

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

***In vitro* Untersuchungen
zur Bildung, Speicherung und Transport
von NO in humanem Vollblut:
relative Bedeutung von Plasma und Erythrozyt**

Dissertation

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

vorgelegt von
Almut Geßmann
2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Gez.: Univ.-Prof- Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan
Referent.: Kelm
Korreferent: Suschek

Für meine Eltern

Liste der Abkürzungen

β -Cys ⁹³	Cystein 93 der β -Kette des Hämoglobins
ARDS	Akute respiratorische Insuffizienz (acut respiratory distress syndrom)
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
cNOS	Konstitutive NO-Synthase
Ca ₂ ⁺	Calcium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu ⁺	Kupferion (I)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenosin-Dinucleotid
FMN	Flavin-Mononucleotid
GSNO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Deoxyhämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HO·	Hydroxylradikal
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HWZ	Halbwertszeit
IL 1	Interleukin 1
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KOH	Kaliumhydroxid
L-NNA	N ^ω -Nitro-L-Arginin
MetHb	Methämoglobin
mtNOS	NOS-Isoform in Mitochondrien
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
Na ⁺	Natriumion
NADPH	Reduziertes Nicotinamiddinucleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NO ⁻	Nitroxylion
NO ⁺	Nitrosoniumion
NO·	Stickstoffmonoxid (im Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)
NO ₂	Stickstoffdioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOHb	Nitrosylhämoglobin
NOS	NO-Synthase
NOx	Summe der Stickoxide
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PVC	Pulmonalvaskuläre Compliance
RSNO	S-Nitrosothiole
SNOHb	S-Nitrosooxyhämoglobin
TNF	Tumornekrosefaktor

LISTE DER ABKÜRZUNGEN **1**

1	<u>EINLEITUNG</u>	4
1.1	FUNKTION VON STICKSTOFFMONOXID IM HUMANEN KREISLAUF	4
1.2	SYNTHESE VON NO	6
1.3	STOFFWECHSEL VON NO	9
1.4	BILDUNG, TRANSPORT UND SPEICHERUNG VON NO IM ZIRKULIERENDEN BLUT	11
1.4.1	METABOLISMUS VON NO IM PLASMA	11
1.4.2	METABOLISMUS VON NO IM ERYTHROZYTEN	14
1.5	ZIELE DER ARBEIT	17
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	18
2.1	UNTERSUCHUNGSANSÄTZE	18
2.1.1	<i>IN VITRO</i> INKUBATION VON L-ARGININ IN HUMANEM VOLLBLUT	18
2.1.2	<i>IN VITRO</i> INKUBATION VON NO IN HUMANEM VOLLBLUT	20
2.2	PROBENGEWINNUNG UND AUFARBEITUNG	21
2.2.1	BLUTENTNAHME UND PATIENTENKOLLEKTIV	21
2.2.2	SEPARATION VON PLASMA AUS VOLLBLUT	22
2.2.3	PROBENAUFARBEITUNG ZUR BIOCHEMISCHEN ANALYSE	22
2.2.3.1	Probenaufarbeitung zur CLD Vermessung	22
2.2.3.2	Probenaufarbeitung zur HPLC Vermessung	23
2.3	MEßMETHODEN ZUR BIOCHEMISCHEN BESTIMMUNG DER NO-METABOLITE	24
2.3.1	GASPHASEN-CHEMILUMINESZENZDETEKTION	24
2.3.2	HOCHDRUCK-FLÜSSIGKEITS-CHROMATOGRAPHIE	26
2.3.3	HERSTELLUNG WÄSSRIGER NO-STANDARDS	28
2.4	MATHEMATISCH-STATISTISCHE METHODEN	30
3	<u>ERGEBNISSE</u>	31
3.1	NO-SYNTHESE DES VOLLBLUTES	31
3.1.1	NO-SYNTHESE IM VOLLBLUT	31
3.1.2	SPEICHERUNG UND TRANSFER VON ERYTHROZYTÄR GEBUNDENEM NO	34
3.1.3	SÄTTIGUNGSVERHALTEN DER NO-SPEICHER VON VOLLBLUT UND PLASMA	37
4	<u>DISKUSSION</u>	40
4.1	BILDUNG VON NO IM VOLLBLUT	40
4.1.1	NACHWEIS EINER NO-BILDUNG IM VOLLBLUT	43
4.2	NITROSATIVER NO-METABOLISMUS IM ERYTHROZYTEN	46
4.2.1	BIOCHEMISCHER NACHWEIS UND DIFFERENZIERUNG DER S-NITROSOTHIOLE IM ERYTHROZYTEN	48
4.3	PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DER BILDUNG, SPEICHERUNG UND DES TRANSPORTES VON NO IM ERYTHROZYTEN	50

<u>5</u>	<u>AUSBLICK</u>	<u>54</u>
<u>6</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>55</u>
<u>7</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>56</u>
<u>8</u>	<u>LEBENS LAUF</u>	<u>72</u>
<u>9</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>74</u>
<u>10</u>	<u>ABSTRACT</u>	<u>76</u>

1 Einleitung

1.1 Funktion von Stickstoffmonoxid im humanen Kreislauf

Bis zu Beginn der 80er-Jahre wurde die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) hauptsächlich in Zusammenhang mit Toxikologie und Technik gebracht. Furchgott und Zawadzki entdeckten bei Versuchen an isolierten Aortenpräparaten, dass Acetylcholin nur bei intaktem und funktionsfähigem Endothel eine gefäßrelaxierende Wirkung besaß.⁴⁶ Die für dieses Phänomen verantwortliche Substanz wurde als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet.^{34,45,47} Einige Jahre später wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen zeitgleich der Beweis erbracht, dass der vom Gefäßendothel freigesetzte EDRF mit NO identisch ist.^{69,82,122} Seither gilt als gesichert, dass NO als EDRF maßgeblich an der Blutdruckregulation beteiligt ist.¹²²

Inzwischen wurde NO als zentrales Signalmolekül mit einem vielfältigen Wirkspektrum in den unterschiedlichsten Organen und Zellsystemen nachgewiesen. Beteiligt an verschiedenen Stoffwechselprozessen wirkt der intra- und interzelluläre Botenstoff, abhängig von der NO-Konzentration, unter anderem sogar zytotoxisch, aber auch zellprotektiv. NO spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Herz-Kreislaufsystems, im zentralen und peripheren Nervensystem, im Rahmen gastrointestinaler Reflexe, beim Atemwegswiderstand sowie in der Immunabwehr.^{68,113,116,148}

NO wird kontinuierlich vom Endothel freigesetzt. Das relativ lipophile Molekül diffundiert in die glatte Gefäßmuskelzelle, in der es die lösliche Guanylatzyklase aktiviert, die eine Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) in cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) bewirkt. Dies führt zur Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase, wodurch über Phosphorylierungen eine Senkung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration mit nachfolgender Relaxation der Muskelzelle und Dilatation des Gefäßes bewirkt wird.^{36,113,167}

Als stärkster körpereigener Vasodilatator übernimmt NO Aufgaben der Blutdruckregulation und der Homöostase.^{56,83,136} NO inhibiert die Thrombozytenaggregation und Adhäsionen von Blutzellen am Gefäßendothel.^{27,113,125,129} Somit ist der NO-Metabolismus direkt am Pathomechanismus der Arterioskleroseentwicklung beteiligt. Neue Befunde belegen, dass NO sogar die myokardiale Funktion selbst beeinflusst.^{13,22,25,26}

NO bewirkt im zentralen Nervensystem einen Calziueinstrom, wodurch ein Anstieg der Glutamatkonzentration erzielt wird. NO dient als Neurotransmitter und beeinflusst kognitive Fähigkeiten wie das Lernen und die Gedächtnisleistung. Tierversuche zeigen, dass durch Inhibition der NO-Synthese die Leistung des Kurzzeitgedächtnisses stark beeinträchtigt wird.⁷⁷ Bisher wurde eine übermäßige NO-Synthese und der damit einhergehende Zelltod (Apoptose) als Ursache der Demenz verantwortlich gemacht. Im Alter nimmt jedoch die NO-Produktion ab,¹¹⁸ womit sich die Demenz als Folge verminderter Signalübertragung erklären ließe.¹⁴² Im peripheren Nervensystem wirkt NO zusätzlich bei der Vermittlung von Schmerzreizen mit.⁸⁵ Über Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur werden Sphinktertonus, Magenentleerung und Peristaltik des Gastrointestinaltraktes reguliert.^{60,105} Eine verminderte NO-Synthese wird im Zusammenhang mit diabetischer Gastropathie und infantiler Pylorusstenose diskutiert.^{159,163} Auch die Atemwegswiderstände sind über die Tonusregulation des Bronchialsystems NO-abhängig.¹¹³

Im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr produzieren aktivierte Makrophagen große Mengen an NO.¹⁵⁷ Dieses wirkt zytostatisch oder zytotoxisch auf Mikroorganismen, wie zum Beispiel Viren, Bakterien oder Pilze.^{37,42,117} Somit besitzt NO einen antiinfektiösen, also zellprotektiven Effekt. Bakterien schützen sich vor dem toxischen Agens, indem sie Hämoglobin als NO-Fänger verwenden.^{44,48,111}

Der NO vermittelte Effekt in Bezug auf das Tumorzellwachstum wird kontrovers diskutiert. Einerseits wirkt NO zytostatisch auf bestimmte Tumorzelllinien, andererseits fördert es durch induzierte DNA-Schäden die Entwicklung von Tumoren.^{66,91,92,117,172}

Bei aktiviertem Immunsystem werden durch exzessive Biosynthese mitunter extrem hohe NO-Konzentrationen erreicht, die zu schwerwiegenden Schäden

führen können. Hierzu zählt insbesondere die toxische Wirkung von NO beim septischen Schock, die eine Vasodilatation und möglicherweise eine myokardiale Dysfunktion verursacht.^{68,89,112,120,143,148,158} In diesem Zusammenhang nimmt man an, dass die hypotensiven Phasen im Sepsisverlauf durch massive NO-Synthese nach endotoxinbedingter Aktivierung des Endothels entstehen. Auch wird eine zytotoxische Wirkung bei Reperfusion nach Apoplex diskutiert. Weitere Studien belegen, dass der Zellschaden bei Herpes-simplex-Enzephalitis ebenfalls durch NO ausgelöst wird.¹¹⁰ UVA-induzierte Hautschäden, wie Ödembildung, Hautalterung und entzündliche Prozesse stehen wahrscheinlich auch in Zusammenhang mit einer gesteigerten NO-Verfügbarkeit.¹²³

Die oben genannten kontroversen Ansichten bezüglich der NO-Wirkung kommen dadurch zustande, dass die NO-Effekte in Abhängigkeit von der NO-Konzentration noch nicht eindeutig geklärt werden konnten. Deutlich wird, dass es sich um ein lebenswichtiges Molekül handelt, welches an einer Vielzahl von Stoffwechselprozessen in Physiologie und Pathophysiologie beteiligt ist.

1.2 Synthese von NO

NO wird von der NO-Synthase gebildet, welche die Reaktion von L-Arginin zu Citrullin und NO katalysiert.^{68,95,113,121} Dabei entsteht in einem ersten Schritt aus L-Arginin unter Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch das Zwischenprodukt N-Hydroxyarginin (siehe Abbildung 1). Im zweiten Schritt kommt es, ebenfalls unter Verbrauch von NADPH und molekularem Sauerstoff, zur Bildung von NO und L-Citrullin. Man nimmt an, dass an diesem Oxidationsschritt die Cytochrom-P₄₅₀ verwandte Hämgruppe der NO-Synthase beteiligt ist.^{65,128} An der Synthese sind die Kofaktoren NADPH, Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) beteiligt.⁹⁵ Diese spielen eine wichtige Rolle beim Elektronentransport von NADPH zum Hämkomplex. Eine Reihe von L-Arginin-Analoga, einschließlich D-Arginin, können nicht als Substrat verwendet werden. N⁰-Nitro-L-Arginin (L-NNA) hat sich als stereospezifischer Hemmstoff der NO-Synthase bewiesen.^{121,136} L-Arginin wird

über die Nahrung aufgenommen oder kann, vorrangig im proximalen Nierentubulus, aus L-Citrullin gebildet werden.¹⁶⁹

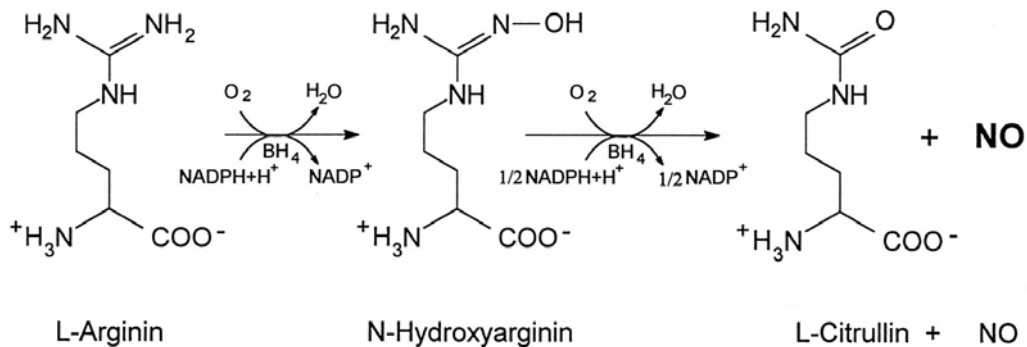


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Biosynthese von NO. Dabei wird oxidoreduktiv die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO umgesetzt. Diese Reaktion wird von der NO-Synthase katalysiert. Als Kofaktoren sind Tetrahydrobiopterin (BH₄) und NADPH an der Reaktion beteiligt. Für die fünf-Elektronenoxidation des L-Arginins werden 1,5mol NADPH als Lieferant für drei Elektronen und zwei Elektronen aus molekularem Sauerstoff benötigt.

Mehrere Isoenzyme der NO-Synthase sind heute bekannt, deren Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind.^{104,113,114,145} Grundsätzlich wurde zwischen konstitutiver (cNOS) und induzierbarer (iNOS) NOS-Form unterschieden. Konstitutiv bedeutet, dass diese NO-Synthase unter normalen physiologischen Bedingungen exprimiert wird. Die induzierbare NOS-Form wird im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr durch Stimulation von Geweben oder Zellen mit Zytokinen aktiviert.

