

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

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

**Etablierung der reduktiven Gasphasenchemilumineszenz zur  
validen Messung von N-oxiden im Blut von Erythropoetin  
überexprimierenden Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Kerstin Albach

2006

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kelm

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Suschek

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen. Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von Ihnen wird immer von neuen Fragestellungen abgelöst.

Hermann Hesse

---

**Liste der Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
Ca <sup>2+</sup>	freies Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion
DAN-Assay	Diaminonaphthalen-Assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
FAD	Flavin-Adenosin-Dinukleotid
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMN	Flavin-Mononukleotid
GC-MS	Gas-Chromatographie-Massen-Spektrometrie
H <sup>+</sup>	Wasserstoffionen
Hb	Hämoglobin
HCL	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO·	Hydroxylradikale
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
I <sub>2</sub>	Iod
I <sup>-</sup>	Iodid
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
MetHb	Methämoglobin
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleimid
NR	Nitrat Reduktase
NO·	Stickstoffmonoxid *

---

$\text{NO}_2^-$	Nitrit
$\text{NO}_3^-$	Nitrat
$\text{NO}^-$	Nitroxylanionen
$\text{NO}^+$	Nitrosylkationen
NOS	NO-Synthase
cNOS	konstitutive NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
mtNOS	NO-Synthase in Mitochondrien
nNOS	neuronale, konstitutive NO-Synthase
NO <sub>x</sub>	Summe aus Nitrit und Nitrat
$\text{O}_2^-$	Superoxidanionen
$\text{ONOO}^-$	Peroxinitrit
L-NAME	N <sub>G</sub> -Nitro-L-Arginin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PDGF	humaner Wachstumsfaktor (platelet driven growth factor)
PEEK	Polyetheretherketon
RSNO	S-Nitrosothiole
SE	Standardfehler (Standarderror)
TG	Transgene Tiere
WT	Wildtyp

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

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1	Funktion, Lokalisation und Synthese von Stickstoffmonoxid	9
1.2	Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Blut	10
1.3	Messverfahren zur Quantifizierung des NO-Pools im Blut	12
1.4	Speicherung und Transport von NO im zirkulierenden Blut	13
1.5	Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Metabolismus im Blut	15
1.6	Ziele	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Biochemische Messmethoden zur Bestimmung der Metabolite von NO	18
2.1.1	Fluss-Injektionsanalyse (FIA)	18
2.1.2	Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD)	20
2.1.2.1	Reduktive Reaktionslösung	22
2.1.2.2	Spezielle Probenaufarbeitung zur Differenzierung von Nitrit und Nitrosothiolen	22
2.1.3	Kolorimetrisches Assay Kit	22
2.2	Herstellung von Standards wässriger NO-Lösung	23
2.3	Hämoglobinkonzentrationsbestimmung	24
2.4	Bestimmung der Erythrozytenaggregation	24
2.5	Blutentnahme und Probenaufarbeitung	25
2.5.1	Charakterisierung der Studienpopulationen	25
2.5.2	Probengewinnung	26
2.5.3	Probenaufarbeitung	27
2.6	Mathematisch-statistische Methoden	28

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Interaktion des Griess-Reagenz mit Hämoglobin</b>	<b>30</b>
3.1.1	Optimierung der hämoglobinfreien Probenaufarbeitung	33
<b>3.2</b>	<b>Validierung der Gasphasen-Chemilumineszenz-Methode zur Nitritbestimmung</b>	<b>34</b>
3.2.1	Validierung der Nitritmessung in wässrigen und proteinhaltigen Proben via CLD und FIA	35
3.2.2	Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Linearität bei der Nitritbestimmung	36
<b>3.3</b>	<b>Nitrit in Säugern</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>NO-Stoffwechsel in Erythropoetin überexprimierenden Mäusen</b>	<b>40</b>
3.4.1	Blutbild	40
3.4.2	NO-Metabolite in Plasma und Erythrozyten	40
3.4.3	Nitrit- und Nitratkonzentration im Sammelurin	42
<b>3.5</b>	<b>Erythrozytenaggregation</b>	<b>43</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Optimierung der Probenaufarbeitung</b>	<b>44</b>
<b>4.2</b>	<b>Methodenkritik der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion gegenüber der Fluss-Injektionsanalyse</b>	<b>45</b>
<b>4.3</b>	<b>Nitrit im Plasma von Säugetieren</b>	<b>47</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Metabolismus</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>52</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>67</b>

## 1 Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator in vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen. Bevor auf die verschiedenen Messverfahren zur Quantifizierung des NO-Pools eingegangen wird, werden Funktion, Lokalisation und Synthese sowie der Metabolismus von NO beschrieben. Anschließend werden die bisher bekannten Möglichkeiten der Speicherung und des Transportes von NO aufgeführt. Zuletzt wird der bisher bekannte Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Metabolismus veranschaulicht.

### 1.1 Funktion, Lokalisation und Synthese von Stickstoffmonoxid

NO ist als intra- und interzellulärer Botenstoff<sup>1</sup> wesentlich an vielen unterschiedlichen physiologischen Regulationsmechanismen des menschlichen Organismus beteiligt. NO ist ein Radikal mit hoher Reaktivität<sup>2,3</sup>. Im Zentralnervensystem stellt NO einen Neurotransmitter dar<sup>4</sup> und ist beteiligt an der Modulation der Signalübertragung nicht-adrenerger und nicht-cholinерger Nerven<sup>5</sup>. Weiterhin spielt NO eine wichtige Rolle in der Regulation der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr und hat wichtige Funktionen in der von Makrophagen vermittelten Immunantwort sowie in der Pathophysiologie der Sepsis<sup>6-9</sup>. Im Gefäßsystem wird NO kontinuierlich durch das Endothel der Gefäßwand freigesetzt. Durch passive Diffusion gelangt es in das Gefäßlumen sowie in die anliegende glatte Muskulatur. In der Zielzelle aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase und es kommt zum Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)<sup>10,11</sup>. Durch eine Senkung der freien Calciumkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ) folgt eine Relaxation der glatten Muskelzelle und eine Dilatation des Gefäßes. Das Endothel reguliert über die Bildung von NO den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und nimmt Einfluss auf den Blutdruck<sup>12-15</sup>. Durch Hemmung der Mitogenese und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen und Unterdrückung der Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten wirkt NO vasoprotektiv<sup>7,16-18</sup>.

NO wird durch die sogenannte NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Beteiligung von Kofaktoren und molekularem Sauerstoff<sup>19</sup> enzymatisch gebildet<sup>20</sup>. L-Arginin kann entweder über die Nahrung aufgenommen oder im Körper im Harnstoffzyklus aus L-Citrullin gebildet werden<sup>21</sup>. Zu den benötigten Kofaktoren zählen Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), Flavin-Adenosin-Dinucleotid (FAD) und Flavin-Mononucleotid (FMN). Diese Kofaktoren spielen eine wichtige Rolle im Elektronentransport von NADPH zum Hämkomplex.

Die Isoformen der NOS werden eingeteilt in eine Calcium- und Calmodulin abhängige, konstitutive Form (cNOS) und in eine Calcium- und Calmodulin unabhängige, induzierbare Form (iNOS)<sup>22</sup>. Die Isoformen haben eine unterschiedliche Affinität für Calmodulin. Bei normalen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt ist Calmodulin fest an die iNOS gebunden. An die cNOS bindet Calmodulin erst, wenn der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel ansteigt. Der Calcium-Gehalt ist abhängig von extrazellulären Signalen wie z.B. dem Anstieg flussvermittelter Scherkräfte im Gefäß, der Freisetzung von Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, Substanz P und Serotonin<sup>23</sup>. Calmodulin kontrolliert den Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne der NOS und bestimmt so die effektive NO-Bildungsrate nach einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg als initiales Triggersignal.

Seit einigen Jahren wird eine konstante Expression der iNOS in bestimmten Zelltypen vermutet<sup>24</sup>. Unter stärkerer Berücksichtigung der molekularen Struktur sind bisher vier verschiedene Isoformen klassifiziert worden<sup>24,25</sup>: Die neuronale, konstitutive NOS (nNOS), die endotheliale, konstitutive NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) aus Makrophagen und die NOS aus Mitochondrien (mtNOS)<sup>26,27</sup>. Die verschiedenen Formen wurden nach den Geweben benannt, in denen sie zuerst nachgewiesen worden. Die nNOS wurde mittlerweile auch in Skelettmuskeln<sup>28</sup> und im respiratorischen Epithel<sup>29</sup> identifiziert. Die eNOS wurde zusätzlich im Herzen, im Skelettmuskel, in Epithelzellen<sup>30</sup> und in Neuronen<sup>31</sup> nachgewiesen. Die Expression der in den Makrophagen gefundenen iNOS wird durch inflammatorische Zytokine stimuliert.

Alle NOS-Isoformen haben eine vergleichbare Aktivität von  $1 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$  Protein. Die häufig differierenden Angaben über die NO-Produktion der einzelnen Isoformen liegen weniger in der unterschiedlichen katalytischen Aktivität, sondern in der Höhe der Expression. Die Höhe der iNOS-Expression kann bei Stimulation des Immunsystems von 0,005% auf 1% des Proteingehaltes der Zelle ansteigen<sup>22</sup>.

## 1.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid im Blut

Die Besonderheiten im Stoffwechsel von NO resultieren zum großen Teil aus seinen chemischen Eigenschaften. NO ist ein farbloses Gas, das in wässrigen Phasen bis zu einer Konzentration von 2 mM löslich ist<sup>32</sup>. Sein paramagnetischer Charakter mit einer ungeraden Anzahl an Elektronen verleiht NO Radikalcharakter und erklärt unter anderem die hohe Reaktivität. Durch die Reaktion mit Sauerstoff kann NO entweder zu Nitroxylanionen ( $\text{NO}^-$ ) reduziert oder zu Nitrosylkationen ( $\text{NO}^+$ ) oxidiert werden<sup>33</sup>.

Das Hauptabbauprodukt von NO in wässriger Lösung ist Nitrit. Die Kinetik der Autoxidation ist abhängig von der NO-Ausgangskonzentration<sup>34</sup>. Die Halbwertszeit von NO ist umgekehrt proportional zur Konzentration und damit kein konstanter Wert. Die Halbwertszeit in wässriger Lösung wird je nach Sauerstoffpartialdruck mit 3,8-6,2 sec angegeben<sup>35</sup>.

Im biologischen System ist der NO-Metabolismus abhängig von der NO- und Sauerstoffkonzentration sowie von der Konzentration anderer möglicher Reaktionspartner als auch von der Diffusionsgeschwindigkeit über biologische Membranen. Die Diffusionskonstante in der Gefäßwand beträgt  $3300 \mu\text{m}^2 \times \text{sec}^{-1}$ <sup>36</sup>. NO kann in kurzer Zeit durch mehrere benachbarte Zellen diffundieren. Somit kann der parakrine Mediator signifikante Entfernungen vom Ort der Bildung zur Zielzelle überwinden<sup>37</sup>.

Während der Diffusion kann es zur Reaktion von NO mit molekularem Sauerstoff kommen. Dabei entstehen höhere Stickoxide, z.B. Stickstoffdioxid und Distickstofftrioxid. Diese Stickoxide können mit anderen Molekülen, z.B. mit Thiolen und Aminen reagieren oder zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) hydrolysieren. Weiterhin reagiert NO mit Hämoproteinen und Sauerstoffradikalen. Das Ausmaß sämtlicher dieser Reaktionen ist abhängig von den Bedingungen unter denen NO freigesetzt wird sowie von der Konzentration der Reaktionspartner<sup>37,38</sup>. Hierdurch können teilweise die Unterschiede der publizierten Halbwertszeiten von Sekunden bis Minuten erklärt werden<sup>37,39,40</sup>, z.B. ist die Reaktion von NO mit Sauerstoff innerhalb von hydrophoben Regionen der Membran um den Faktor 300 gegenüber dem umgebendem wässrigen Medium erhöht<sup>41</sup>.

Zu den grundlegenden Komponenten, die am Abbau von NO beteiligt sind, gehören Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Hydroxylradikale ( $\text{HO}\cdot$ ). Diese kommen in unterschiedlichen Konzentrationen und in verschiedenen Zellen und Organen vor<sup>42-44</sup>. Daraus resultieren unterschiedliche Reaktionskinetiken von NO *in vivo*. Die sauerstoffabhängigen Radikale werden im Gefäßsystem überwiegend von Endothelzellen und Makrophagen gebildet. Hervorzuheben ist  $\text{O}_2^-$ , das mit NO zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) reagiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist mit  $6,7 \times 10^9 \text{ mol/l/s}$  nahezu diffusionslimitiert.  $\text{ONOO}^-$  wird in aktivierten Alveolarmakrophagen, neutrophilen Granulozyten und im Endothel produziert<sup>45</sup>.  $\text{ONOO}^-$  kann als starkes Oxidanz Reaktionen mit einer Vielzahl anderer Biomoleküle eingehen und zu Zellschäden führen<sup>46-48</sup>. Durch die Reaktion von Metallionen mit  $\text{ONOO}^-$  bildet sich ein stark nitrosierendes Agens mit hoher Reaktivität<sup>49</sup>.

Die schnelle Verteilung und der rasche Metabolismus von NO macht die Quantifizierung des NO-Stoffwechsels zur Herausforderung. Es ist wichtig unter Berücksichtigung der biologischen Funktionen von NO, den

Stoffwechsel und die Synthese von NO anhand eines Markers *in vivo* quantifizieren zu können.

Nitrat stellt das wesentliche Produkt bei der Reaktion von NO mit Sauerstoff dar. Mit HO<sup>•</sup> kann NO zu Nitrit reagieren. Der größte Anteil des intravaskulär gebildeten NO wird durch Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert<sup>50,51</sup>. Nitrat entsteht nicht nur als Stoffwechselprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechsels, vielmehr ist die Nitratkonzentration von einer Reihe anderer Faktoren abhängig: Die Aufnahme von Nitrat durch die Nahrung, der Metabolismus durch den Harnstoffzyklus<sup>52</sup>, die Absorption durch den Verdauungstrakt<sup>53</sup> und die Inhalation aus der Luft<sup>54</sup> (siehe Abbildung 1). Nitrat oder die Summe aus Nitrit und Nitrat (NO<sub>x</sub>) sind kein spezifisches Endprodukt der NO-Synthese und kommen nur unter kontrollierten Bedingungen als Marker der NO-Verfügbarkeit in Frage.

Nitrit stellt einen potentiellen Marker für den NO-Stoffwechsel dar. Nitrit ist stabiler als NO und wird nicht wie Nitrat durch andere Stoffwechselwege beeinflusst. In der Literatur sind enorm differierende Angaben zur Konzentration von Nitrit im Plasma zu finden, diese reichen von nicht nachweisbar<sup>55</sup> über nanomolar<sup>56</sup> bis hin zu mikromolar<sup>57</sup>. Hieraus könnte geschlossen werden, dass Nitrit als Marker für den NO-Stoffwechsel *in vivo* eventuell nicht sensibel ist. Diese enormen Unterschiede lassen sich vermutlich durch die unterschiedliche Probengewinnung und -aufarbeitung als auch durch methodische Probleme erklären. Offen bleibt, ob Nitrit in proteinhaltigen Lösungen valide bestimmbar ist und sich als sensitiver Marker der NO-Verfügbarkeit eignet.

### 1.3 Messverfahren zur Quantifizierung des NO-Pools im Blut

Nitrit kann durch zahlreiche Verfahren in wässrigen und proteinhaltigen Medien bestimmt werden. Dazu zählen der spektrophotometrischen Assay durch Griess-Reaktion bzw. Diaminonaphthalen<sup>58</sup> und die Chemilumineszenzdetektion<sup>59</sup>.

Die einfachste und meist angewandte Methode zur Nitritanalyse ist der spektrophotometrische Assay über die Griess-Reaktion. Das Messprinzip der Nitritmessung beruht auf einer Azokupplung von Nitrit an ein Naphthylendiamin und der photometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion bei einer Wellenlänge von 545 nm. Die Sensitivität der Nitritmessung durch die Griess-Reaktion, gemessen über ein herkömmliches Spektrophotometer, liegt im mikromolaren Bereich. Die Nitritkonzentration im Plasma liegt jedoch im nanomolaren Bereich, sodass die Sensitivität dieser Messung nicht ausreicht.

Zur Nitritanalyse wurde die Spektrophotometrie mit der Fluss-Injektions-Analyse kombiniert. Durch die Modifizierung konnte die Sensitivität in den nanomolaren Konzentrationsbereich erweitert und durch die Automatisierung der Anlage ein hoher Probendurchsatz ermöglicht werden<sup>60,61</sup>. Probleme ergeben sich aus den verschiedenen Interaktionen, die das Griess-Reagenz z.B. mit biologischen Aminen, Zinksulfat, Cadmium, Mangan, Eisen, Zink und Harnsäure eingehen kann<sup>62-64</sup>. Weiterhin gibt es Hinweise für Interaktionen der Griess-Reaktion mit Hämoglobin, Alkohol und Zitat<sup>61</sup>. Ein weiteres Problem ergibt sich aus dem relativ hohen Probenvolumen, dass für die Vermessung der Proben benötigt wird.

Falsche Probenbehandlung kann zu nicht validen Ergebnissen führen. Auf eine Kontamination von Laborglaswaren muss geachtet werden<sup>65-67</sup>. Proteine können bei der Nitritmessung mit dem Griess-Reagenz<sup>68</sup> bzw. mit Diaminonaphthalen<sup>69</sup> interagieren. Eine Proteinsubtraktion ist somit maßgeblich erforderlich. Das Verfahren zur Deproteinisierung sollte jedoch ebenfalls gut überdacht werden, da z.B. die Proteinfällung über Zinksulfat mit dem Griess-Reagenz interagiert<sup>70</sup>. Die Ultrafiltration von proteinhaltigen Proben zur Entfernung der Proteine erscheint optimal<sup>61</sup>.

#### 1.4 Speicherung und Transport von NO im zirkulierenden Blut

Durch Synthese und Abbau wird die Menge an NO im zirkulierendem Blut und somit seine biologischen Effekte bestimmt. Bis vor kurzem galt die überwiegende Lehrmeinung, dass NO nahezu ausschließlich autokrin, d.h. nur am Ort seiner Bildung wirken kann. Nach luminal freigesetztes endothelial gebildetes NO wird jedoch nicht nur durch die Reaktion mit oxygeniertem Hämoglobin rasch inaktiviert, sondern kann in Form von bioaktiven Zwischenprodukten im Kreislauf transportiert werden<sup>71</sup>. Die genaue Kenntnis über den Transportpool von NO stellt die Grundlage für die diagnostische und therapeutische Bedeutung von NO dar.

NO reagiert mit den im Plasma zirkulierenden Thiolen Albumin, Glutathion und Cystein zu Nitrosothiolen (RSNO), die im Plasma verschiedener Säuger nachgewiesen wurden<sup>72,73</sup>. Die S-Nitrosothiolderivate der Aminosäuren, Peptide und Proteine sind physiologisch relevante Produkte des NO-Metabolismus. Im menschlichen Plasma liegen RSNO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich vor<sup>71,74</sup>. Die *in vitro* gemessene Halbwertszeit der RSNO im Plasma liegt zwischen 40 min bei S-Nitrosoalbumin, 8 min bei S-Nitrosoglutathion und 1 min bei S-Nitrosocystein. Die Stabilität der NO-Bindung hängt von den umgebenden Reaktionsbedingungen ab, wie dem Vorhandensein von Metallionen<sup>75</sup>, der Reaktion von RSNO mit Ascorbinsäure<sup>76</sup> und von

Transnitrosierungsvorgängen. Bei Transnitrosierungsvorgängen wird an Thiole gebundenes NO durch andere Thiole freigesetzt<sup>77</sup>. Dieses NO kann erneut an Thiole binden, aber auch abgebaut werden. Angenommen wird, dass Thiole in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren über  $\text{NO}^+$  zu RSNO reagieren<sup>78</sup>. Die gebildeten RSNO sind eine potentielle Speicherform für NO im Plasma. Die intravenöse Applikation von NO-Gas gesättigten Lösungen führt zur Bildung und weiteren Erhöhung zirkulierender plasmatischer Nitrosothiole. Diese sind in der Lage, dosisabhängig Leitungs- und Widerstandsarterien im Systemkreislauf zu dilatieren<sup>71</sup>.

NO kann nicht nur im Plasma sondern auch in Blutzellen gebunden werden. Hierbei nehmen die Erythrozyten die entscheidende Rolle ein. Erythrozyten bilden 40-50% des Blutvolumen. Diese zellorganellfreien Blutzellen, die nur durch eine Plasmamembran vom Blutplasma abgegrenzt sind, enthalten vor allem das Protein Hämoglobin. Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten, die je eine Hämgruppe tragen. Je zwei der vier Untereinheiten besitzen identische Polypeptidketten, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Ketten. Während der Oxygenierung wird Sauerstoff reversible an das Häm-Eisen angelagert.

