich ein direkter Einfluss sowohl von NO als auch Nitrit auf die Aktivität des zentralen mTOR-Signalweges.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
µl	Mikroliter
A.	Arteria, <i>lat.</i>
Abb.	Abbildung
CAC	circulating angiogenic cell/s, <i>engl.</i>
CD	cluster of differentiation, <i>engl.</i>
CFU	colony forming units, <i>engl.</i>
cPTIO	2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
DETA-NO	Diethylenetriamine-NONOate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein, <i>engl.</i>
eNOS	Endotheliale NO-Synthase (NOS III; EC 1.14.13.39)
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography, <i>engl.</i>
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare NO-Synthase (NOS II; EC 1.14.13.39)
i.p. / i.v.	intraperitoneal / intravenös
l	Liter
Mb	Myoglobin
mbar	Millibar
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNC	Mononukleäre Zelle/n
ms	Millisekunden
mTOR	mammalian target of rapamycin, <i>engl.</i> (EC 2.7.11.1)
MW	mouthwash, <i>engl.</i> = Chlorhexetidin-Mundspülung
n.a.	nicht angegeben

NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NMRI	naval medical research institute, <i>engl.</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase (EC 1.14.13.39)
NO	Stickstoffmonoxid
NO _x	Gesamtheit der Nitrosospezies
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
n.s.	nicht signifikant
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
OP	Operation
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule, <i>engl.</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMS	5-methylphenazinium-methylsulfat
ROI	region of interest, <i>engl.</i>
ROS	reactive oxygen species, <i>engl.</i>
RPM	rounds per minute, <i>engl.</i>
RNNO	Nitrosamine
RSNO	Nitrosothiole
RXNO	Nitrosospezies (RNNO + RSNO)
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
sGC	soluble Guanylateyclase
SMA α	smooth muscle actin alpha, <i>engl.</i>
TBS-T	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
VEGF	vascular endothelial growth factor, <i>engl.</i>
VEGF-R2	VEGF-Rezeptor 2
Vol%	Volumenprozent
WST-8	(2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium-mononatriumsalz)
XOR	Xanthinoxidoreduktase (EC 1.17.3.2)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der Nitrat-Nitrit-Stickstoffmonoxid (NO)-Weg	1
1.1.1. Rolle kommensaler Bakterien der Mundflora.....	3
1.1.2. Mechanismen der Bildung von NO aus Nitrit.....	3
1.2. Pathophysiologische Bedeutung des Nitrat-Nitrit-NO Weges.....	3
1.3. Pathophysiologie des Ischämieschadens.....	4
1.3.1. Wirkung von Nitrit und NO bei chronischer Ischämie	5
1.3.2. Bedeutung der Myoblasten für die Skelettmuskulatur	5
1.3.3. Wirkung von Nitrit und NO auf Proliferation von Myoblasten	6
1.4. Fragestellungen der Arbeit	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1. Versuchskollektive und Versuchsprotokoll	9
2.2. Mausmodell der kritischen Extremitätenischämie.....	9
2.3. Perfusionsanalyse mittels Laser-Doppler-Messung	11
2.4. Bestimmung der Nitrit-, Nitrat- und Nitrosothiol-Level im Plasma.....	11
2.4.1. Probengewinnung und -aufbereitung.....	12
2.4.2. HPLC-Messung von Nitrat und Nitrit.....	12
2.4.3. Detektion von S-Nitrosoverbindungen mittels CLD.....	13
2.5. <i>Ex vivo</i> Analyse des Muskelgewebes.....	14
2.5.1. Isolation von Myoblasten aus Skelettmuskelproben	14
2.5.2. Charakterisierung der Apoptose per TUNEL-Reaktion.....	16
2.6. <i>In vitro</i> Kultur muriner C2C12-Myoblasten	17
2.6.1. Quantifizierung der Proliferation mittels Neutral-Rot-Assay.....	18
2.6.2. Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus	18
2.6.3. Quantifizierung des intrazellulären cGMP-Gehaltes	19
2.6.4. Bestimmung der mTOR-Phosphorylierungs-Aktivität	19
2.6.5. Messung der metabolischen Aktivität mittels WST-8.....	20
2.7. Mathematisch-statistische Methoden	21

3. Ergebnisse	22
3.1. Einfluss diätetischen Nitrats auf die Geweberegeneration <i>in vivo</i>	22
3.1.1. Perfusion des Hinterlaufs	22
3.1.2. Apoptose der Myoblasten	23
3.1.3. Veränderungen des NO-Pools	25
3.2. <i>In vitro</i> Einfluss von Nitrit auf die Myoblasten-Proliferation.....	28
3.2.1. Dosisabhängigkeit der Proliferation	28
3.2.2. Analyse von Zellzyklus und metabolischer Aktivität.....	30
3.2.3. NO-unabhängige Wirkung von Nitrit auf die Proliferation	32
3.2.4. Intrazellulärer cGMP-Gehalt nach Applikation von Nitrit.....	33
3.2.5. mTOR-Aktivität nach Nitrit- und NO-Behandlung	34
3.2.6. Disinhibierung und Hemmung von mTOR	35
4. Diskussion	37
4.1. Einfluss exogenen Nitrats auf die Regeneration der Perfusion	38
4.2. Diätetische Modulation des NO-Pools.....	39
4.3. Zellkultur.....	40
4.4. Mechanistische Überlegungen	41
5. Schlussfolgerungen	43
Literaturverzeichnis	45

1. Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist von besonderer Bedeutung für eine Reihe wesentlicher, physiologischer Signalprozesse. So reguliert es u.a. den Gefäßtonus¹, besitzt im peripheren und zentralen Nervensystem die Funktion eines Neurotransmitters², ist Effektor des Immunsystems^{3, 4} und Regulator der Hämostase⁵. NO wird hierfür durch das Enzym NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet, wobei molekularer Sauerstoff benötigt wird⁶. Mit fallendem Sauerstoffpartialdruck, wie es z.B. im Rahmen einer Minderdurchblutung der Fall ist, wird jedoch die Funktion aller NOS-Isoformen zunehmend eingeschränkt⁷. Neben einer neuronalen (nNOS)⁸ und induzierbaren (iNOS)⁹ Isoform existiert eine endotheliale (eNOS)^{8, 10} und erythrozytäre Isoform¹¹. Obwohl die physikalische Halbwertszeit des gasförmigen NO im Blut nur Millisekunden beträgt¹⁰, ermöglicht die Interaktion mit Plasmaproteinen eine Wirkung von NO auch über den Ort seiner Bildung hinaus¹². Dafür kann NO mit den Thiolgruppen von Proteinen, Molekülen oder Aminosäuren – wie z.B. Albumin, Glutathion oder Cystein – S-Nitrosothiole (RSNO) bilden, welche mit dem Blutstrom transportiert werden¹². Durch Reaktion mit Übergangsmetallen wird das gebundene NO wieder freigesetzt¹³. Vergleichbare Produkte finden sich auch bei der Reaktion von Aminen mit NO (RNNO)¹².

Als Abbauprodukt von NO gelten Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-). Wenn NO keine Bindung eingeht, wird es stufenweise über NO_2^- zu NO_3^- oxidiert. Beide Produkte können renal ausgeschieden werden.⁷

1.1. Der Nitrat-Nitrit-Stickstoffmonoxid (NO)-Weg

Mittlerweile ist bekannt, dass die beiden Metabolite NO_2^- und NO_3^- auch als Edukte für eine erneute NO-Bildung dienen können. Als alternative Quelle für die NO-Synthese können sie jedoch nicht nur dem endogenen Recycling entstammen – u.a. lässt sich Nitrat von außen als Quelle für den NO-Stoffwechsel zuführen (Abb. 1).

So wird insbesondere über Gemüse wie Spinat, rote Beete oder Kopfsalat Nitrat aufgenommen¹⁴. Auch Leitungswasser enthält in vielen Regionen

beträchtliche Mengen Nitrat⁷; deutsches Trinkwassers enthält meist mehr als 50 mg/l¹⁵. Aus der Nahrung aufgenommenes Nitrat wird schließlich zu Nitrit reduziert¹⁶. Dieses kann unter physiologischen und pathologischen Bedingungen selbst als Effektor auftreten¹⁷⁻¹⁹ oder aber zu NO weiter reduziert werden^{7, 20}. Nitrat spielt über diesen sogenannten Nitrat-Nitrit-NO Weg eine wesentliche Rolle für eine Reihe von Regulationsmechanismen im Herz-Kreislauf-System^{7, 21-28}.

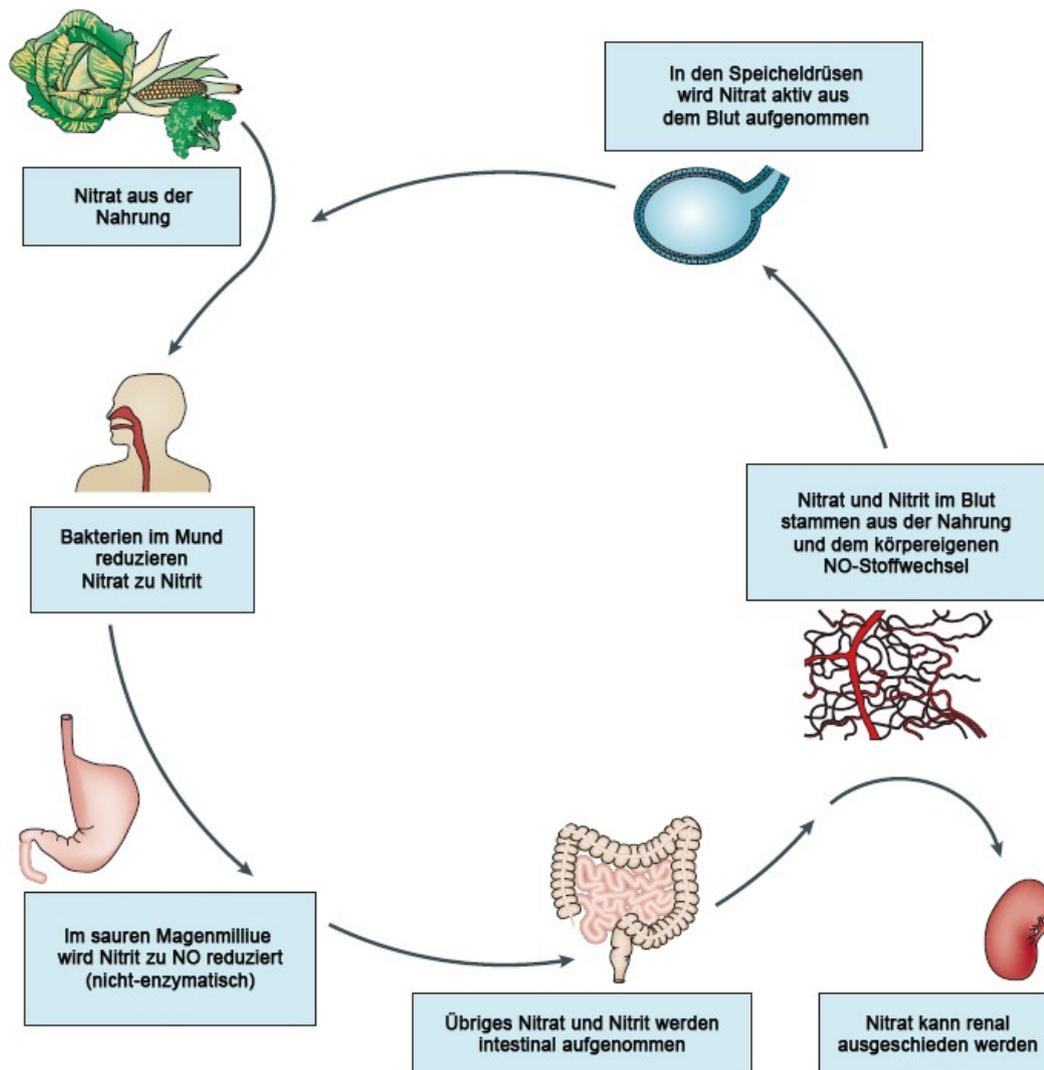


Abb. 1 Der enterosaliväre Nitrat-Kreislauf In besonderem Maße enthält grünes Blattgemüse wie Spinat oder Wurzelgemüse wie Rote Beete Nitrat. Auch im Trinkwasser ist es in unterschiedlichem Maße enthalten. Nitrat wird mittels kommensaler Bakterien im Mund zu Nitrit reduziert. Im sauren Magenmilieu wird Nitrit nicht-enzymatisch zu NO reduziert. Übriges Nitrat und Nitrit wird intestinal in den Blutkreislauf aufgenommen und steht nun systemisch zur Verfügung. Weiterhin kann Nitrat renal ausgeschieden werden oder in den Speicheldrüsen konzentriert werden und dem Kreislauf erneut zugeführt werden. Modifiziert nach ^{7, 29}

1.1.1. Rolle kommensaler Bakterien der Mundflora

Bis zu 25% des Plasmanitrits und 80% des Plasmanitrats entstammen exogenen Ursprungs³⁰. Nitrat wird hierfür im oberen Gastrointestinaltrakt aus Nahrung und Trinkwasser resorbiert. Während bis zu 50% des so gewonnenen Nitrats renal ausgeschieden werden, wird rund ein Viertel des Plasmanitrats in den Speicheldrüsen aktiv extrahiert, so dass die Nitratspiegel des Speichels bis zu 20-fach über den Plasmaspiegeln liegen³¹. Rund 20% des aus dem Plasma extrahierten Nitrats wird zu Nitrit reduziert¹⁶. Diese Reduktion wird im Wesentlichen von Nitratreduktasen kommensaler, fakultativ anaerober Bakterien der Mundflora katalysiert^{7, 16}.

1.1.2. Mechanismen der Bildung von NO aus Nitrit

Die Bildung von NO aus Nitrit erfolgt über mehrere Wege: Im sauren Magenmilieu wird das im Speichel enthaltene Nitrit zu Hydrogennitrit (HNO_2) protoniert, welches dann in NO und andere Nitrogenoxide zerfällt³². In Anwesenheit von Thiocyanat, Ascorbinsäure oder Polyphenolen wird der größte Teil des Nitrits zu NO umgewandelt³³⁻³⁵. Auch die XOR³⁶, mitochondriale Komplexe³⁷, Cytochrom P450³⁸, NO-Synthasen³⁹, Hämoglobin⁴⁰, Myoglobin^{41, 42} und Neuroglobin⁴³ besitzen die Fähigkeit, Nitrit zu NO zu reduzieren.

1.2. Pathophysiologische Bedeutung des Nitrat-Nitrit-NO Weges

Während die Synthese von NO durch die NOS von Sauerstoff abhängig ist, steigt die Bildung von NO aus Nitrit entlang des fallenden Sauerstoffgradienten, wie er bei Ischämie zu beobachten ist, an²⁰. Mit Plasmakonzentrationen von rund 750 nM bei der Maus und zwischen 50 und 300 nM beim Menschen^{12, 22, 44-46} stellt Nitrit einen bioaktivierbaren Pool für die NO-Bildung unter Hypoxie dar^{7, 47}.

1.3. Pathophysiologie des Ischämieschadens

Als Ischämie wird die pathologische, unzureichende oder fehlende Durchblutung von Gewebe in Folge mangelnden arteriellen Blutzufusses bezeichnet⁴⁸. Ätiologisch lassen sich ischämische Ereignisse als inflammatorisch-degenerativ, vasospastisch oder mechanisch okklusiv klassifizieren⁴⁹. Der Abfall des Sauerstoffpartialdrucks sowie fehlende Stoffwechseledukte wie Glukose führen zu einer Einschränkung des aeroben Energiestoffwechsels. Dabei sammeln sich Kohlenstoffdioxid, Laktat und anderen Stoffwechselprodukte an, der pH-Wert fällt ab. Dadurch kommt es u.a. zur direkten und indirekten Schädigung von essentiellen zellulären Enzymen und Strukturproteinen, wie z.B. Plasma- oder Mitochondrienmembranen⁵⁰.