Zwei konstitutive NO-Synthasen sind bekannt, die neuronale NOS (nNOS oder NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS III). Die konstitutiven NOS-Formen sind membrangebunden, produzieren NO in nanomolaren Konzentrationen und sind Calcium (Ca²⁺) und Calmodulin abhängig. Die induzierbare NOS (NOS II) ist im Zytosol lokalisiert, synthetisiert NO in mikromolaren Bereichen und ist Calcium und Calmodulin unabhängig. Inzwischen muss davon ausgegangen werden, dass in bestimmten Zelltypen auch eine konstante Expression der iNOS stattfindet.¹¹⁶

Daher ist man dazu übergegangen in Calcium und Calmodulin abhängige (cNOS) und unabhängige (iNOS) Formen zu unterscheiden.¹¹⁷ Diese Einteilung begründet sich in der unterschiedlichen Affinität für Calmodulin.

Bei normaler intrazellulärer Calciumkonzentration (30-70nM) ist Calmodulin an die iNOS gebunden. Ein intrazellulärer Calciumanstieg auf ca. 1µM bewirkt eine Calmodulinbindung an die cNOS und somit die Aktivierung des Enzyms. Auslöser sind hierbei extrazelluläre Signale wie Steigerung der Scherkräfte oder Freisetzung von Acetylcholin, Histamin, Bradykinin, Substanz P und Serotonin.¹⁵ Die NOS-Isoformen konnten neben den Geweben, in denen sie erstmalig nachgewiesen und nach denen sie benannt worden sind (Endothel, Neurone, Makrophagen), inzwischen auch in vielen anderen Geweben identifiziert werden. So wird die nNOS zusätzlich im Skelettmuskel und im respiratorischen Endothel exprimiert.^{4,115} Die Isoform der eNOS wurde auch in Kardiomyozyten, in Thrombozyten, in Neuronen und in Epithelzellen der Lunge sowie in der Niere gefunden.^{146,149} Die iNOS ist in vielen Zellen, wie zum Beispiel in Makrophagen, Epithelzellen, Muskelzellen, Kardiomyozyten und mesangialen Zellen nachgewiesen worden.¹⁵⁷

Alle genannten NOS-Isoformen haben eine vergleichbare Aktivität von $1\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{Protein}$.³⁵ Die bei immunologischen und inflammatorischen Prozessen bekannte hohe NO-Ausschüttung von Makrophagen begründet sich in einer extrem hohen Enzymexpression der iNOS. Diese kann von 0,005% bis auf 1% des Zellproteingehaltes ansteigen.¹¹⁷ Stimulierend wirken Lipopolysaccharide sowie bestimmte Zytokine wie der Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin 1 (IL 1). Inhibiert wird die iNOS nicht nur durch stereospezifische Inhibitoren und Arginin-Analoga, sondern auch durch Glukokortikoide. Neuere Studien konnten eine weitere NOS-Isoform in Mitochondrien (mtNOS) identifizieren.^{50,52} Diese ist Ca^{2+} abhängig und scheint an der Regulation des pH, beim Membranpotential und an der Zellatmung beteiligt zu sein.⁵⁰

Eine Übersicht über die verschiedenen Formen der NO-Synthasen ist in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Charakteristika der NO-Synthese der verschiedenen Isoformen

	NOS-I	NOS-II	NOS-III
Synonyme	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)
Expression	konstitutiv	induziertbar	konstitutiv
Ca²⁺ / Calmodulin Abhängigkeit	ja	nein	ja
Enzym-Lokalisation	Zellmembran	Zytosol	Zellmembran
Konzentration der NO-Freisetzung	nM	µM	nM
Kinetik	Sekunden	Stunden	Sekunden
Chromosomlokalisierung (Mensch)	12	17	7
Vorkommen	ZNS/PNS Skelettmuskulatur pulmonale Endothel- und Epithelzellen	Makrophagen glatte Muskulatur Kardiomyozyten Hepatozyten mikrovaskuläre Endothelzellen mesangiale Zellen	Endothelzellen Thrombozyten Kardiomyozyten renale/pulmonale Epithelzellen

1.3 Stoffwechsel von NO

NO ist ein farbloses, paramagnetisches Gas, welches, durch sein ungepaartes Elektron bedingt, hohe Reaktivität und Radikalcharakter besitzt.^{55,63} Der NO Metabolismus wird durch verschiedenste Faktoren bestimmt: pH, pO₂, Konzentrationen von Superoxidanionen, Hydroxylradikalen, Hämoglobin sowie durch die Enzymaktivität der Superoxiddismutase, Katalase, Guanylatzyklase und Cytochrom P₄₅₀.

Seine vielfältigen biologischen Funktionen (siehe Kapitel 1.1) werden durch die Kombination zweier Eigenschaften ermöglicht: NO kann zum einen chemische (kovalente) Bindungen mit dem Rezeptormolekül eingehen, zum anderen kann es als lipophiles Molekül frei durch die Zellmembranen diffundieren. Die Diffusionskonstante von NO beträgt 3300µm²/sec.¹⁰⁰ Daher müssen Synthese-

und Wirkort nicht unbedingt beieinander liegen. Vielmehr kann NO signifikante Entfernungen überwinden, bevor es seine Zielzelle erreicht.⁹³ Währenddessen kann es mit molekularem Sauerstoff zu höheren Stickoxiden (NO_2 und N_2O_3) reagieren. Diese reagieren entweder weiter mit anderen Molekülen wie Thiolen und Aminen oder werden zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) hydrolysiert. Wichtige Komponenten, die neben Sauerstoff am Abbau von NO beteiligt sind, sind Superoxidanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$).^{7,8} Diese werden im Gefäßsystem hauptsächlich von Endothelzellen und Makrophagen gebildet.⁷

Die verschiedenen Reaktionskinetiken von NO sowie die wechselnden Konzentrationen dieser Sauerstoffradikale führen zu uneinheitlichen Daten über den NO-Abbau *in vivo*.^{7,8} Superoxidanionen sind hier besonders hervorzuheben, da sie von Endothelzellen zum einen selbst synthetisiert, zum anderen aber auch von diesen durch die zelleigene Superoxiddismutase inaktiviert werden können.^{59,76,90} Dabei wird NO unter Bildung von Peroxinitrit (ONOO^-) abgebaut. Diese Reaktion verläuft mit fast diffusionslimitierter Geschwindigkeit ($6,7 \cdot 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Peroxinitrit selbst besitzt ein hoch zytotoxisches Potential.^{7,70} Sowohl Proteine, Lipide, Kohlenhydrate als auch Organellen und andere Zellsysteme werden chemisch verändert oder denaturiert.^{9,127,147} Hydroxylradikale, welche aus einer Reaktion mit H_2O_2 hervorgehen, führen ebenfalls zu einer Inaktivierung von NO. Während bei Reaktionen von NO mit Sauerstoff als Hauptabbauprodukt Nitrat entsteht, entsteht bei der Reaktion mit Hydroxylradikalen zu großen Anteilen Nitrit. Der größte Anteil des intravaskulär gebildeten NO wird zu Nitrat abgebaut. Der NO-Metabolismus und die Reaktionskinetik sind *in vivo* sowohl von den unterschiedlichen Konzentrationen der zur Verfügung stehenden Reaktionspartner als auch von den Bedingungen, unter denen NO freigesetzt wird, abhängig.^{14,79,93}

In wässriger Lösung ist Nitrit das Hauptabbauprodukt von NO. Die Halbwertszeit (HWZ) von NO ist umgekehrt proportional zur NO-Konzentration und daher kein konstanter Wert.⁴⁰ In wässrigen Phasen wurde die HWZ abhängig vom pH-Wert mit 3,8 bis 6,2sec. bestimmt.⁸⁰

Das in den Endothelzellen gebildete NO kann nach luminal oder nach abluminal freigesetzt werden. Bei Diffusion nach abluminal (Muskelzelle) wird der

biologische Effekt entweder über die Aktivierung der Guanylatzyklase vermittelt (siehe Kapitel 1.1) oder über die Reaktion mit sauerstoffabhängigen Radikalen (siehe oben) erzielt. Dagegen hängt der Metabolismus des nach luminal (Gefäß) freigesetzten NO von den Reaktionen mit den einzelnen Kompartimenten des Blutes ab. Das Vollblut gliedert sich in die zwei wesentlichen Bestandteile Blutzellen und Blutplasma. Insbesondere die Erythrozyten nehmen im intravaskulären NO-Metabolismus eine entscheidende Rolle ein, da das intraerythrozytäre Hämoglobin den Hauptanteil von NO zu Nitrat abbaut (siehe Kapitel 1.4.2).^{30,135} Im Plasma wird NO primär zu Nitrit oxidiert. Ferner kann NO im Plasma mit redox-aktiven Nukleophilen zu Nitrosothiolen reagieren. Diese können NO zu einem späteren Zeitpunkt wieder freisetzen und stellen somit ein Zwischen- oder Speicherprodukt von NO dar (siehe Kapitel 1.4.1).

1.4 Bildung, Transport und Speicherung von NO im zirkulierenden Blut

Der biologische Effekt von NO, der maßgeblich von der vorhandenen NO-Konzentration abhängt, wird durch seine Synthese und seinen Abbau bestimmt. Diese Mechanismen werden durch weitere Faktoren, wie zum Beispiel der Diffusion und der Distanz, vom Ort der Synthese zum Wirkort beeinflusst. Die verschiedenen biochemischen Reaktionen in den einzelnen Kompartimenten des Blutes bestimmen dabei den Metabolismus. Dabei sind besonders das Blutplasma und die Erythrozyten hervorzuheben. Deren physiologische Relevanz am NO-Metabolismus soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.4.1 Metabolismus von NO im Plasma

Da Stickstoffmonoxid mit diffusionslimitierter Geschwindigkeit mit dem erythrozytären Hämoglobin reagiert, wurde dem Plasma lange Zeit keine bedeutende Rolle im NO-Stoffwechsel zugesprochen.

Das endothelial gebildete und nach luminal freigesetzte NO tritt als erstes mit Plasma in Kontakt, da der Gefäßbrandstrom frei von Erythrozyten ist.^{97,98,99,164} Im Plasma wird NO zum Großteil über Distickstofftrioxid zu Nitrit abgebaut. Nitrit

bleibt im Plasma für einige Stunden stabil. Die HWZ im Vollblut beträgt nur 110 Sekunden, da es im Erythrozyten schnell zu Nitrat hydrolysiert wird, welches eine HWZ von 5-8 Stunden aufweist.^{58,81,126} Nitrat stellt das vasoinactive Endprodukt des hämatogenen Stoffwechsels dar. Jedoch bestehen erste Hinweise, dass Nitrat durch UV-Einwirkung in Abhängigkeit von plasmatischen Thiolen wieder zu NO reduziert werden kann. Somit könnte eine nicht-enzymatische NO-Bildung im Plasma existieren.²⁸

Am Beispiel der humanen Unterarmzirkulation konnten Rassaf et al. zeigen, dass NO nicht nur lokal, sondern auch systemisch wirkt.^{132,134} Dabei war die kontralaterale vasoaktive Wirkung deutlich länger als es die HWZ von NO erwarten ließ. Dieser Effekt kann durch die Bildung bioaktiver Intermediate erklärt werden. NO kann im Plasma mit redox-aktivierten Thiolen zu S-Nitrosothiolen (RSNO) reagieren.^{102,151}

Albumin bildet mit einer Konzentration von 0,5-1mM den Hauptanteil der Plasmaproteine.^{72,84,103,132,151,152,153} Daneben findet man ca. 4 μ M Glutathion⁸⁸ und ca. 200 μ M Cystein.¹⁵⁴ Albumin besitzt eine freie Sulfhydrylgruppe an der Nitrosierungsreaktionen stattfinden können. Wie die Nitrosierungsreaktionen im Detail ablaufen ist noch unklar. Es ist denkbar, dass NO mit den Thiolen unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart eines Elektronenakzeptors direkt reagiert.⁵⁴ Möglicherweise entstehen aber auch Zwischenprodukte wie Distickstofftrioxid,¹⁷¹ Nitrosoniumionen (NO⁺),^{12,23} oder Peroxinitrit.¹⁶⁶

Zunehmend wird klar, dass die bei diesen Reaktionen gebildeten RSNO bioaktive Speicher- und Transportformen des NO-Stoffwechsels darstellen.^{34,151,152} Man vermutet, dass aus diesen bei Bedarf NO, NO⁺ oder Nitroxylionen freigesetzt werden können.^{71,154} NO reagiert mit Plasmathiolen unter Bildung von fast ausschließlich S-Nitrosoalbumin (0,25-7 μ M),^{84,132} während kaum S-Nitrosoglutathion (0,02-0,2 μ M)^{17,33} oder S-Nitrosocystein (0,2-0,3 μ M)^{17,141} im menschlichen Blut entsteht.¹³² Die *in vitro* ermittelten HWZ der RSNO im Plasma sind von den Reaktionsbedingungen abhängig. Sie liegen zwischen 15-40min (S-Nitrosoalbumin),^{7,17,151,152} 8min (S-Nitrosoglutathion)^{17,33} und <1min (S-Nitrosocystein).^{17,141} Die um ein Vielfaches längeren HWZ der S-Nitrosothiole sind mit der Funktion eines physiologisch bedeutenden NO-Lieferanten vereinbar.

Zu klären bleibt, inwieweit die *in vitro* ermittelte plasmatische HWZ der *in vivo* ermittelten HWZ im Vollblut entspricht.