Die Erythrozyten wurden im Zusammenhang mit dem NO-Metabolismus bis vor kurzem lediglich als NO-abfangende Zellen betrachtet, bei denen endothelial gebildetes NO durch die Reaktion mit oxygeniertem Hämoglobin bzw. durch die Bindung an deoxygeniertes Hämoglobin inaktiviert wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit von NO mit Hämoglobin liegt bei  $3\text{-}5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$ <sup>79</sup>, was eine Halbwertszeit von etwa 1  $\mu\text{s}$  für NO im Blut ergeben würde. Wird freies Hämoglobin in Versuchstiere oder Versuchspersonen infundiert, resultiert eine Hypertonie<sup>80,81</sup>, hauptsächlich bedingt durch die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin<sup>80</sup>. Da 3-6  $\mu\text{M}$  freies Hämoglobin eine NO-vermittelte Vasodilatation aufheben kann<sup>82</sup>, stellt sich die Frage, wie NO bei einer Hämoglobinkonzentration von 12-15 mM im Blut seine vasoregulatorischen Funktionen erfüllen kann.

Liu *et al.*<sup>83</sup> und Liao *et al.*<sup>84</sup> haben gezeigt, dass der NO-Verbrauch durch Erythrozyten langsamer ist als durch freies Hämoglobin. Endothelial gebildetes NO muss auf seinem Weg vom Endothel zu dem im Erythrozyten enthaltenen Hämoglobin zuerst eine erythrozytenfreie Zone passieren, hierbei wird der NO-Verbrauch durch den intravaskulären Blutfluss reduziert<sup>84-86</sup>. Auch ohne eine erythrozytenfreie Zone ist die Reaktionsgeschwindigkeit von NO mit Erythrozyten um 500-1000mal langsamer als mit freiem Hämoglobin<sup>83,84</sup>. Jeder einzelne Erythrozyt ist von einer Schutzschicht umgeben. Hier ist die NO-Konzentration gegenüber der Umgebung erniedrigt. Auch die Diffusion von NO durch die

Erythrozytenmembran und die Diffusion im Zytoplasma zum reaktiven Hämoglobin muss als limitierender Faktor beachtet werden<sup>87</sup>.

Mit Hämoglobin kann NO prinzipiell drei verschiedene Reaktionen eingehen. Erstens kann NO mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat reagieren<sup>50,51</sup>. 90% des gebildeten NO wird durch diese Reaktion zu Nitrat umgewandelt. Die zweite Reaktion ist die Bildung von Nitrosylhämoglobin durch die Reaktion von NO mit dem Eisen des Deoxyhämoglobin. Drittens beschreibt Jia et al.<sup>88</sup>, dass Hämoglobin in zwei verschiedenen Strukturen vorkommt, in einer R-Form (mit hoher O<sub>2</sub>-Affinität) oder einer T-Form (mit niedriger O<sub>2</sub>-Affinität). Methämoglobin ist der T-Form ähnlich. Nach der Oxygenierung des Hämoglobins in der Lunge (R-Form) bildet sich durch eine Nitrosierungsreaktion von NO an das Cys-93 der  $\beta$ -Kette des Hämoglobin S-Nitrosohämoglobin<sup>89</sup>. Die Sauerstoffabgabe in der Peripherie ist mit einer Strukturänderung des Hämoglobins zur T-Form verbunden. Dies resultiert ebenfalls in der Freisetzung des an Cys-93 gebundenen NO. Sowohl S-Nitrosomethämoglobin als auch S-Nitrosohämoglobin führen infolge der durch die Strukturänderung des Hämoglobins induzierten Instabilität und nachfolgender NO-Abspaltung zu einer Dilatation der Blutgefäße. Dagegen konstringiert Nitrosyl-Hämoglobin, wie natives Hämoglobin, diese durch Abfangen des endothelialen NO. Das aus S-Nitrosohämoglobin freigesetzte NO verändert die Thrombozytenaggregabilität<sup>90</sup>. Unklar war lange, wie das im Erythrozyten an Hämoglobin gebundene NO in das zellumgebende Plasma gelangt. Mittlerweile ist ein in der Erythrozytenmembran lokalisierter AE1-Transporter nachgewiesen, der NO über verschiedene Bindungen in das extrazelluläre Medium überführt<sup>91</sup>. Cosby et al.<sup>92</sup> konnte zeigen, dass Nitrit in supraphysiologischer Konzentration durch eine Oxidase-Aktivität des Hämoglobins NOS-unabhängig zur NO-Bildung führen kann.

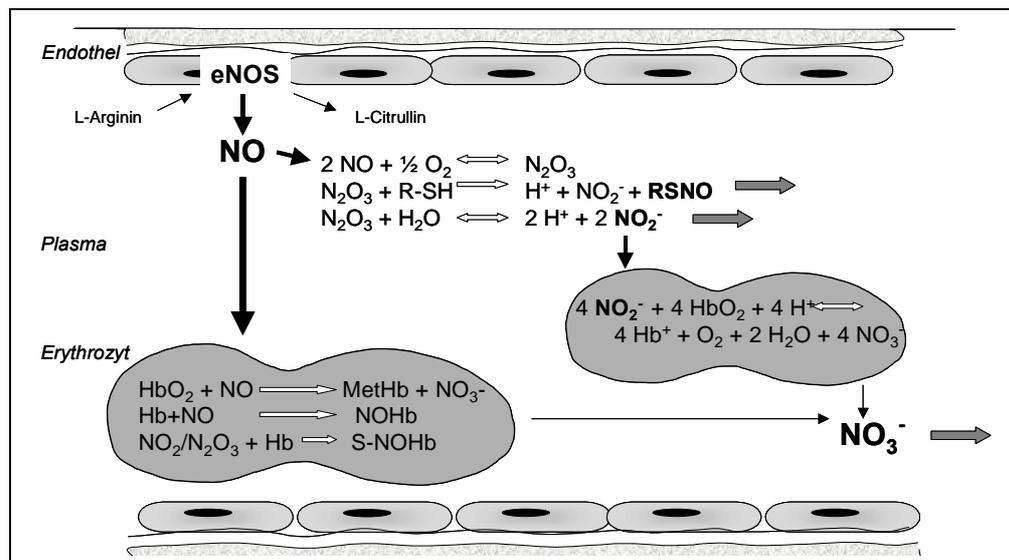
### **1.5 Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Metabolismus im Blut**

Um eine adäquate Sauerstoffkapazität im Blut aufrechtzuerhalten, wird die Erythropoese dem Sauerstoffbedarf des Gewebes über das Hormon Erythropoetin (EPO) angepasst. EPO inhibiert die Apoptose der erythrozytären Vorläuferzellen im Knochenmark und stimuliert ihre Proliferation und Differenzierung. Eine gesteigerte EPO-Bildung führt zu sekundärer Erythrozytose. Ein ansteigender Hämatokrit geht mit einer Erhöhung der Blutviskosität einher. Es kann zu hämodynamischen und rheologischen Problemen kommen. Eine Polyglobulie ist mit einer hohen Inzidenz für arterielle Hypertonie und Thrombembolie assoziiert<sup>93,94</sup>. Patienten mit Polycythämia vera oder chronischer Höhenkrankheit haben

einen hohen Hämatokrit. Auch bei Missbrauch von Erythropoetin durch Sportler wird ein erhöhter Hämatokrit beobachtet. Bewohner großer Höhen, wie zum Beispiel in Tibet, bilden ebenfalls einen erhöhten Hämatokrit, sie scheinen jedoch adaptiert, und es kommt nicht zur Ausbildung von arterieller Hypertonie oder Thrombembolien.

Nach chronischer Behandlung von Ratten mit Erythropoetin zeigt sich ein signifikanter blutdrucksteigernder Effekt und ein Anstieg des Hämatokrit<sup>95</sup>. Nach Gabe von L-NAME, einem eNOS-Inhibitor, kommt es zu einem weiteren Anstieg des Blutdrucks<sup>96</sup>. Diese Beobachtung zeigt, dass die NO-Synthese einen protektiven Mechanismus gegenüber der hypertensiven Wirkung von Erythropoetin darstellen kann.

Um den alleinigen Einfluss einer Polyglobulie auf den NO-Stoffwechsel genauer zu untersuchen, wurden von Ruschitzka et al.<sup>97</sup> genetisch veränderte Mäuse hergestellt, die sich durch eine isolierte, primäre Erythrozytose charakterisierten. Sauerstoffunabhängig wurde durch humane Wachstumsfaktoren (PDGF, platelet driven growth factor) humane Epo cDNA in den transgenen Mäusen expremiert. Durch die Überexpression von EPO wurde eine Erhöhung von Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit auf das 2fache erreicht, ohne dass die transgenen Mäuse Hypertonie, Myokardinfarkt oder Thrombembolien entwickelten. Eine erhöhte eNOS-Expression wurde gemessen<sup>97</sup>. Offen ist jedoch, ob es kompensatorisch zu einer vermehrten NO-Bildung kommt, die sich im zirkulierenden Blut widerspiegelt.



**Abbildung 1.** Schematische Abbildung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges im Kreislaufsystem.

## 1.6 Ziele

Somit ergaben sich folgende Ziele:

1. Optimierung der Probenaufarbeitung zur anschließenden Nitritmessung in kleinvolumigen Plasmaproben von Säugetieren, insbesondere von Mäusen.
2. Validierung einer geeigneten Methodik zur interaktionsfreien, kleinvolumigen und dennoch sensitiven Bestimmung von NO-Metaboliten im Blut von Säugetieren.
3. Etablierung eines im Blutplasma verschiedener Säugetiere vorhandenen spezifischen Markers der endothelialen NO-Bildung.
4. Untersuchung des Einflusses eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Stoffwechsel im Blut von Säugetieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Biochemische Messmethoden zur Bestimmung der Metabolite von NO

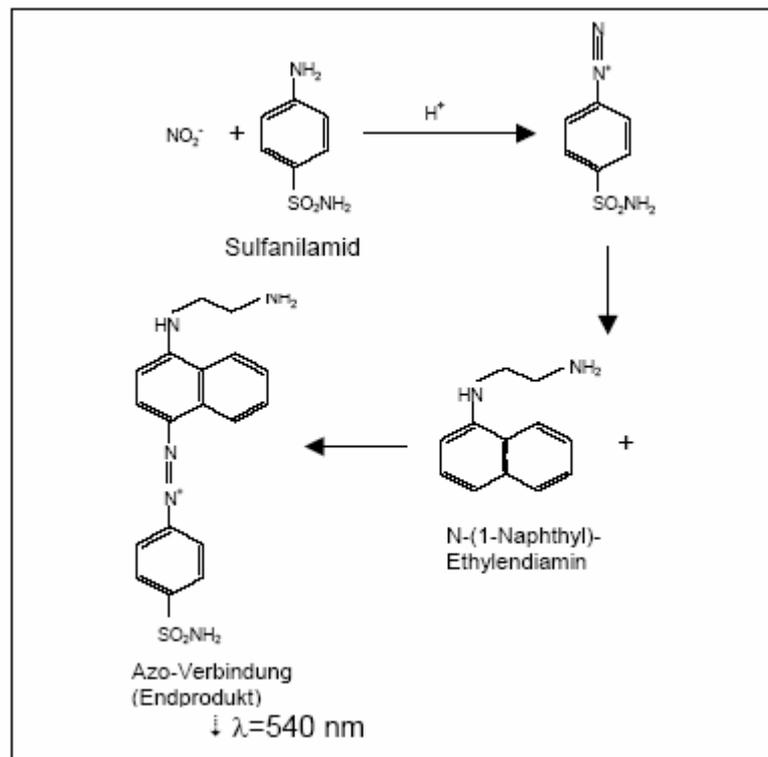
Zur Untersuchung des NO-Stoffwechselweges in Säugern wurden verschiedene Methoden verwendet. Unter Anwendung der Chemilumineszenzdetektion wurde eine reduktive Methode zur Messung von Nitrit und Nitrosothiolen in Plasma und Vollblut neu etabliert und validiert. Vergleichend wurde Nitrit im Plasma mittels der Fluss-Injektionsanalyse in Kombination mit der Griess-Reaktion gemessen. Die Konzentration des Nitrats, welche das Produkt von NO bzw. Nitrit mit Oxyhämoglobin bildet, wurde über das kolorimetrische Assay Kit bestimmt.

#### 2.1.1 Fluss-Injektionsanalyse (FIA)

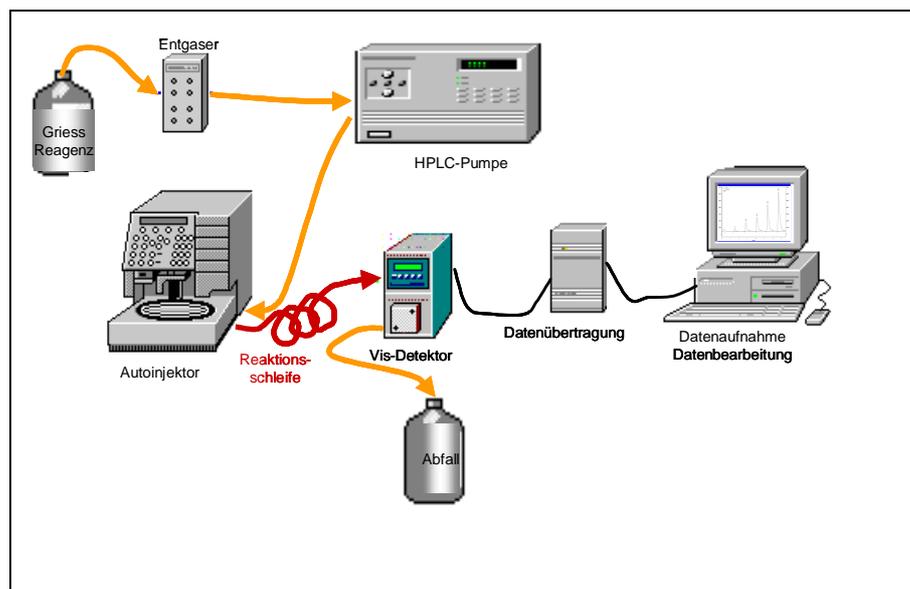
Mittels Fluss-Injektionsanalyse (FIA) kombiniert mit der Griess-Reaktion ist eine schnelle, sensitive und reproduzierbare Messung von Nitrit im Blutplasma möglich<sup>61</sup>. Das Prinzip beruht auf einer durchflussspektrophotometrischen Quantifizierung der Griess-Reaktion mit Nitrit (siehe Abbildung 2). Die Anlage besteht aus einem Entgaser (2-Kanal Degaser Populair, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland), einer HPLC-Pumpe (Sunflow 100, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland), einem Autoinjektor (Triathlon, Spark Holland, Niederlande) und einem UV/Vis-Detektor (Sykam, Deutschland). Die einzelnen Bestandteile sind durch Kapillaren aus Polyetheretherketon (PEEK) mit einem Durchmesser von 0,6 mm verbunden (siehe Abbildung 3). Die Daten werden auf einen Signalumwandler übertragen und mit Hilfe der Chromatographie-Software (ChromGate 2.55, Knauer, Berlin, Deutschland) aufgenommen und integriert.

Das Laufmittel der FIA besteht aus dem Griess-Reagenz. Zur Herstellung dieser Reaktionslösung werden gleiche Anteile des 58 mM in 1%iger Salzsäure (HCl) gelösten Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und des 0,77 mM in hochreinem HPLC-Wasser gelösten Naphtylen-ethylendiamin (Merck, Darmstadt, Deutschland) gemischt. Das Griess-Reagenz wird mit einem kontinuierlichen Fluss von 1 ml/min über einen Entgaser durch das System gepumpt. Je 10 µl der Proben werden mittels Autoinjektor in das System injiziert und mit der Reaktionslösung zum Detektor transportiert. Der in der Reaktionschleife stattgefundenen Farbumschlag wird in der Messzelle des UV/Vis-Detektors (6 mm, 9 µl, Kel-F, Linear-Instruments) bei einer Wellenlänge von 545 nm photometrisch bestimmt. Die gemessene Absorption wird über einen

Signalumwandler der Chromatographie-Software zugeleitet. Die Konzentration von Nitrit wird über die Peakhöhe bestimmt.

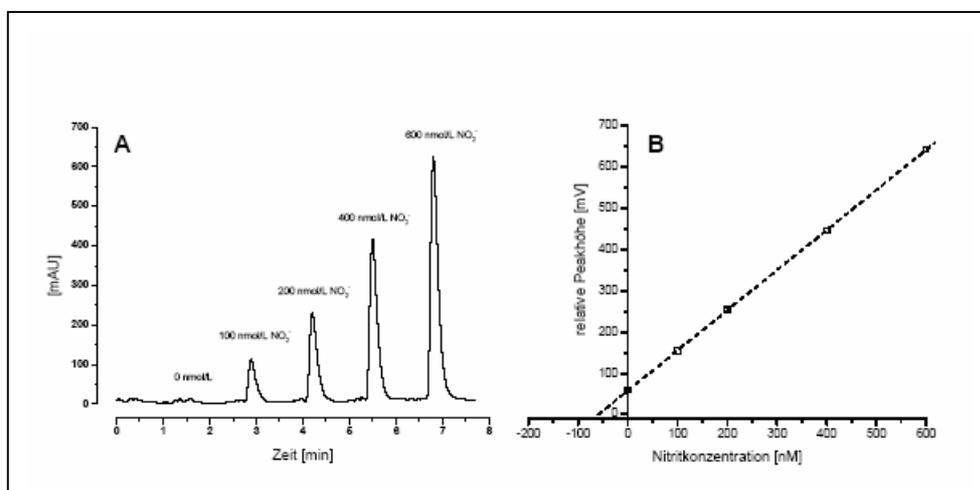


**Abbildung 2.** Reaktion von Nitrit mit den Komponenten des Griess-Reagens (Sulfanilamid und Naphtylenethyldiamin in 1%iger Salzsäure). Nitrit reagiert in Anwesenheit von Säure mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, das durch die Reaktion mit Naphthylethyldiamin eine Azo-Verbindung eingeht.



**Abbildung 3.** Aufbau der FIA zur Nitrit-Bestimmung.

Um die Beeinflussung des Probensignals durch unterschiedliches Probenmaterial zu vermeiden, erfolgt die Bestimmung der Nitritkonzentration mittels Standardadditionsverfahren<sup>61</sup>. Dazu wird eine Nitriteichreihe aufsteigender Konzentration durch entsprechende Verdünnung einer 1molaren Lösung hergestellt (Endkonzentration 0, 100, 200, 400, 600 nM). Jeweils 10  $\mu\text{l}$  dieser Eichreihe werden den 5 Aliquots von je 190  $\mu\text{l}$  des Ultrafiltrats zugefügt. Mittels der detektierten Peakhöhen kann die Regression ermittelt werden. Der Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse ( $y=0$ ) entspricht der Nitritkonzentration der aufgegebenen Probe (siehe Abbildung 4). Die Ausgangskonzentration wird durch die Korrektur des Verdünnungsfaktors (1:5 Verdünnung) und die Subtraktion der Leerwerte berechnet.



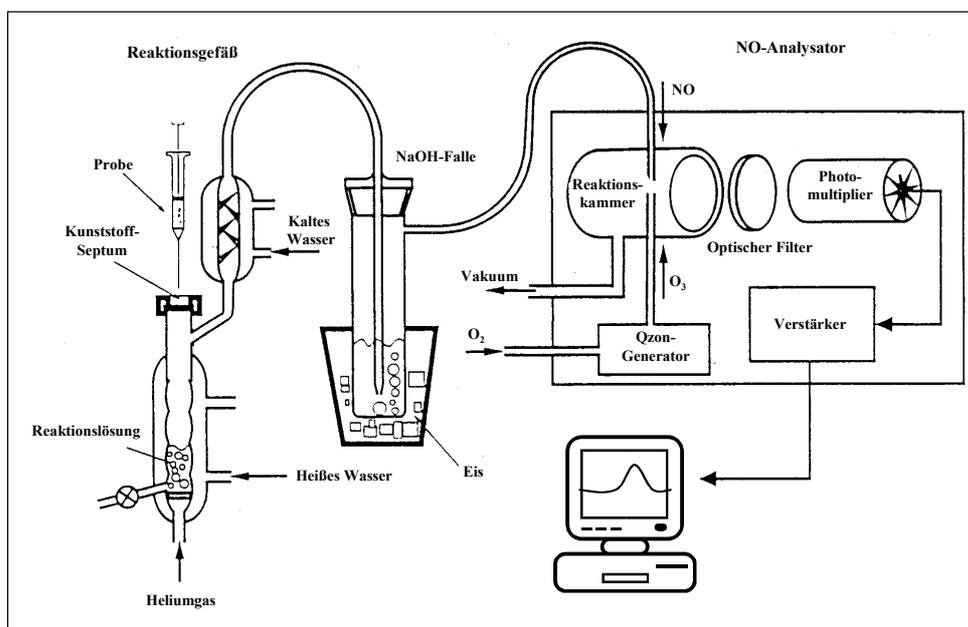
**Abbildung 4.** A. Originalchromatogramm eines Probenlaufs zur Bestimmung von Nitrit über die FIA. B. Die fünf durch den Integrator analysierten Peakhöhen dienen als Grundlage einer Regressionsgeraden. Bei Anwendung des Standardadditionsverfahrens ergibt der Schnittpunkt mit der X-Achse die Nitritkonzentration in der Probe.