Diese pathobiochemischen Vorgänge können letztlich zum Zelltod im Rahmen von apoptotischen Prozessen oder Nekrose führen. Apoptose scheint hierbei einen besonderen Stellenwert einzunehmen, denn im ischämischen Skelettmuskel ist Apoptose für bis zu 40%⁵¹ des Gewebeverlustes und im Falle des Myokardinfarkts für bis zu 86%⁵² des Zellverlustes verantwortlich. Die Apoptose kann hierbei über spezifische Signalwege ausgelöst werden⁵³, welche über eine gemeinsame Endstrecke zum Zelltod führen. Im Rahmen dieser Signalwege löst die Aktivierung membranständiger Rezeptoren eine intrazelluläre Apoptose-Kaskade aus⁵⁴, wobei Caspasen auf der Endstrecke der Apoptose für den intrazellulären Proteinabbau verantwortlich sind. Zugleich aktivieren sie Endonukleasen, welche die DNS im Zellkern zerstört⁵⁵. Auf zellulärer Ebene finden sich in frühen Phasen Veränderungen an der Plasmamembran, wie z.B. die Translokation von Phagozytosesignalen für Makrophagen⁵⁴. Es folgen eine typische Verkleinerung und Fragmentierung des Zellkerns, die Degradation der DNS sowie die Abschnürung von Zytoplasma in membrangebundene Apoptosevesikel⁵⁶, wodurch die unkontrollierte Antigenpräsentation verhindert wird. Alternativ aktivieren bei der intrinsisch bedingten Apoptose intrazelluläre Sensoren die Kaskade, wenn die Zellintegrität zu stark gestört ist. Dies ist beispielsweise in mangelndurchbluteten Geweben als u.a. Folge des Sauerstoffmangels der Fall. Hierbei ändert sich die Permeabilität der

inneren Mitochondrienmembran, woraufhin freigesetztes Cytochrom C die Endstrecke der Apoptose anstößt⁵⁷.

1.3.1. Wirkung von Nitrit und NO bei chronischer Ischämie

Neben den genannten Effekten bei akuter, kurzzeitiger Ischämie konnte eine NO-vermittelte Protektion auch für anhaltende Ischämien nachgewiesen werden. Zum Beispiel konnten neurologische Defizite, welche durch eine chronisch-vasospastische Mangel durchblutung bedingt sind, durch die Infusion von Nitrit verhindert werden⁵⁸.

Park et al. zeigte an *eNOS*^{-/-}-Mäusen, dass die Regenerationsprozesse bei Hinterlaufischämie NO abhängig sind⁵⁹. *eNOS*^{-/-}-Mäuse zeigten im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren bereits 48 Stunden nach Entfernung der A. femoralis Nekrosen der Zehen. In einer ersten Anpassungsphase an die Ischämie wurden vermehrt für Gefäßumbau benötigte Hemangiozyten entlang der Arteriolen im Hinterlauf gefunden, in einer späteren Phase fanden diese sich vor allem intramuskulär, entlang der Kapillaren. Kumar et al. konnte 2008 zeigen, dass die intraperitoneale Anwendung von Nitrit über eine vermehrte Verfügbarkeit von NO die Wiederherstellung der Durchblutung nach Ischämie des Hinterlaufs signifikant verbessert¹⁹. Sowohl die auf ischämische Areal beschränkte Gefäßneubildung als auch der Blutfluss durch Kollateralen und Arteriogenese wurden durch die Behandlung unterstützt. Es ist jedoch bis dato nicht bekannt, ob die Effekte dieser parenteralen Nitrittherapie auch durch eine diätetische Nitratsupplementierung erreicht werden können. Um die Wirkung einer solchen diätetischen Nitratsupplementierung zu beurteilen, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls das Modell der Hinterlaufischämie gewählt.

1.3.2. Bedeutung der Myoblasten für die Skelettmuskulatur

Terminal differenzierte Skelettmuskulatur ist in der Lage, bei Bedarf neue Muskelfasern zu bilden. Als Reaktion auf verschiedene Stimuli, wie z.B. Traumata, Schäden durch degenerative Erkrankungen wie Muskeldystrophien oder auch Training regeneriert die Muskulatur neue

Myozyten⁶⁰⁻⁶⁵. Diese Fähigkeit ist auf die sogenannten Satellitenzellen zurückzuführen, welche als undifferenzierte mononukleäre Zellen zwischen Basallamina und Zellmembran der Muskelfasern liegen⁶⁶⁻⁶⁸. Charakteristisch für den Ruhezustand dieser Satellitenzellen sind neben bestimmten Antigenen an der Zelloberfläche die persistierende G0 Phase^{69, 70}. Durch o.g. Reize aktiviert treten die Zellen zur Proliferation wieder in den Zellzyklus ein. Dabei entsteht eine Subpopulation, die sogenannten Myoblasten, welche daraufhin entweder zu neuen Muskelfasern verschmelzen oder das Synzytium vorhandener Muskelfasern erweitern und somit als terminal differenzierte Zellen nicht mehr für die Regeneration zur Verfügung stehen^{71, 72}. Zeitgleich wird eine zweite Subpopulation regeneriert, welche den Pool ruhender Satellitenzellen aufrecht erhält^{73, 74}.

1.3.3. Wirkung von Nitrit und NO auf Proliferation von Myoblasten

Die stimulierende Wirkung von NO auf die Zellproliferation ist bereits gut untersucht; hierbei gilt die Bildung von cGMP als zentraler Schritt⁷⁵⁻⁷⁷. NO erhöht jedoch auch cGMP-unabhängig die Zahl Pax7⁺ Zellen, wodurch der Erschöpfung des Reservepools dieser Zellen bei schweren Schäden entgegen gewirkt wird⁷⁸. Auch die Effekte von Nitrit bei Vasodilatation und Zellprotektion unter Hypoxie und Ischämie sind größtenteils auf NO zurückzuführen, welches reduktiv aus Nitrit gebildet wird^{41, 42, 79, 80}. Auch Nitrit selbst kann eine Rolle für die Zellproliferation und Wundheilung spielen, wie kürzlich an einem Modell menschlichen Atemwegepithels gezeigt wurde⁸¹.

Die Proliferation von Myoblasten ist von zentraler Bedeutung für die komplex regulierte Myogenese. Eine große Zahl von Wachstumsfaktoren, freigesetzt sowohl von ortsständigen als auch eingewanderten Zellen, ist an der Regulation beteiligt, u.a. hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor (IGF-I), fibroblast growth factor (FGF) und NO^{71, 82}. Diese aktivieren verschiedene Signalwege, einschließlich der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt, ERK1/2 und mTOR⁸³⁻⁸⁵. Letzteres ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase mit zwei Unterformen, Komplex 1 (mTORC1) und Komplex 2 (mTORC2)^{86, 87}, wobei beide in der Regulation von Proteinsynthese und Proliferation involviert sind^{88, 89}.

Die Differenzierung von Myoblasten benötigt im Besonderen die Aktivität des mTORC2⁹⁰. Die Komplexe unterscheiden sich u.a. in ihrer Sensitivität für Inhibitoren, wie z.B. Rapamycin. Während Komplex 1 hochsensitiv auf Rapamycin reagiert, lässt sich Komplex 2 erst durch hohe Konzentrationen und lange Einwirkzeiten von Rapamycin hemmen^{91, 92}. Die Aktivierung von AMPK unterdrückt ebenfalls den mTOR-Signalweg^{93, 94} und kann zusätzlich durch eine Limitierung der Proteinsynthese die Proliferation hemmen⁹⁵.

Ob Nitrit die Proliferation von Myoblasten beeinflusst, ist nicht bekannt. Dieses würde jedoch neue Möglichkeiten in der Modulation der Muskelregeneration bieten, wie z.B. durch die Supplementierung von Nitrit und diätetischem Nitrat.

1.4. Fragestellungen der Arbeit

Aufgrund des derzeitigen Kenntnisstandes ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragen:

- Welchen Effekt hat die diätetische Nitrat-Supplementierung auf die Geweberegeneration im Mausmodell der chronischen, einseitigen Hinterlaufischämie?
- Welchen Einfluss haben Nitrit und NO auf die Proliferation von Myoblasten?
- Ist die Reduktion von Nitrit zu NO Voraussetzung für die Wirkung von Nitrit und welche Rolle spielen mTOR und AMPK?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchskollektive und Versuchsprotokoll

NMRI (Naval Medical Research Institute)-Wildtyp Mäuse (Taconic, Köln, Deutschland) wurden in 2 Behandlungsgruppen untersucht. Die Gruppen unterschieden sich nicht in Bezug auf Gewicht, Alter oder Geschlecht. Die Mäuse wurden in einem vollklimatisierten Raum (20 mbar, 40% Luftfeuchte, 24 °C) bei einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Standardfutter für Kleinnager (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser wurden *ad libitum* gefüttert.

Es wurden 2 Gruppen untersucht:

- Kontrolle: Trinkwasser + Kochsalz (NaCl; 1 g/l)
- Nitrat: Trinkwasser + Natriumnitrat (NaNO₃; 1 g/l)
(NaCl und NaNO₃ von Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)

2.2. Mausmodell der kritischen Extremitätenischämie

Um eine kritische Extremitätenischämie auszulösen, wurden die Versuchstiere am linken Hinterlauf operiert. Die Ligatur und Exzision der A. femoralis proximal der Abzweigung der A. femoralis profunda bis proximal des Abgangs der A. saphena führt zu einer kritischen Minderperfusion des Hinterlaufs im distalen Stromgebiet der A. femoralis^{96, 97}.

Die Mäuse wurden mittels Ketamin i.p. (45 mg/kg) und Xylazin i.p. (10 mg/kg) anästhesiert. Die Anästhesie wurde inhalativ aufrechterhalten (Isofluran 1,5 Vol%). Das Fell an Hinterläufen und Abdomen wurde durch Keratolyse entfernt (Veet, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) und die Maus liegend fixiert. Die Haut wurde entlang der A. femoralis über ca. 10 mm eröffnet. Nachdem die Arterie von begleitendem Nerv und den Venen getrennt worden war, wurde die erste Ligatur proximal des Abgangs der A. femoralis profunda mit 7-0 Seraflex (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) gesetzt. Proximal des Abgangs der A. saphena wurde ebenfalls ein Verschluss gesetzt (Abb. 2). Das dazwischenliegende Stück der A. femoralis

inklusive der Seitenäste wurde abgesetzt, die Wunde desinfiziert und der Hautschnitt mit einer 4-0 Prolene (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) Naht verschlossen. Die Mäuse wurden direkt nach dem Eingriff sowie die nächsten 48 h mit Buprenorphin s.c. (0,1 mg/kg) analgesiert.

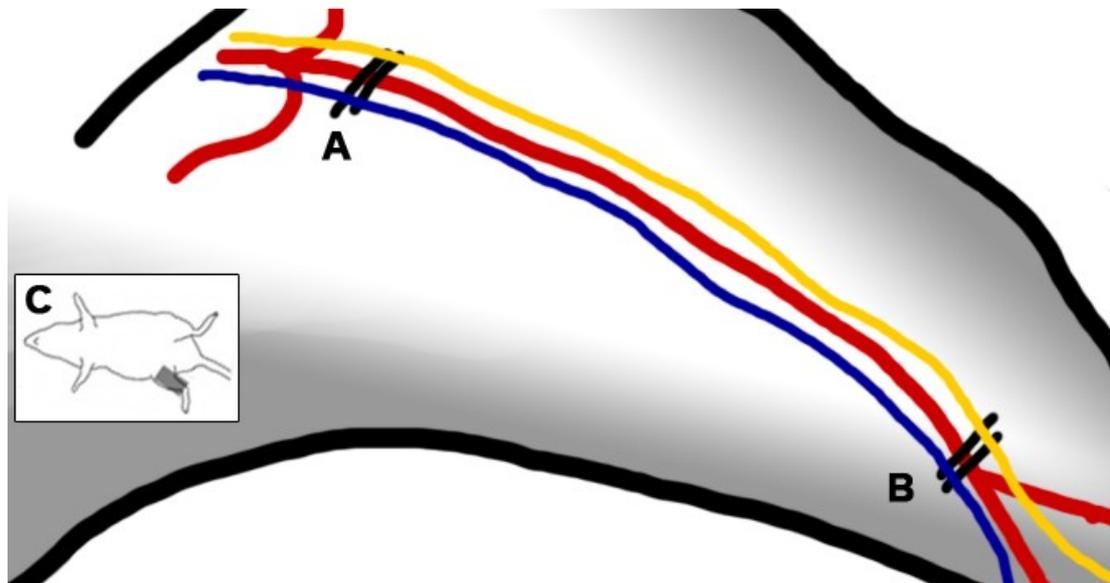


Abb. 2 Schemazeichnung der Hinterlauf-Operation Die A. femoralis (rot) wurde zwischen den Ligaturen (A und B) am linken Oberschenkel entnommen. Die begleitende Vena femoralis (blau) und Nervus femoralis (gelb) wurden belassen. C) Dargestellter Bildausschnitt.

Versuchsprotokoll

Von Tag -7 bis zur Operation (Tag 0) erhielten die Tiere das entsprechende Trinkwasser (s.o.). Die Kontroll-Gruppe erhielt Trinkwasser mit Kochsalz (1g/l). Das Trinkwasser wurde zuvor auf einen möglichst niedrigen basalen Nitratwert hin untersucht (basaler Nitratgehalt: $\sim 165 \mu\text{M}$). Die Nitrat-Gruppe erhielt Wasser, das zuvor mit 1 g/l Natriumnitrat (MW: 84,99; entspricht $11,76 \mu\text{M}$; Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) angereichert wurde. An Tag 0 wurde allen Versuchstieren linksseitig die A. femoralis zur Ischämieinduktion entfernt (s.u.). Über den gesamten 7-tägigen Zeitraum nach Operation wurden die Tiere mit dem supplementierten Trinkwasser versorgt. An Tag 7 post-OP wurden die Tiere nach einer Perfusionsanalyse für die *ex vivo* Untersuchungen durch zervikale Dislokation getötet (Abb. 2A und 2B).

Alle Versuche wurden zuvor vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Recklinghausen, Deutschland) genehmigt (Aktenzeichen 8.87-50.10.35.08.086 mit Genehmigung vom 12.06.2008). Der Fachkundenachweis gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde erbracht (Tierversuchsanlage Universitätsklinikum Düsseldorf, 8.10.2010).

2.3. Perfusionsanalyse mittels Laser-Doppler-Messung

Durchdringt Laserlicht Gewebe, wird es teils absorbiert und teils reflektiert. Reflektiertes Licht kann von einem Photodetektor registriert werden und liefert Informationen über die Mikrozirkulation des Gewebes. Entsprechend dem Doppler-Prinzip ändert sich die Wellenlänge des Lichtsignals, wenn es von einer bewegten Phasengrenze, wie z.B. einem Erythrozyten im Blut, reflektiert wird. Hingegen ändern Lichtsignale, welche von unbewegten Phasengrenzen reflektiert werden, ihre Wellenlänge nicht⁹⁸. Somit kann bei der Laser-Doppler-Untersuchung eine Aussage über die Perfusion des Gewebes getroffen werden.

Für diese Untersuchung wurden die Tiere mit Ketamin i.p. (45 mg/kg) und Xylazin i.p. (10 mg/kg) betäubt, Abdomen und Hinterläufe wurden enthaart (s.o.). Die Tiere wurden rücklings auf einer nicht-reflektierenden Unterlage fixiert. In einem Messfeld der Größe 44 x 44 Punkte wurden beide Hinterläufe vollständig bis über den Hüftansatz vom Laser (PIM3, Perimed, Järfälla, Schweden) erfasst. Die *region of interest* (ROI) wurde so gewählt, dass der Hinterlauf von der Hüfte bis zu den Krallen erfasst wurde. Die Perfusion wurde aus drei Messungen gemittelt und im Verhältnis zum jeweiligen Kontrollbein berechnet.

2.4. Bestimmung der Nitrit-, Nitrat- und Nitrosothiol-Level im Plasma

Um den Einfluss einer exogenen Supplementierung von Nitrat über das Trinkwasser auf die zirkulierenden Nitrit, Nitrat und Nitrosothiol-Spiegel zu untersuchen, wurden Plasmaproben an Tag -7, Tag-3 und Tag 0 analysiert.

2.4.1. Probengewinnung und -aufbereitung

Durch Punktion des Herzens nach Betäubung mit Ketamin i.p. (45 mg/kg) und Xylazin i.p. (10 mg/kg) wurde den Mäusen ca. 1 ml Blut abgenommen.