Über mehrere Mechanismen können S-Nitrosothiole *in vitro* abgebaut werden. Durch Zerfall der RSNO entstehen Transnitrosierungsvorgänge. Dabei bindet das aus Nitrosothiolen freigesetzte NO erneut an Thiole. Solche Transfere finden häufig von stabilen Thiolen, wie zum Beispiel dem S-Nitrosogluthation oder SNO-Albumin, zu relativ labilen Thiolen wie dem S-Nitrosocystein statt.¹⁴¹ So scheinen stabile Nitrosothiole Speicher für niedrigmolekulare RSNO darzustellen. Diese wirken entweder direkt oder über das in Gegenwart von Kupfer freigesetzte NO.^{72,141,151}

Kupferionen wie Cu^{2+} und Cu^{1+} , welche im menschlichen Organismus in großen Mengen vorliegen, führen unter Bildung von Disulfiden und NO zum Abbau von Nitrosothiolen.¹ Da Ascorbinsäure Kupfer reduziert, fördert es indirekt den Nitrosothiolabbau. In hohen Konzentrationen agiert es zusätzlich als Nukleophil und greift die Stickstoffgruppe direkt an, so dass eine NO-Abspaltung erfolgt.⁶⁷ Ob die S-Nitrosothiole *in vivo* über die gleichen Mechanismen abgebaut werden, ist noch nicht abschließend geklärt. Anzunehmen ist, dass der Hauptabbauweg über Kupfer stattfindet. Zusätzlich könnte ein photochemischer Abbau von Bedeutung sein. Lichtempfindliche Moleküle aus den glatten Muskelzellen der Gefäße sollen nach UV-Bestrahlung NO freisetzen können. Im Dunkeln scheinen sich diese Speicher durch endothelial gebildetes NO wieder aufzufüllen.¹⁰⁷ Insgesamt ist der Nitrosothiolfstoffwechsel noch nicht ausreichend erforscht. So sind noch viele Fragen bezüglich der RSNO-Bildung, der Stabilität (HWZ im Vollblut), des Transportes sowie der bedarfsgerechten NO-Abgabe offen.¹⁵⁴ Es ist anzunehmen, dass dem Blutplasma, durch Bildung bioaktiver NO-Zwischenprodukte, die Funktion der Vermittlung und Modulation des Austausches von bioaktivem NO zwischen den Blutzellen, insbesondere den Erythrozyten, und dem Gefäßendothel zukommt. Damit würde es wichtige blutflussregulierende Aufgaben übernehmen.⁷⁸ Neben der Reaktion von NO zu Nitrosothiolen findet die oxidative Umsetzung zu Nitrit statt.

Die extrem kurze HWZ von NO und die schnelle oxidative Umsetzung zu Nitrit machen eine direkte NO-Bestimmung im Vollblut bisher unmöglich.¹⁶² In verschiedenen Studien konnte inzwischen erwiesen werden, dass die

Nitritkonzentration im Plasma einen Index für die endogene NOS Aktivität darstellt. In *in vivo* Versuchen am Unterarm konnten Lauer et al. zeigen, dass die intravenöse Applikation von Acetylcholin beziehungsweise Bradykinin zu einer Stimulation der endothelialen NO-Synthase führte. In gleichem Maße stieg die Nitritkonzentration des Plasmas an.⁹⁴ Kleinbongard et al. zeigten, dass Nitrit im Plasma von verschiedenen Säugetieren ähnliche Konzentrationen aufweist. Applikationen von NOS-Inhibitoren führten bei allen Tieren zu einem Abfall der Nitritkonzentration um 80%. Gleichzeitig nahm der Gefäßwiderstand zu. Die direkte Abhängigkeit der Nitritkonzentration von der NOS-Aktivität zeigt, dass Nitrit als universeller Marker in Säugern akzeptiert werden kann.⁸⁷

Die Nitratkonzentration ist neben dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel noch von anderen Faktoren abhängig. Nitrat wird über die Nahrung oder auch durch Inhalation von Nitrogen-Oxiden aufgenommen. Bei kataboler Stoffwechsellage kann Nitrat via Nitratreduktase zu Nitrit umgesetzt werden. Auch die Leber- und Nierenfunktion nehmen Einfluss auf die Regulation der Nitratkonzentration. So kann die tägliche Nitratkonzentration der Nahrungsaufnahme über der Nitratsynthese des Körpers liegen. Nitrat oder die Summe aus Nitrit und Nitrat (NO_x) würde also nur unter kontrollierten Bedingungen einen sinnvollen Parameter der NO-Verfügbarkeit darstellen. In Frage käme auch eine Nitratbestimmung bei Sepsis. In dieser Stoffwechsellage ist die iNOS-Aktivität stark gesteigert, so dass die endogene Nitratproduktion deutlich über der exogenen Nitratzufuhr liegt.

1.4.2 Metabolismus von NO im Erythrozyten

Im Folgenden wird, nach Umriss der erythrozytären Struktur, auf den NO-Metabolismus im Erythrozyten und dessen Bedeutung eingegangen. Abschließend wird der Wissensstand über die mögliche Existenz einer NO-Synthase im Erythrozyten dargestellt.

Erythrozyten sind einfach gebaute Zellen. Sie besitzen weder Zellkern noch Organellen und werden durch eine Plasmamembran begrenzt. Erythrozyten beinhalten das Protein Hämoglobin in hohen Konzentrationen. Dieses besteht aus vier Untereinheiten mit je 2 α - und 2 β - Polypeptidketten, die, über eine

eisenhaltige Hämgruppe, Sauerstoff reversibel binden können. Neben dem O₂-/CO₂-Transport sind die Erythrozyten an der Aufrechterhaltung des Säure-Basenhaushaltes beteiligt und spielen eine wichtige Rolle im NO-Stoffwechsel.

Erythrozyten wurden lange als „NO-Falle“ angesehen, da NO durch die Reaktion mit Hämoglobin in großen Mengen inaktiviert wird. Diffusion und Inaktivierung im Erythrozyten erscheinen jedoch, je nach membranärer und zytosolischer Lokalisation, nicht einheitlich.^{98,99} Drei möglichen Reaktionen von NO mit Hämoglobin sind im Erythrozyten bekannt: Erstens entsteht bei der Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin (HbO₂) Methämoglobin (MetHb) und Nitrat. Zweitens kann Nitrosylhämoglobin (NOHb) aus NO und Deoxyhämoglobin gebildet werden. Drittens kann NO durch Bindung an das Cys-93 der β-Kette des Hämoglobins im Rahmen einer Nitrosierungsreaktion S-Nitrosohämoglobin (SNOHb) bilden.⁵⁷ Jia et al. stellten 1996 eine Hypothese auf, nach der Hämoglobin prinzipiell in zwei verschiedenen Strukturformen vorliegen kann. Dies ist einerseits die R-Form mit hoher O₂-Affinität und andererseits die T-Form mit niedriger O₂-Affinität. Nach Sauerstoffanlagerung an das Hämoglobin in der Lunge (R-Form) kommt es zur Bindung von NO an das Cys-93 und somit zur Bildung von SNOHb. In der Peripherie hingegen wird Sauerstoff verbraucht, wodurch die Hämoglobinstruktur allosterisch zur T-Form konfiguriert wird. Hierbei wird NO frei.^{71,150} Genauso ist Methämoglobin der T-Form ähnlich. Dementsprechend führen SNO-Methämoglobin und SNO-Deoxyhämoglobin aufgrund der Hb-Strukturänderung zu einer NO-Freisetzung. Diese führt zur Vasodilatation und zur Oxygenierung des Gewebes. Hingegen wirken SNO-Oxyhämoglobin und natives Hämoglobin durch Abfangen von endotheliale NO vasokonstriktiv.⁷¹ Das aus S-Nitrosohämoglobin freigesetzte NO scheint die Thrombozytenaggregation zu hemmen.^{124,125}

Die Untersuchungsergebnisse von Jia et al. zeigten am Beispiel von S-Nitrosohämoglobin, dass Erythrozyten über S-Nitrosothiole verfügen. Unklar bleibt, ob Erythrozyten noch über andere mögliche NO-Speicherformen verfügen und inwieweit ein NO Austausch zwischen Erythrozyt und Plasma existiert. Postuliert wird, dass Erythrozyten über einen in der Plasmamembran lokalisierten AE1-Transporter verfügen. Dieser schleust NO über verschiedene Bindungen in den Extrazellularraum.¹²⁴ Lange wurde angenommen, dass Nitrit als primäres

Abbauprodukt von NO einen rein inaktiven Stoffwechselmetaboliten darstellt. Seit kurzem gibt es Hinweise, dass über eine aktive Nitritreduktase im Erythrozyten NO aus Nitrit freigesetzt werden kann.²⁸ Mögliche Mechanismen einer Konversion und Speicherung von NO sind: 1. die Kooxidation von NO und Oxyhämoglobin, 2. die Bildung von Nitrosylhämoglobin ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-NO}$) und S-Nitrosohämoglobin ($\beta\text{-Cys-93-SNO}$), jeweils im Erythrozyten, 3. die Anlagerung von NO an freie Schwefelgruppen von plasmatischen Proteinen unter Bildung von S-Nitrosothiolen und 4. die Oxidation zu Nitrit.

Insgesamt bleibt die Frage offen, ob das erythrozytär freigesetzte NO allein aus den NO-Speichern stammt, oder ob die Erythrozyten vielleicht sogar selbst in der Lage sind NO zu bilden. Die in der Literatur bestehenden Hinweise auf eine erythrozytäre NO-Synthase sind sehr widersprüchlich: Deliconstantinos et al. beschrieben eine im Zytosol lokalisierte erythrozytäre NOS. Möglicherweise hatte die Stimulation durch Calcium und Wasserstoffperoxid in hohen Konzentrationen jedoch eine nicht enzymatische NO-Freisetzung bewirkt.²⁹ Bei Versuchen zu einer in der Erythrozytenmembran lokalisierten NOS fand sich bisher keine Aktivität.¹¹ Die über eine Säule separierte Fraktion von solubilisierten Erythrozytenmembranen wies hingegen eine Aktivität auf.¹¹ Nach Stimulation der Erythrozyten mit L-Arginin konnte ein gesteigerter Umsatz zu L-Citrullin im Hämolysat, nicht aber im Überstand, festgestellt werden. Demnach wurde ein NO-Austausch zwischen Erythrozyt und Plasma ausgeschlossen.²⁰ Kang et al. widerlegten sogar die Existenz einer aktiven NOS.⁷⁵ Der Proteinnachweis der erythrozytären NOS wird daher entweder als inaktives Protein oder als katalytisches Enzym interpretiert.

Obwohl eine Steigerung der NO-Bildung in unterschiedlichen Ansätzen zu beobachten war, ist unklar, ob die erythrozytäre NO-Freisetzung tatsächlich auf einer NOS-Aktivität oder der Freisetzung von erythrozytär gebundenem NO beruht, da innerhalb einer Versuchsserie keine Stimulation und Inhibition des Enzyms durch L-Arginin und NOS-Inhibitoren erreicht werden konnte.¹⁰⁹ Hinzu kommt, dass Verunreinigungen mit Leukozyten nicht ausgeschlossen werden können und der Proteinnachweis anfechtbar ist.

Zusammenfassend konnten die bisherigen Daten keine ausreichende Evidenz für eine basale erythrozytäre NO-Bildung erbringen.

1.5 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der Blutkompartimente im L-Arginin-NO-Stoffwechsel auf ihre Relevanz untersucht werden. Insbesondere sollte untersucht werden, ob eine NO-Synthase im Vollblut existiert. Inzwischen ist bekannt, dass neben den NO inaktivierenden Reaktionen mit Hämoglobin auch bioaktive NO-Verbindungen (HbNO, SNOHb) existieren (siehe Kapitel 1.4.2). Daher sollten in dieser Arbeit die erythrozytären NO-Speicher quantifiziert und der mögliche NO-Transport zwischen Erythrozyt und Plasma untersucht werden.

Die Ziele lassen sich somit zusammenfassen:

1. Wird NO im Vollblut durch eine NOS synthetisiert?
2. Speichert der Erythrozyt NO und findet ein Austausch von bioaktivem NO zwischen dem erythrozytären und dem plasmatischen Blutkompartiment statt?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsansätze

2.1.1 *In vitro* Inkubation von L-Arginin in humanem Vollblut

Die NO-Bildung des Vollblutes sollte unter physiologischen Bedingungen nach Inkubation mit L-Arginin untersucht werden. L-Arginin wird von der NO-Synthase unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgesetzt (siehe Kapitel 1.2). Eine Zunahme der NO-Konzentration nach L-Arginin Inkubation, würde auf das Vorhandensein einer NO-Synthase der Blutzellen hinweisen.

Nach Gewinnung von Vollblut (A) und Plasma (B) (siehe Kapitel 2.2.1/ 2.2.2) wurden den Versuchsansätzen jeweils drei Aliquots entnommen. Diese wurden mit je einer der folgenden Substanzen zu einer Endkonzentration von 3mM versetzt (siehe Abbildung 2):

1. L-Arginin (Sigma, Steinheim, Deutschland), welches der NOS als Substrat dient.
2. D-Arginin (Sigma, Steinheim, Deutschland), ein von der NOS nicht verwertbares Stereoisomer.
3. N^ω-Nitro-L-Arginin (L-NNA, St. Louis, USA), einem spezifischen NOS-Hemmer.

Dem dritten Ansatz wurde nach L-NNA Inkubation L-Arginin hinzugefügt, um die Inhibition nachzuweisen. PBS Ansätze zur Kontrolle wurden ebenfalls mitgeführt. Die Proben wurden für dreißig Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation und die Entnahme des Überstandes (siehe Kapitel 2.2.2). Im plasmatischen Überstand

wurde die Nitritkonzentration der einzelnen Proben mit der Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.1/ 2.3.1).

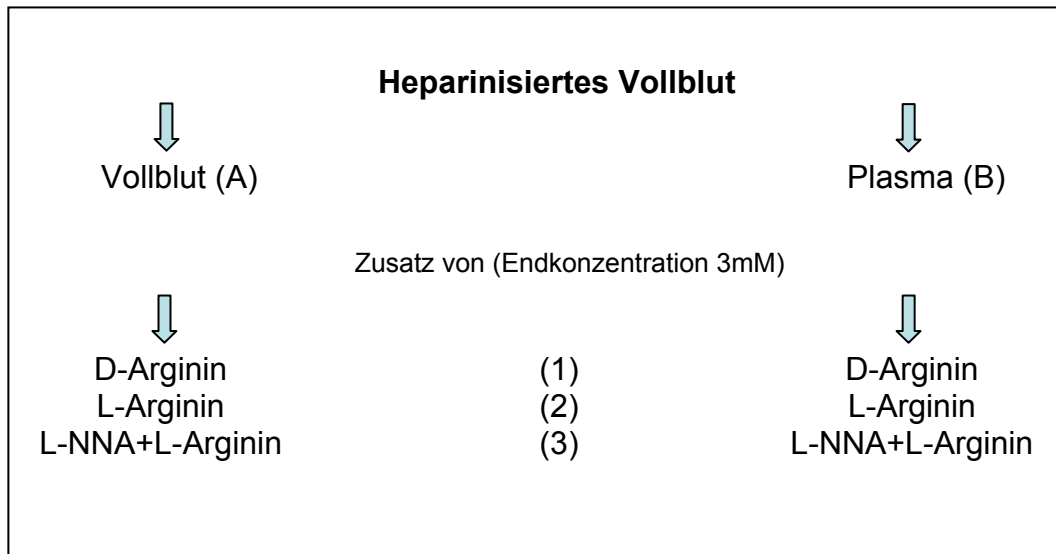


Abbildung 2: Schema des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Nitritkonzentration von Vollblut (A) und Plasma (B). Den zwei Ansätzen wurden je drei Aliquots entnommen, von denen der erste mit L-Arginin (dient der NOS als Substrat), der zweite mit D-Arginin (von der NOS nicht verwertbar), der dritte zuerst mit L-NNA (ein NOS Inhibitor), danach zusätzlich mit L-Arginin inkubiert wurde. Nach 30-minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad wurde Nitrit via CLD im Plasma bestimmt.