### 2.1.2 Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD)

Mit der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD) kann NO in flüssigen und gasförmigen Proben bestimmt werden (siehe Abbildung 5). Sie gehört zu den Methoden mit der höchsten Sensitivität<sup>98</sup> und Spezifität<sup>99</sup> für NO. Durch die Entwicklung einer geeigneten Reaktionslösung sowie die Schaffung von geeigneten Reaktionsbedingungen kann aus Nitrit und Nitrosothiolen stöchiometrisch NO freigesetzt werden. Durch die Reaktion von NO mit Ozon werden Lichtquanten in stöchiometrischen Mengen freigesetzt. Die Methode beruht auf einer Messung dieser Lichtquanten durch die Chemilumineszenzdetektions-Anlage (Sievers, Boulder, CO, USA).

Die flüssige Probe wird je 3fach mittels einer gasdichten Glasspritze (Hamilton, Reno, NV, USA) durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionskammer (Radical Purger, Sievers, Boulder, CO, USA) injiziert. Diese enthält eine iodhaltige, reduktive Reaktionslösung zur Freisetzung von NO aus Nitrit und Nitrosothiolen (siehe 2.1.2.1). Durch den hohen Löslichkeitskoeffizienten ( $\sim 20$ ) geht NO rasch von der flüssigen in die gasförmige Phase über. Die Probe wird mit einem konstanten Systemdruck ( $\sim 0$  bar) von dem Inertgas Helium durchströmt. Helium erleichtert den Übergang von NO in die Gasphase<sup>100</sup>. Der Gasstrom durchströmt zum Schutz der Anlage ein 4°C kaltes Wasserbad und eine als Säurefalle dienende 1molare Natriumhydroxidlösung (NaOH). Im Anschluss erreicht das Gas die Reaktionskammer des NO-Analysators (Sievers NO-Analyser 280, Sievers Instruments Inc., Boulder, CO, USA). Dort findet die Messung von NO über die Photoreaktion statt<sup>99,101,102</sup>.

Die gewonnenen Daten werden einem Rechner zugeleitet. Die Größe des Signals wird als Fläche unter der Kurve bestimmt. Da sich die Höhe des Signals durch mehrere Faktoren ändern kann, gibt die Fläche die NO-Konzentration exakter wieder<sup>72</sup>. Zur Berechnung der Daten wird das Programm NoaWin32 (DeMeTec, Hannover, Deutschland) verwendet. Die Aufnahme findet mit einer Abtastrate von 5 Hz statt. Anschließend werden die Werte integriert und anhand einer externen Nitriteichreihe in aufsteigender Konzentration von 0, 100, 200, 400 und 600 nM ausgewertet.



**Abbildung 5.** Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Anlage. Die zu untersuchende Probe wird in ein Reaktionsgefäß injiziert. Durch die reduktive  $I_3^-$ -Lösung tritt NO in die Gasphase über und gelangt mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators. Die Datenaufnahme erfolgt mit dem angeschlossenen Rechner.

### 2.1.2.1 Reduktive Reaktionslösung

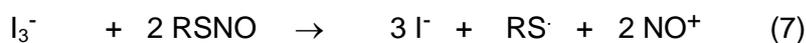
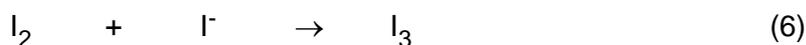
Zur Herstellung der reduktiven Reaktionslösung werden 45 mM Kaliumiodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 10 mM Iod ( $I_3$ ) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. 3,5-5,5 ml dieser sauren Iodide/Iodine-Lösung werden in die Reaktionskammer der CLD-Anlage injiziert und auf 95°C erhitzt. Anschließend werden 100-110  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe hinzugefügt. Durch die Reaktionslösung wird Nitrit zu äquimolaren Mengen NO reduziert. Zuerst kommt es zur Freisetzung von Nitrosiumionen ( $NO^+$ ) aus  $NO_2^-$  (Gleichung 3), anschließend reagieren diese  $NO^+$  mit Iodid ( $I^-$ ) zu NO (Gleichung 4 und 5).



Die freigesetzte NO-Menge, die aus der Summe von Nitrit und Nitrosothiolen besteht, wird im NO-Analysator der CLD mittels Photoreaktion gemessen.

### 2.1.2.2 Spezielle Probenaufarbeitung zur Differenzierung von Nitrit und Nitrosothiolen

Zur Bestimmung von Nitrosothiolen im Vollblut wurde eine besondere Probenaufarbeitung entwickelt. Die Probe muss hierzu in einer 1:10 Verdünnung mit 0,5%igem Sulfanilamid gelöst in 0,1 M HCl versetzt werden. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein sehr stabiles Diazoniumsalz, sodass Nitrit nicht weiter reduziert werden kann. Es konnte allein das aus Nitrosothiolen freigesetzte NO gemessen werden<sup>72</sup>. NO wird vermutlich über  $NO^+$  aus der Thiolbindung durch die Reaktionslösung aus  $I_2$  und  $I^-$  freigesetzt<sup>72</sup>.



### 2.1.3 Kolorimetrisches Assay Kit

Mit dem kommerziell erhältlichen, kolorimetrischen Assay Kit (Cayman Kit R, Alexis, Grünberg, Deutschland) wird die Summe (NOx) der Nitrit- und Nitratkonzentration mittels Griess-Reaktion bestimmt (siehe Abbildung 2).

Die Bearbeitung des Kits erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Zuerst wird Nitrat durch die Nitratreduktase zu Nitrit umgewandelt. Die Absorption des über die Griess-Reaktion entstandenen Azofarbstoffes wird mit einem

Plattenspektrophotometer (iEMS-Reader MF, Thermo Labsystems, Vantaa, Finnland) bei 545 nm gemessen. Nach Abzug der Blanks wird die NO<sub>x</sub>-Konzentration mit der Standardkurve errechnet. Zur Berechnung der Nitratkonzentration wird die durch FIA und CLD (siehe 2.1.1. und 2.1.2.) bestimmte Nitritkonzentration von der ermittelten NO<sub>x</sub>-Konzentration subtrahiert.

## 2.2 Herstellung von Standards wässriger NO-Lösung

Zur Untersuchung des Einflusses von NO auf die Aggregation von Erythrozyten wurde Vollblut mit definierten Konzentrationen exogenen NO inkubiert (siehe 2.4).

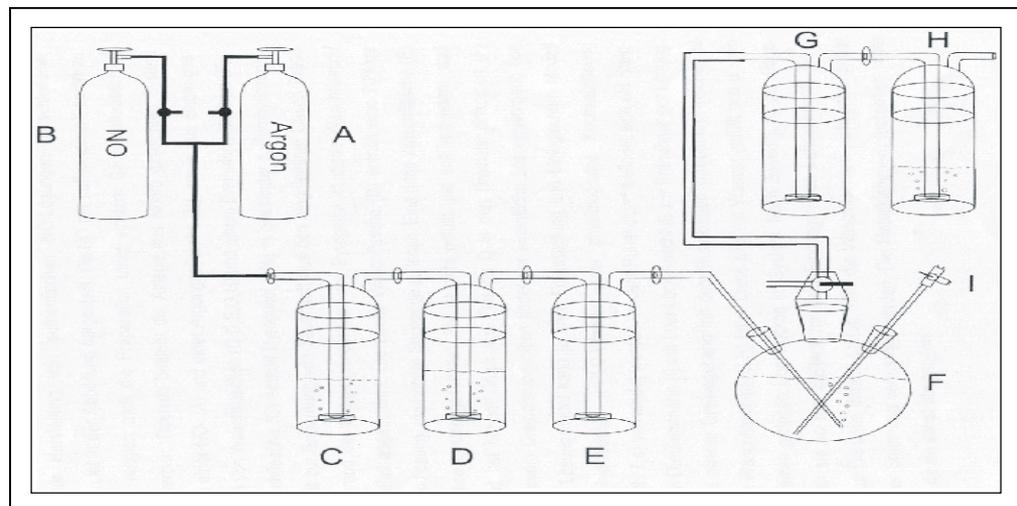
Die NO-Lösung wird in einer sauerstofffreien Atmosphäre hergestellt<sup>14</sup>. NO-Gas bildet bei Kontakt mit Luftsauerstoff Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>), das mit NO zu seinen toxischen Formen Distickstofftrioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und Distickstofftetraoxid (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) weiterreagiert. Das Einatmen dieses rotbräunlichen, nach Chlor riechenden Gases kann zu einem Lungenödem führen. Aus Sicherheitsgründen befindet sich die Anlage unter einem Abzug.

Die Anlage wird zu einem gasdichten System aus mehreren Waschflaschen und einem Dreihalsrundkolben aufgebaut (siehe Abbildung 6). Alle Glasgeräte werden vor dem Zusammenbau sorgfältig mit NaOH, anschließend mit hochreinem HPLC-Wasser und zuletzt mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Eine NO- und eine Argon-Flasche sind über Stahlkapillaren an die erste Waschflasche angeschlossen. In der ersten Waschflasche befindet sich 5%iges Pyrogallol (Merck, Darmstadt, Deutschland) in gesättigter Kaliumhydroxidlösung (KOH) (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Entfernung von Sauerstoff aus den durchströmenden Gasen Argon und NO. Die Flasche wird auf Grund der Lichtempfindlichkeit von Pyrogallol gegen Lichteinfall geschützt. Die zweite Waschflasche enthält eine 20%ige NaOH-Lösung, um höhere Stickoxide zu lösen. Eine dritte Waschflasche dient als Flüssigkeitsfalle und soll ein Übertreten von NaOH bei zu hohem Druck in den folgenden Dreihalsrundkolben verhindern. In diesem Kolben findet der eigentliche Lösungsvorgang von NO statt. Als Lösungsmittel dient physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, pH 7,4).

Das System wird zunächst für 45 min mit dem Edelgas Argon (99,998%; N3.0, Linde, Düsseldorf, Deutschland) begast, um den Sauerstoff aus dem System zu entfernen. Daran schließt sich eine 45minütige Begasung mit NO-Gas (99,5%; N3.0, Linde, Düsseldorf) an.

Die gesättigte NO-Lösung wird mittels einer zuvor mit Argon begasten, gasdichten Spritze über ein in den Rundkolben eingelassenes Steigrohr mit einem Dreiwegehahn mit Luer-Lock-Anschluß entnommen. Über einen zweiten Dreiwegehahn sind zwei weitere mit Wasser gefüllte Waschflaschen angeschlossen, die zum Aufbau eines leichten Überdrucks im System dienen. Zusätzlich schützen sie nach abgeschlossener Begasung vor dem Eindringen von Luftsauerstoff in das System.

Die NO-Konzentration der Lösung wird über die CLD gemessen. Sie schwankt zwischen 1,5-1,8 mmol/l. Die NO-Lösung wird maximal über 3 h gelagert.



**Abbildung 6.** Anlage zur Herstellung wässriger NO-Standards mit ausreichender Stabilität, Sterilität und Reproduzierbarkeit. A: Argon; B: NO; C: Pyrogallol; D: NaOH; E: Überlaufschutz; F: Dreihalsrundkolben; G, H: Wasserfallen; I: gasdichtes Steigrohr

### 2.3 Hämoglobinkonzentrationsbestimmung

Der Hämoglobingehalt einer Probe wird durch die Messung des Absorptionsmaximums für Hämoglobin bei 415 nm mit dem Spektrophotometer (Beckmann, USA) bestimmt. Die Hämoglobinkonzentration wird mit dem Lambert'schen Gesetz berechnet. Zum Versuchsaufbau siehe 2.5.3.

### 2.4 Bestimmung der Erythrozytenaggregation

Zur Bestimmung der Aggregation von Erythrozyten wurde das Aggregometer der Firma Myrenne, Roetgen benutzt<sup>103</sup>. Aufgegeben wurden je 10 µl einer Vollblutprobe, die zuvor mit ansteigenden Konzentrationen der authentischen NO-Lösung inkubiert wurde.

Als Referenzwert für die eingestrahlte Lichtintensität dient der Leerwert bei nicht gefüllter Kammer. Die Probe wird daraufhin in die transparente Platte-Kegel-Kammer gefüllt. Diese Messkammer wird ringförmig mit Licht im Infrarotbereich durchstrahlt. Nach dem Durchmischen bei konstantem Schergrad wird die nach Anhalten der Plattendrehung stattfindende Bildung der Erythrozytenaggregate gemessen. Durch diese Aggregation nimmt die Zahl der lichtbrechenden Flächen ab. Die Intensität des Lichtsignals wird somit verringert. Durch die Registrierung des transmittierten Lichtes wird ein Syllektogramm erstellt. Als Messwert wird die Fläche unter der Syllektogrammkurve innerhalb eines, an den Beginn der Aggregationsphase anschließenden Zeitintervalls von 10 sek durch elektronische Integration bestimmt<sup>103</sup>.

## 2.5 Blutentnahme und Probenaufarbeitung

### 2.5.1 Charakterisierung der Studienpopulationen

Versuchspersonen: Vollblut wurde Versuchspersonen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren mit einem mittleren Gewicht von 69 kg entnommen. Diese wiesen eine normale Endothelfunktion und keinerlei kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Nikotinabusus auf. Für die Gegenüberstellung der Nitritkonzentration im Blut von Normotonikern und Hypertonikern stellte sich neben den oben erwähnten Versuchspersonen eine Subpopulation von hypertonen Patienten (systolischer Blutdruck > 140 mmHg; diastolischer Blutdruck > 90 mmHg) der kardiologischen Station der Universität Düsseldorf zur Verfügung.

Nitrit in Säugern: Zur Bestimmung der basalen Nitritkonzentration in verschiedenen Säugetieren wurden 7 Kaninchen (New Zealand White) und 19 eNOS Wildtypmäuse (C57BL6) verwendet.

Erythropoetin überexprimierende Mäuse: Blut und Urin wurde von 25 Wildtypen (WT-Mäuse, B6C3F1) und von 25 Erythropoetin überexprimierenden Mäusen (EPO-Mäuse, genetischer Hintergrund B6C3F1) verwendet. Die Tiere waren im Mittel 4-10 Monate alt und wogen 20-35 g. Die Expression der humanen Epo c DNA in den transgenen, heterozygoten Mäusen wurde durch humane Wachstumsfaktoren (PDGF, platelet driven growth factor), das in Thrombozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet wird, gefördert. Es kam zu einer Überexpression für humanes EPO<sup>97</sup>. Die transgenen Tiere zeigten auf das 2-fache erhöhte Werte für Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit gegenüber den nicht transgenen Tieren. In den durchgeführten Experimenten wurde der Einfluss des vom Endothel gebildeten NO auf den

Nitrit- und Nitratgehalt in Blut und Urin der polyglobulären, transgenen EPO-Mäuse untersucht.

### 2.5.2 Probengewinnung

Menschen: Den nüchternen Probanden wurde ungestautes Blut aus der Vena mediana cubiti über eine Butterfly-Nadel (0,6 mm Innendurchmesser) entnommen. Verwendet wurden 5 ml Spritzen, wobei die ersten 5 ml verworfen wurden. Das entnommene Blut wurde sofort in 50 ml PE-Plastikgefäße mit Heparin (50 I.E./ml Blut) überführt und anschließend durch vorsichtiges Schwenken gemischt.

Kaninchen: Die Kaninchen wurden einzeln in Edelstahlkäfigen auf Lochgittern unter konstanten Umgebungsbedingungen (siehe EPO-Mäuse) gehalten. Den Kaninchen wurde Blut mittels einer Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,9 mm aus der Ohrarterie entnommen und mit Heparin (50 I.E./ml Blut) gemischt.

EPO-Mäuse: Die EPO-Mäuse und ihre Wildtypen wurden über einen Zeitraum von 2 Wochen unter konstanten Bedingungen gehalten und bekamen ausschließlich nitrit- und nitratreduziertes Futter (Altromin) und demineralisiertes Wasser ad libitum. Die Umgebungstemperatur betrug 18-20°, die relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5\%$ , der Tag Nacht-Rhythmus von 12 h wurde durch Kunstlicht aufrechterhalten. Nach der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere in Stoffwechsellkäfige (FMI, Seeheim / Ober Beerbach, Deutschland) überführt. Die genaue Flüssigkeitseinfuhr und -ausfuhr wurde bilanziert und der Urin für die Nitrit- und Nitratmessung über je 24 Stunden aufgefangen.

Nach weiteren 2 Wochen wurde eine Herzpunktion zur Blutgewinnung durchgeführt. Die Versuchstiere wurden mit 1000 I.E. Heparin subcutan heparinisiert. Die Anästhesie wurde mit Diethylether eingeleitet und bis zur vollständigen Muskelrelaxierung durchgeführt. Die Mäuse wurden auf dem Versuchstisch an den Extremitäten fixiert und über die Versuchsdauer weiterhin mit Ether narkotisiert. Die Eröffnung des Thorax erfolgte über einen Oberbauchquerschnitt und anschließender Durchtrennung des Zwerchfells entlang des Rippenbogens. Die Rippen wurden lateral durchgeschnitten. Zuerst wurde die rechte und nachfolgend die linke Herzkammer mit einer Kanüle von einem Innendurchmesser von 0,6 mm bei den EPO-Mäusen bzw. von 0,5 mm bei den WT-Mäusen punktiert und das Blut langsam mit 1 ml-Insulin-Spritzen aspiriert. Durchschnittlich konnte ein Volumen von 500 µl gewonnen werden.

### 2.5.3 Probenaufarbeitung

Um die Nitrit- und Nitratkontamination bei allen verwendeten Materialien so gering wie möglich zu halten, wurden alle verwendeten Gefäße vor Benutzung mit destilliertem Wasser gespült und die Kontaktzeit der Proben mit Luft so gering wie möglich gehalten<sup>61</sup>.

Bestimmung der NO-Metabolite im Blut: Zur Nitritbestimmung über die CLD (siehe 2.1.2.) wurde das heparinisierte Vollblut im Verhältnis 1:5 mit einer bei 4°C gekühlten 5 mM N-Ethylmaleimide-Lösung (NEM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) verdünnt. NEM alkylt Sulfhydrylgruppen von Thiolen und verhindert den Abbau von Nitrosothiolen über Transnitrosierungsreaktionen<sup>72,104</sup>. Für die Bestimmung von Nitrit mittels FIA (siehe 2.1.1.) sowie von Nitrat über das kolorimetrische Assay Kit (siehe 2.1.3.) wurde eine 1:5 Verdünnung mit 0,9%igem NaCl verwendet. Bis zur Analyse wurden die Proben für maximal eine Stunde lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die folgenden Bestimmungen der NO-Metabolite wurden jeweils alle aus einer Probe durchgeführt.

Nitritkonzentration im Vollblut: Je zwei Aliquots von 1000 µl der verdünnten Vollblutproben wurden für die Bestimmung der Nitrit- und Nitrosothiolkonzentration über die CLD (siehe 2.1.2.) entnommen. Zur Bestimmung der Nitrosothiolkonzentration wurden die Proben zusätzlich vor der Messung mit 5%igem Sulfanilamid in 0,1 M HCl-Lösung in einer 1: 10 Verdünnung versetzt.

Nitritkonzentration im Plasma: Die verbliebenen Proben wurden 15 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert. Um eine Vermischung der Zellbestandteile mit dem Plasma zu vermeiden, wurde die Zentrifugation mit auslaufendem Rotor beendet. Der Überstand wurde abpipettiert. Für die Bestimmung über die FIA (siehe 2.1.1) wurde der Überstand bei 1800 g und 4°C in Ultrafiltrationsröhrchen zentrifugiert. Für die Messung mittels CLD (siehe 2.1.2) wurde ein Aliquot von 1000 µl des Überstandes ohne Sulfanilamid und weitere 1000 µl mit Sulfanilamid zur Nitrit- und Nitrosothiolbestimmung verwendet.

Nitratkonzentration in den Erythrozyten: Die sedimentierten Erythrozyten wurden abpipettiert und 1:10 mit Aqua iniectionabilia verdünnt. Die hämolysierten Erythrozyten wurden bei 1800 g und 4°C in Ultrafiltrationsröhrchen (Cut-off 20 kDa; Cellulosetriacetat-Filter, Centricon, Millipore, USA) zentrifugiert. Lediglich im hämoglobinfreien Überstand wurde die Nitratkonzentration mit dem kolorimetrischen Assay Kit gemessen (siehe 2.1.3). Der Hämolysegrad wurde nach einer 1:10 Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung mittels Spektrophotometer (siehe 2.3) bestimmt.