Für die Nitrit- und Nitratbestimmung wurde Plasma durch Zentrifugation (5 min, 800 x g) des Vollblutes gewonnen.

Für die Bestimmung der RNO-Verbindungen wurde Vollblut mit 5mM N-Ethylmaleinimid (NEM; Merck, Darmstadt, Deutschland) in NaCl und 2 mM EDTA im Verhältnis 10:1 verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 800 x g, 4°C) und der Plasmaanteil abgenommen. Alle Schritte erfolgten auf Eis und unter Schutz vor direktem Lichteinfall.

Die vorbehandelten Proben wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

2.4.2. HPLC-Messung von Nitrat und Nitrit

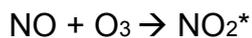
In einer Kombination aus Flüssigchromatographie und Farbstoffbildung aus Griess-Reagenz wurden per Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) sowohl Plasma- als auch Gewebeproben auf ihren Nitrat- und Nitritgehalt hin untersucht^{99, 100}.

Vor Analyse der Proben wurde zur Aufreinigung der Proben eine Methanolfällung durchgeführt. Die HPLC-Analge musste bei jeder Inbetriebnahme mit einer frisch angesetzten, aufsteigenden Reihe von Nitrit- und Nitratstandards (beides Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland in Aqua dest. HPLC-grade) kalibriert werden. Über einen Autoinjektor (Varian ProStar 420 Triathlon Cool, Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland) wurden je 10 µl der Probe in einer mobilen Phase aus Chloridpuffer (0,3 M NaCl und 0,1 M NH₄Cl, pH 8,5) über Vorsäule und Anionenaustauscher geführt (beide: EiCom, Dublin, Irland). Hierbei werden Proteinreste in der Vorsäule abgefangen sowie Nitrat aufgrund der höheren Polymer-Affinität in der nachgeschalteten Trennsäule von Nitrit getrennt; die spätere Ablösung des Nitrats ermöglicht die separate Messung von Nitrit (früher Peak) und Nitrat (später Peak). In der folgenden Kadmium-Kupfer-Säule wird Nitrat zu Nitrit reduziert. Nitrit reagiert in der Reaktionskapillare bei 40°C mit dem

Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, welches durch eine weitere Reaktion mit N-(1-naphtyl)-Ethylendiamindihydrochlorid zu einer violetten, sauren Azo-Verbindung führt. Die Absorption wurde mit einem UV/Vis-Spektrophotometer (EiCom, Dublin, Irland) bei 540 nm gemessen, woraus sich über eine PC-Schnittstelle die Nitrit- und Nitratkonzentrationen der Proben als Fläche unter der Kurve mit Hilfe der zugehörigen Software (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) berechnen lassen.

2.4.3. Detektion von S-Nitrosoverbindungen mittels CLD

Die Bestimmung von S-Nitrosoverbindungen durch Chemilumineszenzdetektion (CLD) nutzt die Messung von Lichtquanten, welche stöchiometrisch bei der Gasphasen-Chemilumineszenz von NO mit Ozon freigesetzt und detektiert werden können.



Per CLD kann freies NO direkt gemessen werden. Auch Speicherformen und Abbauprodukte von NO wie Nitrit, Nitrosamine oder Nitrosothiole lassen sich bestimmen, indem man NO aus seiner Bindung freisetzt.

Dem Chemilumineszenz-Detektor wird ein Glas-Reaktionsgefäß vorgeschaltet. Die darin enthaltene Reduktionslösung wird mit Helium begast, welches als inertes Trägergas das freigesetzte NO zum Detektor transportiert. Die Reduktionslösung aus 45mM Kaliumjodid/10mM Jod in Essigsäure setzt NO aus Nitrit und Nitrosospezies frei. Der Begriff Nitrosospezies (RXNO) fasst Nitrosothiole (RSNO) und Nitrosamine (RNNO) zusammen (Abb. 3)¹⁰⁰.

RXNO: Zur Erfassung der Gesamtheit der Nitrosospezies zu erfassen (RXNO = RSNO + RNNO) werden die Proben in 0,5%iger Sulfanilamidlösung in 25% HCl vorinkubiert um freies Nitrit aus der Messung zu eliminieren. Hierfür bildet Nitrit in der Vorinkubation ein stabiles Diazoniumsalz, welches nicht mehr reduziert wird.

RNNO: Um aus einer Probe zusätzlich RSNO zu entfernen, so dass nur noch RNNO detektierbar sind, wird diese noch vor der Sulfanilamidbehandlung mit Quecksilberchlorid (0,2%) behandelt. Hierdurch werden die RSNO über NO^+ zu Nitrit (NO_2^-) reduziert und anschließend durch Sulfanilamid aus der Messung entfernt.

RSNO: Die Nitrosothiole (Schwefel-gebundene Nitrosospezies) lassen sich als Differenz zwischen RXNO und RNNO berechnen.¹⁰¹

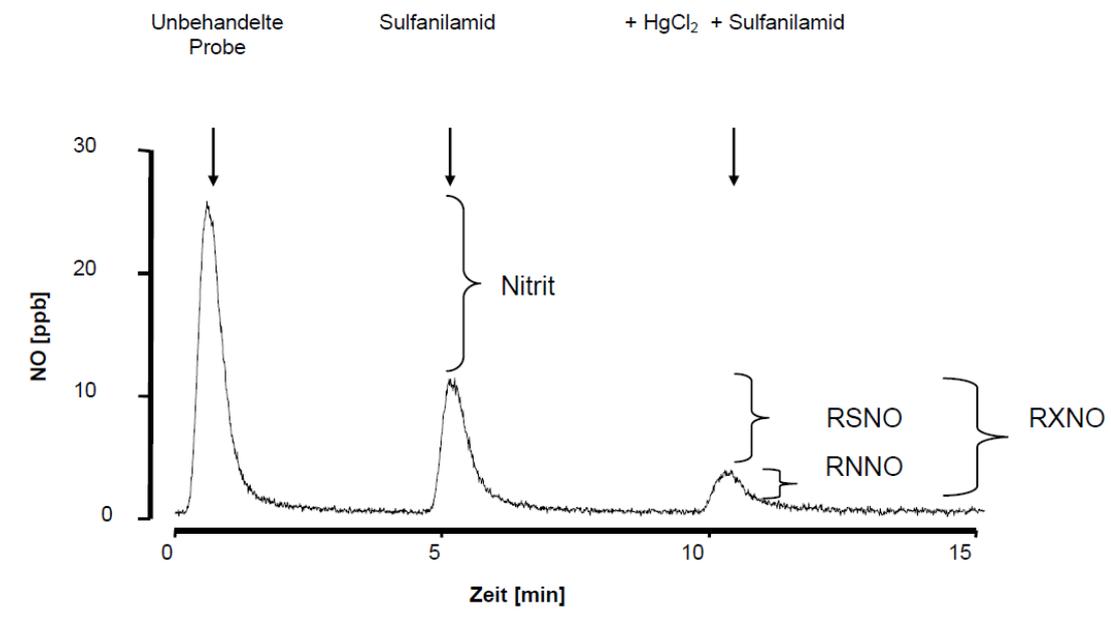


Abb. 3 Indirekte Bestimmung der S-Nitrosospezies Nach Abzug von Nitrit können die RSNO als Differenz von RXNO und RNNO berechnet werden.^{12, 102}

2.5. Ex vivo Analyse des Muskelgewebes

Zur Bestimmung der Apoptoserate muriner Myoblasten als Teil des Muskelgewebes wurden diese aus der Muskulatur der Hinterläufe isoliert. Der Phänotyp der isolierten Zellen wurde durch Integrin- α 7-Antikörpermarkierung durchflusszytometrisch bestimmt.

2.5.1. Isolation von Myoblasten aus Skelettmuskelproben

Zur Gewinnung von Myoblasten wurden die jeweiligen Mäuse betäubt (Ketamin i.p. (45 mg/kg) und Xylazin i.p. (10 mg/kg)). Nachdem die Hinterläufe von Fell und Haut befreit waren, wurden diese mit sterilem

Besteck auf Höhe des Hüftgelenks abgesetzt und vorübergehend in einer Petrischale in PBS auf Eis gelagert. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Abzug durchgeführt.

Das Muskelgewebe wurde vom Knochen abgelöst, mechanisch zerkleinert und für den Verdau in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt. Zusammen mit 5 ml Verdaulösung (4 ml Pronase (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland) in PBS (10 mg/ml) mit 1 ml HEPES Puffer (25 mM; Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)) und 45 ml DMEM (500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) + 50 ml fetales bovines Serum + 1 ml Penicillin / Streptomycin) wurden die Proben bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die entstandenen Suspensionen wurden durch ein 100 µm sowie ein 40 µm Sieb filtriert, mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert (350 x g, RT, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und mit *Ham's 10* Medium (500 ml *Ham's 10* mit Glutamin (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) + 100 ml fetales bovines Serum + 50 ml Pferdeserum + 1 ml Penicillin / Streptomycin) auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden auf jeweils 5 Petrischalen (Durchmesser: 10 cm) ausgesät und inkubiert (37 °C, 5% CO₂, 1 h). Die Fibroblastenadhäsion wurde viertelstündlich unter dem Mikroskop kontrolliert. Der Myoblasten-reiche Überstand wurde abgenommen und abzentrifugiert (350 x g, RT, 10 min). Das Pellet wurde für die weiteren Versuche in 2 ml PBS resuspendiert und die Zellkonzentration durch Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt.

Zur Verifizierung der isolierten Zellpopulation als Myoblasten wurde eine Antikörper-Einfachfärbung gegen Integrin- α 7 (Antikörper-Online GmbH, Aachen, Deutschland) durchgeführt und der Anteil positiver Zellen, welche Myoblasten entsprechen, im Durchflusszytometer bestimmt (FACS Canto, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Hierfür wurden die Zellen in Waschpuffer gereinigt (PBS mit 2% FCS), mit Ziegen Serum (10µl) und humanem IgG geblockt und nach erneutem waschen mit 20 µl PE-markiertem Integrin- α 7 Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem waschen und zentrifugieren (500 x g, RT, 1 min) wurden die Zellen für die Analyse in 500 µl des Waschpuffers resuspendiert. Im FACS wurde der *side scatter* und *forward scatter* justiert, die

Zielpopulation abzüglich Detritus und verbundener Zellen gegatet und die Anzahl gegen den PE-Gehalt aufgetragen.

2.5.2. Charakterisierung der Apoptose per TUNEL-Reaktion

Zur Quantifizierung der Apoptose wurde der sogenannte TUNEL-Bioassay¹⁰³ nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. Dabei wird nach Zellpermeabilisierung FITC-markiertes dUTP-biotin durch eine Transferase an die überstehenden DNS-Einzelstrang-Enden („sticky ends“) angelagert; diese sind charakteristisch für die DNS-Degradation bei Apoptose und hingegen bei Nekrose nicht zu finden.

Isolierte Myoblasten wurden dabei zweimal in PBS gewaschen und abzentrifugiert (350 x g, RT, 5 min). Je 2×10^6 Zellen wurden in 100 μ l PBS in 2 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Pro 10 Proben wurde eine Positiv- und eine Negativkontrolle angesetzt. 100 μ l Fixierungslösung (4 % Paraformaldehyd in *aqua dest.*) wurde zugegeben, resuspendiert und anschließend inkubiert (RT, 1 h). Nach Abzentrifugation (350 x g, RT, 5 min) wurden die Pellets in 200 μ l PBS gewaschen, nach erneuter Zentrifugation (350 x g, RT, 5 min) in 100 μ l Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton-X in 0,1 % Natriumcitrat in PBS) resuspendiert und 2 min auf Eis inkubiert. Die Suspensionen wurden mit 100 μ l PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (350 x g, RT, 5 min) und einmal in PBS gewaschen. Die Positivkontrollen wurden daraufhin in 50 μ l DNase (1,2 μ l DNase + 12 μ l Inkubationspuffer + 106,8 μ l RNase-freies Wasser; sämtlich Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) resuspendiert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, auf 200 μ l mit PBS aufgefüllt und abzentrifugiert (350 x g, RT, 5 min).

Proben und die jeweiligen Kontrollen wurden daraufhin in 50 μ l TUNEL-Reaktions-Mix resuspendiert (50 μ l Enzymlösung in 450 μ l Markerlösung), die Negativkontrollen in je 50 μ l Label-Solution ohne Enzyme. Alle Proben wurden inkubiert (37 °C, 1 h, 5% CO₂) und in 200 μ l PBS 2 x gewaschen (Zentrifugation: 350 x g, RT, 5 min). Alle Proben und Kontrollen wurden mit 200 μ l Hoechst-Kernfärbung resuspendiert, 5 min inkubiert (RT, dunkel) und

erneut in PBS gewaschen (Zentrifugation: 350 x g, RT, 5 min). Für die Analyse wurden die Proben in je 250 µl PBS resuspendiert und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Lagerung der Platte erfolgte im Kühlschrank über Nacht. Analyse und Dokumentation wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die Hoechst-Kernfärbung wird dabei im DAPI-Filter sichtbar, die TUNEL-Reaktion im FITC-Filter. Pro Well wurden mindestens drei Sichtfelder mit FITC- und DAPI-Filter dokumentiert und ausgezählt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde als Quotient aus TUNEL-positiven zu Hoechst-positiven Zellen berechnet, der „Apoptose-Quotient“ als Anteil apoptotischer Zellen im operierten Bein geteilt durch die Anzahl apoptotischer Zellen im Kontrollbein derselben Maus:

$$\text{Apoptose-Quotient} = \left[\frac{\text{(TUNEL}^+\text{-Zellen/Hoechst}^+\text{-Zellen OP-Bein)}}{\text{(TUNEL}^+\text{-Zellen/Hoechst}^+\text{-Zellen Kontrollbein)}} \right] \times 100\%$$

2.6. *In vitro* Kultur muriner C2C12-Myoblasten

Murine C2C12-Myoblasten (ATCC, Rockville, MD, U.S.A.) wurden in standardisiertem Wachstumsmedium (*standard growth medium*; SGM) gehalten. Dieses bestand aus *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) mit 20 mM D-Glukose, 10% fetales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS; Lonza, Köln, Deutschland), 4 mM HEPES, 4 mM L-Glutamin sowie 1% Penicillin/Streptomycin (PAA). Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ (Linde, Pullach, Deutschland) inkubiert (HERACell, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.). Zwölf Stunden vor dem jeweiligen Versuchsbeginn wurden die Myoblasten mit einer Dichte von 12,5 x 10⁵/cm² in SGM ausgesät. Für die durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus und die Bestimmung des cGMP-Gehaltes wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 – 90% gezogen. Der mTOR-Hemmer Rapamycin, der Inhibitor der löslichen Guanylatzyklase (soluble Guanylatecyclase, sGC) 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), der NO-Donor Diethylenetriamine-NONOate (DETA-NO), der NO-Radikalfänger 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO; alle von Cayman Chemical,

Ann Arbor, MI, U.S.A.) sowie Natriumnitrit (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden jeweils frisch in ihrem entsprechenden Lösungsmittel vorbereitet und bis zur finalen Konzentration in SGM verdünnt. Compound C (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

2.6.1. Quantifizierung der Proliferation mittels Neutral-Rot-Assay

Zur Quantifizierung der Proliferation wurde die Aufnahme azidophilen Farbstoffes in die Lysosomen der Zellen genutzt. Dessen Gehalt in den Zellen ist somit proportional zur Zellzahl. Die Myoblasten wurden für 24 h in SGM mit jeweiliger pharmakologischer Behandlung gehalten. Danach wurde das Medium vollständig durch frisches SGM + 1% Neutral-Rot-Farbstoff für 60 min ersetzt. Die Kulturen wurden mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. Durch Lyse der Zellen mit Isopropanol + 1% 1M HCl wird der Farbstoff aus den Lysosomen freigesetzt und photometrisch (540 nm Wellenlänge) quantifiziert.