2.1.2 *In vitro* Inkubation von NO in humanem Vollblut

Die erythrozytäre NO-Speicherung sollte differenziert und der mögliche NO-Transport zwischen Erythrozyt und Plasma näher untersucht werden.

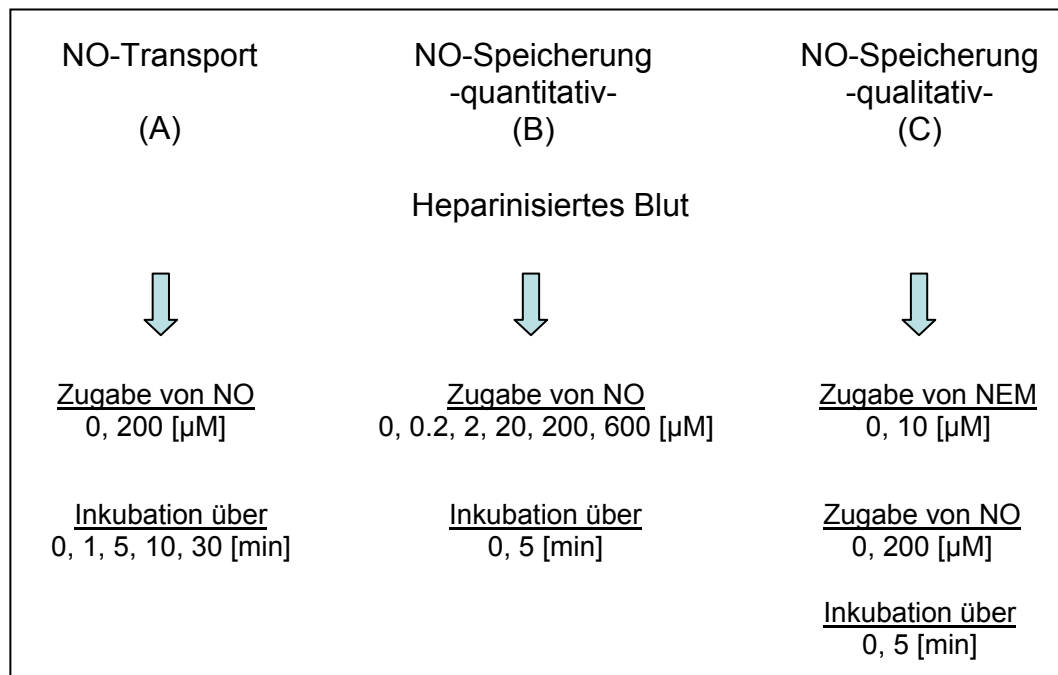


Abbildung 3: Zielsetzungen und Schemata von Versuchen, deren Grundlage die Inkubation von Vollblut mit authentisch hergestellter NO-Lösung darstellt. Nach Inkubationsende wurden die NO-Metabolite via CLD und HPLC bestimmt.

Der Versuchsaufbau gliedert sich in drei Teile (A, B, C) mit verschiedenen Zielsetzungen. Im Teil (A) wurde eine mögliche NO-Diffusion zwischen Erythrozyt und Plasma untersucht, die Schwerpunkte der Teile (B) und (C) beziehen sich auf die erythrozytäre NO-Speicherung. Im Teil (B) wurden die NO-Speicher durch NO-Zusatz moduliert, um eine Sättigung abschätzen zu können, im Teil (C) sollten durch Blockade der SH-Gruppen die erythrozytären NO-Speicher differenziert werden (siehe Abbildung 3). Grundsätzlich wurde heparinisiertes Vollblut mit authentisch hergestellter NO-Lösung inkubiert (siehe Kapitel 2.3.3).

Im Versuchsteil (A) wurde der Probe eine definierte Menge von 200 μM NO

(Endkonzentration) hinzugefügt und diese über eine Zeitreihe von 1, 5, 10 und 30 Minuten inkubiert. Nach Inkubationsende wurden die NO-Metabolite separat im Plasma und im Vollblut bestimmt (siehe unten). Um die NO-Speicherung quantitativ zu erfassen (Teil B), wurde das Vollblut mit authentischer NO-Lösung zu Endkonzentrationen von 0,2, 2, 20, 200, 600 μM versetzt. Im Versuchsteil (C) wurde einer der zwei Ansätze zuvor mit N-Ethylmaleimid (NEM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert, bevor sich nach Zugabe von NO eine fünfminütige Inkubation anschloss. N-Ethylmaleimid alkyliert freie Sulfhydrylgruppen der Thiole, diese stehen dann der Bildung neuer S-Nitrosothiole nicht mehr zur Verfügung. Weitere Transnitrosierungen als auch Abbaureaktionen der Nitrosothiole wurden so verhindert.^{102,144}

In den Versuchsteilen wurden folgende Kontrollen mitgeführt: (A) ohne Zugabe von NO, ohne Inkubation, (B) ohne Zugabe von NO, ohne Inkubation, (C) ohne Zugabe von NEM, ohne Zugabe von NO, ohne Inkubation. Diese wurden bei 4°C im Dunkeln bis zur Vermessung zwischengelagert. Die Proben wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert.

Bei allen Versuchsteilen fanden die Bestimmungen von Nitrit, RSNO bzw. X-NO und Nitrat sowohl im Plasma als auch im Vollblut statt. Dazu wurde nach Beendigung der NO-Inkubation zur Gewinnung des Plasmas die Hälfte der jeweiligen Vollblutprobe zentrifugiert (800xg mit auslaufendem Rotor, 4°C, 20min).

2.2 Probengewinnung und Aufarbeitung

2.2.1 Blutentnahme und Patientenkollektiv

Die Blutentnahme erfolgte morgens an gesunden, nüchternen Probanden im Alter zwischen 20 und 30 Jahren mit einem Body mass index zwischen 22 und 25. Alle Probanden waren Nichtraucher. Unter normoxischen Bedingungen wurde aus der Vena mediana cubiti zur Vermeidung von shear stress und Hämolyse das Blut ungestaut über eine Butterfly-Nadel (Innendurchmesser 0,8mm, ABBOT, Irland)

in 5ml Spritzen (Stripette, New York, USA) vorsichtig aspiriert. Um Kontaminationen der Probe zu vermeiden, wurden die ersten 5ml verworfen. Das Vollblut wurde sofort in heparinisierte Röhrchen (Liquemin N 5000, Grenzach Wyhlen, Deutschland, Endkonzentration 50IE/ml) überführt und durch leichtes Schwenken vermischt.

2.2.2 Separation von Plasma aus Vollblut

Das entnommene Vollblut wurde direkt weiterverarbeitet, um Konzentrationsänderungen von NO und dessen Metaboliten in der Ausgangsprobe zu minimieren. Vollblut konnte direkt verwendet werden. Zur Separation von Plasma, wurde das Vollblut 20 Minuten bei 4°C, 800xg und auslaufendem Rotor zentrifugiert. Anschließend wurde der obere Anteil des plasmatischen Überstandes vorsichtig abpipettiert, um Kontaminationen mit dem darunter liegenden Buffy-coat, bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, zu verhindern.

Vor der weiteren Versuchsabfolge wurden die Zellzahlen sowie der Hämoglobin- und der Hämatokritwert der Proben bestimmt, um mit möglichst vergleichbaren Blutparametern arbeiten zu können (Cooler Mikro Diff. Beckmann, Krefeld, Deutschland). Falls Zwischenlagerungen (max. 20min) zur Vermessung der Proben nötig waren, erfolgten diese bei 4°C im Dunkeln. Nach Inkubation wurden die Proben ebenfalls für 20 Minuten bei 4°C, 800xg und auslaufendem Rotor zentrifugiert. Nur das Plasma, ohne Buffy-coat, wurde zur Messung verwendet.

2.2.3 Probenaufarbeitung zur biochemischen Analyse

2.2.3.1 Probenaufarbeitung zur CLD Vermessung

Je nach Versuchsansatz wurden die NO-Metabolite im Plasma oder im Vollblut nach Aufarbeitung direkt vermessen (siehe Kapitel 2.1.1/ 2.1.2).

Nach Beendigung der Inkubation, als jeweils letzten Versuchsschritt, wurde die

Probe 1:5 in einer 4°C kalten Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland), die 5mM NEM enthielt, verdünnt (siehe Kapitel 2.1.2).

Die Nitritkonzentrationen der Probe ließen sich direkt bestimmen. Zur separaten RSNO/X-NO (Summe von gebundenem NO im Erythrozyten) Messung wurden die Proben 1:10 mit 5%igem Sulfanilamid (Endkonzentration 29mM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst, in 1M 25%iger HCL-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein stabiles Diazoniumsalz, welches durch die iodhaltige Reaktionslösung nicht zu NO reduziert wird. Gemessen werden nur die spaltbaren, reaktionsfähigen Nitrosothiole.¹⁰²

2.2.3.2 Probenaufarbeitung zur HPLC Vermessung

Zur Bestimmung der Nitratkonzentration mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie in wässrigen oder proteinarmen Medien konnten die Proben direkt analysiert werden. Um biologische Proben (Vollblut, Plasma) zu vermessen, war folgende weitere Aufarbeitung notwendig.

Die Proben wurden nach Beendigung der Inkubation 1:5 in 4°C kaltes 0,9%iges NaCl überführt. Zur Nitratbestimmung konnte NEM nicht als Alkylierungsreagens der Thiole (siehe Kapitel 2.2.3.1) verwendet werden, da sich in den Chromatogrammen Überlagerungen der NEM- und Nitratpeaks zeigten und somit die Nitratkonzentrationen nicht exakt zu ermitteln waren. Die Vollblutproben wurden vor der Analyse 1:10 mit Aqua injektabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt, um die Erythrozyten zu hämolysieren. Alle biologischen Proben wurden zur Abtrennung von höhermolekularen Proteinen 60 Minuten bei 1800xg ultrafiltriert (Centricon YM 10, Millipore, Bedford, USA). Das Ultrafiltrat wurde direkt der Analyse zugeführt oder bis zur Vermessung für maximal vier Wochen bei -80°C tiefgefroren.

2.3 Meßmethoden zur biochemischen Bestimmung der NO-Metabolite

2.3.1 Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion

Die Chemilumineszenzdetektion (CLD) (Sievers, Boulder, CO, USA) wurde zur Bestimmung der oxidativen und nitrosativen NO-Metabolite im Plasma und Vollblut eingesetzt. Diese zählt in flüssigen und gasförmigen Proben zu den Methoden höchster Sensitivität und Spezifität für Stickstoffmonoxid.^{24,32,62,132}

Das Grundprinzip stellte eine Reduktion der zu bestimmenden Metabolite zu NO dar. Die gasförmigen NO-Moleküle setzen in einer Reaktion mit Ozon äquimolar zur Nitrit- bzw. Nitrosothiolkonzentration der Probe Energie frei, die in Form von Lichtquanten gemessen wird. Der schematische Aufbau einer CLD-Anlage ist in Abbildung 4 dargestellt.

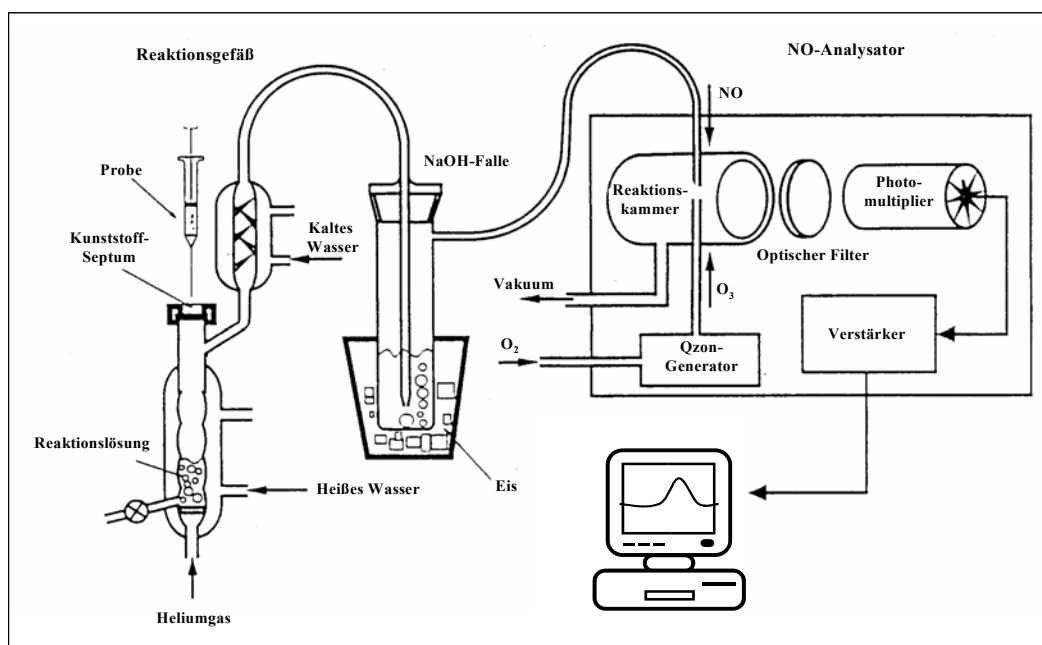


Abbildung 4: Nitrit und Nitrosothiole in der Probe werden zu NO reduziert und mittels Inertgas transportiert. Über einen Kondensator und eine NaOH-Falle (1M) gelangt das zu bestimmende NO-Gas zur Reaktionskammer in der die Lichtreaktion stattfindet. Die Impulse werden verstärkt, integriert und über eine Software graphisch dargestellt.