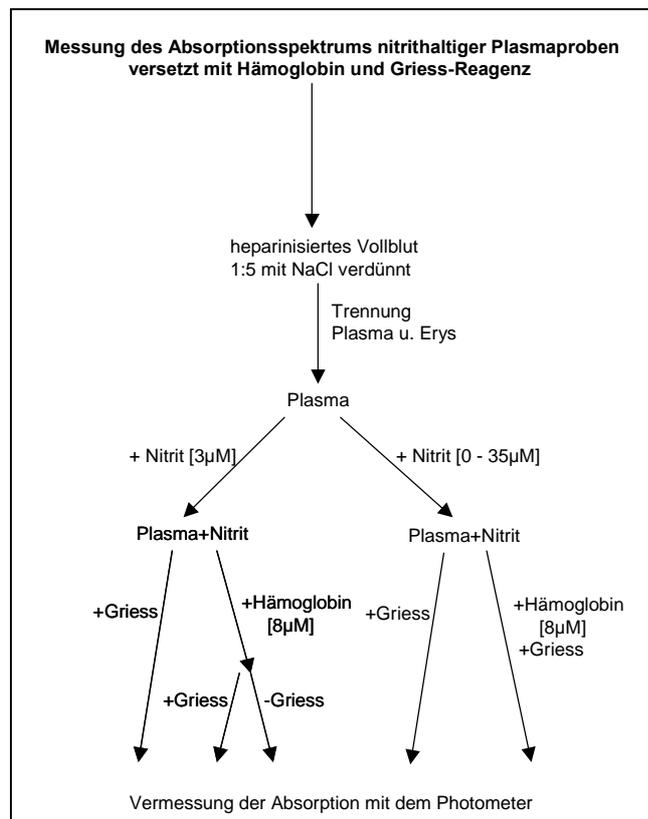
Nitratkonzentration im Plasma: Zur sensitiven und interaktionsfreien Nitratbestimmung wurde der restliche Plasmaüberstand auf Ultrafiltrationsröhrchen (Cut-off 20 kDa; Cellulosetriacetat-Filter, Centricon, Millipore, USA) verteilt und nochmals bei 1800 g und 4°C für 60 min zentrifugiert. Das entstandene Ultrafiltrat wurde zur Nitratbestimmung mittels kolorimetrischen Assay (siehe 2.1.3) verwendet. Auch hier wurde nach einer 1:10 Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung der Grad der Hämolyse über das Spektrophotometer (siehe 2.3) bestimmt.

Die Blutbildbestimmung erfolgte aus je 100µl der unverdünnten Vollblutproben (Coulter Micro Diff II, Beckmann, USA).

Bestimmung der NO-Metabolite im Urin: Die Urinproben wurden 1:10 mit NaCl verdünnt und anschließend bei 1800 g und 4°C ultrafiltriert (Cut-off 20 kDa; Celluloseacetat-Filter; Centriscat, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Der Überstand wurde abpipettiert und das Ultrafiltrat zur Analyse verwendet. Nitrit wurde über die FIA (siehe 2.1.1.) und Nitrat über ein kolorimetrisches Assay Kit (siehe 2.1.3.) bestimmt.

Hämoglobinkonzentrationsbestimmung: Zur Untersuchung der Interaktion zwischen dem Griess-Reagenz und Hämoglobin gab es zwei Versuchsmodelle. Im ersten Ansatz wurde Blutplasma mit einer definierten Menge Nitrit [3 µM] versetzt. Anschließend wurde zur Probe Griess-Reagenz, Hämoglobin [8 µM] oder Griess-Reagenz und Hämoglobin hinzugegeben. Das Absorptionsspektrum wurde mit dem Spektrophotometer gemessen (siehe 2.3). Im zweiten Versuchsaufbau wurde Plasma Nitrit in aufsteigender Konzentration hinzugefügt [0-35 µM], worauf die Absorption der Proben bei 545 nm nach Zugabe von Griess-Reagenz bzw. von Griess-Reagenz und Hämoglobin [8 µM] bestimmt wurden (siehe Abbildung 7).

Testung der Ultrafiltrationsröhrchen: Zur Minimierung des Hämoglobingehaltes in Plasmaproben wurden verschiedene Ultrafiltrationsröhrchen getestet. Vor Gebrauch wurden einige Röhrchen mit PBS oder HPLC-Wasser gespült. Gewaschene Erythrozyten wurden in einer Verdünnung von 1:1000 mit Aqua iniectionabilia hämolytisiert. Die Proben wurden mit 800 g zentrifugiert. Der Grad der Hämolyse wurde über das Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 415 nm bestimmt (siehe 2.3).



**Abbildung 7.** Versuchsaufbau zur Nitritbestimmung über die Griess-Reaktion in Abhängigkeit der Hämoglobinkonzentration.

## 2.6 Mathematisch-statistische Methoden

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE) angegeben. Bei direktem Gruppenvergleich wurde der Student's t-Test von ungepaarten Daten durchgeführt. Als statistisch relevant galt ein p-Wert  $\leq$  0,05. Zur Analyse diente das Computerprogramm SPSS® 11.0 für Windows (Chicago Ill., USA).

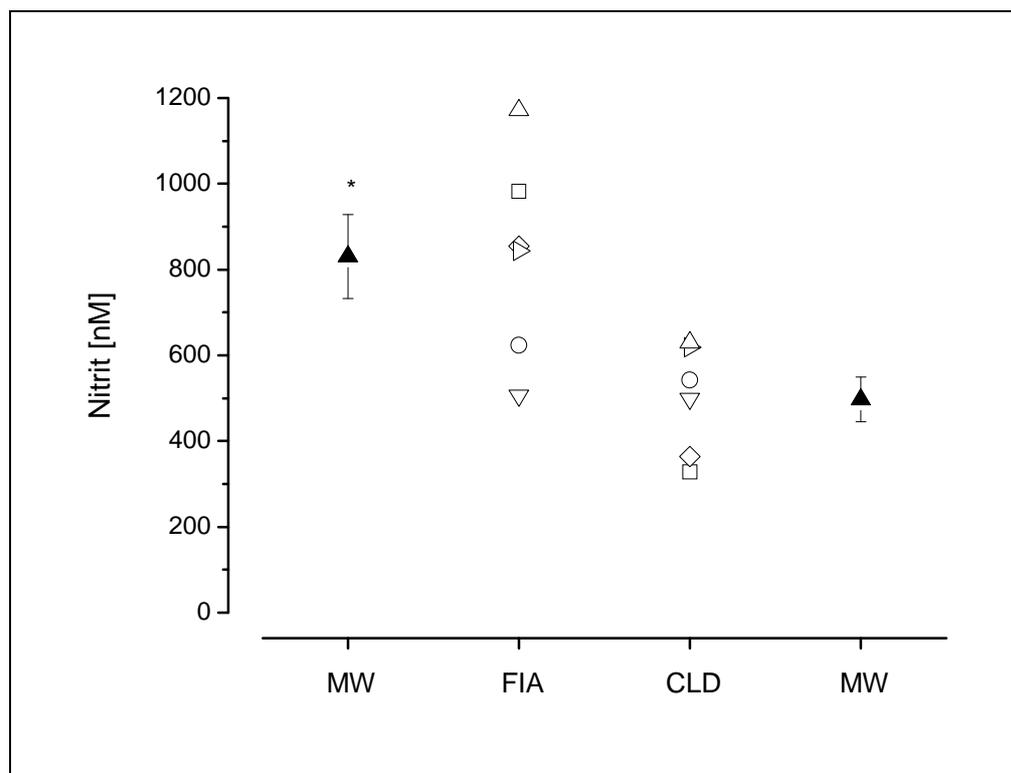
Die graphische Darstellung der Daten und die lineare Regression, insbesondere zur Erstellung der Eichgeraden der Nitrit- bzw. Nitratstandards, wurde mit Hilfe des Computerprogramms MicroCal Origin® (Version 7.0, MicroCal Software Inc., Northampton, MA, USA) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Interaktion des Griess-Reagenz mit Hämoglobin

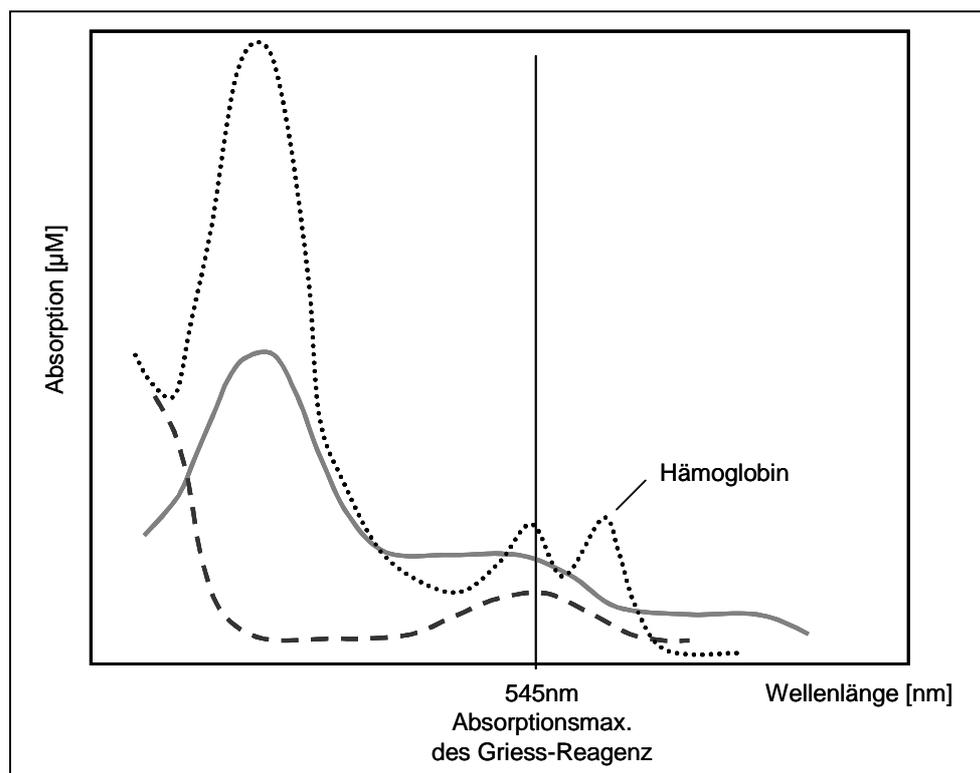
Bei der Untersuchung von Blutproben spielt ein potentiell möglicher durch Hämolyse auftretender Hämoglobingehalt im Plasma eine große Rolle (siehe 1.3). Für die Nitritbestimmung über die FIA wird Griess-Reagenz als Laufmittel verwendet und der Farbumschlag bei einer Wellenlänge von 545 nm detektiert (siehe 2.1.1). Hämoglobin hat ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 545 nm. Auch das Prinzip des Nitrat-nitrit-kolorimetrischen Assay Kit beruht auf der Griess-Reaktion (siehe 2.1.3).

Bei der parallelen Messung der Plasmanitritkonzentration im Blut der EPO-Mäuse (siehe 3.4) über FIA und CLD fiel eine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Konzentrationen auf. Der über die FIA gemessene Mittelwert der Nitritkonzentration ist um das 1,7fache gegenüber dem über die CLD gemessenen Mittelwert erhöht (siehe Abbildung 8).



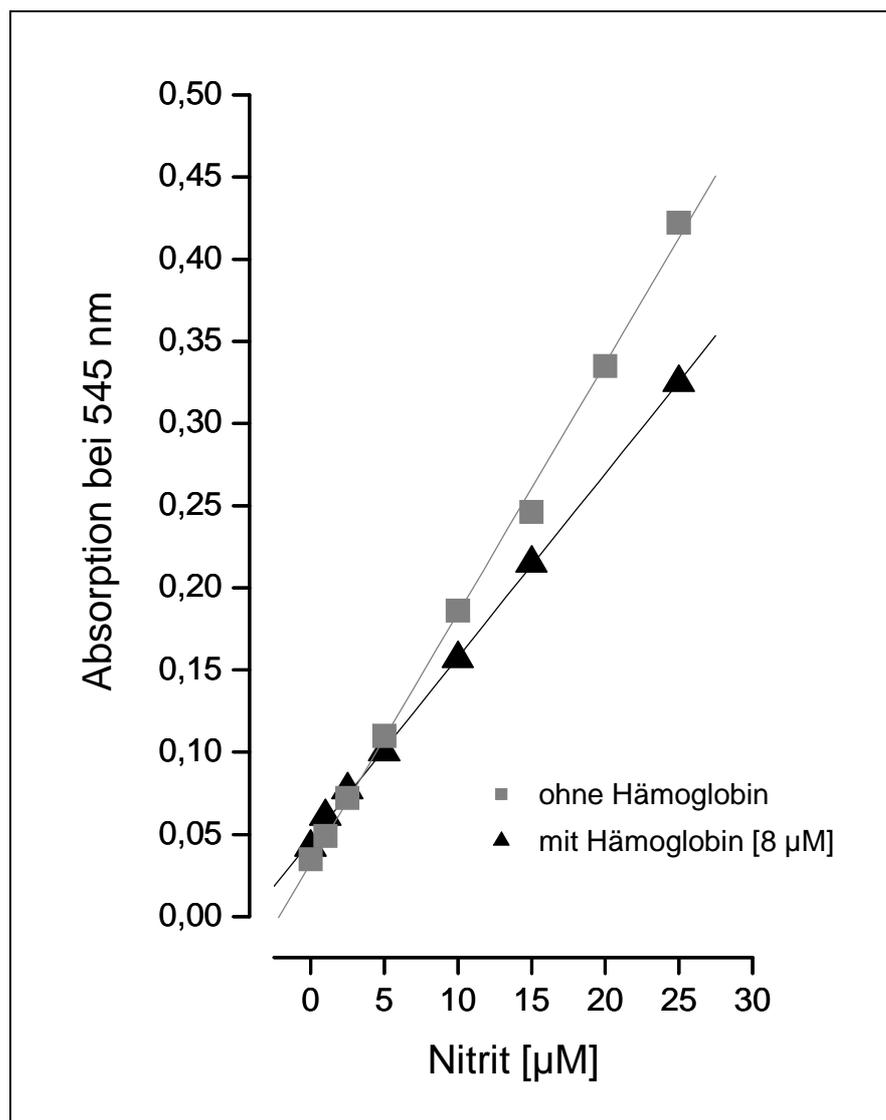
**Abbildung 8.** Nitritkonzentrationen im Plasma von EPO-Mäusen gemessen über FIA und CLD (n=6). Es wird eine signifikante Erhöhung der über die FIA gemessenen Nitritkonzentrationen (MW 830,37 nmol/l) gegenüber der CLD (MW 497,15 nmol/l) deutlich (\* = p<0,05).

Zur Ursachenklärung dieser differierenden Konzentrationen wurde in den weiteren Versuchen humanes Plasma verwendet (Versuchsaufbau siehe 2.5.3). Versetzt man eine nitrithaltige Plasmaprobe mit Griess-Reagenz kann bei 545 nm das typische Absorptionsmaximum mittels Spektrophotometer vermessen werden. Gibt man zusätzlich Hämoglobin hinzu, verschiebt sich die Peakhöhe in einen falsch positiven Bereich, da ein typisches Absorptionsmaximum von Hämoglobin im Bereich von 545 nm liegt (siehe Abbildung 9) und es zu Überlagerungen der Maxima kommt.



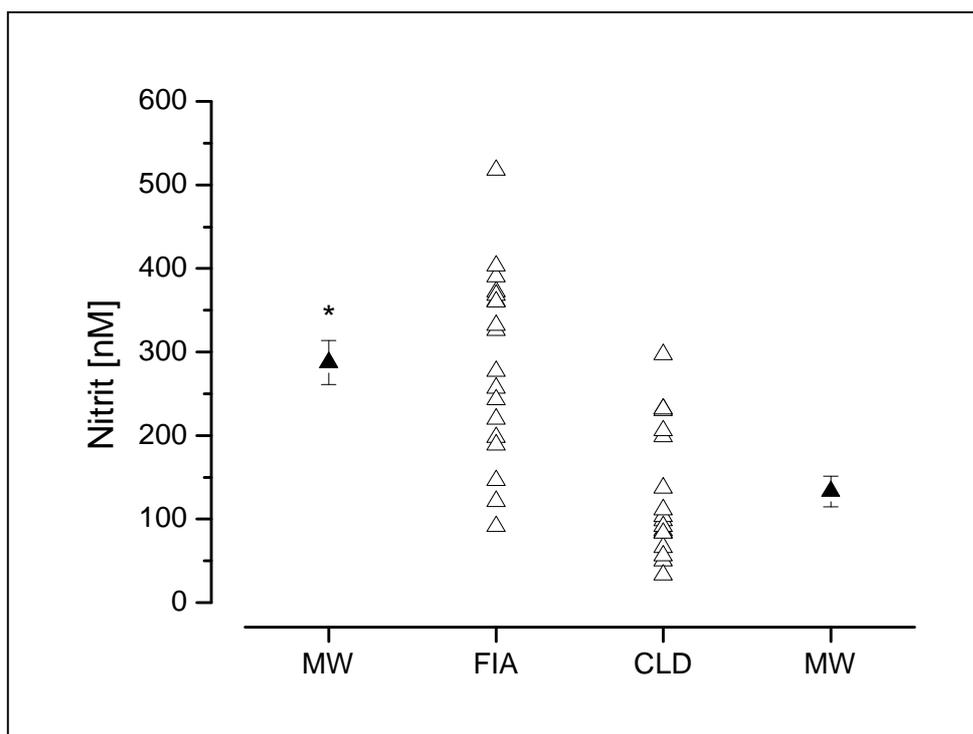
**Abbildung 9.** Absorptionsspektren von Plasmaproben versetzt A mit Hämoglobin und  $\text{NO}_2^-$  (.....), B mit Hämoglobin,  $\text{NO}_2^-$  und Griess-Reagenz (—) sowie C mit  $\text{NO}_2^-$  und Griess-Reagenz (— —). Nitrit wurde in einer Konzentration von  $3 \mu\text{M}$  und Hämoglobin von  $8 \mu\text{M}$  hinzugegeben. Für Hämoglobin und Griess-Reagenz liegt ein Absorptionsmaximum bei  $545 \text{ nm}$ , sodass bei der Detektion von Nitrit über die Griess-Reaktion die Nitritkonzentrationsbestimmung durch die Hämoglobinverunreinigung der Probe beeinflusst wird.

Die gemessene Absorptionsstärke wurde in Abhängigkeit der Nitritkonzentration in Plasmaproben mit und ohne Hämoglobinverunreinigung gemessen (siehe Abbildung 10, Probenaufarbeitung siehe 2.5.3). Im physiologischen Bereich für Plasmanitrit ( $< 5 \mu\text{M}$ ) kommt es zu einer erhöhten Absorption bei 545 nm. Dies resultiert in einer falsch positiven Bestimmung der Nitritkonzentration. Ab einer Nitritkonzentration von  $5 \mu\text{M}$  kehrt sich das Verhältnis um, und es werden erniedrigte Konzentrationen gemessen.



**Abbildung 10.** Hämoglobin-Griess-Interaktion: Vermessen wurden die Absorption bei 545 nm von proteinhaltigen Proben mit und ohne Hämoglobinverunreinigung ( $\pm 8 \mu\text{M}$ ).

Hämoglobinfreies Plasma wurde exogen mit Hämoglobin versetzt, um den Effekt von Hämoglobin auf die Bestimmung der Nitritkonzentration über die FIA zu analysieren. Als Referenzmethode wurde die CLD verwendet. Die über die FIA bestimmten Konzentrationen sind um das 2,2fache erhöht (siehe Abbildung 11). Zum Ausschluss einer möglichen Interaktion zwischen Hämoglobin und CLD wurden hämoglobinfreie und mit Hämoglobin versetzte Plasmaproben über die CLD bestimmt (n=10). Es wurde kein signifikanter Unterschied gemessen (nicht abgebildet).



**Abbildung 11.** Hämoglobinverunreinigte Proben gemessen über FIA und CLD. Plasmaproben wurde mit 0,6  $\mu$ M Hämoglobin versetzt und die Nitritkonzentration bestimmt (n=18). Die mit der FIA gemessenen Konzentrationen sind mit 116% signifikant gegenüber den durch die CLD gemessenen Konzentrationen erhöht (\* =  $p < 0,05$ ).

### 3.1.1 Optimierung einer hämoglobinfreien Probenaufarbeitung

Zur Messung proteinhaltiger Proben via Griess-Reaktion müssen die Proben zunächst deproteinisiert werden. Bei der Deproteinisierung sollte nach der im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Hämoglobin-Griess-Interaktion nicht nur eine Nitritkontamination sondern ebenfalls eine Hämoglobinverunreinigung ausgeschlossen werden. Hierzu wurden verschiedene Ultrafiltrationsröhrchen getestet.

Tabelle 1. Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Ultrafiltrat verschiedener Ultrafiltrationsröhrchen. Aufgeführt sind die Mittelwerte von Vierfachbestimmungen.

	Vorbereitung	Hb-Konzentration	Reduktion der Hb-Konzentration
<b>Hämolyt vor Zentrifugation</b>		1,7799 $\mu\text{M}$	
<b>Vivaspin Cut-off 30 kDa (VS 2021)</b>	Ohne Waschen	0,2191 $\mu\text{M}$	87,7%
<b>Vivaspin Cut-off 30 kDa (VS 2021)</b>	Waschen mit PBS	0,1301 $\mu\text{M}$	92,7%
<b>Centrisat Cut-off 10 kDa (Sartorius)</b>	Waschen mit PBS	0,2690 $\mu\text{M}$	86,9%
<b>Centrisat Cut-off 10 kDa (Sartorius)</b>	Waschen mit HPLC-Wasser	0,1465 $\mu\text{M}$	91,8%
<b>Centricon Cut-off 10 kDa (Milipore)</b>	Waschen mit PBS	-0,0076 $\mu\text{M}$	100%
<b>Centricon Cut-off 10 kDa (Milipore)</b>	Waschen mit HPLC-Wasser	-0,0045 $\mu\text{M}$	100%

Im Vergleich zeigte sich nach Ultrafiltration des Hämolytates mittels Centricon Ultrafiltrationsröhrchen von 10 kDa eine Reduktion der Hämoglobinkonzentration der Probe um 100%, während z.B. die Zentrifugation mit Vivaspin Cut-off 30 kDa nur eine Verminderung um 87,7% zeigte.