2.6.2. Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher an die DNS bindet und dessen Gehalt in der Zelle folglich proportional zum Gehalt der DNS ist. Über den Gehalt der DNS lassen sich Rückschlüsse auf den aktuellen Stand im Zellzyklus ziehen. Die Untersuchung wurde in Anlehnung an etablierte Methoden durchgeführt⁵¹. Hierbei wurden die Zellen für 30 min mit RNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) inkubiert und anschließend mit PI gefärbt. Die Analyse erfolgte an einem BD FACS Canto II (BD, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.), die Auswertung mittels FlowJo 7.9.1 Software (Tree Star Inc., Ashland, OR, U.S.A.). Nachdem *forward* und *sideward scatter* justiert waren, wurden die Zellen manuell gated und die Zellzyklusverteilung aus einem Histogramm des PI-Gehaltes (linear) abgelesen.

2.6.3. Quantifizierung des intrazellulären cGMP-Gehaltes

Der cGMP-Gehalt aus Zelllysat wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers mittels eines kommerziellen Kits analysiert (GE Healthcare, München, Deutschland). Die Zellen wurden durch 0,1 M HCl und Ultraschall lysiert. Zellüberreste wurden durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g) entfernt und der Überstand ohne weitere Verdünnung im Assay verwendet. Die 96-Well-Platte wurde mit Anti-cGMP-Antikörpern gecoated. Anschließend wurde parallel zu den Proben eine Standardreihe mit vorgegebenen cGMP-Konzentrationen in die Wells pipettiert und 3 Stunden im Kühlraum bei 7°C inkubiert. Beim nachfolgenden Waschen wurde der Überstand entfernt. Anschließend aufgetragenes, an das Enzym Horseradish-Peroxidase gekoppeltes cGMP besetzte während einer weiteren Inkubation (1h) restliche Bindungsstellen. Anschließend wurde die Platte erneut gewaschen und das Horseradish-Peroxidase-Substrat zugefügt. Nach einer weiteren Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M) gestoppt, zugleich kam es dadurch zu einem Farbumschlag des blauen Eduktes in gelb. Die optische Dichte des durch die Horseradish-Peroxidase generierten Eduktes wurde im Plattenphotometer gemessen und nach Abzug von Blanks eine Standardkurve erstellt. Hierbei entspricht eine hohe optische Dichte einem geringen cGMP-Gehalt. Die cGMP-Konzentrationen wurden schließlich anhand der Standardkurve zurückgerechnet.

Parallel wurde der Proteingehalt der aufgebrauchten Proben durch einen Bradford-Assay bestimmt, so dass der cGMP Gehalt in fmol/µg Protein angegeben wird.

2.6.4. Bestimmung der mTOR-Phosphorylierungs-Aktivität

Das Protein mTOR ist in der Lage, andere Proteine zu phosphorylieren. Der Grad dieser Aktivität wurde in einem kolorimetrischen Assay (Merck) entsprechend den Vorgaben des Herstellers gemessen. Zu Beginn des Versuches wurden standardisierte mTOR-Proben (mTOR angereichert aus Rattenhirn) mit Natriumnitrit (20 µM) oder DETA-NO (10 µM) für 30 min auf

Eis inkubiert. Im kommerziellen Assay wurde das mTOR-Substrat rekombinantes p70S6K-GST-Fusionsprotein an die Glutathion-beschichtete 96-Well-Platte gebunden. Anschließend wurden einerseits die vorinkubierten Proben als auch eine Standardreihe aufsteigender mTOR-Konzentration zugegeben. mTOR phosphorylierte p70S6K-GST an Threonin 389 während einer Inkubation bei 30°C für 30 Minuten unter Zugabe von ATP. Die Kinase-Reaktion wurde gestoppt und nach Auswaschen des Überstandes wurde ein Antikörper (Anti-p70S6K-T389) gegen phosphoryliertes P70S6K eingebracht und 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden erfolgreich gebundene Antikörper mit einem weiteren Antikörper markiert, welcher mit Horesradish-Peroxidase konjugiert war. Nach Inkubation (1 Stunde) und Auswaschen des Überstandes wurde das Horseradish-Peroxidase-Substrat zugegeben, so dass ein blauer Farbstoff gebildet wurde. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M) gestoppt und die Farbe von blau nach gelb umgeschlagen. Mittels Plattenphotometer wurde die Absorption bei 450 nm und 595 nm gemessen. Je höher die gemessene optische Dichte, desto höher der Anteil des durch mTOR phosphorylierten p70S6K-Proteins.

2.6.5. Messung der metabolischen Aktivität mittels WST-8

Der WST-8-Ansatz ermöglicht die Charakterisierung der Stoffwechselaktivität von lebenden Zellen in Suspension: Hierbei wird das Tetrazoliumsalz WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium-mononatriumsalz) in Abhängigkeit des Elektronentransporters 1-methoxy - PMS (1-methoxy-5-methylphenazinium-methylsulfat) reduziert. Letzterer ist assoziiert mit der NADH-Dehydrogenase-Aktivität der Zelle. Das dabei entstehende wasserlösliche, gelbfarbene Formazan erlaubt durch Bestimmung der optischen Dichte den Rückschluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen.

Für die Messung wurde von jeder Probe eine Zellsuspension mit $0,1 \times 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium angesetzt. 100 µl dieser Suspension wurden im Dreifachansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden

Referenzproben bestehend aus 100 µl Kulturmedium und 10 µl WST-8 als Basiswert pipettiert. In jedes Well wurden 10 µl der WST-8-Lösung gegeben. Die Platte wurde anschließend für 4 Stunden inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Plattenphotometer bei 450 nm Wellenlänge und die Werte wurden um den Mittelwert der Referenzproben korrigiert.

2.7. Mathematisch-statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA). Soweit nicht anders vermerkt, werden alle Daten als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Statistische Analysen erfolgten mittels Student's *t*-Test, bei signifikant unterschiedlichen Varianzen mit Welch's Korrektur. P-Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss diätetischen Nitrats auf die Geweberegeneration *in vivo*

3.1.1. Perfusion des Hinterlaufs

Die durchgeführte Erfolgskontrolle der Hinterlauf-OP zeigte unmittelbar postoperativ eine vergleichbare Ischämie in den operierten Hinterläufen aller Gruppen im Verhältnis zum jeweiligen Kontrollbein (Kontrolle $19\pm 3\%$, Nitrat $18\pm 2\%$, $n = 12 - 16$ /Gruppe, $p = n.s.$, Abb. 4A).

Nach einer Regenerationsphase von 7 Tagen wies die Kontroll-Gruppe eine Perfusion des operierten Hinterlaufs von $59\pm 4\%$ ($n = 23$) im Verhältnis zum jeweiligen Kontrollbein auf. Die operierten Hinterläufe der Tiere der Nitrat-Gruppe waren hingegen mit $73\pm 4\%$ ($n = 21$) signifikant besser perfundiert ($p < 0,05$, Abb. 4B).

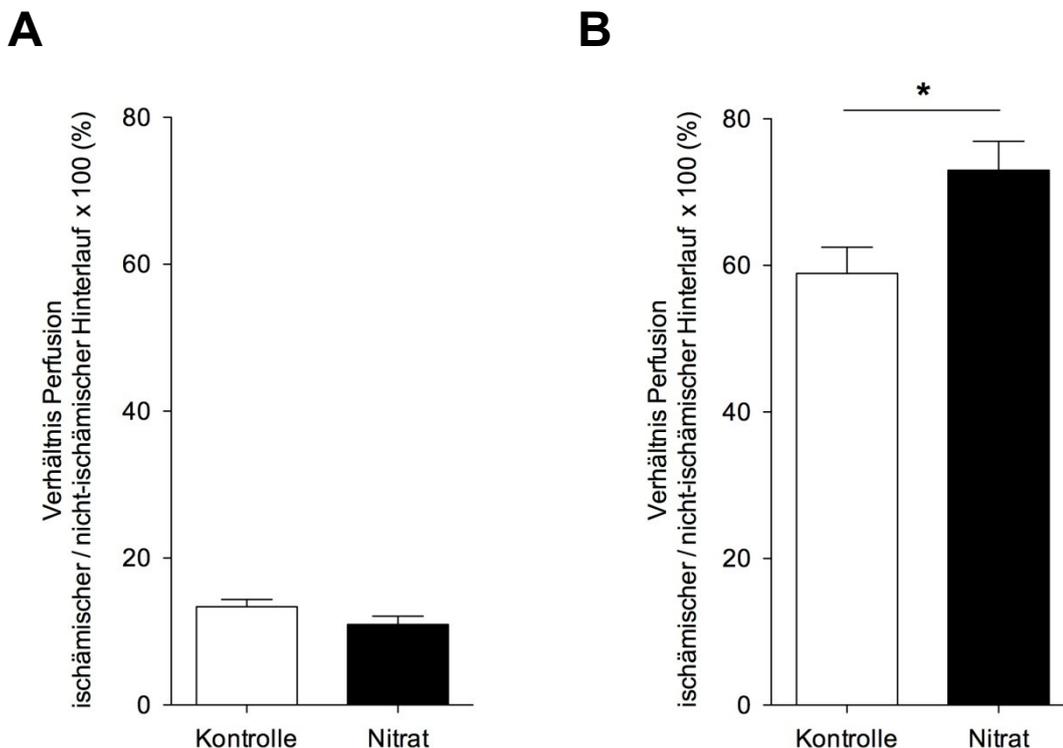


Abb. 4 Regeneration der Hinterlauf-Perfusion A) Direkt nach operativer Entfernung der A. femoralis zeigte sich kein Gruppen-spezifischer Unterschied in der Restperfusion ($n = 12 - 16$). B) Nach 7 Tagen Regeneration war die Perfusion in der Nitrat-Gruppe ($n = 21$) signifikant besser als in der Kontrollgruppe ($n = 23$). (Diese Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit Fr. Dipl.-Biol. M. Kropp und Hr. Cand. med. M. Niessen entstanden)¹⁰⁴

3.1.2. Apoptose der Myoblasten

Um zu klären, ob die diätetische Nitratbehandlung Auswirkungen auf das Muskelgewebe im Ischämiegebiet hatte, wurden aus murinen Hinterläufen isolierte Myoblasten, identifizierbar über den spezifischen Oberflächenmarker Integrin- α 7, auf Apoptose hin untersucht.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils Integrin- α 7 positiver Myoblasten an allen isolierten und untersuchten Zellen zeigte einen Myoblastenanteil von $97 \pm 1\%$ in der gefärbten Probe gegenüber $3 \pm 0,1\%$ in der ungefärbten Probe ($p < 0,0001$; Abb. 5A und 5B).

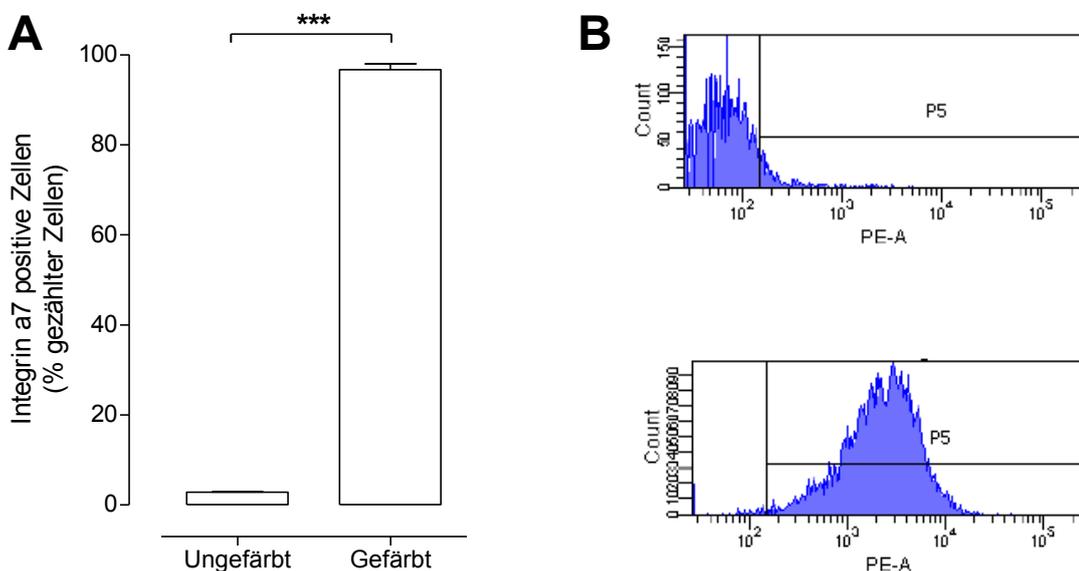


Abb. 5 Anteil Integrin- α 7 positiver Myoblasten in den isolierten Proben. A) Die mit Antikörper gefärbte Probe zeigt einen Myoblastenanteil von $97\% \pm 1\%$ in der FACS-Analyse von Proben aus muriner Hinterlaufmuskulatur. B) Originalregistrierungen der ungefärbten (oben) und gefärbten (unten) Probe im Durchflusszytometer.

In der Nitratgruppe lag die Rate apoptotischer Zellen im ischämischen Muskelgewebe an Tag 7 nach Operation bei $67 \pm 16\%$ ($n = 11$) und damit signifikant niedriger als bei nicht Nitrat-behandelten Tieren ($198\% \pm 19\%$, $n = 9$, $p < 0,001$; Abb. 6 und 7).

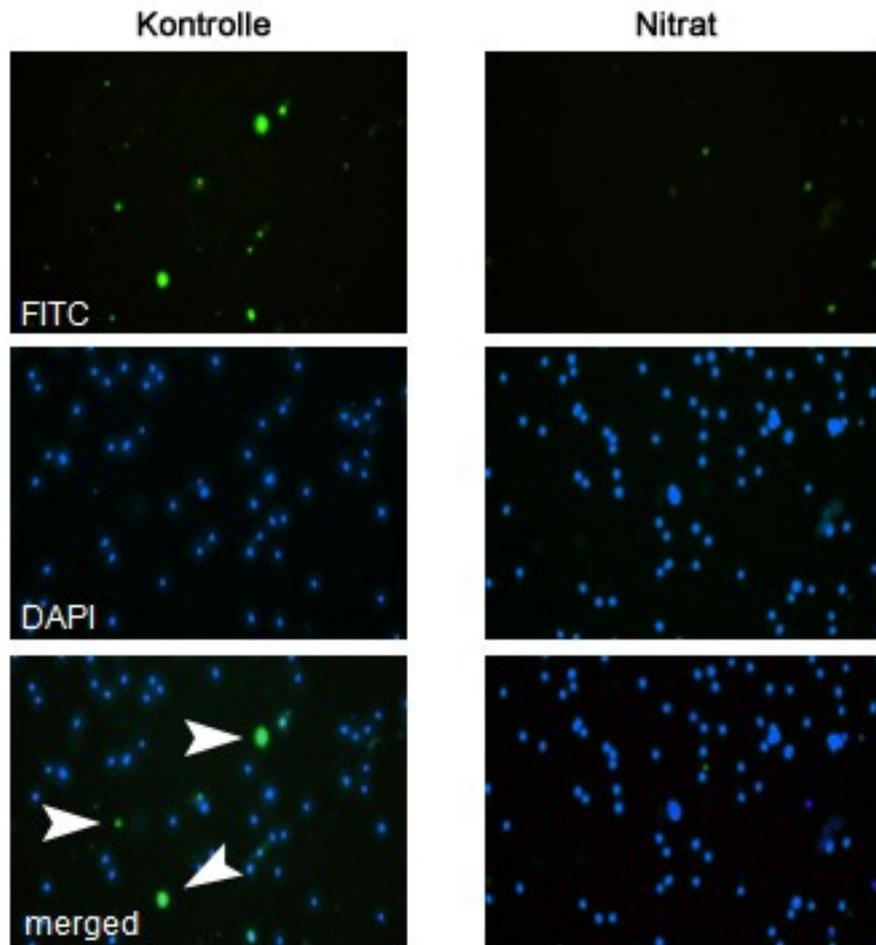


Abb. 6 TUNEL-Färbung isolierter Myoblasten Fluoreszenz-Fotografie. Die blaue DAPI-Färbung markiert alle DNS-haltigen Zellkerne, die grüne TUNEL-Färbung alle Doppelstrangbrüche bei Apoptose. Mit Pfeilen markiert sind doppelt positive und damit apoptotische Zellen, beispielhaft in einer Probe der Kontrollgruppe. Vergleichbare Bilder der Kontrollgruppe in der rechten Spalte. Es handelt sich um primär isolierte Myoblasten aus murinem Hinterlaufgewebe nach 7-tägiger Fütterung von üblichem Trinkwasser vs. Nitrat-angereichertem Trinkwasser. (Diese Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit Fr. Dipl.-Biol. M. Kropp und Hr. Cand. med. M. Niessen entstanden)¹⁰⁴

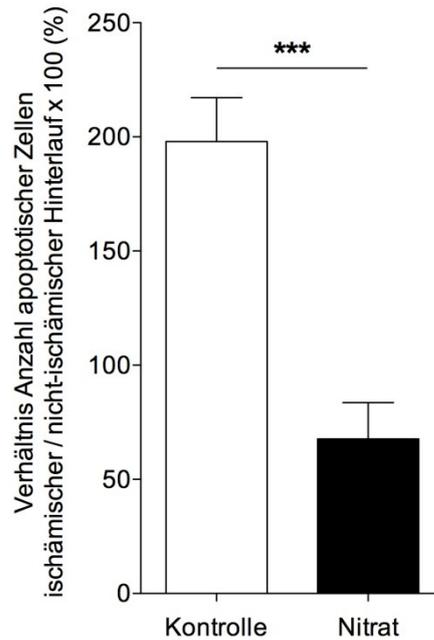


Abb. 7 Zahl apoptotischer Zellen im Hinterlaufgewebe Im Muskelgewebe des ischämischen Hinterlaufs finden sich in der Nitratgruppe (n = 11) signifikant weniger apoptotische Zellen als bei der Kontrollgruppe (n = 9). Verwendete Myoblasten: vgl Abb. 6. (Diese Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit Fr. Dipl.-Biol. M. Kropp und Hr. Cand. med. M. Niessen entstanden)¹⁰⁴

3.1.3. Veränderungen des NO-Pools

Die durch die Nitrat-Supplementierung verursachten Änderungen im Nitrit-, Nitrat- und RSNO-Gehalt des Plasmas wurden durch HPLC und CLD in einer Stichprobe gemessen. Am 4. und 7. Tag der gruppenspezifischen Fütterung waren Nitrit, Nitrat und RSNO im Plasma der Nitrat-supplementierten Tiere (Abb. 8A) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$; Abb. 8B) erhöht. Die Einzelwerte sind der Tabelle 1 (s.u.) zu entnehmen.