Zur Messung wurden 100µl der aufgearbeiteten Probe mit einer Hamiltonspritze (Hamilton, Reno, NV, USA) durch eine gasdichte Kunststoffmembran (Hitze-Stabilitätssepten, Langerwehe, Deutschland) in das Reaktionsgefäß (Radical Purger, Sievers, Boulder, CO, USA) injiziert. Diese enthielt die Reaktionslösung, welche sich aus 0.6M Kaliumiodid (KI, Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,2M Iod (I_2 , Sigma, St. Louis, MO, USA), gelöst in 1ml HPLC-Wasser sowie in 8ml 100%iger Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammensetzte. Diese wurde von außen über ein zirkulierendes Wasserbad (Bayer, Düsseldorf) auf 95° C erhitzt. In diesem sauren Medium wurde Nitrit äquimolar zu NO reduziert. Dabei setzten Nitrit und Wasserstoff Nitrosoniumionen frei, die mit Iodid (I^-) weiter zu NO reagierten. Nach Zusatz von Sulfanilamid stammte das freigesetzte NO ausschließlich aus den Thiolbindungen.^{103,105}

Aufgrund des hohen Löslichkeitskoeffizienten (~ 20), trat das in der Probe enthaltene NO sofort in die Gasphase über. Durch eine Fritte am Boden des Kolbens wurde das Reaktionsgemisch kontinuierlich mit Helium (Linde, Deutschland) als Inertgas durchströmt. Dieses trieb NO aus der Flüssigkeit heraus und erleichterte den Transport zum Analysator.² Über die Regulation des Heliumflusses wurde der Systemdruck auf ~ 0 bar eingestellt.

Zwischen Reaktionsgefäß und Reaktionskammer waren ein Kondensatorsystem zur Elimination wässriger Bestandteile und eine Säurefalle zwischengeschaltet. Die Säurefalle beinhaltete eisgekühlte Natronlauge (1M), um Kontaminationen des NO-Analysators (Sievers Seeheim) mit Säurerückständen zu verhindern.

Die Reaktionskammer enthielt Zufluss von dem zu Ozon (O_3) generierten Sauerstoff (O_2). Ozon reagiert mit NO zu energetisch angereichertem Stickstoffdioxid (NO_2^*). Diese Energie wird als Photon frei, wobei das Stickstoffdioxidmolekül in einen stabileren Zustand zurückfällt (siehe Gleichung 1).⁶²



Die eigentliche Lumineszenzreaktion fand in der Reaktionskammer statt. Dabei setzte die Reaktion von NO und Ozon über eine energiereiche Zwischenstufe

(Nitrogenoxyd) Photonen frei. Das emittierte Licht war linear proportional zur NO-Konzentration der Probe.³⁹ Nach Verstärkung und Integration der Lichtemission wurde diese in ein elektrisches Signal umgewandelt und von einem Computer erfasst. Zur Aufnahme der Daten diente das NoaWin32[®] (DeMeTec, Hannover, Deutschland). Das Signal wurde als Fläche unter der Kurve gemessen. Durch eine externe Eichreihe wässrigen Nitritstandards, konnte über die ermittelte Steigung die Reduktion der Reaktionslösung als auch die Funktion des Analysators überprüft werden.

2.3.2 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Das Endprodukt des oxidativen Abbaus von NO ist Nitrat. Dessen Bestimmung erfolgte durch eine hochsensitive HPLC-Methode (high pressure liquid chromatography) (siehe Abbildung 5).^{79,126,170} Dieses Verfahren, trennt Proben durch unterschiedliche Adhäsion von Anionen an die stationäre Phase auf.

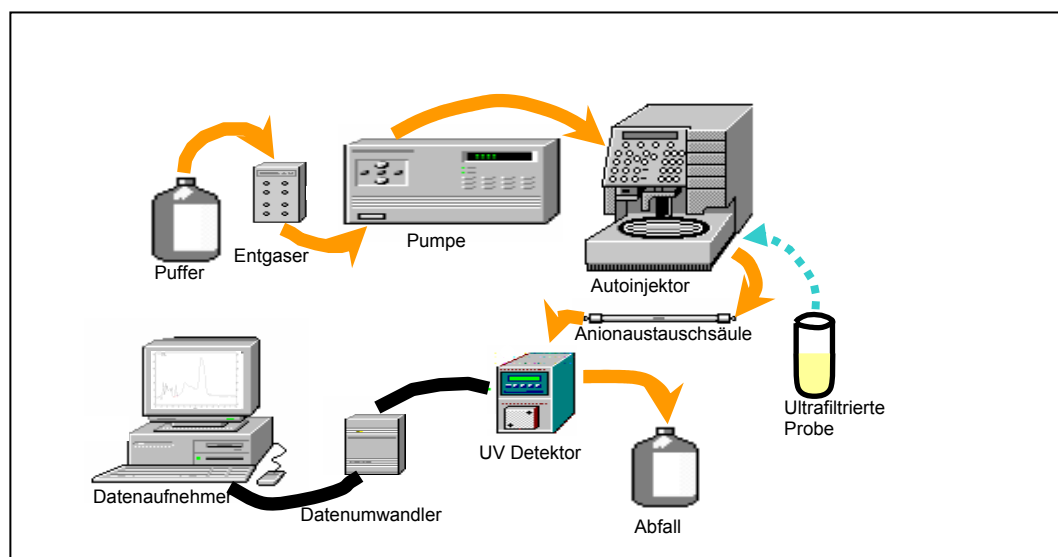


Abbildung 5: Aufbau der HPLC-Anlage. Das Laufmittel (Puffer) wurde kontinuierlich in das System gepumpt. Die zu analysierenden Substanzen wurden über den Autoinjektor in die Anionenaustausch-Säule injiziert, welche die Probe gemäß ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften auftrennte. Die Substanz-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt, integriert und als Chromatogramme graphisch dargestellt.

Der Puffer (mobile Phase) bestand aus Acetonitril, Methanol (Riedel de Haën,

Seelze, Deutschland) und HPLC-Wasser (70:10:20), verdünnt in 40mmol/l NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) und fungierte als Laufmittel der Probe. Dieser wurde entgast (Degasser 24, Sun Chrom) und bei Raumtemperatur mit konstantem Fluss von 1ml/min über die Doppelkolbenpumpe (Sykam S 1000, Gilching, Germany) in das System befördert. Ein Probenvolumen von 40 μ M wurde vom Autoinjektor (Jasco 851-AS, Großzimmern, Deutschland) in das System injiziert und über eine Vorsäule (LC A08 125x4,6mm I.D.Sykam, Gilchingen, Deutschland), die zum Schutz der Hauptsäule die Probe reinigte, in die Anionenaustausch-Säule (stationäre Phase) (LC A08 125x4,6mm I.D.Sykam, Gilchingen, Deutschland) gepumpt.

Durch verschieden starke Affinität der Ionen passierten die Moleküle die Säule in einer spezifischen Abfolge, so dass das Stoffgemisch getrennt und zeitlich versetzt vermessen werden konnte. Mittels UV-Detektor (UVIS 200, Linear Instruments, Reno, NE, USA) wurde Nitrat photometrisch ($\lambda=220\text{nm}$) bestimmt. Zur Datenaquisition und Integration diente das Chromgate Chromatography Data System (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland). Durch diese Methode wurde ein Detektionslimit von 3nmol/l in wässrigen Proben und 60nmol/l in humanem Plasma erreicht. Die Linearität wurde für den Bereich von 10 bis 1000nmol/l mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,99 festgestellt. Vor Analyse der aufbereiteten Proben (siehe Kapitel 2.2.3.2) wurde zur Datenauswertung und zur Trennleistungs-Kontrolle der Anionenaustausch-Säule durch Vermessung eines wässrigen Nitratstandards die Anlage geeicht.

2.3.3 Herstellung wässriger NO-Standards

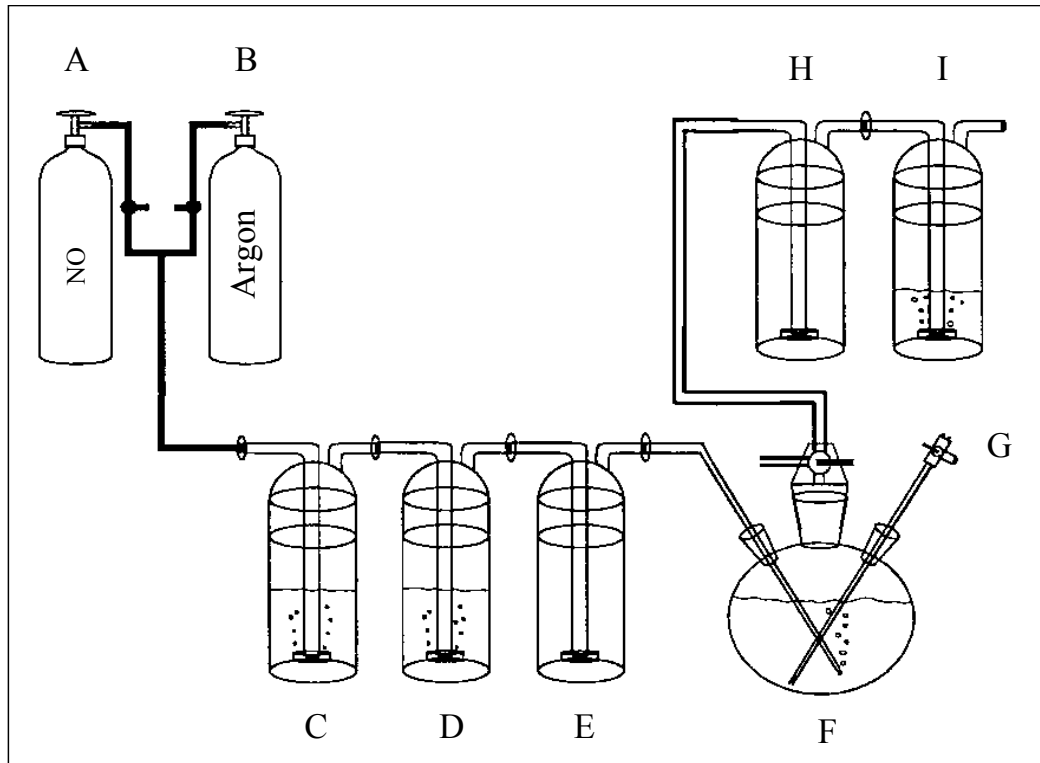


Abbildung 6: Gasdichte Anlage zur Herstellung authentischen NO-Standards. Nachdem die Begasung mit Argon (A) das System von Sauerstoff befreit hatte, erfolgte der NO-Zufluss (B). Das NO-Gas durchlief die hintereinandergeschalteten Waschflaschen mit Pyrogallol (C) und NaOH-Lösung (D) gefüllt, um Spuren von Sauerstoff und Stickoxiden zu lösen. Die Flaschen (E), (H) und (I) dienten als Überlauf- beziehungsweise Sauerstoffschutz. Im Dreihalsrundkolben (F) löste sich NO bis zur Sättigung in physiologischer Kochsalzlösung und konnte am Steigrohr (G) entnommen werden.

Die in Abbildung 6 dargestellte Anlage bildete ein gasdichtes, sauerstoffreies System zur reproduzierbaren Herstellung steriler NO-Standards.^{33,83}

Eine NO- (A) (99,5%, N3.0, Linde, Düsseldorf) sowie eine Argongasflasche (B) (99,998%, N5.0, Linde, Düsseldorf, Deutschland) waren über drei Waschflaschen mit einem Dreihalsrundkolben verbunden. Dieser enthielt 0,9% NaCl-Lösung, in der sich nach Begasung durch die oben genannten Flaschen NO löste.

Die Waschflasche (C) war über eine Stahlkapillare, an der zwei Ventile befestigt waren, mit den Gasflaschen verbunden. Sie enthielt Pyrogallol (5%, Merck, Darmstadt, Deutschland) in gesättigter Kaliumhydroxydlösung (KOH) (Merck,

Darmstadt, Deutschland) zur Entfernung von Sauerstoffresten aus den eingeleiteten Gasen NO und Argon. Um Pyrogallol gegen Lichteinfall zu schützen, wurde die Flasche abgedunkelt. Die Glasflaschen waren untereinander über Glaskapillaren verbunden. In der mit Natriumhydroxidlösung (20%, Merck, Darmstadt, Deutschland), gefüllten Waschflasche (D) wurden höhere Stickoxide gebunden. Um zu vermeiden, dass Lösungen aus (C) und (D) bei erhöhtem Systemdruck in den Kolben (F) übertreten, wurde eine leere Waschflasche (E) zwischengeschaltet. Im Dreihalsrundkolben fand der eigentliche Lösungsvorgang statt. Dessen mittlerer Hals führte über einen Dreiwegehahn zu zwei weiteren Waschflaschen (H, I). Diese waren mit Wasser gefüllt und erzeugten einen leichten Systemüberdruck. Nach Beendigung der Begasung verhinderten sie den Sauerstoffeinstrom von außen. In dem Rundkolben befand sich außerdem ein Steigrohr, über das die NO-Lösung abgezogen werden konnte.

Zur Herstellung der NO-Lösung mussten zuerst alle Glasbestandteile in mehreren Schritten gereinigt werden, um danach das System zusammenzusetzen. Der Rundkolben wurde mit steriler NaCl-Lösung gefüllt. Es folgte eine 45-minütige Begasung mit Argon, die sowohl das System als auch die Flüssigkeiten von Sauerstoff befreite. Daran schloss sich eine 45-minütige Begasung mit NO an. Nach Beendigung der Begasungen konnte die NO-Lösung über einen Sterilfilter (0.2µM Filter, Millipore, Eschborn, Deutschland) mit Argon begasten gasdichten Spritzen am Luer-Lock-Verschluss (G) abgenommen werden.

Die NO-Konzentration der Lösung wurde mittels Chemilumineszenzdetektion (siehe Kapitel 2.3.1) bestimmt. Diese lag bei $1,5 \pm 0,2$ mM. Die Lösung wurde innerhalb einer Stunde benutzt.

2.4 Mathematisch-statistische Methoden

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

Zur graphischen Darstellung der Daten und der linearen Regression, insbesondere zur Erstellung der Eichgeraden der Nitrit- bzw. der Nitratstandards, wurde das Computerprogramm MicroCal Origin[®] (Version 7.0, MicroCal Software Inc., NorthHampton, MA, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 NO-Synthese des Vollblutes

Vollblut wurde mit L-Arginin, D-Arginin und L-NNA inkubiert, um eine potentielle NOS-Aktivität im Vollblut spezifisch stimulieren und inhibieren zu können. Nitrit wurde als Marker der NO-Synthese gewählt.