Für die weitere Probenaufarbeitung wurden Centricon Ultrafiltrationsröhrchen mit einem Cut-off von 10 kDa verwendet. Zuvor wurden die Röhrchen zur Minimierung der Nitritkontamination mit HPLC-Wasser gespült. Die aus regenerierter Zellulose bestehende Membran darf nach dem Waschen nicht austrocknen.

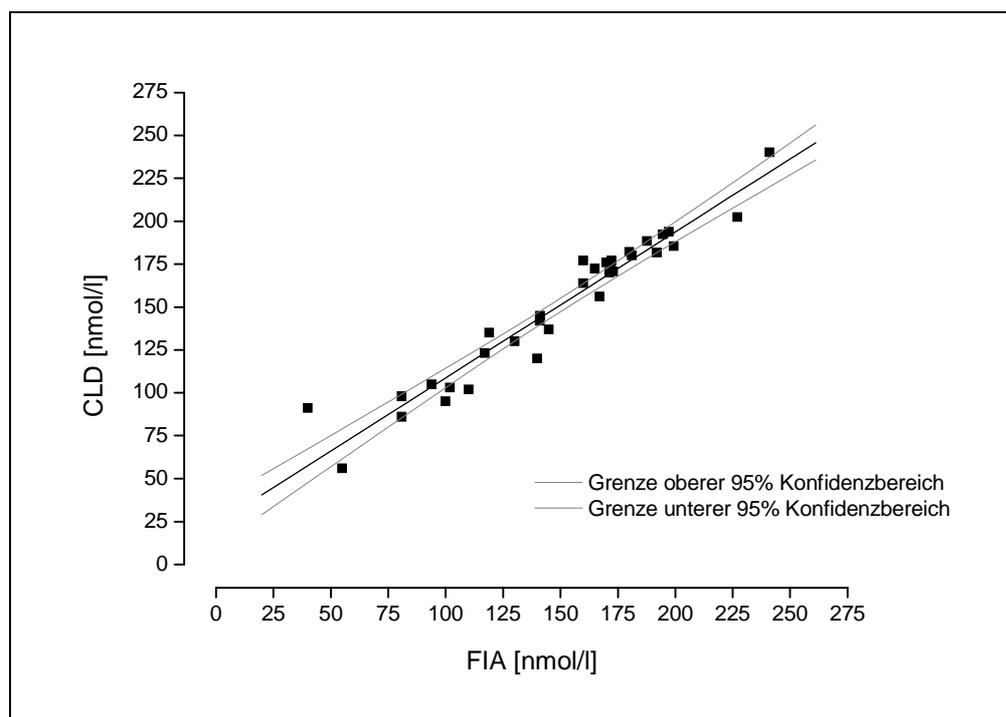
### 3.2 Validierung der Gasphasen-Chemilumineszenz-Methode zur Nitritbestimmung

Mittels der speziell entwickelten Probenaufarbeitung, der reduktiven Reaktionslösung und der CLD (siehe 2.1.2) war es möglich aus Nitrit und Nitrosothiolen stöchiometrisch NO in die Gasphase zu überführen und somit indirekt zu messen.

### 3.2.1 Validierung der Nitritmessung in wässrigen und proteinhaltigen Proben via CLD und FIA

Die neu zu etablierende Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der bereits etablierten FIA verglichen. Im Wässrigen korrelieren die gemessenen Nitritkonzentrationen der Eichreihen von 0 bis 200 nm und bilden eine Regressionsgerade ( $r=0,96$ ,  $p<0,0001$ ). Der Variationskoeffizient für Konzentrationen über 100 nm beträgt 3% bei Dreifachbestimmungen.

Die Nitritkonzentration im Plasma der Versuchspersonen wurde parallel über CLD und FIA gemessen ( $n=33$ ). Unter Anwendung der hier etablierten Probenaufarbeitung liegen die über die CLD gemessenen Konzentrationen in einem engeren Messbereich (MIN 56 nmol/l, MAX 240 nmol/l) als die der FIA (MIN 40 nmol/l, MAX 241 nmol/l). Die Mittelwerte der Messungen stimmen überein (MW CLD 150,1 nmol/l, MW FIA 148,67 nmol/l). Die Nitritmessung in plasmatischen Proben zeigt einen linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r=0,96$  (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12.** Nitritbestimmung über CLD und FIA in proteinhaltigen Proben. Aufgetragen sind die Einzelwerte der Nitritkonzentrationen die über CLD und FIA gemessen wurden ( $r=0,96$ ,  $p<0,0001$ ). Das 95% Konfidenzintervall zeigt nur einen schmalen Bereich, in dem die wahren Messwerte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegen.

### 3.2.2 Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Linearität bei der Nitritbestimmung

Die CLD zeigt eine höhere Spezifität zur Bestimmung von NO-Metaboliten als die hier verglichenen analytischen Methoden. Verglichen wurden die FIA und das kommerziell erhältliche kolorimetrische Assay Kit. Die Reaktionen der FIA und des kolorimetrisches Assay Kit laufen über die Griess-Reaktion ab. Verschiedene Interaktionen des Griess-Reagenz v.a. mit Hämoglobin sind bekannt und wurden in der vorliegenden Arbeit beschrieben (siehe 3.1).

Das kolorimetrische Assay Kit erreicht nur eine Sensitivität von 250 nmol/l und eine Linearität von 250 bis 80.000 nmol/l, während die CLD eine Sensitivität von 1 nmol/l und eine Linearität von 2 bis 100.000 nmol/l erreicht. Der Variationskoeffizient liegt zwischen 3 und 6%. Für eine Dreifachbestimmung einer Probe über die CLD ist ein geringes Probenvolumen von 100 µl notwendig. Das Volumen zur Bestimmung mittels FIA liegt mit 1000 µl um ein 10faches höher. Die Analysezeit der CLD beträgt 1 h/Probe.

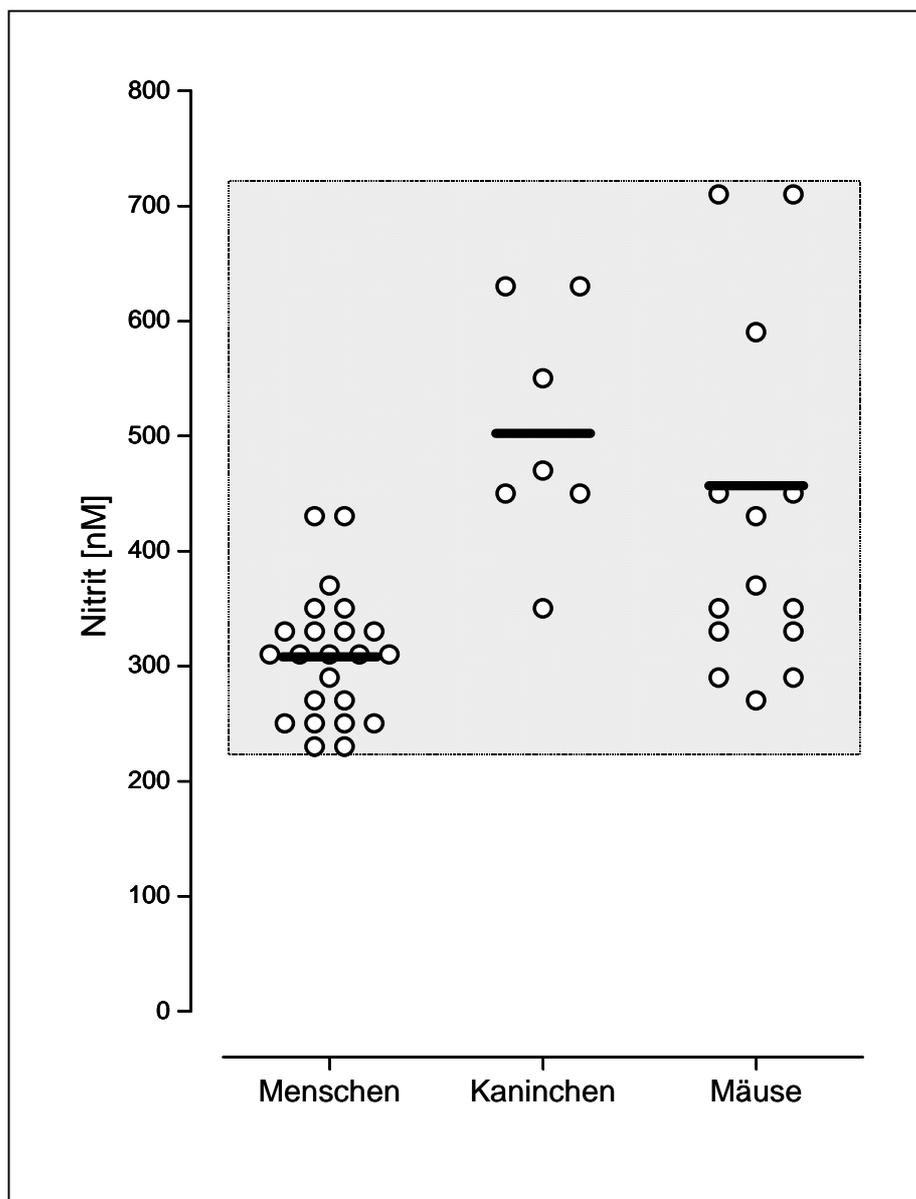
Weitere Eigenschaften der Messmethoden sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Charakteristika von CLD, FIA und kolorimetrischem Assay Kit bei der Nitritbestimmung.

	<b>CLD</b> Chemilumineszenz- detektion	<b>FIA</b> Fluss- Injektionsanalyse	<b>Kolorimetrisches Assay Kit</b>
<b>Reaktion</b>	reduktive äquimolare NO-Freisetzung	Griess-Reaktion	Griess-Reaktion
<b>Sensitivität</b> (nmol/l)	1	10	250
<b>Variationskoeffizient</b> (%) >100 nM <100 nM	3 6	5 10	5 nicht messbar
<b>Wiederfindungsrate</b> (%)	100±5	100±10	100±10
<b>Linearität</b> (nmol/l)	2-100.000	10-40.000	250-80.000
<b>Probenvolumen</b> Einfachbestimmung (µl)	100	1000	80
<b>Analysezeit pro Probe</b> Dreifachbestimmung (h)	1	0,5	0,1

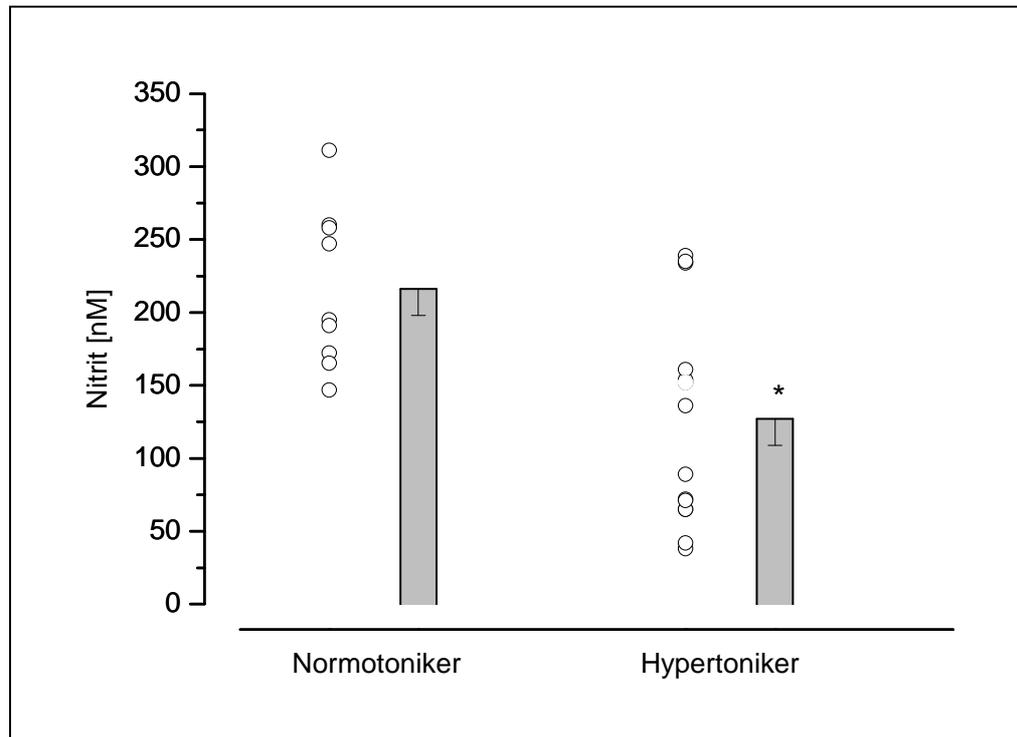
### 3.3 Nitrit in Säugern

Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit beschriebenen Probengewinnung und Probenaufarbeitung zum Ausschluss einer Hämoglobinkontamination konnte gezeigt werden, dass die physiologischen Nitritkonzentrationen im Plasma von Säugetieren in einem nanomolaren Bereich von 200 bis 800 nmol/l liegen (siehe Abbildung 13): Menschen ( $305 \pm 23$  nmol/l), Kaninchen ( $502 \pm 21$  nmol/l) und Mäuse ( $457 \pm 51$  nmol/l).



**Abbildung 13.** Plasmanitritbestimmung in Säugern über die FIA. Aufgetragen sind die Plasmanitritkonzentrationen als Einzelwerte und deren Mittelwerte (Menschen  $n=24$ , Kaninchen  $n=7$ , Mäuse  $n=19$ ). Die Nitritkonzentration aller getesteten Säugetiere schwankt zwischen 230 und 710 nmol/l.

In der Patientengruppe mit mindestens einem Risikofaktor für Arteriosklerose, hier Hypertonie und der Kontrollgruppe wurde die Plasmanitritkonzentration gemessen (siehe Abbildung 14). In der Patientengruppe lag eine mittlere Plasmanitritkonzentration von  $127 \pm 18$  nmol/l vor, die Kontrollgruppe zeigte eine mittlere Plasmanitritkonzentration von  $216 \pm 20$  nmol/l. Die pathophysiologische Plasmanitritkonzentration in der Patientengruppe ist signifikant niedriger als im Kontrollkollektiv .



**Abbildung 14.** Gegenüberstellung der Nitritkonzentration im Plasma von Normotonikern (n=9) und Hypertonikern (n=15). Aufgetragen sind Einzel- und Mittelwerte mit einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (\* =  $p < 0,001$ ).

### 3.4 NO-Stoffwechsel in Erythropoetin überexprimierenden Mäusen

#### 3.4.1 Blutbild

Die EPO-Mäuse weisen einen 1,8fach erhöhten Hämatokrit (65,2%) und einen 1,7fach erhöhten Hämoglobingehalt (22,5 g/dl) im Vergleich zu den WT-Mäusen auf. Die weitere Charakterisierung der EPO-Mäuse und des Blutbildes ist unter Kapitel 2.5.1 beschrieben.

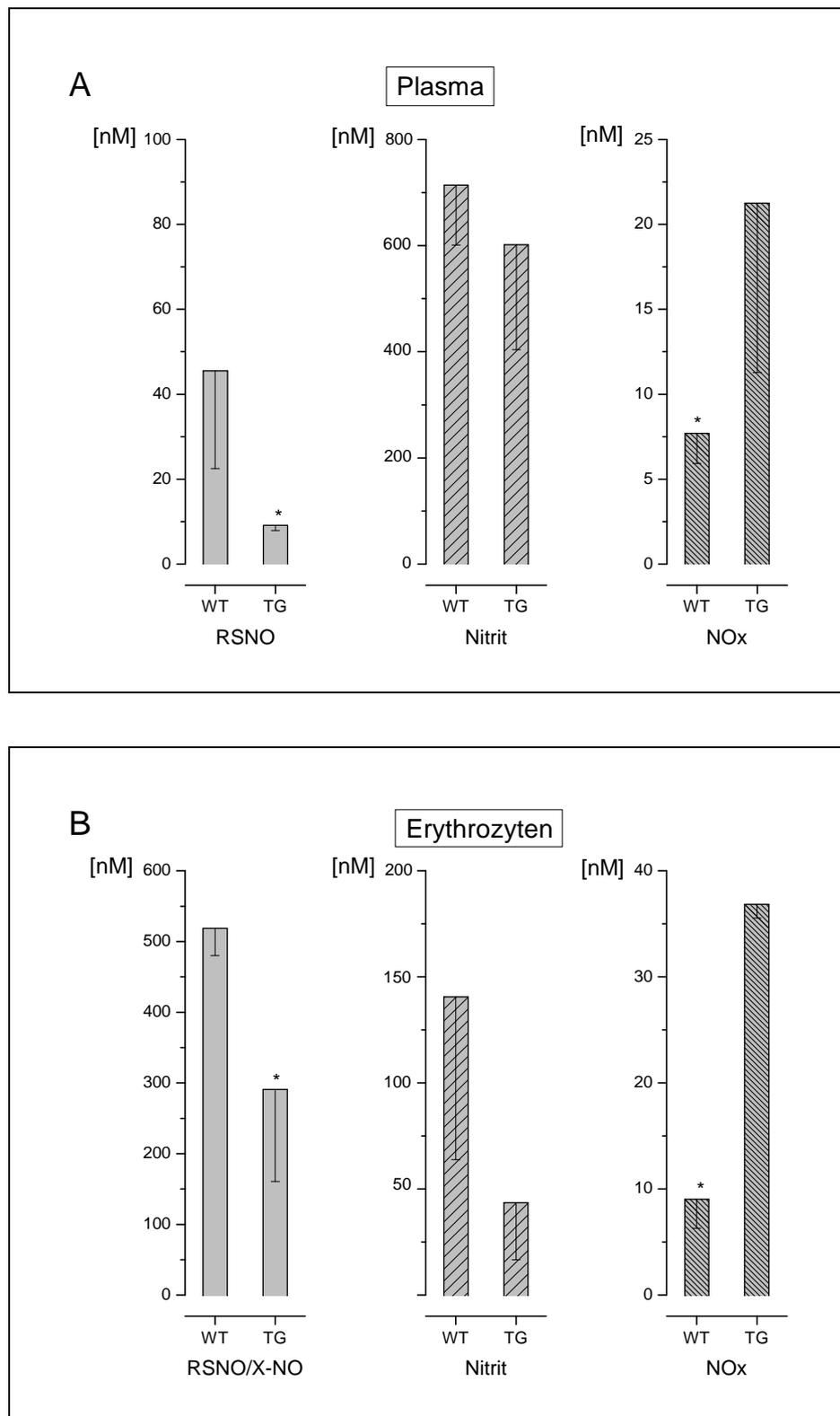
*Tabelle 3. Ausschnitt aus dem Blutbild der EPO-Mäuse (\* =  $p < 0,05$ ).*

	HGB [g/dl]	HKT [%]	MCV [fl]	MCH [pg]	MCHC [g/dl]
<b>WT</b> (n=6)	13,3	35,8	57,8	16,4	36,3
<b>TG</b> (n=4)	22,5*	65,2*	51,3	19,0	37,1

#### 3.4.2 NO-Metabolite in Plasma und Erythrozyten

Um den Einfluss eines erhöhten Hämatokrits auf den NO-Pool im Blut von Erythropoetin überexprimierenden Mäusen zu untersuchen, wurde die Konzentration der verschiedenen NO-Metabolite (RSNO,  $\text{NO}_2^-$ , NOx) in den Blutkompartimenten Plasma und Erythrozyten mit der in dieser Arbeit neu etablierten Methode CLD bestimmt (siehe Abbildung 15).