Tab. 1 Nitrit-, Nitrat- und RSNO-Werte im Plasma Gezeigt sind Mittelwerte SEM. Die Werte an Tag -7 gelten für alle drei Gruppen, da die Randomisierung der Versuchstiere in die Versuchsgruppen erst nach der Blutentnahme vorgenommen wurde. N-Zahlen in Klammern; Schwankungen der n-Zahlen methodisch bedingt. Den Versuchstieren wurde während dem abgebildeten 7-tägigen Verlauf entweder übliches Trinkwasser (Kontrolle) oder Nitrat-angereichertes Wasser verabreicht (Zur Messung: vgl. Material & Methoden).

	Tag	Kontrolle	Nitrat
Nitrit (µM)	-7	0,28 ± 0,03 (8)	
	-3	0,78 ± 0,13 (8)	4,61 ± 1,75 (6)
	0	0,46 ± 0,06 (7)	5,77 ± 1,73 (7)
Nitrat (µM)	-7	88,15 ± 66,55 (8)	
	-3	49,73 ± 8,64 (8)	1028 ± 195,8 (8)
	0	39,67 ± 16,88 (7)	451 ± 75 (8)
RSNO (nM)	-7	5 ± 1 (7)	
	-3	10 ± 2 (7)	132 ± 33 (6)
	0	9 ± 2 (8)	349 ± 98 (6)

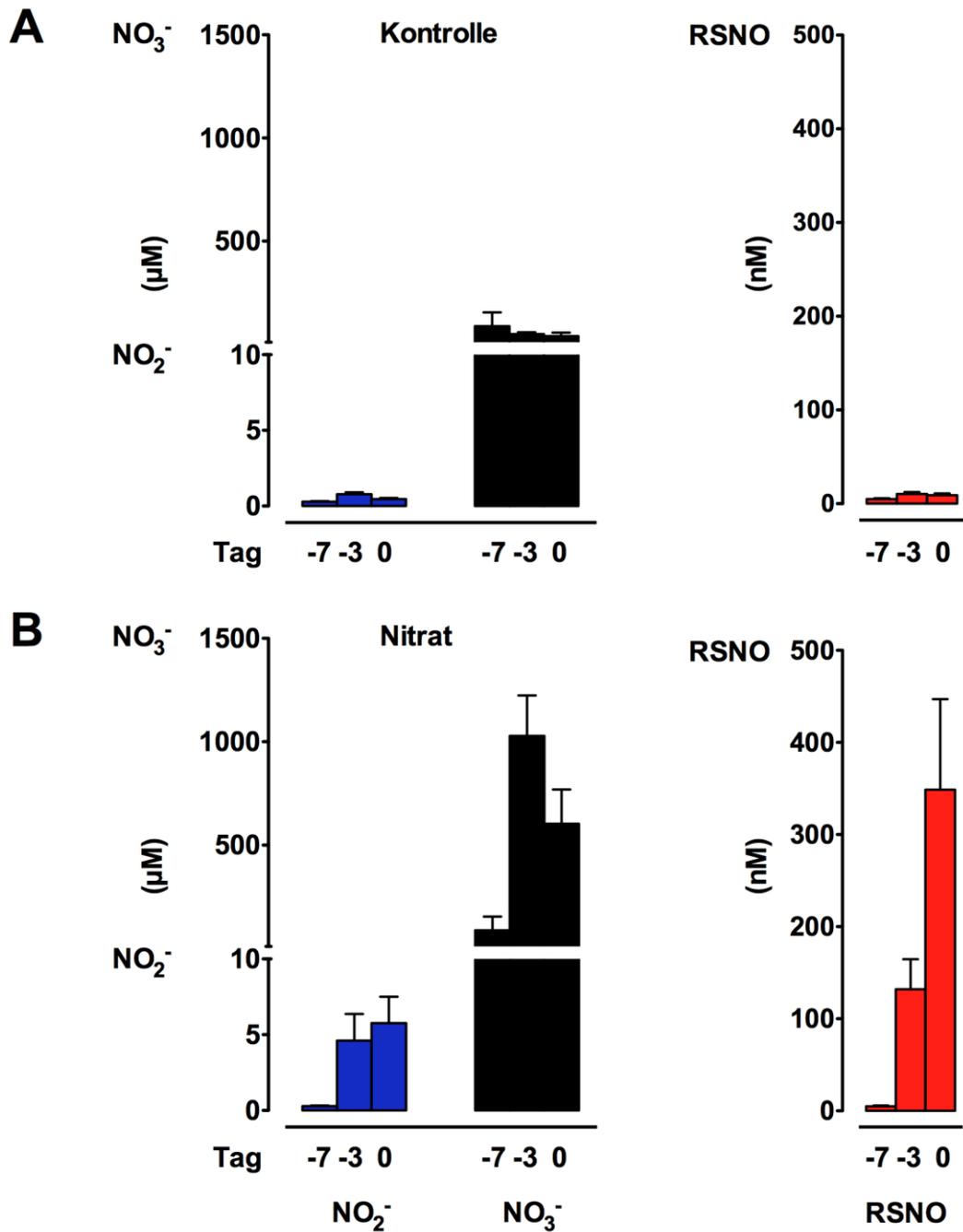


Abb. 8 Veränderungen von Nitrat, Nitrit und RSNO im Plasma nach diätetischer Nitratsupplementierung A) In der Kontrollgruppe blieben die Nitrat- (schwarz), Nitrit- (blau) und RSNO (rot) -Werte über den Beobachtungszeitraum konstant. B) In der Nitratgruppe stiegen sowohl Nitrat, als auch Nitrit und RSNO signifikant an. Einzelwerte und n-Zahlen in Tabelle 1.¹⁰⁴

3.2. *In vitro* Einfluss von Nitrit auf die Myoblasten-Proliferation

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von Nitrit und NO auf Myoblasten wurden kommerziell erhältliche, immortalisierte, murine C2C12 Myoblasten als Modell gewählt. Diese wurden *in vitro* als Zellkulturen gehalten und in verschiedenen Versuchsansätzen mit pharmakologischen Interventionen analysiert.

3.2.1. Dosisabhängigkeit der Proliferation

Die Proliferation der Myoblasten wurde mittels Neutral-Rot-Methode untersucht. Hierbei wurde in der Kultur (Abb. 10) Standardmedium verwendet, welches mit verschiedenen Konzentrationen Nitrit und DETA-NO versetzt war.

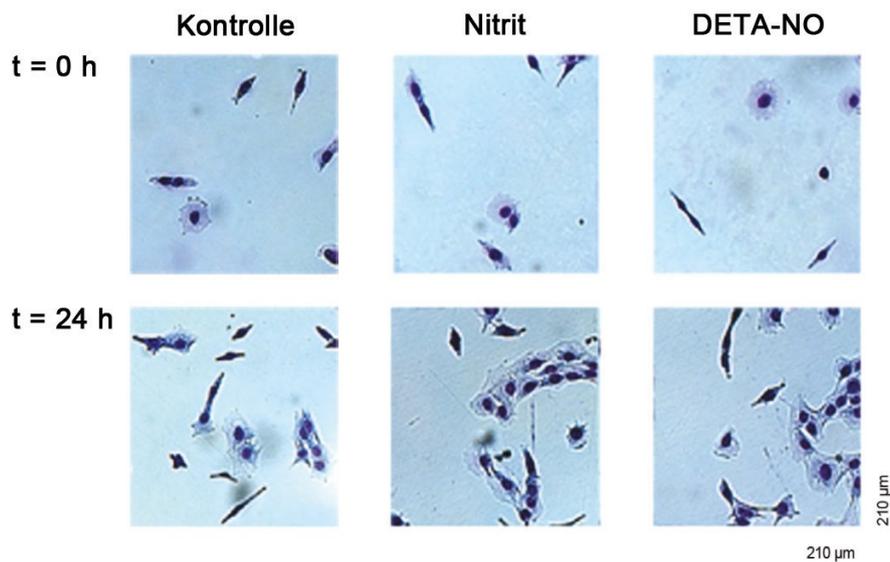


Abb. 9 C2C12-Myoblasten in Kultur Zum Zeitpunkt $t = 0$ (obere Zeile) ist bei allen Behandlungen eine vergleichbare Zelldichte zu sehen. Nach 24 h ($t = 24$, untere Zeile) ist bei Nitrit- und DETA-NO-Behandlung eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Zelldichte zu erkennen.

Die unbehandelte Kontrollkultur wurde als Referenz gleich 100% gesetzt ($100 \pm 3\%$, $n = 6$). Bei $0,2 \mu\text{M}$ Nitrit vergrößerte sich die Zellpopulation im selben Zeitraum auf $109 \pm 1\%$ ($n = 6$), bei $2 \mu\text{M}$ auf $114 \pm 2\%$ ($n = 5$, $p < 0,005$ vs. Kontrolle), bei $20 \mu\text{M}$ auf $119 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle), bei $200 \mu\text{M}$ auf $128 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle), bei $2000 \mu\text{M}$ auf $98 \pm 3\%$ ($n =$

6). Der Zusatz von DETA-NONOate (DETA-NO, 1 μM) proliferierte die Kultur auf $121 \pm 1\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle, Abb. 10A). Die halbmaximale Antwort EC_{50} wurde aus diesen Daten für $2,04 \times 10^{-6}$ μM Nitrit berechnet (Abb. 10B).

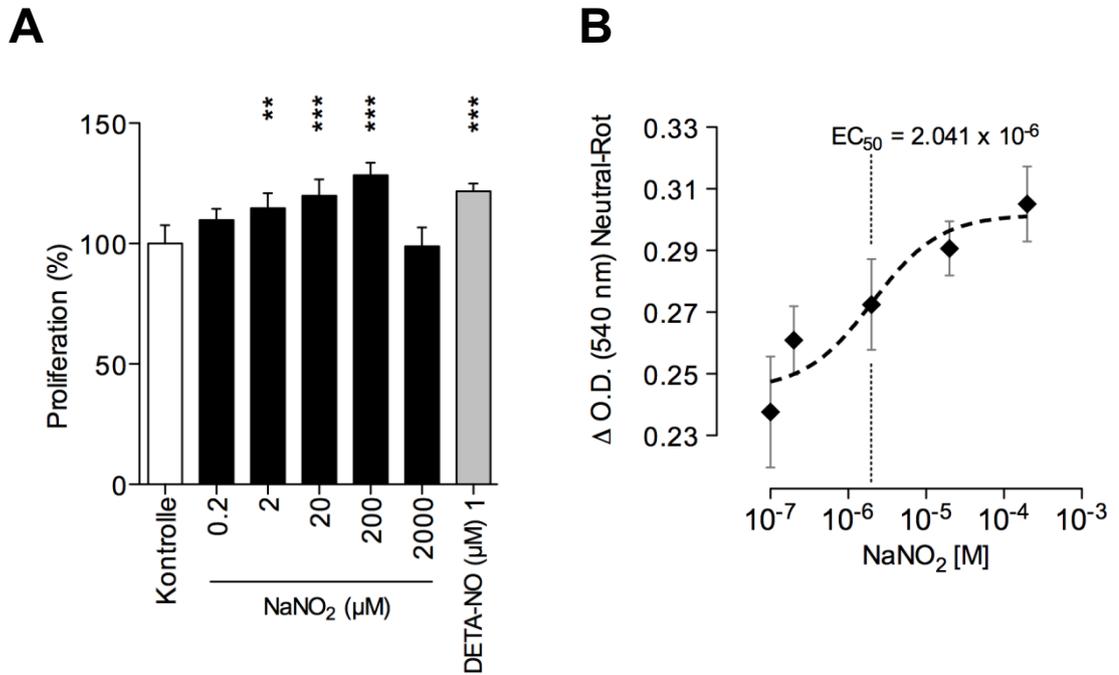


Abb. 10 Dosisabhängigkeit der Proliferation A) Der maximale proliferative Stimulus wurde mit einer Konzentration von 200 μM Nitrit erreicht. Auch DETA-NO (1 μM) löste eine deutliche proliferative Antwort aus. Proliferation gemessen mittels Neutral-Rot-Assay in C2C12-Myoblasten nach 24h. B) Die halbmaximale Proliferationsgeschwindigkeit EC_{50} wird bei 2,04 μM Nitrit erreicht.

3.2.2. Analyse von Zellzyklus und metabolischer Aktivität

Die Färbung der DNS mit Propidiumiodid (PI) ermöglicht einen Rückschluss auf den DNS-Gehalt der einzelnen Zelle und somit auf den aktuellen Stand innerhalb des Zellzyklus (Abb. 11).

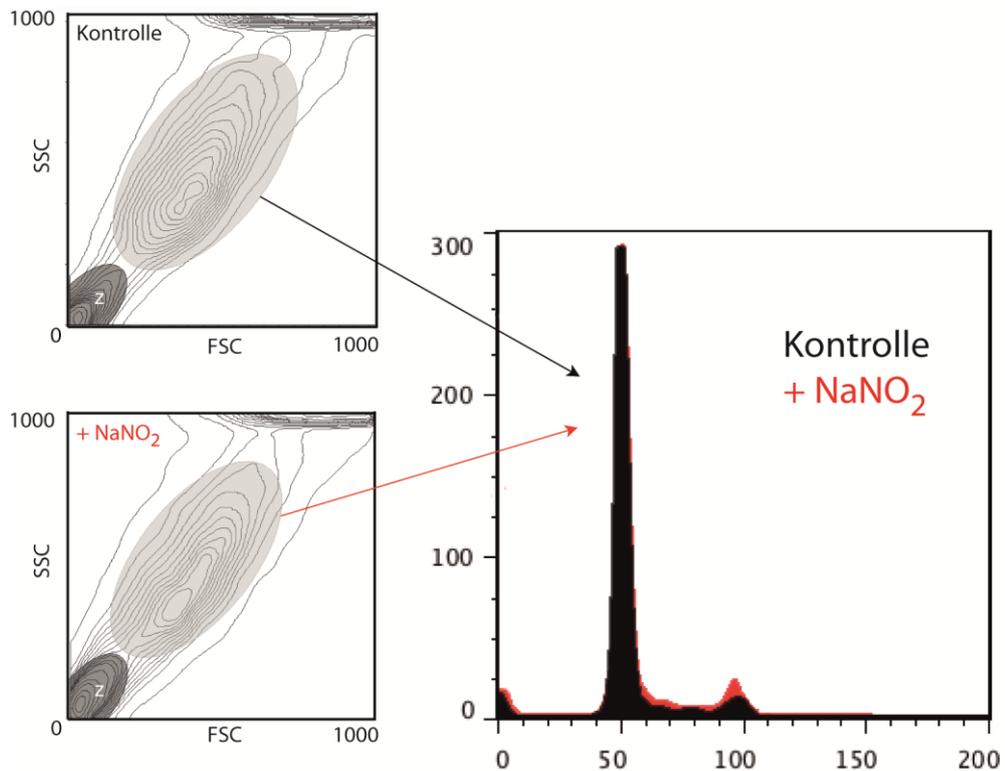


Abb. 11 Beispielregistrierung einer durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus
Nachdem die Population einkerniger Zellen (hellgrau, links oben und links unten) durch forward (FSC) und side scatter (SSC) ausgewählt wurde (z = Zellreste, dunkelgrau), wurde der Propidiumiodidgehalt der C2C12-Zellen als Histogramm aufgetragen (rechts). Unbehandelte Zellen schwarz / links oben, Nitrit-behandelte Zellen rot / links unten.