3.1.1 NO-Synthese im Vollblut

Vollblut und isoliertes Plasma wurde für 30 Minuten mit je einer dieser im Folgenden erläuterten Substanzen inkubiert (siehe Kapitel 2.1.1):

- PBS: Puffer zur Kontrolle
- D-Arginin: unverwertbares Substrat der NOS
- L-Arginin: verwertbares Substrat der NOS
- L-NNA: Inhibitor der NOS

Im Anschluss an die Inkubation mit L-NNA erfolgte eine L-Arginininkubation. Nach Versuchsende wurde Nitrit mittels CLD im Plasma bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.1/ 2.3.1). Es zeigte sich ein signifikanter Nitritanstieg von $134 \pm 20 \text{ nmol/l}$ nach L-Arginin Inkubation ($p=0,001$). Nach Inkubation mit dem Stereoisomer D-Arginin konnte, im Vergleich zur Kontrolle, kein Nitritanstieg erreicht werden (D-Arginin $79 \pm 13 \text{ nmol/l}$, Kontrolle $52 \pm 7 \text{ nmol/l}$) (siehe Abbildung 7). Wurde Vollblut zunächst mit L-NNA und anschließend mit L-Arginin inkubiert, konnte die durch L-NNA ausgelöste Inhibition der NO-Bildung durch Arginin nicht aufgehoben werden ($-0,7 \pm 1 \text{ nmol/l}$) (siehe Abbildung 7).

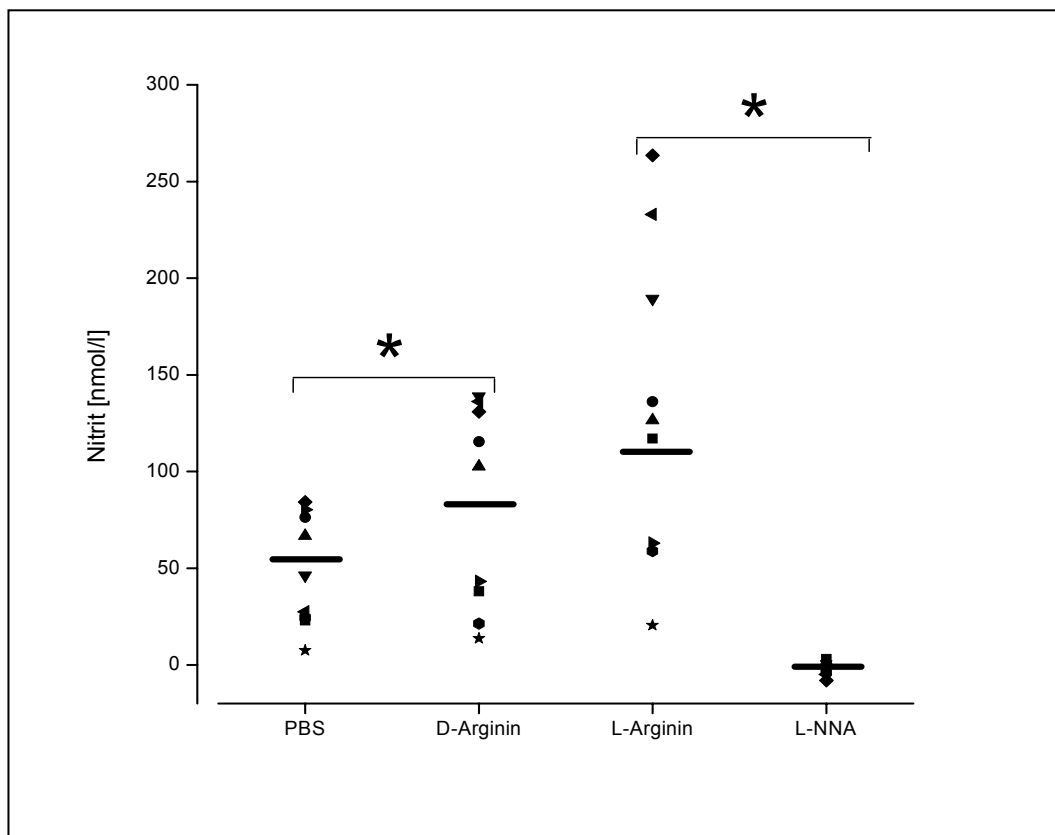


Abbildung 7: Vollblut wurde mit folgenden Substanzen inkubiert: PBS zur Kontrolle, D-Arginin als für die NOS nicht zu verwertendes, L-Arginin als verwertbares Substrat. L-NNA verhindert die NO_2^- Bildung. Nitrit wurde im Plasma zur Quantifizierung der NO-Bildung bestimmt (n=11). * signifikant zur Kontrolle, * signifikant zu Arginin, die Balken entsprechen dem MW.

Die durch Inkubation hervorgerufene NO_2^- -Konzentrationsdifferenz in Abhängigkeit der NOS Substrate wurden in Bezug zur Inkubationszeit [pmol/ml Vollblut/min] gesetzt (siehe Abbildung 8).

Die Nitritbildung bzw. die NO-Synthese wird durch die L-Arginin-Inkubation des Vollblutes auf ($4,4 \pm 0,68$ pmol/ml Vollblut/min) signifikant erhöht. Nach D-Arginin-Inkubation ($2,6 \pm 0,46$ pmol/ml Vollblut/min) lässt sich im Verhältnis zur Kontrolle (PBS) ($1,9 \pm 0,25$ pmol/ml Vollblut/min) keine signifikante Steigerung der Nitritbildung feststellen. Die Inkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NNA hob das Signal vollständig auf ($0 \pm 0,04$ pmol/ml Vollblut/min). Die Differenz zwischen L-Arginin und der Kontrolle war hoch signifikant ($p=0,001$).

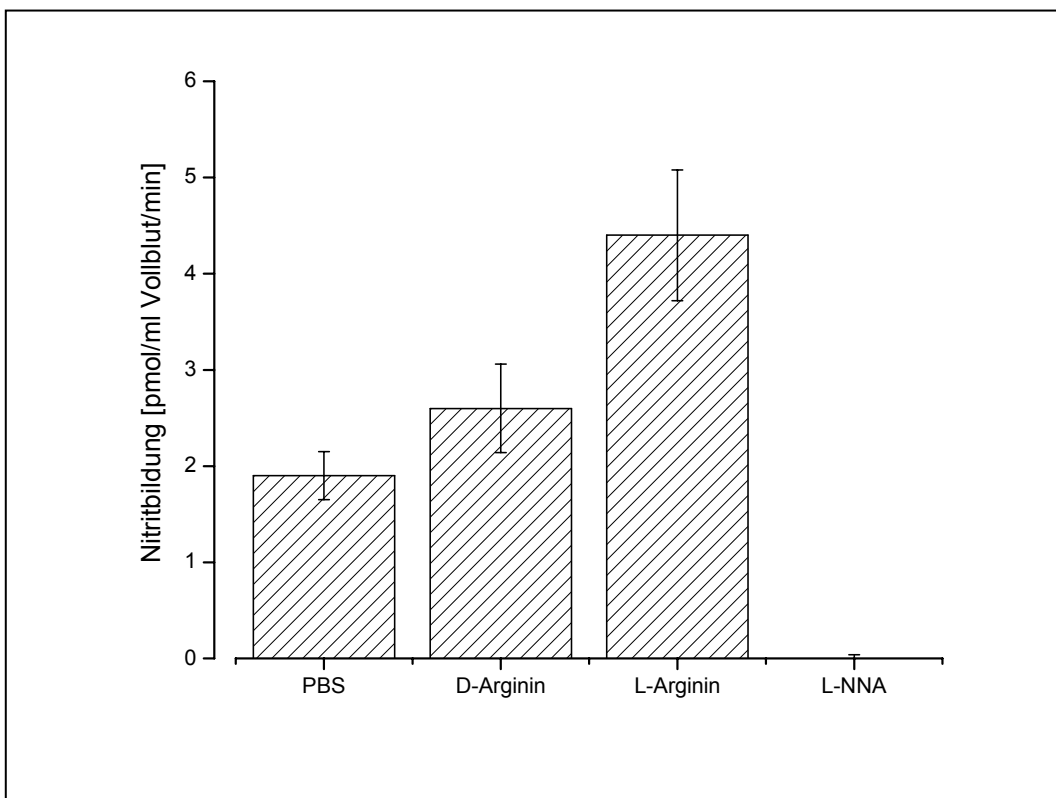


Abbildung 8: Nach Vollblutinkubation mit oben genannten Substanzen wurde die Nitritbildung in [pmol/ml Vollblut/min] berechnet (n=11).

Zur Differenzierung der NO-Bildung zwischen zellulärem und plasmatischem Kompartiment des Blutes wurde Plasma von Vollblut separiert und die Nitritbildung von Plasma in Abhängigkeit von L-Arginin untersucht. Im Vollblut zeigte sich nach L-Arginininkubation eine signifikante NO-Bildung von 31% ($p=0,001$) in Bezug zur Kontrolle. Im zellfreien Plasma fand hingegen keine NO-Freisetzung statt (siehe Abbildung 9). Eine zelluläre Verunreinigung des Plasmas wurde ausgeschlossen (siehe Kapitel 2.2.2).

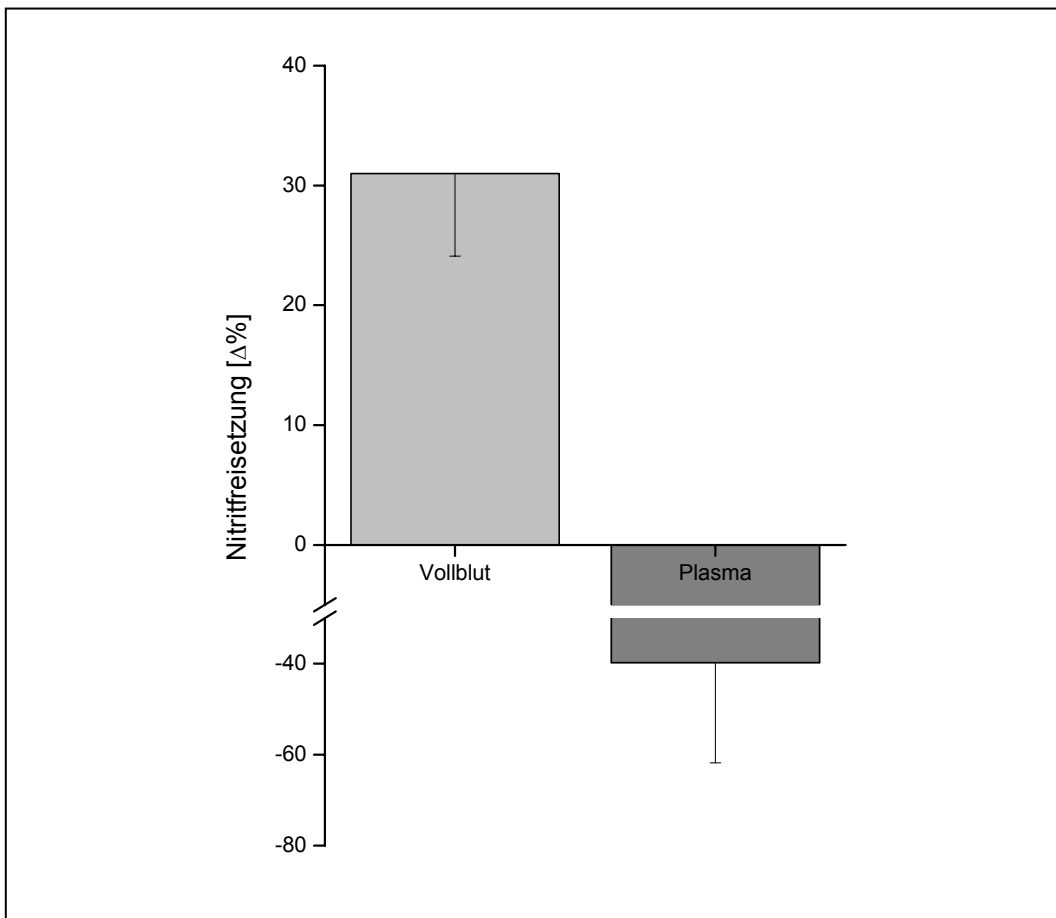


Abbildung 9: Dargestellt ist die Nitritkonzentration (nmol/l) nach L-Arginininkubation in $\Delta\%$ zum Basalwert. Im Vollblut steigt die Nitritfreisetzung nach L-Arginininkubation um $(31\% \pm 6,9 p=0,001)$ an. Im zellfreien Plasma findet keine Nitritfreisetzung statt. (n=11).

3.1.2 Speicherung und Transfer von erythrozytär gebundenem NO

Humanes Vollblut beziehungsweise Plasma wurden mit einer Endkonzentration von $200\mu\text{M}$ NO-Lösung inkubiert. Die Proben wurden über eine Zeitreihe von 0 bis 30 Minuten inkubiert.