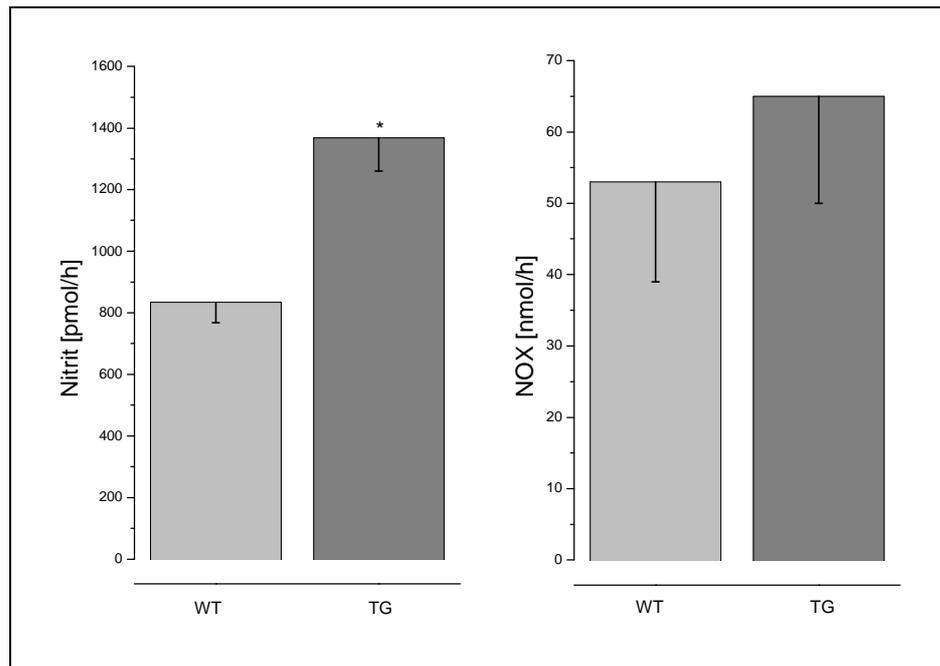
NOx ist im Blut der transgenen EPO-Mäuse (Plasma 21,25  $\mu\text{mol/l}$ ; Erythrozyten 37,81  $\mu\text{mol/l}$ ) gegenüber den WT-Mäusen (Plasma 7,7  $\mu\text{mol/l}$ ; Erythrozyten 9,03  $\mu\text{mol/l}$ ) um den Faktor 2,8 im Plasma und den Faktor 4,1 in den Erythrozyten erhöht. Die NO-Speicher der EPO-Mäuse in Erythrozyten (X-NO: WT 518,5 nmol/l, TG 290,73 nmol/l) und Plasma (RSNO: WT 45,53 nmol/l, TG 9,12 nmol/l) sind signifikant erniedrigt. Die Nitritkonzentration zeigt nur eine geringfügige Reduktion im Blut der EPO-Mäuse (Plasma 601,62 nmol/l, Erythrozyten 43,5 nmol/l) gegenüber den WT-Mäusen (Plasma 714,27 nmol/l, Erythrozyten 140,6 nmol/l) (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15.** Einfluss des Hämatokrit auf den NO-Pool im Blut von EPO-Mäusen (je n=7). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (\* =  $p < 0,05$ ).

### 3.4.3 Nitrit- und Nitratkonzentration im Sammelurin

Im Sammelurin (siehe 2.5.2 und 2.5.3) der transgenen EPO-Mäuse konnte eine signifikant erhöhte Nitritkonzentration nachgewiesen werden. Die Nitritkonzentration ist in den transgenen Tieren signifikant um den Faktor 1,6 gegenüber den WT-Mäusen erhöht. Die Nitratkonzentration zeigt die gleiche Tendenz, ist jedoch nur um den Faktor 1,2 in den transgenen Tieren erhöht (siehe Abbildung 16).

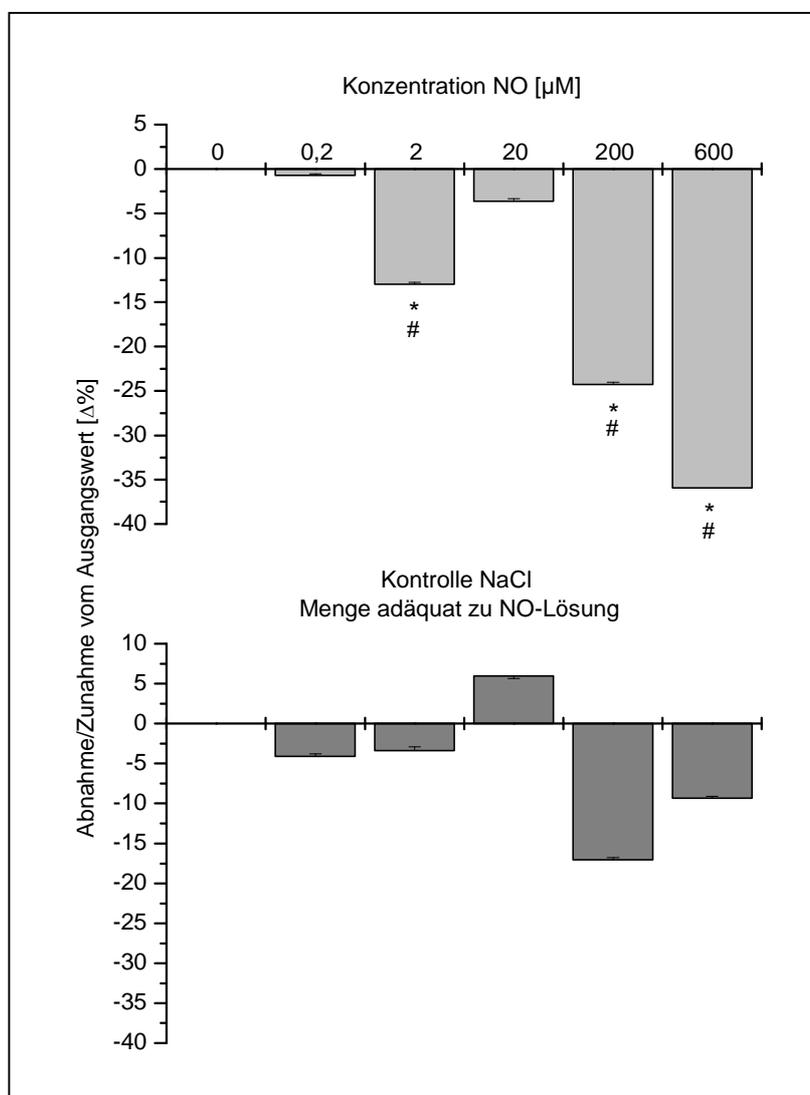


**Abbildung 16.** Nitrit- und Nitratkonzentration im Urin transgener Mäuse (je n=12). Dargestellt sind die Mittelwerte der Nitrit- und NOx-Konzentration und ihre Standardabweichung. Die NO-Metabolite sind im Urin der transgenen Tiere signifikant erhöht (\* =  $p < 0,05$ ).

### 3.5 Erythrozytenaggregation

Die Versuche zur Aggregation von Erythrozyten unter dem Einfluss einer erhöhten NO-Konzentration wurden mit humanen Erythrozyten durchgeführt, da im Tiermodell der Mäuse ein zu geringes Probenvolumen abnehmbar war.

Nach Inkubation der Vollblutproben mit authentischer NO-Lösung (0-600  $\mu\text{mol/l}$ ) sinkt die Erythrozytenaggregabilität mit zunehmender NO-Konzentration signifikant (Abbildung 17). Bei einer NO-Konzentration von 600  $\mu\text{mol/l}$  ist eine Abnahme von 33% des Ausgangswertes zu verzeichnen. In der Kontrolle zeigt sich nach Inkubation mit adäquaten Mengen NaCl kein linearer Zusammenhang.



**Abbildung 17.** Aggregabilität humaner Erythrozyten nach NO-Inkubation (je n=3). Mit zunehmender NO-Konzentration sinkt die Erythrozytenaggregabilität signifikant (\* Signifikanz gegenüber dem Nullwert, # Signifikanz gegenüber der NaCl-Kontrolle; p<0,05).

## 4 Diskussion

Folgende Ziele wurden in der vorliegenden Arbeit erreicht: 1. Die Probenaufarbeitung zur Vermessung der NO-Metabolite konnte optimiert werden, sodass durch den Ausschluss einer Hämoglobinkontamination eine interaktionsfreie Bestimmung über verschiedene analytische Methoden möglich war. 2. Es wurde eine spezifische Methode validiert, die die sensitive Bestimmung der Nitrit- und Nitrosothiolkonzentration im Plasma und Vollblut ermöglicht. 3. Unter Anwendung der beiden verschiedenen Methoden FIA und CLD wurden vergleichbare Plasmanitritkonzentrationen im nanomolaren Bereich gemessen. 4. Der Einfluss der Polyglobulie auf den NO-Stoffwechsel im Blut konnte erstmalig charakterisiert werden.

In Abschnitt 4.1 wird zunächst die optimierte Probenaufarbeitung diskutiert. Abschnitt 4.2 beschreibt die Validierung der CLD als auch die Vor- und Nachteile der CLD gegenüber anderen Methoden, die zur Nitritmessung verwendet werden. In Abschnitt 4.3 wird auf die Nitritkonzentration als universeller Marker der NOS im Plasma von Säugetieren eingegangen. Der Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf die NO-Verfügbarkeit im Blut wird in Abschnitt 4.4 dargelegt, zusätzlich wird hier die Beeinflussung rheologischer Parameter durch eine erhöhte NO-Verfügbarkeit diskutiert.

### 4.1 Optimierung der Probenaufarbeitung

Ist das Ziel die valide Bestimmung von Nitrit, muss auf eine präzise Probenaufarbeitung geachtet werden. Bei der Etablierung einer Methode ist es wichtig eine Referenzmethode zu haben, die Nitrit interaktionsfrei und valide misst. Kleinbongard et al.<sup>61</sup> optimierte ein Protokoll zur interaktionsfreien Probenaufarbeitung.

Bekannt sind Interaktionen der Griess-Reaktion mit Proteinen und Alkohol, die zu falsch positiven Bestimmungen führen, mit Zitrat zu falsch negativen Bestimmungen<sup>61</sup>. Viele weitere Substanzen, die mit dem Griess-Reagenz interagieren, sind bekannt, wie z.B. biologische Amine, Zinksulfat, Cadmium, Mangan, Eisen, Zink und Harnstoff<sup>62-64</sup>.

Ein Einfluss von Hämoglobin wurde bisher nicht beschrieben. Hämoglobin und Griess-Reagenz haben ein gleiches Absorptionsmaximum bei 545 nm. Bisher wurde von Giovanni et al.<sup>62</sup> nur eine Interaktion zwischen dem Griess-Reagenz und Proteinen beschrieben, die nicht weiter charakterisiert wurden. Durch die zusätzliche Lichtabsorption proteinhaltiger Proben bei 545 nm wurden falsch positive Ergebnisse erhoben. Die Resultate dieser Arbeit belegen, dass es bei der Vermessung von Blutproben über die FIA von besonderer Bedeutung ist, eine Hämoglobinkontamination

auszuschließen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überlagerung der Absorptionsmaxima von Hämoglobin und dem verwendeten Griess-Reagenz bei 545 nm zu falsch positiven Ergebnissen führt. Bei der Bestimmung der Nitritkonzentration über die CLD zeigt sich kein Einfluss von Hämoglobin auf das Ergebnis (siehe Kapitel 3.1).

Die Deproteinisierung von Plasmaproben zur Nitritbestimmung via Griess-Reagenz ist schon aufgrund der Plasmaeigenfärbung notwendig. Die Methode der Wahl ist die Ultrafiltration, da alle anderen Verfahren, wie die Säurefällung mittels Trichloressigsäure und die Alkoholfällung mittels Methanol entweder mit dem Griess-Reagenz interagieren oder mit Nitrit kontaminiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Ultrafiltrationsröhrchen mit einer unterschiedlichen Durchlässigkeit der Zellulosemembran für Proteine von 10-30 kDa getestet. Die Molekularmasse eines Häm-Molekül beträgt etwa 16 kDa, die eines tetrameren Hämoglobin-Molekül etwa 64 kDa. Hämoglobinfreie Proben wurden durch die Verwendung von Centricon Ultrafiltrationsröhrchen mit einem Cutt-off von 10 kDa erreicht. Durch diese Probenaufarbeitung konnte ein Vergleich der durch FIA und CLD gemessenen Proben erfolgen (siehe 4.2).

#### **4.2 Methodenkritik der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion gegenüber der Fluss-Injektionsanalyse**

Die reduktive Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion ist eine hochsensitive und spezifische Methode, die es ermöglicht aus  $\text{NO}_2^-$  und RSNO reduktiv NO freizusetzen und zu detektieren. Die zunächst von Marley et al.<sup>72</sup> beschriebene Methode konnte weiterentwickelt und durch die Modifikation der verwendeten Reaktionslösung verbessert werden. Die Zugabe von Kupfer(II)sulfat war nicht mehr notwendig, und es mussten keine schaumreduzierenden Reagenzien verwendet werden. Die Reaktionslösung musste nicht mehr nach jeder Probenaufgabe ausgewechselt werden. Die Vorteile gegenüber verschiedener zuvor beschriebener Methoden zur Nitrosothiolbestimmung werden in der Literatur diskutiert<sup>73,105-107</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte die CLD anhand der zur Nitritbestimmung bereits etablierten FIA validiert werden<sup>61</sup>. Wird auf eine korrekte Probenaufarbeitung bei der FIA geachtet (siehe 4.1), korrelieren die gemessenen Nitritkonzentrationen in wässrigen und proteinhaltigen Proben (siehe 3.2).

Die FIA stellt im Vergleich zu anderen Analyseverfahren eine einfache, günstige und schnelle Methode mit vergleichbarer Sensitivität von 10 nmol/l dar<sup>61</sup>. Das kommerziell erhältliche kolorimetrische Assay Kit zur Nitritbestimmung basiert ebenfalls auf der Griess-Reaktion. Die Punkt-zu-

Punkt Auflösung der FIA ist 250mal höher als bei dem kolorimetrischen Assay Kit. Die Reproduzierbarkeit der FIA im mikromolaren Bereich liegt 2mal höher. Weitere valide Methoden zur Nitritbestimmung sind das Diaminonaphthalen-Assay (DAN-Assay)<sup>108</sup>, die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC)<sup>109</sup> und die Gas-Chromatographie-Massen-Spektrometrie (GC-MS)<sup>110</sup>. Analysekosten und Zeitaufwand von HPLC und GC-MS sind im Vergleich mit den anderen Methoden sehr hoch.

Mit den genannten Methoden können jedoch keine Vollblutproben vermessen werden und die Bestimmung der Konzentration an gebundenem NO ist nicht möglich. Die CLD ist im Gegensatz zu den Methoden, die auf der Griess-Reaktion basieren, unabhängig von einer Hämoglobinverunreinigung. Mit Hämoglobin verunreinigte Proben, die über die FIA vermessen wurden, zeigten eine auf das 2,2fache erhöhte Nitritkonzentration gegenüber der CLD, mit der nach Hämoglobinverunreinigung der Proben identische Nitritkonzentrationen gemessen wurden (siehe Kapitel 3.1). Cosby et al.<sup>92</sup> konnte durch Infusion mikromolarer Nitritmengen eine Freisetzung von NO aus Nitrit durch die Reaktion mit Deoxyhämoglobin zeigen. Unter normalen Redoxbedingungen und physiologischen Konzentrationen von Nitrit im Erythrozyten, wie in der vorliegenden Arbeit gegeben, scheint dieser Prozess nicht aufzutreten.

Die CLD stellt eine interaktionsfreie Methode dar, mit der es möglich ist, Nitrit als auch Nitrosothiole in wässrigen und biologischen, proteinhaltigen Proben zu vermessen. Insbesondere ist eine direkte Bestimmung von Vollblutproben möglich. Diese Methode zeigt eine hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit. Sie ist gegenüber der FIA 10fach sensitiver (siehe Tabelle 2). Im Vergleich ist bei der CLD 1/10 des Probenvolumens ausreichend, ein Kriterium für Untersuchungen an Tiermodellen. Ein Nachteil der CLD ist der hohe Zeitaufwand durch fehlende Automatisierung der Probenapplikation und der Auswertung. Kürzlich wurde von Dejam et al.<sup>111</sup> eine optimierte Methode zur Nitritbestimmung im Vollblut etabliert. Unter Verwendung der CLD in Kombination mit einem Eisencyanid enthaltendem Assay wird Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert und unterbindet dadurch den schnellen Abbau von Nitrit durch Hämoglobin<sup>111</sup>.

Tabelle 3. Vor- und Nachteile der CLD gegenüber der FIA

	<b>CLD</b>	<b>FIA</b>
<b>Linearität</b>	2-100.000 nM	10-40.000 nM
<b>Wiederfindungsrate</b>	100±5 %	100±10 %
<b>Sensitivität</b>	1 nM	10 nM
<b>NO-Metabolite</b>	Nitrit-/ Nitrosothiolbestimmung	Nitritbestimmung
<b>Probenapplikation</b>	Manuell	Automatisiert
<b>Probenvolumen (n=3)</b>	300 µl	3000 µl
<b>Analysezeit (n=3)</b>	1 h	0,5 h
<b>Störanfälligkeit</b>	Interaktionsfrei	Verschiedene Interaktionen z.B. mit Hämoglobin

### 4.3 Nitrit im Plasma von Säugetieren

Nitrit war in den Plasmaproben aller untersuchten Spezies in einem physiologischen Bereich messbar. In der vorliegenden Arbeit lagen alle gemessenen Nitritkonzentrationen im nanomolaren Bereich (200-800 nmol/l) (siehe 3.3). Die korrelierenden absoluten Plasmanitritlevel, analysiert mittels unterschiedlicher Methoden, sprechen für die Genauigkeit der gemessenen Plasmanitritkonzentrationen.

Die Anwendung von Nitrit als Marker für die NO-Verfügbarkeit ist in vielerlei Hinsicht interessant. Am Beispiel der humanen Unterarmzirkulation konnte eine Signalkaskade durch die Bestimmung von Nitrit weiter aufgeklärt werden. Vorher war unbekannt, ob der kininerge Agonist Bradykinin die eNOS stimuliert und die Gefäßerweiterung auslöst. Die Applikation von muskarinergen (Acetylcholin) und kininergen Agonisten in der humanen Unterarmzirkulation verursachte einen Anstieg des plasmatischen Nitrits<sup>112,113</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass Bradykinin die endotheliale NOS stimuliert. Die pharmakodynamische Wirkung des Bradykinin konnte weiter aufgeklärt werden.

Bei kardiovaskulären Erkrankungen sind Analysen zur NO-Verfügbarkeit als diagnostisches Kriterium von Interesse. Das Ziel sollte sein, z.B. das

Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung durch die Nitritanalyse einzuschätzen. Eine Abhängigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren und der pathophysiologisch erniedrigten Nitritkonzentration im Plasma wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen (siehe 3.3).

Ein an die Risikoeinschätzung anschließendes Ziel ist die Therapie-Kontrolle durch die Analysen der NO-Verfügbarkeit an. Einige Medikamente, die bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt werden, greifen in den NO-Stoffwechsel ein. Bei der Behandlung von hyperlipoproteinämischen Kaninchen mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren konnte parallel zum Therapieerfolg eine gesteigerte NO-Verfügbarkeit über die plasmatische Nitritkonzentration nachgewiesen werden<sup>114</sup>.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Nitrit nicht nur als Index der basalen NO-Verfügbarkeit sondern auch als Marker der pathologisch veränderten NO-Synthese herangezogen werden kann. Die valide Bestimmung von Nitrit in biologischen Proben erfordert den Ausschluss von Interaktionen (siehe 4.1 und 4.2).

Nitrat stellt als weiteres oxidatives Produkt des NO-Stoffwechselweges einen weiteren potentiellen Marker für die eNOS-Aktivität dar. Die Plasmanitratkonzentration wird jedoch von vielen NOS-unabhängigen Faktoren beeinflusst, wie der Nitrataufnahme mit der Nahrung, der Speichelbildung, der Nitratsynthese durch Bakterien im Verdauungstrakt, der Inhalation aus der Luft und der Ausscheidung über die Nieren<sup>32</sup>. Außerdem wird die Sensitivität der Nitratbestimmung durch die hohe Hintergrundkonzentration im mikromolaren Bereich und die im Vergleich zu Nitrit relative lange Halbwertszeit herabgesetzt<sup>112</sup>. Nitrat stellt viel mehr einen Marker dar, der in kontrollierten klinischen Studien die chronischen Veränderungen im NO-Stoffwechsel reflektiert<sup>115</sup>.

Die nitros(yl)ierten Metabolite von NO sind bioaktive Speicherformen von NO<sup>71</sup>. Diese Metabolite spielen eine wichtige Rolle im Transport von NO. Zur Zeit stehen jedoch quantitative und qualitative Analysen von gebundenem NO als Index der NO-Verfügbarkeit noch aus.

Als weiterer Marker könnten Aminosäuren dienen, die in den L-Arginin-NO-Stoffwechsel involviert sind<sup>116</sup>. Arginin ist das Substrat der NOS und Citrullin ist neben NO ein weiteres Produkt der NOS. Arginin und Citrullin sind jedoch nicht spezifisch für den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg, sie sind zusätzlich in andere Stoffwechselwege wie den Citrat- oder Harnstoffzyklus involviert. Um Citrullin eindeutig dem NO-Stoffwechselweg zuzuordnen zu können, muss radioaktiv markiertes L-Arginin bei der Untersuchung der NOS-Aktivität eingesetzt werden. Dieses Analyseverfahren ist jedoch sehr aufwendig. Es ist unsensitiver als die Nitritbestimmung und nicht für jedes Versuchsprotokoll geeignet.

Garlichs et al.<sup>117</sup> hat zur Untersuchung der NOS-Aktivität N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin, das stabile Intermediat bei der Katalyse von Arginin zu Citrullin, über eine HPLC bestimmt. Die Konzentrationen an N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin sind unbeeinflusst von Geschlecht und Alter der Versuchspersonen. Im Gegensatz hierzu konnte bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion eine reduzierte N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin-Konzentration nachgewiesen werden, während die Konzentrationen an L-Arginin und L-Citrullin gleich blieben. Um die Spezifität dieser Methode genauer zu untersuchen, sind weitere Studien zur Bestimmung der N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin-Konzentration notwendig, in denen die NOS stimuliert (z.B. mit Acetylcholin) und inhibiert (z.B. mit N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginine) wird.