Bei unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe fanden sich zum Versuchszeitpunkt $11,3 \pm 0,4\%$ der Zellen in der S+G2/M-Phase des Zellzyklus ($n = 4$). Nitrit-behandelte Zellen befanden sich zu $14 \pm 0,6\%$ ($n = 6$, $p < 0,005$ vs. Kontrolle) in der Proliferation, DETA-NO-behandelte Zellen zu $14 \pm 0,3\%$ ($n = 7$, $p < 0,005$ vs. Kontrolle, Abb. 12A).

Die metabolische Aktivität, gemessen als optische Dichte (O.D.) nach Formazan-Farbreaktion mittels WST8, war bei den Zellen der Kontrollgruppe $1,12 \pm 0,05$ ($n = 4$). Nach Nitritbehandlung stieg die metabolische Aktivität auf

2,08±0,08 (n = 3, p < 0,001 vs. Kontrolle), nach DETA-NO-Behandlung auf 1,89±0,02 (n = 4, p < 0,001 vs. Kontrolle, Abb. 12B).

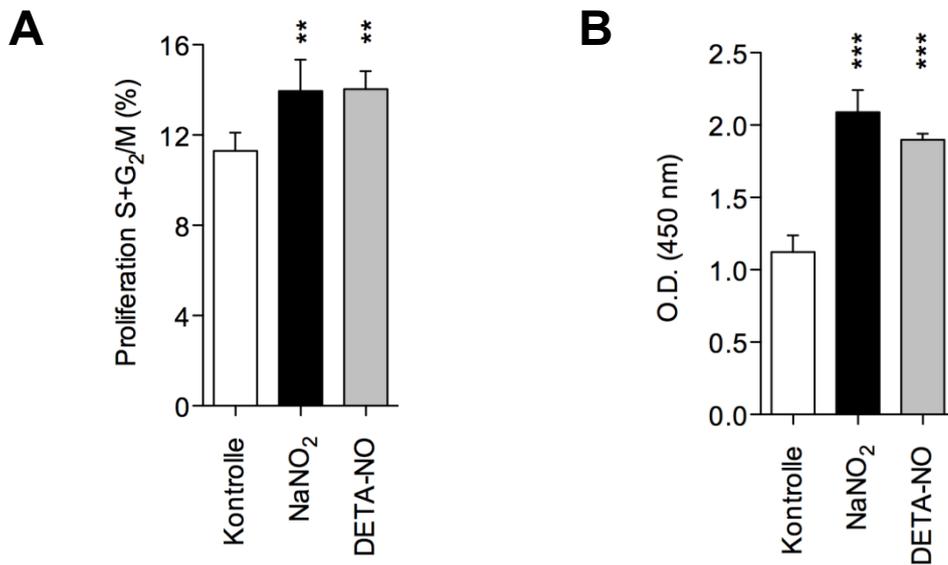


Abb. 12 Analyse von Zellzyklusdistribution und metabolischer Aktivität A) Sowohl Nitrit (2,5 μ M) als auch DETA-NO (1,25 μ M) führten zu einer deutlich höheren Zahl von C2C12-Zellen in den Phasen S und G₂/M des Zellzyklus nach 24 Stunden. B) Eine erhöhte metabolische Aktivität zeigte sich bei Nitrit- (2,5 μ M) behandelten und bei DETA-NO-behandelten (1,25 μ M) C2C12-Zellen.

3.2.3. NO-unabhängige Wirkung von Nitrit auf die Proliferation

Das Wachstum der unbehandelten Kulturen wurde als Referenz gleich 100% gesetzt ($100 \pm 1,8\%$, $n = 12$). Behandlung mit Nitrit steigerte das Wachstum der Kultur im selben Zeitraum auf $127 \pm 3\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle), mit DETA-NO auf $125 \pm 4\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Die Kombination von Nitrit und DETA-NO führte zu einem Wachstum auf $135 \pm 3\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Der alleinige Einsatz des NO-Fängers cPTIO verlangsamte das Wachstum, so dass die Kultur eine Größe von nur $65 \pm 1\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle) erreichte. Bei gleichzeitiger Zugabe von Nitrit wurden $98 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. cPTIO) erreicht, bei Kombination von cPTIO mit DETA-NO $107 \pm 2\%$ ($n = 6$, $p < 0,001$ vs. cPTIO). Auch Hemmung des NO-Rezeptors sGC durch ODQ verlangsamte die Proliferation ($72 \pm 3\%$, $n = 6$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Parallele Behandlung mit ODQ und Nitrit führte zu einer vergrößerten Kultur ($114 \pm 2\%$, $n = 12$, $p < 0,001$ vs. ODQ). Ein ähnliches Resultat erzielte die Kombination von ODQ mit DETA-NO ($113 \pm 2\%$, $n = 6$, $p < 0,001$ vs. ODQ, Abb. 13).

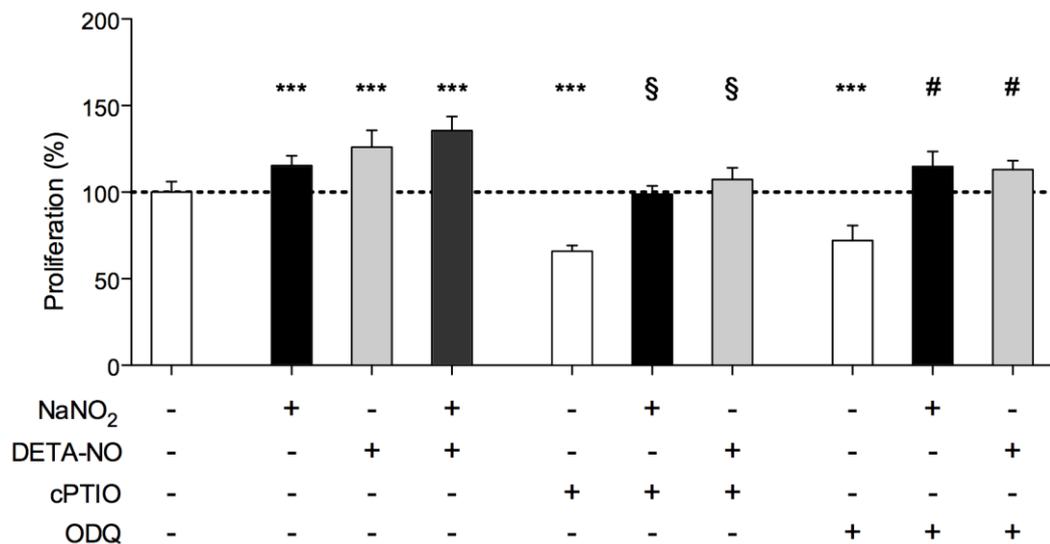


Abb. 13 NO-Unabhängigkeit der Nitritwirkung auf die Proliferation Die Nitritwirkung ($2,5 \mu\text{M}$) wurde weder durch den Radikalfänger cPTIO ($20 \mu\text{M}$) noch durch die Hemmung der sGC mittels ODQ ($10 \mu\text{M}$) aufgehoben. Als Positivkontrolle wurde der NO-Donor DETA-NONOate ($1,25 \mu\text{M}$) eingesetzt. Proliferation gemessen mittels Neutral-Rot-Assay in C2C12-Myoblasten nach 24h.

3.2.4. Intrazellulärer cGMP-Gehalt nach Applikation von Nitrit

Der cGMP-Gehalt in unbehandelten Zellen betrug $3,76 \pm 0,15$ fmol cGMP/ μ g Protein. Die Behandlung mit $2,5 \mu\text{M}$ Nitrit über 10 min und 180 min führte zu keiner Änderung des cGMP-Gehaltes (10 min: $3,69 \pm 0,12$ fmol cGMP/ μ g Protein, 180 min: $3,62 \pm 0,29$ fmol cGMP/ μ g Protein). Eine tendenzielle, aber nicht signifikante Verringerung des cGMP-Gehaltes zeigte sich nach Behandlung mit cPTIO ($2,94 \pm 0,11$ fmol cGMP/ μ g Protein), Nitrit und cPTIO ($2,93 \pm 0,24$ fmol cGMP/ μ g Protein), sowie Nitrit und ODQ ($2,95 \pm 0,26$ fmol cGMP/ μ g Protein). Die alleinige Behandlung mit ODQ führte zu einem deutlich verringerten cGMP Gehalt ($2,50 \pm 0,32$ fmol cGMP/ μ g Protein, $p < 0,005$ vs. Kontrolle). In der Positivkontrolle zeigte sich ein tendenzieller Anstieg des cGMP-Gehaltes nach DETA-NO-Behandlung ($4,22 \pm 0,25$ fmol cGMP/ μ g Protein), welcher bei gleichzeitiger ODQ-Anwendung ausblieb (DETA-NO + ODQ $3,14 \pm 0,22$ fmol cGMP/ μ g Protein, Abb. 14).

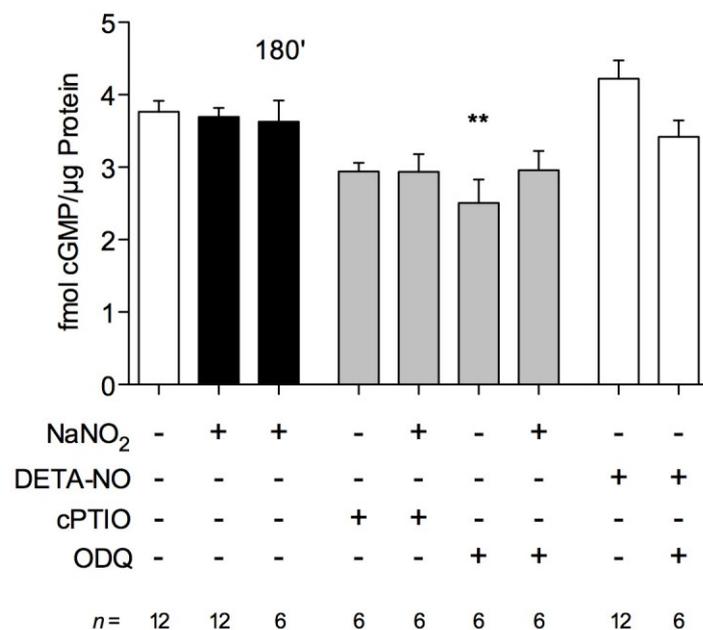


Abb. 14 Intrazellulärer cGMP-Gehalt nach Nitritbehandlung Nitritbehandlung ($2,5 \mu\text{M}$) führte weder bei 10 min (alle Balken außer 180') noch bei 180 min (180') Inkubation zu einer signifikanten Veränderung des cGMP-Gehaltes in C2C12-Myoblasten. DETA-NO ($1,25 \mu\text{M}$) führte zu einer tendenziellen Zunahme des cGMP-Gehaltes. cPTIO ($20 \mu\text{M}$) verringerte jeweils tendenziell den cGMP-Gehalt der Zellen während die alleinige Gabe von ODQ ($10 \mu\text{M}$) eine signifikante Abnahme von intrazellulärem cGMP bedingte.

3.2.5. mTOR-Aktivität nach Nitrit- und NO-Behandlung

Zur Bestimmung der mTOR-Aktivität wurde die Menge Protein kolorimetrisch quantifiziert, welche zuvor durch mTOR phosphoryliert wurde.

Unbehandelte mTOR-Standards wiesen im durchgeführten Versuchsansatz eine Aktivität von $0,74 \pm 0,03$ ($n = 8$) auf. Wurden die Proben mit Nitrit ($20 \mu\text{M}$) vorbehandelt, stieg die Aktivität auf $1,02 \pm 0,01$ an ($n = 8$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Bei Vorinkubation mit DETA-NO ($10 \mu\text{M}$) stieg die Aktivität auf $1,02 \pm 0,03$ an ($n = 7$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle, Abb. 15).

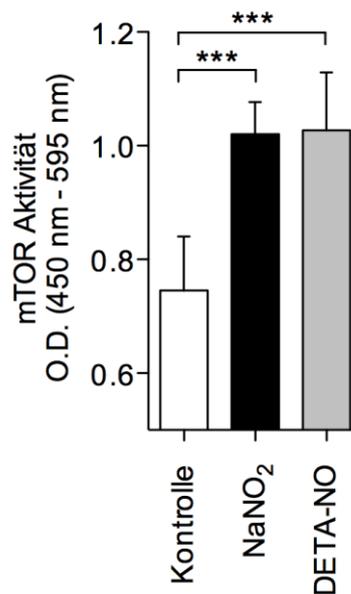


Abb. 15 Phosphorylierungsaktivität von mTOR Nach 30-minütiger Inkubation mTOR-Standards sowohl mit Nitrit ($20 \mu\text{M}$) als auch mit DETA-NO ($10 \mu\text{M}$) war die Phosphorylierungsaktivität von mTOR im *in vitro* Ansatz deutlich gegenüber der Kontrolle gesteigert.

3.2.6. Disinhibierung und Hemmung von mTOR

Um den Stellenwert von mTOR für die Nitritwirkung differenziert beurteilen zu können, wurden zwei zusätzliche Inhibitoren eingesetzt. Compound C blockiert AMPK^{105, 106}, welches seinerseits physiologisch mTOR inhibiert; Compound C führt somit zu einer indirekten Disinhibierung von mTOR. Als Gegenspieler wurde der direkte mTOR-Inhibitor Rapamycin eingesetzt^{91, 107}. Die C2C12-Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe wurden als Referenz definiert (100±1%, n = 12). Die Nitritbehandlung führte zu einer Zunahme auf 115±2% (n = 6). Die alleinige Zugabe von Compound C, einem AMPK-Inhibitor, führte zu einer Steigerung auf 129±8% (n = 5, p < 0,005 vs. Kontrolle). Die Kombination von Nitrit und Compound C zeigte eine Proliferation auf 158±8% (n = 5, p < 0,001 vs. Kontrolle). Die Kombination von Compound C mit DETA-NO führte zu einer Steigerung auf 145±8 (n = 5, p < 0,001 vs. Kontrolle), bei alleiniger DETA-NO-Gabe auf 125±4% (n = 6, p < 0,005 vs. Kontrolle, Abb. 16A).

Die Applikation von Rapamycin unterdrückte die Proliferation wirksam (55±2%, n = 6, p < 0,001 vs. Kontrolle). Die gleichzeitige Behandlung mit Rapamycin und Nitrit führte zu einem neuerlichen Anstieg der Proliferation auf 88±1% (n = 12, p < 0,001 vs. Rapamycin). Auch bei zusätzlicher Blockade des NO-Rezeptors sGC mittels ODQ stieg die Proliferation auf 80±2% (n = 11, p < 0,001 vs. Rapamycin, Abb. 16B) gegenüber Rapamycin an.