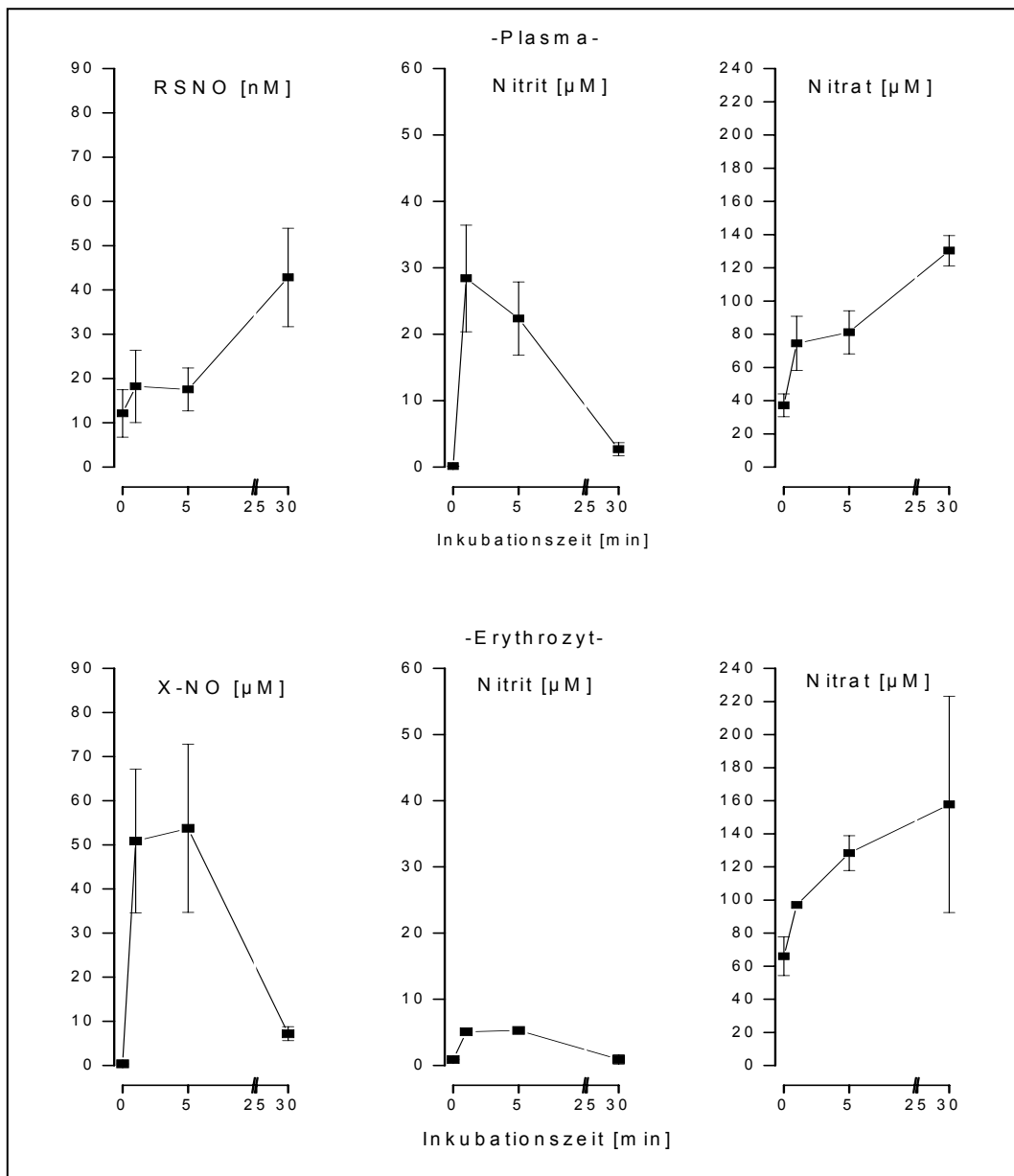


Abbildung 10: NO-Austausch zwischen Plasma und Erythrozyt nach exogener NO-Zugabe. Nur im Erythrozyten steigt bis zu fünf Minuten nach NO-Zugabe (1x bei 0min) die X-NO-Konzentration an. Danach sinkt diese im Erythrozyten nahezu bis zum Ausgangswert ab, zeitgleich steigt die plasmatischen RSNO-Konzentrationen an. Die Nitritkonzentrationen steigen bis zur ersten Minute an und fallen dann ab, während die Nitratkonzentrationen über die gesamte Zeitreihe ansteigen (n=6).

Unser besonderes Interesse lag darin, das Transportverhalten von NO zwischen Erythrozyt und Plasma zu charakterisieren. Bis zur fünf-minütigen Inkubation steigt nur die X-NO-Konzentration des Erythrozyten von $<1\mu\text{M}$ bis über $50\mu\text{M}$ signifikant an ($50,8\pm 16,2\mu\text{M}$, $p=0,001$). Zwischen fünf- und 30-minütiger Inkubation fällt die X-NO-Konzentration bis auf $7,1\pm 1,6\mu\text{M}$ zurück. Zeitgleich

steigt die RSNO-Konzentration des Plasmas von $17,5 \pm 4,8 \text{ nm}$ (5min) auf $42,8 \pm 11,1 \text{ nm}$ (30min, $p=0,001$) signifikant an. Die Nitritkonzentrationen steigen in beiden Blutkompartimenten bis zur ein-minütigen Inkubation an (Plasma $28,4 \pm 8 \mu\text{M}$, Erythrozyt $5,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$) und fallen dann wieder ab (Plasma $2,6 \pm 0,9 \mu\text{M}$, Erythrozyt $0,9 \pm 0,68 \mu\text{M}$). Insgesamt liegt der Nitritanstieg des Plasmas über dem des Erythrozyten. In beiden Blutkompartimenten findet etwa eine Verdreifachung der Nitratkonzentrationen über die Zeitreihe statt.

Das exogen hinzugefügte NO wurde zu 100% in Form von NO-Metaboliten wiedergefunden.

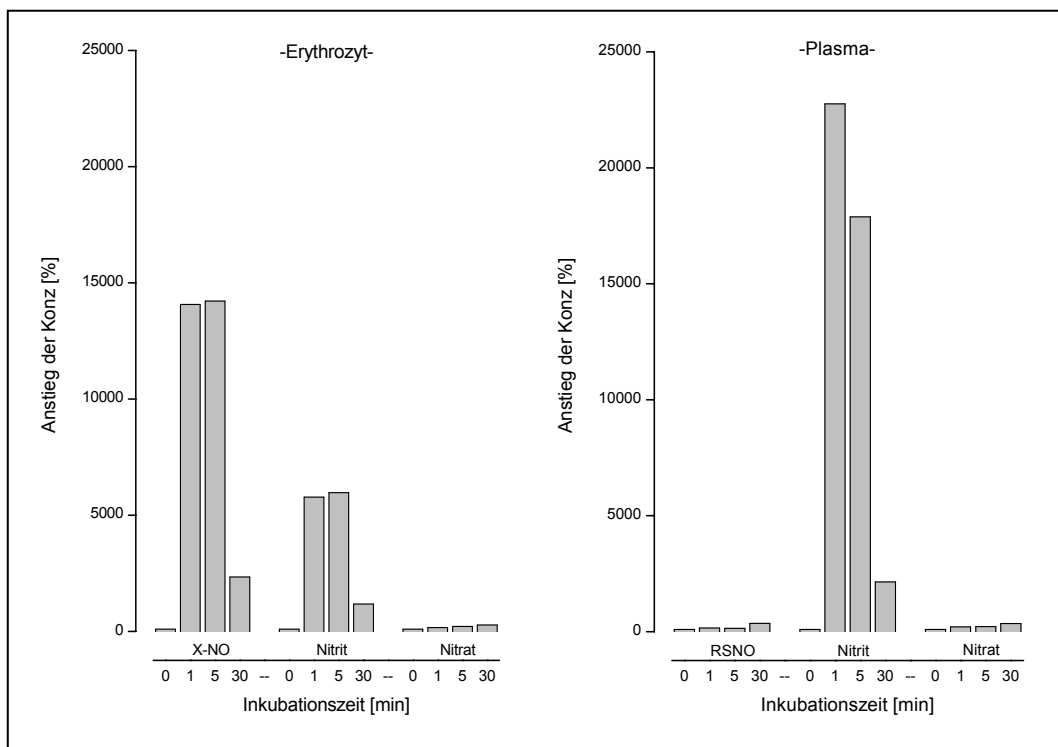


Abbildung 11: Metabolismus von NO im Plasma und Erythrozyten nach Inkubation mit authentischer NO-Lösung: Im Erythrozyten fand der größte Anstieg in den X-NO-Metaboliten statt. Im Plasma hingegen stieg fast ausschließlich nur die Nitritkonzentration an. Anstieg der NO-Metabolite RSNO, X-NO, NO_2^- und NO_3^- in $\Delta\%$ zum Ausgangswert ($n=6$).

In Abbildung 11 sind die Konzentrationsänderungen der verschiedenen NO-Metabolite in Bezug zum Ausgangswert dargestellt. Nach Inkubation des Plasmas stiegen die Nitritkonzentrationen besonders innerhalb der ersten fünf Minuten stark an. Zwischen fünf und 30 Minuten fiel die Nitritkonzentration um mehr als

80% ab, gleichzeitig stieg die Nitratkonzentration an. Diese stieg kontinuierlich über die Zeitreihe an. Insgesamt steigt im Plasma hauptsächlich Nitrit an. In den Erythrozyten hingegen, stieg die X-NO Fraktion in den ersten fünf Minuten am stärksten an. Die X-NO Konzentration in Prozent zum Ausgangswert entsprach zu diesen Zeitpunkten dem dreifachen Nitritwert des Erythrozyten. Im weiteren Zeitverlauf sanken die X-NO und Nitritwerte, die Nitratkonzentration stieg an.

Zu beachten ist, wie in Abbildung 11 dargestellt, dass nur die RSNO-Konzentrationen im nanomolaren Bereich liegen, alle anderen Werte sind im mikromolaren Bereich dargestellt. Der größte Konzentrationszuwachs, gemessen als Konzentrationsanstieg zum Ausgangswert, findet im Plasma beim Nitrit und im Erythrozyten beim X-NO statt.

3.1.3 Sättigungsverhalten der NO-Speicher von Vollblut und Plasma

Durch Inkubation mit ansteigenden NO-Konzentrationen über einen definierten Zeitpunkt von fünf Minuten, wurde die Auffüllung bzw. potentielle Sättigung der NO-Speicher erfasst. Als Inkubationsspanne wurden fünf Minuten gewählt, da zu diesem Zeitpunkt in den vorausgegangenen Versuchen (siehe Abbildung 10/11) die höchste X-NO Konzentration im Erythrozyten gemessen wurde. Vollblut wurde mit ansteigenden NO-Konzentrationen bis zu 600 μ M NO inkubiert.

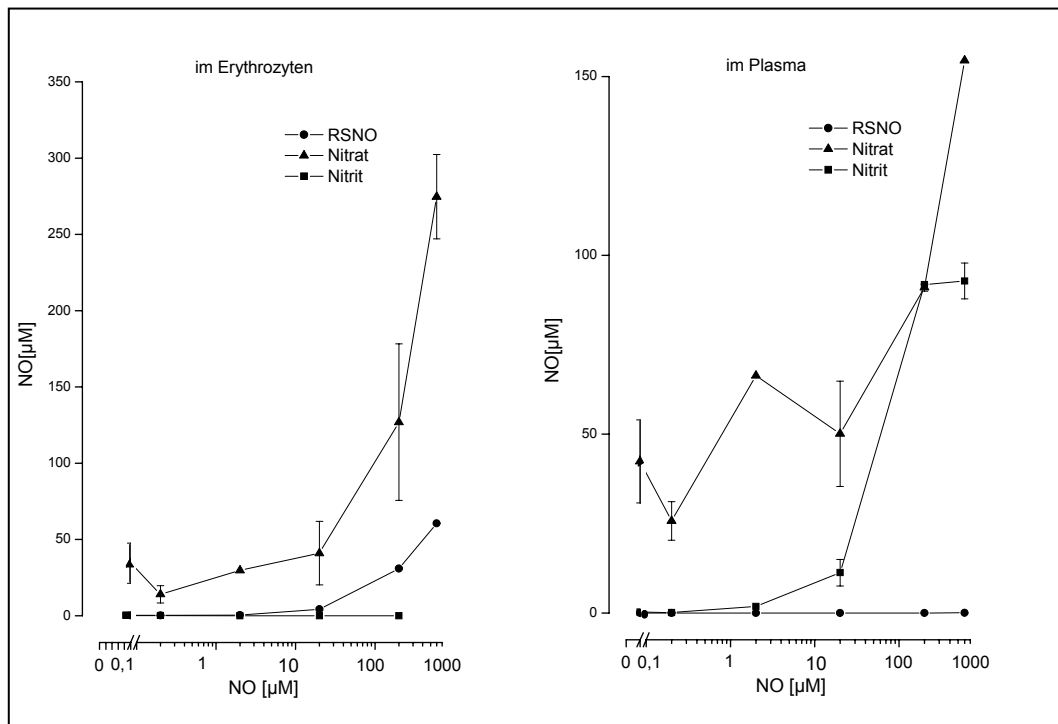


Abbildung 12: Dosis-Antwort-Kurve nach Vollblutinkubation mit NO-Lösung. Die X-NO-Konzentration der Erythrozyten steigt kontinuierlich an. Es findet sich kein Maximum ($n=6$).

Die X-NO-Konzentration steigt mit Zunahme der zugefügten NO-Konzentration an ($0 \pm 0 \mu\text{M}$ bis $60,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$). Auch in Konzentrationsbereichen, die weit über den physiologischen lagen, waren die Bindungsstellen nicht sättigbar. Die Nitratkonzentration steigt ebenfalls im Gegensatz zur Nitritkonzentration des Erythrozyten mit Erhöhung der NO-Konzentration an ($34,4 \pm 13,2 \mu\text{M}$ bis $274,7 \pm 27,5 \mu\text{M}$). Im Plasma steigt sowohl die Nitritkonzentration ($0,2 \pm 0 \mu\text{M}$ bis $92,8 \pm 5 \mu\text{M}$) als auch die Nitratkonzentration ($42,3 \pm 11,6 \mu\text{M}$ bis $154,5 \pm 0 \mu\text{M}$) in Abhängigkeit der NO-Konzentration an. Die Konzentration der RSNO nehmen nicht zu (siehe Abbildung 12).

Durch Alkylierung der SH-Gruppen wurde der Stickstoffmonoxidanteil, der R-SH-gebunden vorliegt abschätzt. Dazu wurde Vollblut mit $200 \mu\text{M}$ NO für fünf Minuten mit und ohne vorherigen NEM-Zusatz inkubiert. Gebundenes NO wurde im Vollblut und Plasma bestimmt. Wie in Abbildung 13 dargestellt, verringert sich die X-NO-Konzentration nach vorheriger Inkubation mit NEM um ca. 50%.

Hingegen wird die RSNO-Konzentration des Plasmas durch eine vorherige NEM-Inkubation um 90% reduziert.