Asymmetrisches-Dimethyl-Arginin wurde als endogener kompetitiver Inhibitor der NOS charakterisiert<sup>118</sup>. In jungen hypercholesterinämischen Patienten waren erhöhte Konzentrationen des Asymmetrischen-Dimethyl-Arginin mit einer eingeschränkten endothelabhängigen Vasodilatation assoziiert<sup>119</sup>. Diese und andere Studien legen nahe, dass die erhöhte Konzentration des Asymmetrischen-Dimethyl-Arginin als Risiko-Indikator für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen anzusehen ist. Der Nachweis einer direkten Verknüpfung zwischen der NO-Verfügbarkeit und der plasmatischen Konzentration des Asymmetrischen-Dimethyl-Arginin steht noch aus. Auch Asymmetrisches-Dimethyl-Arginin wird wie das N<sup>o</sup>-Hydroxy-L-Arginin über die HPLC bestimmt, eine lange, komplizierte und teure Analyse.

Zusammenfassend kann die Analyse von plasmatischen Nitrit als eine der momentan besten Möglichkeiten zur Einschätzung der NO-Verfügbarkeit angesehen werden. Abhängig vom jeweiligen Ziel und Zweck einer Studie kann es, zum besseren Verständnis der vielen verschiedenen Reaktionen von NO, sinnvoll und hilfreich sein, die verschiedenen potentiellen NO Indices zu bestimmen.

#### **4.4 Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Metabolismus**

Bei einem Anstieg des Hämatokrit über 50% und somit der Erhöhung der Blutviskosität sind hämodynamische und rheologische Risiken für das kardiovaskuläre System zu erwarten. Die Erythrozytose wird sekundär durch eine Hypoxie hervorgerufen<sup>120</sup>. Die Hypoxie kann neben der Erythrozytose weitere pathologische Ereignisse hervorrufen<sup>121</sup>. Die Untersuchung einer isolierten chronischen Erythrozytose ermöglichte das Tiermodell der transgenen EPO-Mäuse.

Am Beispiel der EPO-Mäuse konnte der Einfluss eines erhöhten Hämatokrit auf den NO-Haushalt näher identifiziert werden. Mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten CLD war es möglich, den plasmatischen

NO-Pool der polyglobulären transgenen Tiere erstmalig zu charakterisieren. Die EPO-Mäuse zeigten trotz eines Hämatokrit bis 80% keinen Anstieg des Blutdruckes und keine Reduktion der Herzleistung. Der mittlere arterielle Druck und die Auswurfleistung des Herzens lagen im Normbereich und stimmten mit den gemessenen Werten der normozytären WT-Mäuse überein<sup>122</sup>. Im Gegensatz hierzu wurde in Hunden, deren Hämatokrit auf 68% angehoben wurde, ein Abfall der Herzleistung um 51% gemessen<sup>123</sup>. Es ist denkbar, dass die akute Erhöhung des Hämatokrit einen zu schnellen Anstieg der Blutviskosität bedingt hat, der nicht durch andere Mechanismen kompensiert werden konnte. Die EPO-Mäuse adaptierten sich seit Geburt an den erhöhten Hämatokrit, sodass das kardiovaskuläre System keine pathologischen Veränderungen zeigte<sup>122</sup>. Ruschitzka et al.<sup>97</sup> haben bei diesen transgenen, polyglobulären EPO-Mäusen eine 6fach erhöhte eNOS im Western-Blot nachgewiesen. Der aufgrund des erhöhten Hämatokrit zu erwartende Blutdruckanstieg wird durch eine Weitstellung der Gefäße über die erhöhte Bereitstellung von NO kompensiert<sup>97</sup>. Durch den erhöhten Hämatokrit der transgenen Mäuse verringert sich der Plasmasaum gegenüber den Kontrolltieren, die Scherkräfte entlang des Endothels steigen an. Hierdurch steigt die Aktivität der eNOS, z.B. durch eine erhöhte eNOS mRNA Expression und Stabilität oder eine erhöhte eNOS Proteinphosphorylierung<sup>124,125</sup>. Es kommt zu einer erhöhten Verfügbarkeit von NO. Von Banerjee et al.<sup>126</sup> konnte eine direkte Aktivierung der eNOS durch Erythropoetin gezeigt werden. Trotz der deutlich erhöhten Hämoglobinwerte ist die NO-Konzentration im Plasma der transgenen Tiere deutlich erhöht. Es resultiert eine Vasodilatation und somit eine Normotonie trotz erhöhtem Hämatokrit<sup>97</sup>. Die orale Gabe von L-NAME, einem NOS-Inhibitor, hat zu peripherer Vasokonstriktion, Hypertonie und schließlich zum Versterben der transgenen Tiere innerhalb von 52 Stunden geführt<sup>97</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurde der NO-Metabolismus in polyglobulären EPO-Mäusen charakterisiert. Gegenüber den WT-Mäusen sind in den Erythrozyten und im Plasma der EPO-Mäuse eine erniedrigte Konzentration von RSNO und Nitrit zu messen, während die NOx-Konzentration in beiden Kompartimenten deutlich erhöht ist. Eventuell kommt es durch die gesteigerte Gefäßdilatation zum erhöhten NO-Verbrauch im Endothel, es lässt sich eine geringe Konzentration an gebundenem NO im Blut der EPO-Mäuse gegenüber den Kontrolltieren nachweisen. Mutmaßlich gelangt NO aufgrund des kürzeren Weges durch den verringerten Plasmasaum vermehrt in den Erythrozyten, wo es zu Nitrat abgebaut wird. Somit könnte es sein, dass die Erythrozyten das Gleichgewicht zwischen der vermehrten Bildung und dem Abbau von NO halten. Eine erhöhte NO-Konzentration kann auf umgebende Zellen toxisch

wirken. NO bindet z.B. an die Eisengruppen von regulatorischen Enzymen und verändert oder verhindert deren Aktivität<sup>127</sup>. Die pathogene Wirkung von NO beschränkt sich nicht nur auf den Zellzyklus, sondern beeinflusst z.B. ebenfalls das Membranpotential über eine Inhibition von K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen und den hieraus resultierenden verminderten Ionenstrom. Hämoglobin neutralisiert diesen pathogenen Mechanismus des Radikals NO. Die erhöhte Nitratkonzentration im Vollblut der EPO-Mäuse belegt den erhöhten Abbau von NO und spricht für den erhöhten Gesamtumsatz von NO. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Ruschitzka et al.<sup>97</sup> gemessenen Nitratkonzentrationen, die in der Gefäßwand von Aorta und Pulmonalarterie der EPO-Mäuse signifikant erhöht waren. Offen bleibt, warum die Nitritkonzentration in Erythrozyten und Plasma gegenüber den WT-Mäusen reduziert ist. Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass Nitrit im Metabolismus der transgenen EPO-Mäuse entweder beschleunigt abgebaut wird oder aber eine erneute Umwandlung zu NO stattfindet.

Unter pathologischen Bedingungen, wie sie im Tierversuchsmodell der EPO-Mäuse gegeben sind, scheint die Verwendung von Nitrit als Marker für die erhöhte NO-Verfügbarkeit nicht möglich zu sein. Vielmehr belegen die Ergebnisse, dass Nitrat als Langzeitmarker der chronischen Veränderung im NO-Stoffwechsel der EPO-Mäuse dienen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nitrit und Nitrat im Urin der EPO-Mäuse erhöht ist. Im Urin der EPO-Mäuse stellt Nitrat den Hauptanteil der NO-Metabolite dar. Die Nitritkonzentration ist signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Im Urin stellt Nitrit den spezifischen Marker der erhöhten NOS-Aktivität. Zu beachten ist, dass die Nitritkonzentration im Urin ebenfalls durch eine Infektion erhöht wird<sup>128,129</sup>.

Um die physiologische Relevanz einer erhöhten NO-Verfügbarkeit auf die Blutviskosität bzw. die Erythrozytenaggregabilität abschätzen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit humane Erythrozyten mit steigenden NO-Konzentrationen inkubiert. Mit steigender NO-Konzentration sinkt die Aggregabilität der Erythrozyten. Der im humanen Vollblut gezeigte Abfall der Erythrozytenaggregabilität lässt vermuten, dass auch die Erythrozytenaggregabilität der EPO-Mäuse durch die erhöhte NO-Verfügbarkeit herabgesetzt ist und sich somit die ausbleibende Thrombembolisierung erklären lässt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Starzyk et al.<sup>130</sup>, die eine Abnahme der Aggregabilität in Ratten nach Inkubation mit einem NO-Donator gezeigt haben. Weitere Anpassungsmechanismen in polyglobulären transgenen Mäusen konnte von Vogel et al.<sup>131</sup> und Shibata et al.<sup>132</sup> nachgewiesen werden. Es konnte eine erhöhte Verformbarkeit der Erythrozyten<sup>131</sup> und eine herabgesetzte Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade<sup>132</sup> gezeigt werden.

Insgesamt reflektiert der aufgezeigte NO-Stoffwechsel im Blut der polyglobulären transgenen EPO-Mäuse eine erhöhte NO-Verfügbarkeit trotz der erhöhten Konzentration von Hämoglobin, welches als potentielle Falle für NO *in vivo* dienen könnte<sup>133,134</sup>. Diese Ergebnisse unterstützen das Konzept einer erhöhten und kontinuierlichen Vasodilatation durch NO in den EPO-Mäusen. Somit kann dem Effekt der ansteigenden Blutviskosität in den peripheren Widerstandsgefäßen entgegengewirkt werden. Das Endothel reagiert auf die erhöhten Scherungskräfte, hervorgerufen durch den Blutfluss<sup>81</sup>, mit einer zunehmenden Aktivierung der eNOS. EPO scheint ebenfalls einen direkten Einfluss auf die Erythropoetinrezeptoren und die eNOS zu haben. Es wirkt gegenregulatorisch auf den hypertensiven Effekt der ansteigenden Hämoglobinkonzentration<sup>135</sup>.

#### 4.5 Ausblick

Durch die Validierung der hochsensitiven und spezifischen CLD zur Messung von Nitrit im Plasma steht eine analytische Methode zur Verfügung, mit der neben der Bestimmung der Plasmanitritkonzentration auch die Bestimmung der Konzentration von Nitrit im Vollblut und der Konzentration von gebundenem NO in Plasma und Vollblut möglich ist. Diese Methode kann Anwendung in Tierversuchsmodellen finden, bei denen ein geringes Probenvolumen zur Verfügung steht. Interaktionen z.B. mit Hämoglobin sind hierbei ausgeschlossen. Unter Verwendung der CLD ist es möglich in anschließenden Studien den Metabolismus von NO weiter aufzuschlüsseln.

Von besonderem Interesse in der kardiovaskulären Diagnostik ist es, einen spezifischen Marker zur Risikoabschätzung kardiovaskulärer Erkrankungen zu finden. Im Einklang mit der Arbeit von Kleinbongard et al.<sup>136</sup> konnte hier Nitrit als Marker des NO-Stoffwechsels bei arterieller Hypertonie identifiziert werden. Zusätzlich bietet die Nitritbestimmung auch eine Möglichkeit der Therapiekontrolle bei Behandlung durch Medikamente, die in den NO-Stoffwechsel eingreifen<sup>114</sup>.

Medikamentöse Interventionen in der Kardiologie zielen auf eine Verbesserung der Endothelfunktion ab. Die Verbesserung einer Endothelfunktion führt zur einer Erhöhung der NOS sowie der NO-Verfügbarkeit. Hier wurde aufgezeigt, dass sich für die Behandlung mit EPO eventuell neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung einer endothelialen Dysfunktion ergeben. Die Erkenntnis, dass eine erhöhte NO-Verfügbarkeit die Aggregabilität und die Verformbarkeit von Erythrozyten moduliert, lässt auf einen potentiellen therapeutischen Einfluss von NO bei der Behandlung von Erkrankungen, die die Mikrozirkulation betreffen, schließen.

## 5 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) reguliert im kardiovaskulären System unter anderem Gefäßtonus, Gefäßwachstum, Adhäsion von Blutzellen und die Blutgerinnung. NO wird von der NOS aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert, im kardiovaskulären System hauptsächlich durch die eNOS. Es erfolgt eine rasche Verstoffwechslung zu Nitrit und Nitrat. Nitrit spiegelt akute Veränderungen in der eNOS-Aktivität wieder. Es war notwendig, eine Methode zur sensitiven, reproduzierbaren und interaktionsfreien Bestimmung von Nitrit zu entwickeln. Für die Untersuchung des NO-Metabolismus am Tiermodell war keine Methode verfügbar, die ein möglichst kleines Probenvolumen sowie die Bestimmung von Nitrosothiolen im Plasma als auch im Vollblut erlaubt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch die Interaktion von Hämoglobin mit dem bei der FIA verwendeten Griess-Reagenz kann es bei der Bestimmung von Nitritkonzentrationen in plasmatischen Proben zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Die Probenaufarbeitung konnte zur interaktionsarmen Vermessung optimiert werden.
2. Die CLD stellt im Vergleich die Methode mit der höchsten Sensitivität und Reproduzierbarkeit dar. Eine interaktionsfreie Bestimmung von Nitrit und Nitrosothiolen in Plasma und Vollblut ist auch bei einem geringen Probenvolumen möglich. Die gemessenen Nitritkonzentrationen im wässrigen und plasmatischen Milieu korrelieren signifikant zwischen CLD und FIA.
3. Nitrit konnte unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Blut von Säugern nachgewiesen werden. Die Plasmanitritkonzentrationen im Blut der verwendeten Säugetiere liegen im nanomolaren Bereich von 200-800 nmol/l. Die signifikante Erniedrigung der Nitritkonzentration im Plasma von Hypertonikern konnte nachgewiesen werden.
4. Die Untersuchung des NO-Stoffwechsel in EPO-Mäusen hat gezeigt, dass sich die NO-Produktion sowie der Verbrauch von NO in einer erhöhten NO<sub>x</sub>-Konzentration widerspiegelt. Eine steigende NO-Konzentration wirkt sich positiv auf die Erythrozytenaggregabilität aus.

Die hier dargestellten methodischen Möglichkeiten können in der Diagnostik zur Bestimmung des verfügbaren NO sowie in der Analyse des NO-Metabolismus in verschiedenen Säugetieren verwendet werden. Nitrit stellt ein potentiell Diagnosekriterium bei kardiovaskulären Erkrankungen dar. Die Untersuchung der EPO-Mäuse gibt einen Einblick in die Modulation des kardiovaskulären System durch Erythropoetin und NO und den möglichen Nutzen einer erhöhten NO-Verfügbarkeit.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest.* 56, 577-581 (1996).
2. Heger J., Gödecke A., Flögel U., Merx M.W., Molojavyi A., Kühn-Velten N., & Schrader J. Cardiac-specific overexpression of inducible nitric oxide synthase does not result in severe cardiac dysfunction. *Circ Res.* 90, 93-99 (2002).
3. Moncada S., Palmer R.M.J., & Higgs E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol.* 38, 1709-1715 (1989).
4. Vallance P. & Collier J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. *BMJ.* 309, 453-457 (1994).
5. Moncada S., Higgs E.A., Hodson H.F., Knowles R.G., Lopez-Jaramillo P., McCall T., Palmer R.M.J., Radomski M.W., Rees D.D., & Schulz R. The L-arginine: Nitric oxide pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 17, 1-9 (1991).
6. Ignarro L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 30, 535-560 (1990).
7. Moncada S. & Higgs E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 9, 1319-1330 (1995).
8. Palmer R.M.J. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg.* 128, 396-401 (1993).
9. Snyder S.H. & Bredt D.S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 266 (5), 68-77 (1992).
10. Feron O., Saldana F., Michel J.B., & Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem.* 273, 3125-3128 (1998).
11. Walter U. Physiological role of cGMP and the cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 73, 41-88 (1989).
12. Gödecke A., Decking U.K.M., Ding Z., Hirchenhain J., Bidmon H.-J., Gödecke S., & Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ es.* 82, 186-194 (1998).

13. Griendling K. & Alexander R.W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 10, 283-292 (1996).
14. Kelm M. & Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res.* 66, 1561-1575 (1990).
15. Rees D.D., Palmer R.M.J., & Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86, 3375-3378 (1989).
16. Radomski M.W. & Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost.* 70, 36-41 (1993).
17. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol.* 80, 3-6 (1991).
18. Schrör K. Organische Nitrate. I. Wirkmechanismen und neue therapeutische Ansätze bei Myokardischämie. *Internist.* 36, 392-403 (1995).
19. Leone A.M., Palmer R.M.J., Knowles R.G., Francis P.L., Ashton D.S., & Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem.* 266, 23790-23795 (1991).
20. Moncada S. & Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329, 2002-2012 (1993).
21. Gardner P.R., Gardner A.M., Martin L.A., & Salzman A.L. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 10378-10383 (1998).
22. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064 (1992).
23. Busse R. & Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 27, 331-340 (1995).
24. Nathan C. & Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell.* 78, 915-918 (1994).
25. Blitzer M.L., Loh E., Roddy M.A., Stamler J.S., & Creager M.A. Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans. *J Am Coll Cardiol.* 28 (3), 591-596 (1996).
26. Ghafourifar P. & Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418, 291-296 (1997).

27. Giulivi C., Poderoso J.J., & Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273, 11038-11043 (1998).
28. Nakane M., Schmidt H.H., Pollock J.S., Forstermann U., & Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316, 175-180 (1993).
29. Asano K., Chee C.B.E., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C., Drazen J.M., & Stamler J.S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 10089-10093 (1994).
30. Shaul P.W., North A.J., Wu L.C., Wells L.B., Brannon T.S., Lau K.S., Michel T., Margraf L.R., & Star R.A. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest.* 94, 2231-2236 (1994).
31. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., & Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 444-448 (1992).
32. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1411, 273-289 (1999).
33. Heslop R.B. & Jones K. Inorganic chemistry. *Elsevier, Amsterdam.* (1976).
34. Ford P.C., Wink D.A., & Stanbury D.M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett.* 326, 1-3 (1993).
35. Kelm M., Feelisch M., Deussen A., Schrader J., & Strauer B.E. The role of nitric oxide in the control of coronary vascular tone in relation to partial oxygen pressure, perfusion pressure and flow. *J Cardiovasc Pharmacol.* 17, 95-99 (1991).
36. Malinski T., Taha Z., Grunfeld S., Patton S., Kapturczak M., & Tomboulis P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biophys Res Commun.* 193, 1076-1082 (1993).
37. Lancaster jr.J.R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 8137-8141 (1994).
38. Bonner F.T. & Stedman G. The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: *Methods in nitric oxide research.* Feelisch M., Stamler J., eds. *John Wiley & Sons Ltd., Chichester* (1996).

39. Grube R., Kelm M., Motz W., & Strauer B.E. Measurement of oxides of nitrogen in biological fluids: implication for studies *in vivo*. In: The biology of nitric oxide. 4 Enzymology, biochemistry and immunology. Moncada S., Feelisch M., Busse R., Higgs E.A., eds. *Portland Press, London* (1994).
40. Kelm M. & Schrader J. Comparison of nitric oxide formation in cultured endothelial cells and isolates guinea-pig hearts. In: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. Moncada S., Higg E.A., eds. *Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division), Amsterdam*. (1990).
41. Liu X., Miller M.J.S., Joshi M.S., Thomas D.D., & Lancaster J.R. Accelerated reaction of nitric oxide with O<sub>2</sub> within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, 2175-2179 (1998).
42. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., & Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 1624 (1990).
43. Beckman J.S., Carson M., Smith C.D., & Koppenol W.H. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*. 364, 584 (1993).
44. Hughes M.N. & Nicklin H.G. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J Chem Soc*. 450-452 (1968).
45. Ischiropoulos H., Zhu L., & Beckman J.S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 298, 446-451 (1992).
46. Beckman J.S. & Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*. 271, C1424-C1437 (1996).
47. Pryor W.A. & Squadrito G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 268, L699-L722 (1995).
48. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 91, 31S-38S (1991).
49. Ischiropoulos H., Zhu L., Chen J., Tsai M., Martin J.C., Snyder S.D., & Beckman J.S. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*. 298, 431-437 (1992).
50. Doyle M.P. & Hoekstra J.W. Oxidation of nitrogen oxide by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem*. 14, 351-358 (1981).