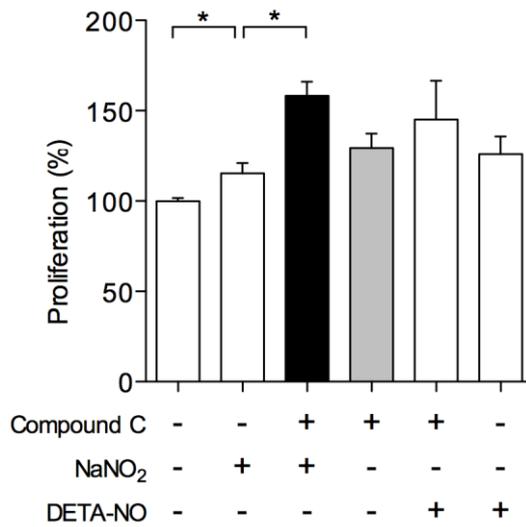
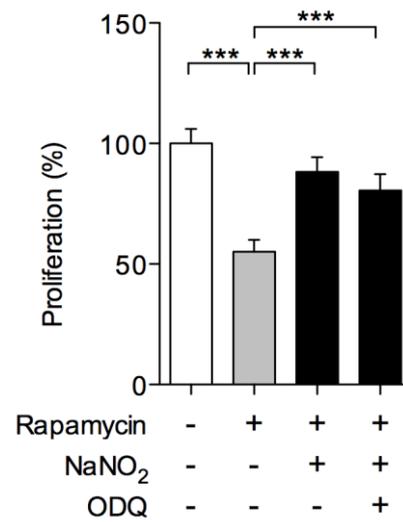
A**B**

Abb. 16 Disinhibierung und Hemmung von mTOR A) Nitrit (2,5 μM) führt zu gesteigerter Proliferation (vgl. Abb. 11A, 13A, 14). Disinhibierung von mTOR durch die Blockade von AMPK mittels Compound C (2,5 μM) führt zu einem weiteren, deutlichen Anstieg der Proliferation. B) Blockade von mTOR durch Rapamycin hemmt das Zellwachstum. Gleichzeitige Nitritbehandlung (2,5 μM) führt zu einem erneuten Anstieg der Proliferation. Proliferation gemessen mittels Neutral-Rot-Assay in C2C12-Myoblasten nach 24h.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss einer diätetischen Nitratsupplementierung auf die Regeneration des Gewebes nach kritischer Hinterlaufischämie *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurden im Speziellen die Folgen der Ischämie für das betroffene Muskelgewebe und hierfür *in vitro* die Bedeutung von Nitrit für die Proliferation der Myoblasten analysiert.

Es wurde NMRI-Wildtyp Mäusen die A. femoralis einseitig entnommen und 7 Tage vor bis 7 Tage nach dem Eingriff Natriumnitrat über das Trinkwasser zugeführt (1g/l). Die Kontrollgruppe erhielt Trinkwasser mit Kochsalz (1g/l). Der Einfluss der Behandlung wurde primär durch die Perfusion des Hinterlaufes – durch Laser Doppler Messung – erfasst. Aus dem betroffenen, ischämischen Muskelgewebe wurden Myoblasten isoliert und der Anteil apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay bestimmt. Die Veränderungen des körpereigenen NO-Pools durch zweiwöchige Nitrat-Behandlung wurden mittels HPLC- und CLD-Messungen von Nitrat, Nitrit und RSNO im Plasma untersucht. Um den Zusammenhang der Myoblastenapoptose mit dem veränderten NO-Pool näher untersuchen zu können, wurden im Weiteren C2C12-Myoblasten als Zellkulturen genutzt. Dabei wurde der Effekt verschiedener pharmakologischer Interventionen auf Proliferation, Zellzyklus, metabolische Aktivität und cGMP-Gehalt der Zellen beobachtet.

Im Folgenden soll zunächst auf die beobachteten Effekte der Nitrat-Behandlung auf Perfusion und Apoptose der Myoblasten nach einwöchiger Regenerationsphase eingegangen werden (4.1). Die Veränderungen des NO-Pool durch die 14 Tage dauernde Zuführung exogenen Nitrats über das Trinkwasser, wird im Anschluss diskutiert (4.2). Die Ergebnisse der pharmakologischen Interventionen in der Zellkultur (4.3) führen zu mechanistischen Überlegungen der Nitrit- und NO-Wirkung (4.4). Im letzten Abschnitt (4.5) wird die Bedeutung der Ergebnisse für Physiologie, Pathophysiologie und klinische Arbeit betrachtet, sowie weiterführende Fragestellungen angesprochen.

4.1. Einfluss exogenen Nitrats auf die Regeneration der Perfusion

Für NO wurden neben zahlreichen physiologischen Funktionen⁷ protektive Effekte unter pathologischen ischämischen Bedingungen beschrieben¹⁷⁻¹⁹. Die Reduktion von Nitrat über Nitrit zu NO gilt als alternativer Weg der NO-Bildung bei Sauerstoffmangel^{20, 46}. Da die NOS molekularen Sauerstoff als Kofaktor benötigen, wird deren Funktion bei fallendem Sauerstoffpartialdruck, wie z.B. unter Ischämie, zunehmend eingeschränkt und stehen daher als NO-Quelle nur unzureichend zur Verfügung⁷. Kumar et. al. nutzten 2008 i.p.-verabreichtes Nitrit, um den Schaden bei Hinterlaufischämie zu begrenzen. Nach Operation wurde ein Anstieg der Durchblutung auf ~75% an Tag 7 post-OP beschrieben¹⁹. Aicher et. al. haben 2003 einen Anstieg der Durchblutung nach 14 Tagen auf ~70% bei C57BL/6J-Mäusen und auf nur ~20% bei eNOS^{-/-}-Mäusen beobachtet; diese schlechte Regeneration wurde durch die fehlende NO-abhängige Rekrutierung endothelialer Vorläuferzellen begründet¹⁰⁸. In der hier durchgeführten Studie konnte durch die diätetische Nitrat-Behandlung ein Anstieg der Durchblutung von 18% ± 1 % unmittelbar post-operativ auf 73% ± 4% nach sieben Tagen gezeigt werden. Unterschiede erklären sich einerseits durch den gewählten Zugang zum Nitrat-Nitrit-NO-Stoffwechsel: rein diätetische Nitrat-Substitution in der vorliegenden Studie gegenüber invasiven Nitrit-Injektionen bei Kumar und VEGF-Injektionen bei Aicher. Andererseits ergeben sich Abweichungen durch den von Kumar und Aicher verwendeten C57BL/6J-Mausstamm, da unterschiedliche Mausstämme verschiedene Gefäßverläufe und Kollateralen aufweisen¹⁰⁹. Der Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppen zeigt, dass die Regeneration der Durchblutung nach sieben Tagen auch vom untersuchten Mausstamm beeinflusst wird: in dieser Studie verwendete NMRI-Mäuse regenerierten innerhalb einer Woche von 19% ± 3% auf 59% ± 4%, während die Durchblutung bei C57BL/6J von ~25% auf nur ~40% stieg. Ein deutlicher Vorteil der hier durchgeführten diätetischen Nitrat-Verabreichung sind fehlende Schwierigkeiten und Risiken, welche bei einer invasiven Therapie in Kauf genommen werden müssten. Neben dem prozeduralen Aufwand einer invasiven Therapie muss auch mit periinterventionellen Komplikationen wie Spritzenabzessen und Hämatomen

gerechnet werden. Die Aufnahme mit der Nahrung zeigte weder Nebenwirkungen noch Komplikationen.

Die Isolation von Myoblasten aus ischämischer Skelettmuskulatur zeigte, dass unter Nitratsupplementierung die Rate apoptotischer Myoblasten gegenüber der unbehandelten Kontrolle deutlich verringert war. Als Ursache für diese Beobachtung lassen sich vorrangig zwei Hypothesen formulieren: Einerseits könnte die verbesserte Perfusion im Hinterlauf der Nitratgruppe die Apoptose der Myoblasten verringern. Andererseits könnten aber auch die Veränderungen im NO-Pool der supplementierten Tiere direkte Wirkung auf die Myoblasten haben.

4.2. Diätetische Modulation des NO-Pools

Bryan und Kollegen konnten nach einwöchiger Nitrat-Applikation (1g/l im Trinkwasser) einen signifikanten Anstieg des Plasmanitrats von $\sim 25 \mu\text{mol/l}$ auf $\sim 50 \mu\text{mol/l}$ beobachten¹⁸. Durch HPLC-Untersuchungen von Plasma, welches 7 Tage nach Operation gewonnen worden war, konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls gezeigt werden, dass es nach 7 Tagen diätetischer Nitratgabe zu einer signifikanten Erhöhung des Plasmanitrats gegenüber der Kontrollgruppe kam ($451 \pm 75 \mu\text{mol/l}$ vs. $88,15 \pm 66,55 \mu\text{mol/l}$). Diese Ergebnisse sprechen für eine Aufnahme und Akkumulation des über das Trinkwasser verabreichten Nitrats. Unterschiede gab es bei den verwendeten Versuchstieren (n.a. vs. NMRI) und Futter (Purina 5001, Labdiet PMI, London, England vs. Standardfutter von Ssniff, Soest, Deutschland) annehmen. Trotz identischer Messmethode der NOx-Spiegel¹⁰ waren die Nitritspiegel im Plasma der vorliegenden Studie vergleichsweise niedrig: Unbehandelt wurden bei Bryan et al. $\sim 0,75 \mu\text{mol/l}$ Nitrit im Plasma im Vergleich zu hier $0,28 \pm 0,03 \mu\text{mol/l}$ gemessen. Der signifikante Anstieg nach diätetischer Behandlung konnte bestätigt werden. Zugleich stieg die Konzentration von S-Nitrosothiolen deutlich an; diese post-translational modifizierten Proteine sind als mögliche Effektoren der Nitratgabe von besonderer Bedeutung. So konnte z.B. von Lüdike et al. gezeigt werden, dass die S-Nitrosierung des *macrophage inhibitory factor* MIF kardioprotektive Effekte einer Nitrittherapie vermittelt¹¹. Die hier

gewonnenen Daten über Nitrat, Nitrit und RSNO deuten auf eine regulierte Homöostase hin, wodurch die Rolle von Nitrat und Nitrit als alternative Quelle für Sauerstoff-unabhängige NO-Bildung unterstützt wird⁴⁷.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine diätetische Nitratbehandlung bei Hinterlaufischämie den Nitratgehalt im Plasma effektiv steigert sowie den Nitritspiegel im Plasma anhebt. Ob es, wie bereits zuvor angesprochen (vgl. 4.1), eine direkte Wirkung von Nitrit auf Myoblasten gibt, wurde im Zellkulturmodell mittels immortalisierter, muriner C2C12-Myoblasten untersucht.

4.3. Zellkultur

Die Beteiligung von NO an der Myogenese wurde bereits ausführlich untersucht⁷⁵⁻⁷⁷. NO stimuliert die Proliferation der Myoblasten über einen cGMP-abhängigen Mechanismus⁷⁸. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Zusätzlich wurde jedoch die Wirkung von Nitrit untersucht, welches bislang als inertes Oxidationsprodukt von NO gesehen wurde. Es dient jedoch als Quelle für eine reduktive NO-Bildung, besonders unter hypoxischen Bedingungen, unter welchen die Sauerstoff-abhängigen NOS nicht mehr als NO-Quelle dienen. Erstmals konnten in dieser Studie Effekte von Nitrit unter Normoxie auf die Proliferation und die metabolische Aktivität von Myoblasten nachgewiesen werden. Diese Parameter beeinflusst Nitrit dosisabhängig, beginnend bei niedrigen Konzentrationen von 2,5 μM . Dies passt zu den Ergebnissen einer kürzlich publizierten Studie⁸¹, welche bei Atemwegsepithel Konzentrationen zwischen 10 und 50 μM einsetzte. Interessanterweise waren die Nitriteffekt zumindest teilweise NO-unabhängig. Denn Nitrit führte zu keinem Anstieg der intrazellulären cGMP-Level, wie sie bei NO-Aktivierung der sGC zu beobachten waren. Da die Nitritwirkung auch bei gleichzeitigem Einsatz des NO-Fängers cPTIO erhalten blieb, kann für die Nitriteffekte ein NO-unabhängiger Mechanismus vermutet werden.

4.4. Mechanistische Überlegungen

Kürzlich wurde gezeigt, dass Nitrit in Herz und Leber unter Anwesenheit von cPTIO bei Normoxie nitrosative Wirkungen entfaltet und dabei Häm-Proteine nitrosyliert und Thionitrite bildet¹¹². Die Bildung von Thionitriten ist eine mögliche posttranslationale Modifikation für alle bekannten Proteinklassen¹¹³. Dabei spielen die Cystein-Gruppen die zentrale Rolle¹¹⁴. Auch mTOR besitzt zahlreiche Cysteine, welche möglicherweise einer Nitrosylierung offen stehen^{88, 89}. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl Nitrit als auch NO in der Lage ist, die Phosphorylierungsaktivität von mTOR zu steigern.

Der Downstream-Signalweg von mTOR ist aufgrund seiner zwei Komplexe mTORC1 und mTORC2 für eine Analyse schwerlich zugänglich, es ist jedoch bekannt, dass beide Komplexe an der Proliferation beteiligt sind⁸⁸. Komplex 1 bindet Rapamycin und wird dabei stark gehemmt⁹¹. Jedoch lassen sich durch Rapamycin nicht alle Wirkungen von mTOR unterdrücken, so dass eine Regulation über mTORC2 angenommen werden kann⁸⁸. Hierin stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit bisher veröffentlichten Erkenntnissen bezüglich der Regulation des Zellzyklus überein. Rapamycin unterdrückte in den hier durchgeführten Versuchen, bei hohen Konzentrationen und langer Inkubation, die Proliferation deutlich. Bemerkenswert ist der Effekt einer parallelen Nitritbehandlung, welche den Effekt von Rapamycin teilweise ausgleicht. Jedoch kann anhand der durchgeführten Experimente nicht abschließend geklärt werden, ob Nitrit dabei mit Rapamycin und mTORC1, mTORC2, mTOR-Downstream-Signalwegen oder über dritte Signalwege seine Effekte vermittelt. Hierfür müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dass Nitrosylierungen sowohl eine Auf- als auch Abregulation von Proteinaktivität bewirken kann, wurde kürzlich am *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) gezeigt. S-nitrosiertes MIF zeigt eine erhöhte Oxidoreduktase-Aktivität bei gleichzeitig verminderter Interaktion mit c-Jun activation domain binding protein-1 (JAB1)^{102, 111}. Frühere Studien konnten zeigen, dass eine Aktivierung von AMPK die Proliferation glatter Muskelzellen inhibiert indem mTOR supprimiert wird¹¹⁵. Vorliegende Ergebnisse ergänzen diese

Beobachtung dahingehend, dass eine Hemmung von AMPK mit folgender Disinhibierung von mTOR zu einer Steigerung der Proliferation führte.

Es konnte somit gezeigt werden, dass nicht nur NO, sondern auch Nitrit selbst in der Lage ist, Signalwege zu modulieren und die Proliferation von Myoblasten zu unterstützen.

5. Schlussfolgerungen

In verschiedenen Tiermodellen wurde belegt, dass NO unter Hypoxie und Ischämie in verschiedenen Organen protektiv wirkt¹⁷⁻¹⁹. Wie sich die hierfür nötigen erhöhten NO-Spiegel möglichst effektiv und unkompliziert bereitstellen lassen, ist aktuell Gegenstand der Forschung. Da die NOS bei Ischämie aufgrund des mangelnden Sauerstoffangebots als Quelle nicht weiter in Frage kommen, erscheint die Reduktion von Nitrat zu Nitrit zu NO als möglicher exogen modulierbarer Zugang. Am murinen Hinterlaufmodell kritischer Ischämie konnte in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, dass die nicht-invasive, diätetische Substitution von Nitrat die Regeneration der Perfusion fördert. In Verbindung mit den guten Ergebnissen anderer Nitrat- und Nitrit-modulierender Studien^{21-23, 104, 111, 116, 117} sollte überprüft werden, für welche Bedingungen eine diätetische Nitrat-Gabe als Prävention oder Therapie geeignet ist und wie die diätetische Nitrat-Anwendung optimal umgesetzt werden kann.