51. Recchia F.A., Vogel T.R., & Hintze T.H. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart C.* 279, H852-H856 (2000).
52. Yoshida K., Kasama K., Kitabatake M., Okuda M., & Imai M. Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate. *Int Arch Occup Environ Health.* 52, 103-115 (1983).
53. Castillo L., DeRojas T.C., Chapman T.E., Vogt J., Burke J.F., Tannenbaum S.R., & Young V.R. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 193-197 (1993).
54. Lee K., Greger J.L., Consaul J.R., Graham K.L., & Chinn B.L. Nitrate, nitrite balance and de novo synthesis of nitrate in humans consuming cured meats. *Am J Clin Nutr.* 44, 188-194 (1986).
55. Meulemans A. & Delsenne F. Measurement of nitrite and nitrate levels in biological samples by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 660, 401-404 (1994).
56. Leone A.M., Francis P.L., Rhodes P., & Moncada S. A rapid and simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* 200, 951-957 (1994).
57. Gorenflo M., Zheng C., Poge A., Bettendorf M., Werle E., Fiehn W., & Ulmer H.E. Metabolites of the L-arginine-NO pathway in patients with left-to-right shunt. *Clin Lab.* 47, 441-447 (2001).
58. Marzinzig M., Nussler A.K., Stadler J., Marzinzig E., Barthlen W., Nussler N.C., Beger H.G., Morris S.M., & Brückner U.B. Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate and s-nitrosothiols. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry.* 1, 177-189 (1997).
59. Bateman R.M., Ellis C.G., & Freeman D.J. Optimization of nitric oxide chemiluminescence operating conditions for measurement of plasma nitrite and nitrate. *Clin Chem.* 48, 570-573 (2002).
60. Habu H., Yokoi I., Kabuto H., & Mori A. Application of automated flow injection analysis to determine nitrite and nitrate in mouse brain. *Neuroreport.* 5, 1571-1573 (1994).
61. Kleinbongard P., Rassaf T., Dejam A., Kerber S., & Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein containing sample. *Methods Enzymol.* 359, 158-168 (2002).
62. Giovannoni G., Land J.M., Keir G., Thompson E.J., & Heales S.J.R. Adaption of the nitrate reductase and Griess reaction methods for

- the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem.* 34, 193-198 (1997).
63. Tsikas D., Fuchs I., Gutzki F.-M., & Frölich J.C. Measurement of nitrite and nitrate in plasma, serum and urine of humans by high-performance liquid chromatography, the Griess assay, chemiluminescence and gas chromatography - mass spectrometry: Interferences by biogenic amines and N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine analogs. *J Chromatogr B.* 715, 441-444 (1998).
  64. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung Anionen (Gruppe D), D10 DIN 38405. 2005.
  65. Ellis G., Adatia I., Yazdanpanah M., & Makela S.K. Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem.* 31, 195-220 (1998).
  66. Granger D.L., Anstey N.M., Miller W.C., & Weinberg J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 301, 49-61 (1999).
  67. Ishibashi T., Himeno M., Imaizumi N., Maejima K., Nakano S., Uchida K., Yoshida J., & Nishio M. NO<sub>(x)</sub> contamination in laboratory ware and effect of countermeasures. *Nitric Oxide.* 5, 516-525 (2000).
  68. Kirkeboen K.A. & Strand O.A. The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Anaesthesiol Scand.* 43, 275-288 (1999).
  69. Fernandez-Cancio M., Fernandez-Vitos E.M., Centelles J.J., & Imperial S. Sources of interference in the use of 2,3-diaminonaphthalene for the fluorimetric determination of nitric oxide synthase activity in biological samples. *Clin Chim Acta.* 312, 205-212 (2001).
  70. Guevara I., Iwanejko J., Dembinska-Kiec A., Pankiewicz J., Wanat A., Anna P., Golabek I., Bartus S., Malczewska-Malec M., & Szczudlik A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 274, 177-188 (1998).
  71. Rassaf T., Kleinbongard P., Preik M., Dejam A., Gharini P., Lauer T., Erckenbrecht J., Duschin A., Schulz R., Heusch G., Feelisch M., & Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO. Experimental and clinical study on the Fate of NO in human blood. *Circ Res.* 91, 470-477 (2002).

72. Marley R., Feelisch M., Holt S., & Moore K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res.* 32, 1-9 (2000).
73. Stamler J.S., Jaraki O., Osborne J.A., Simon D.I., Keaney J.F., Vita J., Singel D.J., Valeri C.R., & Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 7674-7677 (1992).
74. Marley R., Patel R.P., Orié N., Caesar E., Darley-Usmar V., & Moore K. Formation of nanomolar concentration of S-nitrosoalbumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 31, 688-696 (2001).
75. Al-Sa'doni H.H., Megson I.L., Bisland S., Butler A.R., & Flitney R.W. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol.* 121, 1047-1050 (1997).
76. Holmes A.J. & Williams D.L.H. Reactions of S-nitrosothiols with ascorbate: clear evidence of two reactions. *Chem Commun.* 16, 1711-1712 (1998).
77. Barnett D.J., Rios A.M., & Williams D.L.H. Transnitrosation between nitrosothiols and thiols. *J Chem Soc. , Perkin Tran. 2 2*, 1279-1282 (1995).
78. Clancy R.M., Miyazaki Y., & Cannon P.J. Use of thionitrobenzoic acid to characterize the stability of nitric oxide in aqueous solutions and in porcine aortic endothelial cell suspensions. *Anal Biochem.* 191, 138-143 (1990).
79. Eich R.F., Li T., Lemon D.D., Doherty D.H., Curry S.R., Aitken J.F., Mathews A.J., Johnson K.A., Smith R.D., Phillips G.N., jr., & Olson J.S. Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 35, 6976-6983 (1996).
80. Doherty D.H., Doyle M.P., Curry S.R., Vali R.J., Fattor T.J., Olson J.S., & Lemon D.D. Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol.* 16, 672-676 (1998).
81. Pohl U. & Lamontagne D. Impaired tissue perfusion after inhibition of endothelium-derived nitric oxide. *Basic Res Cardiol.* 86, 97-105 (1991).
82. Mosseri M., Bartlett-Pandite A.N., Wenc K., Isner J.M., & Weinstein R. Inhibition of endothelium-dependent vasorelaxation by sickle erythrocytes. *Am Heart J.* 126, 338-346 (1993).

83. Liu, X., Miller, M.J., Joshi, M.S., Sadowska-Krowicka, H., Clark, D.A., & Lancaster, J. Diffusion-limited Reaction of Free Nitric Oxide with Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 18709-18713 (1998).
84. Liao, J.C., Hein, W., Vaughn, M.W., Huang, K.T., & Kuo, L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *PNAS* 96, 8757-8761 (1999).
85. Vaughn, M.W., Kuo, L., & Liao, J.C. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 274, H1705-H1714 (1998).
86. Butler A.R., Megson I.L., & Wright P.G. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochim Biophys Acta.* 1425, 168-176 (1998).
87. Vaughn, M.W., Huang, K.T., Kuo, L., & Liao, J.C. Erythrocytes Possess an Intrinsic Barrier to Nitric Oxide Consumption. *J. Biol. Chem.* 275, 2342-2348 (2000).
88. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., & Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 380, 221-226 (1996).
89. Gross S.S. & Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 9967-9969 (1999).
90. Megson I.L., Sogo N., Mazzei F.A., Butler A.R., Walton J.C., & Webb D.J. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells *in vitro*: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol.* 131, 1391-1398 (2000).
91. Pawloski J.R., Hess D.T., & Stamler J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature.* 409, 622-626 (2001).
92. Cosby K., Partovi K.S., Crawford J.H., Patel R.P., Reiter C.D., Martyr S., Yang B.K., Waclawiw M.A., Zalos G., Xu X., Huang K.T., Shields H., Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Cannon III R.O., & Gladwin M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 9, 1498-1505 (2003).
93. Bertinieri, G., Parati, G., Ulian, L., Santucci, C., Massaro, P., Cosentini, R., Torgano, G., Morganti, A., & Mancia, G. Hemodilution Reduces Clinic and Ambulatory Blood Pressure in Polycythemic Patients. *Hypertension* 31, 848-853 (1998).
94. Hart R.G. & Kanter M.C. Hematologic disorders and ischemic stroke. A selective review. *Stroke.* 21, 1111-1121 (1990).

95. del Castillo D., Rajj L., Shultz P.J., & Tolins J.P. The pressor effect of recombinant human erythropoietin is not due to decreased activity of the endogenous nitric oxide system. *Nephrol Dial Transplant.* 10, 505-508 (1995).
96. Tsukahara H., Hiraoka M., Hori C., Hata I., Okada T., Gejyo F., & Sudo M. Chronic erythropoietin treatment enhances endogenous nitric oxide production in rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 57, 487-493 (1997).
97. Ruschitzka F.T., Wenger R.H., Stallmach T., Quasching T., de Wit C., Labugger R., Kelm M., Noll G., Rüllicke T., Shaw S., Lindberg R.P., Rodenwaldt B., Lutz H., Bauer C., & Lüscher T.F. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoetin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 11609-11613 (2000).
98. Cox R.D. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal Chem.* 52, 332-335 (1980).
99. Hampl V., Walters C.L., & Archer S.L. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M.; Stamler J.S.; eds. *John Wiley & Sons Ltd.*, Chichester (1996).
100. Aoki T. Continuous flow determination of nitrite with membrane separation/chemiluminescence detection. *Biomed Chromatogr.* 4, 128-130 (1990).
101. Fontijn A., Sabadell A.J., & Ronco R.J. Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Anal Chem.* 42, 579 (1970).
102. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.* 7, 349-360 (1993).
103. Kiesewetter H., Radtke H., Schneider R., Mußler K., Scheffler A., & Schmid-Schönbein H. Das Mini-Erythrozyten-Aggregometer: Ein neues Gerät zur schnellen Quantifizierung des Ausmaßes der Erythrozytenaggregation. *Biomed Technik.* 27, 209-213 (1982).
104. Scorza G., Pietraforte D., & Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from s-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathion in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 1997, 633-642 (1997).
105. Samouilov A. & Zweier J.L. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal Biochem.* 258, 322-330 (1998).

106. Fang K., Ragsdale N.V., Carey R.M., MacDonald T., & Gaston B. Reductive assays for S-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 252, 535-540 (1998).
107. Ewing J.F. & Janero D.R. Specific S-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium(III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Radic Biol Med.* 25, 621-628 (1998).
108. Li H., Meininger C.J., & Wu G. Rapid determination of nitrite by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 746, 199-207 (2000).
109. Preik-Steinhoff H. & Kelm M. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with high-performance anion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 685, 348-352 (1996).
110. Tsikas D., Böger R.H., Bode-Böger S.M., Gutzki F.-M., & Frölich J.C. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their <sup>15</sup>N-labelled analogs. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 661, 185-191 (1994).
111. Dejam A., Hunter C.J., Pelletier M.M., Hsu L.L., Machado R.F., Shiva S., Power G.G., Kelm M., Gladwin M.T., & Schechter A.N. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood.* (2005).
112. Lauer,T., Preik,M., Rassaf,T., Strauer,B.E., Deussen,A., Feelisch,M., & Kelm,M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *PNAS* 98, 12814-12819 (2001).
113. Lauer T., Kleinbongard P., Preik M., Rauch B.H., Deussen A., Feelisch M., Strauer B.E., & Kelm M. Direct biochemical evidence for eNOS stimulation by bradykinin in the human forearm vasculature. *Basic Res Cardiol.* 98, 84-89 (2003).
114. Perings S.M., Grubert N., Kleinbongard P., Reinecke P., Schulz R., Hermsen D., Willers R., & Kelm M. Chronic treatment with fluvastatin improves smooth muscle dilatory function in genetically determined hyperlipoproteinemia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 43, 183-190 (2004).
115. Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T., Rassaf T., Schindler A., Picker O., Scheeren T., Gödecke A., Schrader J., Schulz R., Heusch G., Schaub G.A., Bryan N.S., Feelisch M., & Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 35, 790-796 (2003).

116. Lauer,T., Kleinbongard,P., & Kelm,M. Indexes of NO Bioavailability in Human Blood. *News Physiol Sci* 17, 251-255 (2002).
117. Garlichs C.D., Beyer J., Zhang H., Schmeisser A., Plötze K., Mügge A., Schellong S., & Daniel W.G. Decreased plasma concentrations of L-hydroxy-arginine as a marker of reduced NO formation in patients with combined cardiovascular risk factors. *J Lab Clin Med.* 135, 419-425 (2000).
118. Vallance P., Leone A., Calver A., Collier J., & Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339, 572-575 (1992).
119. Böger,R.H., Bode-Böger,S.M., Szuba,A., Tsao,P.S., Chan,J.R., Tangphao,O., Blaschke,T.F., & Cooke,J.P. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA): A Novel Risk Factor for Endothelial Dysfunction : Its Role in Hypercholesterolemia. *Circulation* 98, 1842-1847 (1998).
120. Fisher J.W. Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Proc Soc Exp Biol Med.* 216, 358-369 (1997).
121. Marshall J.M. The integrated response to hypoxia: from circulation to cells [The Joan Mott Prize Lecture]. *Exp Physiol.* 84, 449-470 (1999).
122. Wagner K.F., Katschinski D.M., Hasegawa J., Schumacher D., Meller B., Gembruch U., Schramm U., JelkmannW., Gassmann M., & Fandrey J. Chronic inborn erythrocytosis leads to cardiac dysfunction and premature death in mice overexpressing erythropoietin. *Blood.* 97, 536-542 (2001).
123. Richardson T.Q. & Guyton A.C. Effects of polycythemia and anemia on cardiac output and other circulatory factors. *Am J Physiol.* 197, 1167-1170 (1959).
124. Davis,M.E., Cai,H., Drummond,G.R., & Harrison,D.G. Shear Stress Regulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression Through c-Src by Divergent Signaling Pathways. *Circ Res* 89, 1073-1080 (2001).
125. Boo,Y.C., Sorescu,G., Boyd,N., Shiojima,I., Walsh,K., Du,J., & Jo,H. Shear Stress Stimulates Phosphorylation of Endothelial Nitric-oxide Synthase at Ser1179 by Akt-independent Mechanisms. ROLE OF PROTEIN KINASE A. *J. Biol. Chem.* 277, 3388-3396 (2002).
126. Banerjee D., Rodriguez M., Nag M., & Adamson J. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. *Kidney International.* 57, 1895-1904 (2000).

127. Kroncke K.D., Fehsel K., & Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when, and where? *Nitric Oxide*. 1, 107-120 (1997).
128. Smith S.D., Wheeler M.A., & Weiss R.M. Nitrite oxide synthase: An endogenous source of elevated nitrite in infected urine. *Kidney International*. 45, 586-591 (1994).
129. Gharini P., Dejam A., Lauer T., Matern S., Kelm M., & Kleinbongard P. A simple method to measure nitrite and nitrate in urine: Measurement of the end product of NO-metabolisms pathway in urine through vanadium chloride and griess. *SKET*. 100-105 (2002).
130. Starzyk D., Korbut R., & Gryglewski R.J. Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats *ex vivo* and *in vitro*. *J Physiol Pharmacol*. 50, 629-637 (1999).
131. Vogel,J., Kiessling,I., Heinicke,K., Stallmach,T., Ossent,P., Vogel,O., Aulmann,M., Frietsch,T., Schmid-Schonbein,H., Kuschinsky,W., & Gassmann,M. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* 102, 2278-2284 (2003).
132. Shibata,J., Hasegawa,J., Siemens,H.J., Wolber,E., Dibbelt,L., Li,D., Katschinski,D.M., Fandrey,J., Jelkmann,W., Gassmann,M., Wenger,R.H., & Wagner,K.F. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. *Blood* 101, 4416-4422 (2003).
133. Gow A.J. & Stamler J.S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*. 391, 169-173 (1998).
134. Gow,A.J., Luchsinger,B.P., Pawloski,J.R., Singel,D.J., & Stamler,J.S. The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *PNAS* 96, 9027-9032 (1999).
135. Beleslin-Cokic B.B., Cokic V.P., Yu X., Weksler B.B., Schechter A.N., & Noguchi C.T. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. *Blood* 104, 2073-2080 (2004).
136. Kleinbongard P., Dejam A., Lauer T., Kerber S., Gharini P., Zotz R., Scharf R., and Kelm M. Nitrite in human plasma: An index for NO-availability in individuals with cardiovascular risk factors. 2005.

## 7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm für die Überlassung des Themas, seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit, selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen, bedanken. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement haben bei mir tiefen Eindruck hinterlassen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard für die Einführung in das experimentelle Arbeiten und ihre intensive Betreuung. Ihre Aufmerksamkeit sowie ihre unermüdliche Geduld haben mir sehr geholfen. Sie beeindruckte und motivierte mich stets durch ihre große Begeisterung für die wissenschaftliche Arbeit. Für ihren Einsatz und ihre uneingeschränkte Unterstützung bin ich ihr zu großem Dank verpflichtet.

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

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Kardiologischen Labors für die Geduld meine ständigen Fragen zu beantworten. Vor allem danke ich Frau MTA Simone Matern und Frau BTA Claudia Ferfers für ihre stete und freundliche Unterstützung.

Nicht zu vergessen ist meine Familie, meine Eltern und meine Brüder, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

## 8 Lebenslauf

Name: Kerstin Henrike Albach  
 Geburtsdatum: 22.05.1976  
 Geburtsort: Wermelskirchen  
 Nationalität: deutsch  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Dipl. ing. Robert Albach  
 Hiltrud Albach, geb. Dönges  
 Geschwister: Dirk Albach  
 Wulf Albach

### Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschule Widdert, Solingen  
 1986 – 1995 Gymnasium Schwertstrasse Solingen  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

1995 – 2003 Studium der Humanmedizin an der  
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 08/1998 Ärztliche Vorprüfung  
 08/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/2002 – 04/2003 Praktisches Jahr:  
 Innere Medizin: Kantonsspital Luzern, Schweiz  
 Chirurgie: Städtisches Klinikum Krefeld  
 Pädiatrie: Zentrum für Kinder- und  
 Jugendmedizin, Städtisches Klinikum Krefeld  
 05/2003 Dritter Abschnitt der Ärztliche Prüfung

### Berufliche Erfahrungen:

09/2003 – 09/2004 Ärztin im Praktikum, Zentrum für Kinder-  
 und Jugendmedizin, Städt. Klinikum Krefeld  
 Seit 10/2004 Assistenzärztin, Zentrum für Kinder-  
 und Jugendmedizin, Städt. Klinikum Krefeld

Veröffentlichungen:

K. Albach, P. Kleinbongard, A. Geßmann, P. Gharini, T. Rassaf, M. Feelisch, M. Kelm. Interaktion der Speicher- und Transportkapazität von NO zwischen Plasma und Erythrozyten in humanem Vollblut. *NO-Forum Magdeburg* (2001).

A. Geßmann, P. Kleinbongard, K. Albach, T. Rassaf, P. Gharini, T. Lauer, M. Feelisch, M. Kelm. L-Arginin: NO-Metabolismus in humanem Blut. *NO-Forum Magdeburg* (2001).

M. Kelm, P. Kleinbongard, K. Albach, A. Geßmann, P. Gharini, T. Rassaf, M. Feelisch. Transfer von gebundenem Stickstoffmonoxid zwischen Erythrozyten und Plasma im menschlichen Blut. *Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim* (2002).

Düsseldorf, im April 2006

Abstract zur Dissertationsschrift

**ETABLIERUNG DER REDUKTIVEN GASPHASENCHEMILUMINESZENZ ZUR VALIDEN MESSUNG VON N-OXIDEN IM BLUT VON ERYTHROPOETIN ÜBEREXPREMIERENDEN MÄUSEN**

vorgelegt von Kerstin Albach

Stickstoffmonoxid (NO) reguliert im kardiovaskulären System unter anderem Gefäßtonus, Gefäßwachstum, Adhäsion von Blutzellen und die Blutgerinnung. NO wird von der NOS aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert, im kardiovaskulären System hauptsächlich durch die eNOS. Es erfolgt eine rasche Verstoffwechslung zu Nitrit und Nitrat. Nitrit spiegelt akute Veränderungen in der eNOS-Aktivität wieder. Es war notwendig, eine Methode zur sensitiven, reproduzierbaren und interaktionsfreien Bestimmung von Nitrit zu entwickeln. Für die Untersuchung des NO-Metabolismus am Tiermodell war keine Methode verfügbar, die ein möglichst kleines Probenvolumen sowie die Bestimmung von Nitrosothiolen im Plasma als auch im Vollblut erlaubt.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Durch die Interaktion von Hämoglobin mit dem bei der FIA verwendeten Griess-Reagenz kann es bei der Bestimmung von Nitritkonzentrationen in plasmatischen Proben zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Die Probenaufarbeitung konnte zur interaktionsarmen Vermessung optimiert werden.
2. Die CLD stellt im Vergleich die Methode mit der höchsten Sensitivität und Reproduzierbarkeit dar. Eine interaktionsfreie Bestimmung von Nitrit und Nitrosothiolen in Plasma und Vollblut ist auch bei einem geringen Probenvolumen möglich. Die gemessenen Nitrit-konzentrationen im wässrigen und plasmatischen Milieu korrelieren signifikant zwischen CLD und FIA.
3. Nitrit konnte unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen im Blut von Säugern nachgewiesen werden. Die Plasmanitritkonzentrationen im Blut der verwendeten Säugetiere liegen im nanomolaren Bereich von 200-800 nmol/l. Die signifikante Erniedrigung der Nitritkonzentration im Plasma von Hypertonikern konnte nachgewiesen werden.
4. Die Untersuchung des NO-Stoffwechsel in EPO-Mäusen hat gezeigt, dass sich die NO-Produktion sowie der Verbrauch von NO in einer erhöhten NOx-Konzentration widerspiegelt. Eine steigende NO-Konzentration wirkt sich positiv auf die Erythrozytenaggregabilität aus.

Die hier dargestellten methodischen Möglichkeiten können in der Diagnostik zur Bestimmung des verfügbaren NO sowie in der Analyse des NO-Metabolismus in verschiedenen Säugetieren verwendet werden. Nitrit stellt ein potentiell Diagnosekriterium bei kardiovaskulären Erkrankungen dar. Die Untersuchung der EPO-Mäuse gibt einen Einblick in die Modulation des kardiovaskulären System durch Erythropoetin und NO und den möglichen Nutzen einer erhöhten NO-Verfügbarkeit.

Düsseldorf, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. med. Kelm