Diätetisches Nitrat als Zugangsweg zum NO-Metabolismus

Die Regulierung der Homöostase von Nitrat und Nitrit ist bis dato nicht abschließend geklärt. Neben parenteralen Zugangsmöglichkeiten zum Nitrat-Nitrit-NO-Weg^{17, 19} gibt es die Möglichkeit, über diätetische Intervention die Verfügbarkeit der Vorstufen der NOS-unabhängigen NO-Bildung zu erhöhen^{16, 18, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 31, 47, 118, 119}. Dies schließt die Möglichkeiten sowohl der dauerhaften Umstellung in der Ernährung mit vermehrtem grünen Gemüse, roter Beete und Wurzelgemüse^{7, 20, 118}, sowie die unterstützende Zuführung über Nahrungsergänzungsmittel ein. Auch als akute therapeutische Intervention kommt eine diätetische Verabreichung, z.B. in Form von Säften, Kapseln oder Tabletten, in Betracht.

Zusammenfassend konnte die diätetische Nitratbehandlung in der vorliegenden Studie effektiv die Regeneration der Perfusion unterstützen. Dies scheint besonders unter ischämischen/traumatischen Bedingungen von Bedeutung zu sein. Die neuen Erkenntnisse über die Wirkung von Nitrit auf die Proliferation der Myoblasten und die Bedeutung von mTOR bietet aber

auch Ansätze für physiologische Situationen wie Rehabilitation, Physiotherapie oder Training. Wie sich die diätetische Nitratgabe in Krankheit und Gesundheit nutzen lässt, sollte an weiterführenden Tier- und Humanstudien physiologischer und pathologischer Bedingungen weiter verfolgt werden.

Literaturverzeichnis

1. Rees DD, Palmer RM, 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
2. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*. 1990;345:346-347
3. Green SJ. Nitric oxide in mucosal immunity. *Nat Med*. 1995;1:515-517
4. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;375:408-411
5. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987;92:639-646
6. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;153:1251-1256
7. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:156-167
8. O'Dell TJ, Huang PL, Dawson TM, Dinerman JL, Snyder SH, Kandel ER, Fishman MC. Endothelial nos and the blockade of ltp by nos inhibitors in mice lacking neuronal nos. *Science*. 1994;265:542-546
9. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Cardiac and regional haemodynamics, inducible nitric oxide synthase (nos) activity, and the effects of nos inhibitors in conscious, endotoxaemic rats. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2005-2016
10. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from l-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666
11. Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, Kelm M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*. 2006;107:2943-2951
12. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of n-nitroso and s-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:1590-1596
13. Nedospasov A, Rafikov R, Beda N, Nudler E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13543-13548
14. Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2:593-602
15. Wolter R. *Nitrate contamination of surface- and groundwater in germany – results of monitoring*. 2004.
16. Spiegelhalter B, Eisenbrand G, Preussmann R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: Possible relevance to in vivo

- formation of n-nitroso compounds. *Food Cosmet Toxicol.* 1976;14:545-548
17. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest.* 2005;115:1232-1240
 18. Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19144-19149
 19. Kumar D, Branch BG, Pattillo CB, Hood J, Thoma S, Simpson S, Illum S, Arora N, Chidlow JH, Jr., Langston W, Teng X, Lefer DJ, Patel RP, Kevil CG. Chronic sodium nitrite therapy augments ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:7540-7545
 20. Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon RO, 3rd, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster JR, Jr., Feelisch M, Lundberg JO. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol.* 2005;1:308-314
 21. Carlstrom M, Larsen FJ, Nystrom T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, Lundberg JO. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:17716-17720
 22. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab.* 2011;13:149-159
 23. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:342-347
 24. Kenjale AA, Ham KL, Stabler T, Robbins JL, Johnson JL, Vanbruggen M, Privette G, Yim E, Kraus WE, Allen JD. Dietary nitrate supplementation enhances exercise performance in peripheral arterial disease. *J Appl Physiol.* 2011
 25. Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Gilchrist M, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of walking and running: A placebo-controlled study. *J Appl Physiol.* 2011;110:591-600
 26. Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Pavey TG, Wilkerson DP, Benjamin N, Winyard PG, Jones AM. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:R1121-1131
 27. Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, Winyard PG, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *J Appl Physiol.* 2010;109:135-148
 28. Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Tarr J, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate

- supplementation reduces the o₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2009;107:1144-1155
29. Sobierajski J, Kelm M, Rassaf T. [new strategies in cardioprotection during acute myocardial infarction: Impact of hypoxic nitrate-nitrite-no signaling]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2013;138:799-804
 30. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:790-796
 31. Pannala AS, Mani AR, Spencer JP, Skinner V, Bruckdorfer KR, Moore KP, Rice-Evans CA. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:576-584
 32. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: Measurements in expelled air. *Gut*. 1994;35:1543-1546
 33. Carlsson S, Wiklund NP, Engstrand L, Weitzberg E, Lundberg JO. Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine. *Nitric Oxide*. 2001;5:580-586
 34. Peri L, Pietraforte D, Scorza G, Napolitano A, Fogliano V, Minetti M. Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: A new biological function for polyphenols with a catechol group? *Free Radic Biol Med*. 2005;39:668-681
 35. Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:1233-1242
 36. Zhang Z, Naughton DP, Blake DR, Benjamin N, Stevens CR, Winyard PG, Symons MC, Harrison R. Human xanthine oxidase converts nitrite ions into nitric oxide (NO). *Biochem Soc Trans*. 1997;25:524S
 37. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*. 1999;454:127-130
 38. Kozlov AV, Dietrich B, Nohl H. Various intracellular compartments cooperate in the release of nitric oxide from glycerol trinitrate in liver. *Br J Pharmacol*. 2003;139:989-997
 39. Vanin AF, Bevers LM, Slama-Schwok A, van Faassen EE. Nitric oxide synthase reduces nitrite to NO under anoxia. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64:96-103
 40. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003;9:1498-1505
 41. Rassaf T, Flogel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: Oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res*. 2007;100:1749-1754
 42. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Berenbrink M, Klare JP, Steinhoff HJ, Semmler D, Shiva S, Williams D, Kipar A, Gladwin MT,

- Schrader J, Kelm M, Cossins AR, Rassaf T. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation. *Circulation*. 2012;126:325-334
43. Tiso M, Tejero J, Basu S, Azarov I, Wang X, Simplaceanu V, Frizzell S, Jayaraman T, Geary L, Shapiro C, Ho C, Shiva S, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Human neuroglobin functions as a redox regulated nitrite reductase. *J Biol Chem*. 2011
 44. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO, 3rd. 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
 45. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: Evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res*. 1999;41:765-772
 46. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:395-400
 47. Bryan NS, Calvert JW, Gundewar S, Lefer DJ. Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:468-474
 48. Kety SS, Nathanson IT, et al. The toxic factors in experimental traumatic shock; shock accompanying muscle ischemia and loss of vascular fluid. *J Clin Invest*. 1945;24:839-844
 49. Carter SA. The definition of critical ischemia of the lower limb and distal systolic pressures. *Br J Surg*. 1983;70:188-189
 50. Siegenthaler W, Blum HE. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart, New York: Thieme; 2006.
 51. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res*. 2008;26:351-356
 52. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74:86-107
 53. Peter ME. Programmed cell death: Apoptosis meets necrosis. *Nature*. 2011;471:310-312
 54. Ashkenazi A. Death receptors: Signaling and modulation. *Science*. 1998;281:1305-1308
 55. Zhang JH, Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res*. 2000;10:205-211
 56. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of caspase inhibitor in caspase activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*. 1998;391:96-99
 57. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001;15:2922-2933
 58. Pluta RM, Dejam A, Grimes G, Gladwin MT, Oldfield EH. Nitrite infusions to prevent delayed cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *Jama*. 2005;293:1477-1484

59. Park B, Hoffman A, Yang Y, Yan J, Tie G, Bagshahi H, Nowicki PT, Messina LM. Endothelial nitric oxide synthase affects both early and late collateral arterial adaptation and blood flow recovery after induction of hind limb ischemia in mice. *J Vasc Surg.* 2010;51:165-173
60. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: Molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* 2005;15:666-673
61. Le Grand F, Rudnicki MA. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:628-633
62. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol.* 2000;218:115-124
63. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;123:213-257
64. Schultz E, Jaryszak DL, Valliere CR. Response of satellite cells to focal skeletal muscle injury. *Muscle Nerve.* 1985;8:217-222
65. Schultz E. Satellite cells in normal, regenerating and dystrophic muscle. *Adv Exp Med Biol.* 1985;182:73-84
66. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493-495
67. Muir AR, Kanji AH, Allbrook D. The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J Anat.* 1965;99:435-444
68. Allbrook DB, Han MF, Hellmuth AE. Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology.* 1971;3:223-243
69. Fukada S, Uezumi A, Ikemoto M, Masuda S, Segawa M, Tanimura N, Yamamoto H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Molecular signature of quiescent satellite cells in adult skeletal muscle. *Stem Cells.* 2007;25:2448-2459
70. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell.* 2000;102:777-786
71. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209-238
72. Zammit PS, Relaix F, Nagata Y, Ruiz AP, Collins CA, Partridge TA, Beauchamp JR. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sci.* 2006;119:1824-1832
73. Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec.* 1971;170:421-435
74. Schultz E, Jaryszak DL. Effects of skeletal muscle regeneration on the proliferation potential of satellite cells. *Mech Ageing Dev.* 1985;30:63-72
75. Madhusoodanan KS, Murad F. No-cgmp signaling and regenerative medicine involving stem cells. *Neurochem Res.* 2007;32:681-694
76. Lincoln TM, Wu X, Sellak H, Dey N, Choi CS. Regulation of vascular smooth muscle cell phenotype by cyclic gmp and cyclic gmp-dependent protein kinase. *Front Biosci.* 2006;11:356-367
77. Pilz RB, Broderick KE. Role of cyclic gmp in gene regulation. *Front Biosci.* 2005;10:1239-1268
78. Buono R, Vantaggiato C, Pisa V, Azzoni E, Bassi MT, Brunelli S, Sciorati C, Clementi E. Nitric oxide sustains long-term skeletal muscle

- regeneration by regulating fate of satellite cells via signaling pathways requiring vangl2 and cyclic gmp. *Stem Cells*. 2012;30:197-209
79. Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. A highlight of myoglobin diversity: The nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide*. 2010;22:75-82
 80. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:10256-10261
 81. Wang L, Frizzell SA, Zhao X, Gladwin MT. Normoxic cyclic gmp-independent oxidative signaling by nitrite enhances airway epithelial cell proliferation and wound healing. *Nitric Oxide*. 2012;26:203-210
 82. Wozniak AC, Anderson JE. Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev Dyn*. 2007;236:240-250
 83. Bennett AM, Tonks NK. Regulation of distinct stages of skeletal muscle differentiation by mitogen-activated protein kinases. *Science*. 1997;278:1288-1291
 84. Conejo R, Lorenzo M. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in c2c12 myoblasts. *J Cell Physiol*. 2001;187:96-108
 85. Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS, Olwin BB. Erk1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *J Cell Physiol*. 2001;186:104-115
 86. Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates tor action. *Cell*. 2002;110:177-189
 87. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mtor, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14:1296-1302
 88. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2009;122:3589-3594
 89. Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell*. 2010;40:310-322
 90. Shu L, Houghton PJ. The mTORC2 complex regulates terminal differentiation of c2c12 myoblasts. *Molecular and cellular biology*. 2009;29:4691-4700
 91. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and akt/pkb. *Mol Cell*. 2006;22:159-168
 92. Rosner M, Hengstschlager M. Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: Rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1. *Hum Mol Genet*. 2008;17:2934-2948
 93. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle

- through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:23977-23980
94. Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K. A possible linkage between amp-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells.* 2003;8:65-79
 95. Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C, Rider M. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr Biol.* 2002;12:1419-1423
 96. Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzembichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 1998;152:1667-1679
 97. Yang Z, von Ballmoos MW, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C, Di Santo S. Call for a reference model of chronic hind limb ischemia to investigate therapeutic angiogenesis. *Vascul Pharmacol.* 2009;51:268-274
 98. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature.* 1975;254:56-58
 99. Rassaf T, Bryan NS, Maloney RE, Specian V, Kelm M, Kalyanaraman B, Rodriguez J, Feelisch M. NO adducts in mammalian red blood cells: Too much or too little? *Nat Med.* 2003;9:481-482; author reply 482-483
 100. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2002;16:1775-1785
 101. Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, Hamada S, Gharini P, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:1551-1559
 102. Sobierajski J. The role of macrophage migration inhibitory factor in myocardial ischemia/reperfusion: Interaction with nitrite signalling pathways. *Klinik für Kardiologie, Pneumologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin.* 2011
 103. Sanders EJ, Wride MA. Ultrastructural identification of apoptotic nuclei using the tunel technique. *Histochem J.* 1996;28:275-281
 104. Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Totzeck M, Kropp M, Schicho A, Stock P, Rammos C, Niessen M, Heiss C, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M, Rassaf T. Dietary nitrate supplementation improves revascularization in chronic ischemia. *Circulation.* 2012;126:1983-1992
 105. Huang SW, Wu CY, Wang YT, Kao JK, Lin CC, Chang CC, Mu SW, Chen YY, Chiu HW, Chang CH, Liang SM, Chen YJ, Huang JL, Shieh JJ. P53 modulates the ampk inhibitor compound c induced apoptosis in human skin cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;267:113-124
 106. Yang WL, Perillo W, Liou D, Marambaud P, Wang P. Ampk inhibitor compound c suppresses cell proliferation by induction of apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells. *J Surg Oncol.* 2012;106:680-688

107. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol.* 2001;3:1014-1019
108. Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, Dimmeler S. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med.* 2003;9:1370-1376
109. Beckmann N. High resolution magnetic resonance angiography non-invasively reveals mouse strain differences in the cerebrovascular anatomy in vivo. *Magn Reson Med.* 2000;44:252-258
110. Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:4308-4313
111. Luedike P, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Totzeck M, Reeh M, Dewor M, Lue H, Krisp C, Wolters D, Kelm M, Bernhagen J, Rassaf T. Cardioprotection through s-nitros(yl)ation of macrophage migration inhibitory factor. *Circulation.* 2012;125:1880-1889
112. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2005;1:290-297
113. 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
114. Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF. Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature.* 2010;468:790-795
115. Ferri N. Amp-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease. *Vascul Pharmacol.* 2012;56:9-13
116. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Rammos C, Frommke LM, Knackstedt C, Predel HG, Kelm M, Rassaf T. Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. *Nitric Oxide.* 2012;27:75-81
117. Schiffer TA, Larsen FJ, Lundberg JO, Weitzberg E, Lindholm P. Effects of dietary inorganic nitrate on static and dynamic breath-holding in humans. *Respir Physiol Neurobiol.* 2013;185:339-348
118. Lundberg JO, Carlstrom M, Larsen FJ, Weitzberg E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc Res.* 2011;89:525-532
119. Petersson J, Phillipson M, Jansson EA, Patzak A, Lundberg JO, Holm L. Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292:G718-724

Danksagung

Während der Anfertigung dieser Arbeit habe ich von vielen Seiten wertvolle Hilfe und Unterstützung erfahren.

Mein Dank gilt zunächst Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm für die Ermöglichung der Forschungsarbeiten in seiner Abteilung.

Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf gilt mein besonderer Dank für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das Vertrauen, dass er damit in mich gesetzt hat. Ohne seine Betreuung und Nachsicht wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Du warst mir nicht nur Lehrer, sondern auch Vorbild.

Dr. rer. nat. Ulrike Hendgen-Cotta danke ich herzlich für all die Mühen, Ratschläge und aufmunternden Worte; du hältst durch deine Anstrengung alles auf Kurs.

Dr. med. Matthias Totzeck, dessen Ideenreichtum und Durchhaltevermögen ich bewundere, war mir ebenso Freund und Helfer wie Dr. med. Peter Lüdike, Dr. med. Julia Sobierajski und Dr. med. Christos Rammos. Ich denke gerne an die Zeit, Erlebnisse und Kongresse mit euch zurück.

Neben Simone, Thomas, Leena, Anita, Dominik, Steffi, Rainer und Rabia gilt auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden mein Dank für die Hilfe und die schöne Zeit, im alten wie im neuen Labor.

Nie möglich gewesen wäre die Arbeit jedoch ohne die Geduld & Unterstützung meiner Eltern und meiner Schwester Katrin, auf die ich mich immer verlassen kann. Euch ist diese Arbeit gewidmet.

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 3.6.2013

Andreas Schicho