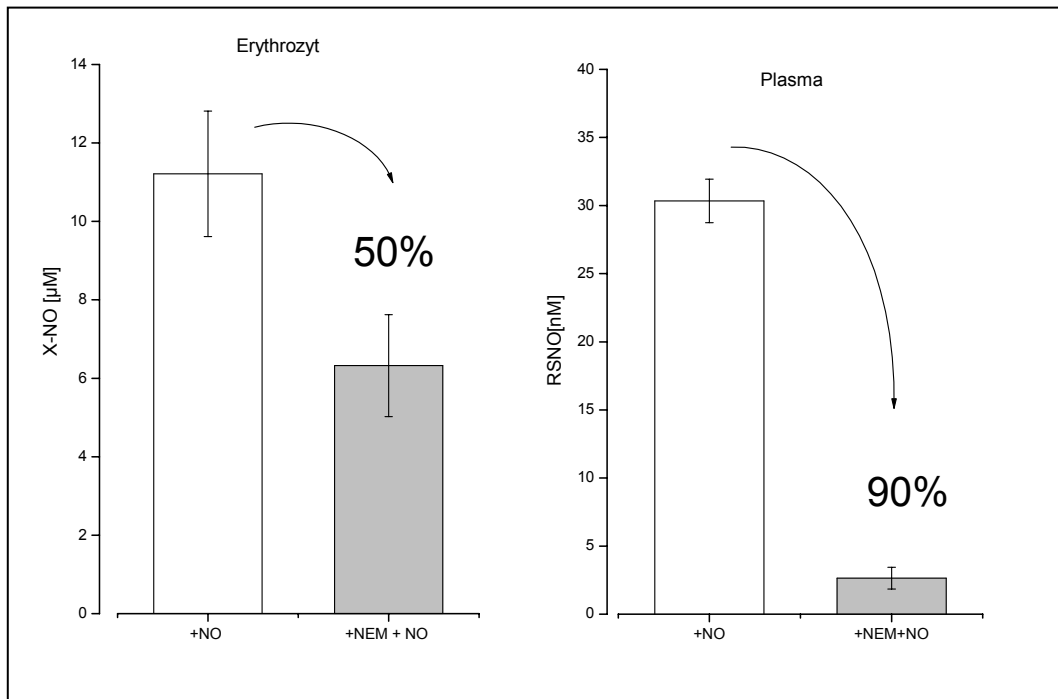


Abbildung 13: Mögliche prozentuale Verteilung von an Thiolgruppen gebundenem NO im Erythrozyt und Plasma. Durch Zusatz von NEM vor der NO-Inkubation wurden die Sulfhydrylgruppen alkyliert und standen der S-Nitrosothiolbildung nicht zur Verfügung (n=3).

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Eine enzymatische, basale NO-Bildung findet im humanen Vollblut statt.
2. Im Erythrozyten gespeichertes NO wird in bioaktiver Form an das Plasma abgegeben.

4.1 Bildung von NO im Vollblut

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Gefäßfunktion und des Kreislaufs. NO stammt im Gefäßsystem hauptsächlich von der konstitutiv exprimierten endothelialen NO-Synthase (eNOS). Das endothelial synthetisierte NO reguliert nicht nur den Gefäßtonus, sondern auch die Interaktion und Funktion von Blutzellen, wie zum Beispiel die Thrombozytenaggregation und die Inhibition der Monozyten-Endothel-Adhäsion.^{15,38,68,129,131,161} Im Gefäßsystem wird NO nicht ausschließlich von Endothelzellen synthetisiert, sondern ebenfalls von Blutzellen. In Leukozyten wird die induzierbare NOS (iNOS) durch inflammatorische Prozesse stimuliert.^{64,137}

In einigen Studien wird eine NO-Synthese in aktivierten Thrombozyten beschrieben (siehe Kapitel 4.1.1). Zur NOS im Erythrozyten waren widersprüchliche Hinweise zu finden. Den Stand der Literatur zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen zusammenfassend, wurde Folgendes deutlich: Verschiedene biochemische Nachweisverfahren wurden angewendet, in denen Nitrit als Marker der NO-Bildung bestimmt wurde. Deliconstantinos et al. beschrieben eine im Zytosol lokalisierte NOS, deren Aktivität durch Zusatz von Wasserstoff-Peroxid oder Kalzium-Ionophor bis zu einer Freisetzungsrate von $7 \cdot 10^7 \text{ pmol} \cdot \text{Zell}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ gesteigert werden konnte.²⁹ Diese Versuchsparameter stellten durch Veränderungen von pH, PO_2 und der Ca^{2+} -Konzentration erhebliche Eingriffe in die Versuchsbedingungen dar. Da nicht zwischen enzymatischer und nicht-enzymatischer NO-Freisetzung unterschieden wurde, kann eine Konversion

von Nitrit zu NO oder eine NO-Freisetzung aus S-Nitrosohämoglobin bzw. Nitrosylhämoglobin nicht ausgeschlossen werden. Auch eine NO-Produktion aus aktivierten Leukozyten oder Thrombozyten wäre denkbar. Deliconstantinos et al. bestimmten mittels Fluoreszenz-Spektrophotometrie die Nitritkonzentration im Hämolysat. Dies bedingt eine „Konkurrenz“ zwischen dem NO-Fänger Hämoglobin und dem zur NO-Quantifizierung verwendeten NO-bindenden System.

Spätere *in vivo* Ergebnisse von Durak et al. sind ebenfalls kritisch zu bewerten. Er stellte fest, dass nach einer einmonatigen Aspirineinnahme der Probanden ein signifikanter Nitritanstieg im Hämolysat im Gegensatz zum Plasma zu finden war.³¹ Daraus ergab sich die Annahme, dass eine erythrozytäre, im Zytosol lokalisierte NOS durch Aspirin aktiviert worden war. Damit es bei der Differenzierung der Enzymaktivität zwischen Membran und Zytosol nicht zu falsch positiven Ergebnissen kommt, muss eine Hämoglobinkontamination vermieden werden. Die Griess-Reaktion, die Durak et al. zur Nitritbestimmung verwendeten, wird durch eine Hämoglobininteraktion stark beeinträchtigt.⁸⁶

Über NO-Bestimmungen konnten indirekte Hinweise auf eine erythrozytäre NO-Synthese erbracht werden. Bhattacharya et al. publizierten Daten, die auf die Existenz einer membrangebundenen erythrozytären NOS hinwiesen, die basal inaktiv und lediglich durch Insulin stimulierbar war.¹¹ Die über eine Säule separierte Fraktion von biochemisch aktiven solubilisierten Erythrozytenmembranen wies eine Aktivität von $506 \text{ pmol} \cdot \text{Zelle} \cdot \text{min}^{-1}$ auf. Tyrosinkinase wirkte stimulierend, NOS-Hemmer und Antikörper gegen den Insulinrezeptor inhibierten die NO-Freisetzung. Mutmaßlich wurde in diesen Versuchen die NO-Freisetzung eines erythrozytären Insulinrezeptors bestimmt und somit ein indirekter NOS-Enzymnachweis erbracht.^{11,19} Bhattacharya und Chakraborty bestimmten spektrophotometrisch Methämoglobin, welches bei der Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin entsteht. Eine Hämoglobininteraktion ist nicht auszuschließen. Carvalho et al. stellten nach Stimulation (L-Arginin, Acetylcholin) resuspendierter, intakter Erythrozyten mittels amperometrischer NO-Messung eine NO-Freisetzung fest. Auch eine Zunahme der oxidativen NO-Metabolite, Nitrit und Nitrat konnte über die Griess-Reaktion bestimmt werden.

Da eine basale NOS-Aktivität nicht gefunden wurde und eine spezifische NOS-Inhibition fehlt, ist eine unspezifische NO-Freisetzung aus den Erythrozyten ebenfalls nicht auszuschließen. In mehreren Untersuchungen wurde die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin für den erythrozytären NOS-Nachweis genutzt. Chen und Metha wiesen eine NOS-Aktivität im intakten Erythrozyten nach.²¹ Kang et al. interpretierten die Verstoffwechslung des H₃-markierten L-Arginins in den in Puffer hämolysierten Erythrozyten als Arginase-Aktivität.⁷⁵ Diese war nicht mit NOS-Inhibitoren, sondern mit dem Arginase-Inhibitor Norvalin zu unterdrücken.⁷⁵ Hämolysen steigert die Arginaseaktivität. Gleichzeitig wurden durch metabolische Prozesse Kofaktoren abgebaut. Zum Nachweis einer katalytischen Aktivität ist die Anwesenheit von ausreichend Substrat und Kofaktoren, die sich sowohl in den Erythrozyten als auch im Blutplasma befinden, Voraussetzung.⁸⁷ Ghigo et al. fanden nur in Plasmodium falciparum infizierten Erythrozyten eine NOS-Aktivität. Postuliert wird, dass der Parasit zusätzlich Mediatoren zur eNOS-Stimulation freisetzt, oder der Parasit selbst enzymatisch NO bildet.⁵¹

Verschiedene Verfahren erbrachten erste Hinweise zum proteinbiochemischen Nachweis der NOS im Erythrozyten. Bhattacharya et al. erbrachten über eine Säulenpräparation einen positiven Proteinnachweis.¹¹ Erythrozyten reagierten im NADPH-Diaphorase-Labeling positiv für die endotheliale und induzierbare NOS-Isoform, mittels Western-Blot wurde die eNOS separiert.^{21,73,75} Ghigo et al. wiesen im Western-Blot eNOS- und iNOS-Proteine in parasitär infizierten Erythrozyten nach.⁵¹ Insgesamt sind leukozytäre Verunreinigungen nicht ausgeschlossen und die Kontrollen mittels spezifischer Antikörpern uneinheitlich. Diskutiert wird, ob die erythrozytäre NOS ein Residuum aus früheren Entwicklungsstadien darstellt.¹⁰⁹ Mit dem während der Reifung des Erythrozyten verbundenen Verlust des Zellkerns und des Mitochondriums geht ein Funktionsverlust vieler Enzyme einher. Denkbar wäre, dass proerythrozytäre Vorläuferzellen noch eine aktive NOS besitzen, welche im Knochenmark wichtige Funktionen übernimmt.

Insgesamt konnte bisher kein eindeutiger Nachweis einer basalen NO-Bildung in den Erythrozyten erbracht werden. Unphysiologische Versuchsbedingungen, die

Abwesenheit von Kofaktoren sowie mögliche Verunreinigungen der Proben mit Hämoglobin oder Leukozyten (leukozytäre NO-Synthese, erythrozytäre NO-Freisetzung aus NO-Speichern) stellen bisherige Probleme dar und schließen eine unspezifische NO-Freisetzung nicht aus.

4.1.1 Nachweis einer NO-Bildung im Vollblut

In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmalig eine basale Aktivität einer NO-Synthase im humanen Vollblut belegt werden. Diese war spezifisch stimulierbar und inhibierbar. Die Inkubation von Vollblut mit dem NOS-Substrat L-Arginin führte zu einem signifikanten Nitritanstieg. Die durch L-Arginin stimulierte NO-Freisetzung deutet auf eine aktive NO-Synthase hin. Weiter erhärtet wird dieser Hinweis dadurch, dass nach Stimulation mit D-Arginin, als nicht verwertbares Stereoisomer der NOS, keine NO-Freisetzung erfolgte. Dieser Nachweis war bisher nicht erbracht worden.

Der ausbleibende Nitritanstieg nach L-NNA-Inkubation, einem NOS-Inhibitor, belegt die Spezifität des Versuchsaufbaus und die Inhibition einer aktiven NOS. Nach Inkubation des Plasmas mit L-Arginin kam es zu keinem Nitritanstieg. Daraus lässt sich schließen, dass die als Nitrit gemessene NO-Bildung aus einer aktiven NOS der Blutzellen stammt.^{75,109}

Die Differenz zwischen einer NO-Bildung unter physiologischen Bedingungen ohne Stimulationseinfluss und der reduzierten NO-Bildung nach Einsatz eines NOS-Inhibitors, wird als basale NO-Bildung bezeichnet. In Bezug zur Zeit gesetzt, spricht man von einer basalen NO-Freisetzungsrage. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine basale NO-Bildung aus einer NOS im Vollblut nachgewiesen werden. Der Ausschluss einer NO-Produktion im Plasma weist auf eine NOS-Lokalisation in den Blutzellen hin.

Insgesamt enthält das Vollblut über fünf Millionen Blutzellen/ml, davon ca. 94% Erythrozyten, >5% Thrombozyten und <1% Leukozyten. Es ist bekannt, dass Leukozyten und Thrombozyten unter bestimmten Bedingungen NO synthetisieren. Die leukozytäre NOS (iNOS) wird während entzündlicher Prozesse exprimiert.^{64,137} Stimulierend wirken inflammatorischen Zytokine, wie

zum Beispiel Interleukin 1 (IL1), Tumornekrosefaktor (TNF) und Lipopolysaccharide. Extrem hohe NO-Konzentrationen wie sie bei der Sepsis erreicht werden, wirken sogar zelltoxisch (siehe Kapitel 1.1). NOS-Proteine konnten in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gefunden werden.^{20,73} Neue Ergebnisse deuten sogar auf eine NOS-Expression in T-Lymphozyten hin.⁷⁴ Die iNOS ist unter basalen, physiologischen Bedingungen inaktiv. Auch eine NO-Produktion aus aktivierten Thrombozyten, die der Thrombenentstehung entgegenwirkt, wurde in einigen Studien beschrieben.^{43,101,130,140} Chen und Metha wiesen biochemisch eine thrombozytäre NOS nach, die durch Zytokine stimulierbar zu sein scheint und die Thrombozytenaggregation hemmt.¹⁰⁸ Berkels et al. lieferten Hinweise zur Existenz einer membranständigen thrombozytären NOS, welche durch Aggregation zur NO-Produktion aktiviert wird.¹⁰ Ein proteinbiochemischer eNOS-Nachweis mittels Western-Blot konnte nicht erbracht werden.¹¹⁹ Eine NOS-Aktivität des unstimulierten Thrombozyten wurde bisher überwiegend nicht belegt.^{119,130,174}

Das verwendete Vollblut wurde unter normoxischen Bedingungen abgenommen und stammte von gesunden Probanden ohne erhöhte Entzündungsparameter. Unter diesen Versuchsbedingungen kann eine Aktivität der iNOS sowie der thrombozytären NO-Synthese ausgeschlossen werden. Zusammenfassend konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass unter nicht entzündlichen Bedingungen eine in den Zellen des Vollblutes lokalisierte NO-Synthase aktiv ist, welche spezifisch stimulierbar, inhibierbar und isoformspezifisch ist. Deutliche Hinweise auf die Existenz einer erythrozytären NOS konnten erbracht werden.

Um diese Frage eindeutig klären zu können, müsste zunächst unter Einsatz eines hypotonen Lysepuffers, ein Ausschluss der Erythrozyten und eine Leukozytenisolation erfolgen, um dann unter Anwendung der differenziellen Zentrifugation zur Thrombozytenseparation eine genaue Trennung der einzelnen Blutkompartimente zu erreichen. Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma sollten dann, entsprechend des beschriebenen Versuchsschemas (siehe Kapitel 2.1.1), hinsichtlich einer NOS-Aktivität untersucht werden. Nach Bestätigung der Aussagen durch Vergleich getrennter Blutkompartimente könnte im Folgenden die Lokalisation der erythrozytären NOS differenziert werden. Die

Erythrozytenmembranen, separiert nach Zellyse, müssten im Vergleich zu intakten Erythrozyten hinsichtlich der Nitritbildung untersucht werden.

Neben den biochemischen Nachweisen einer erythrozytären NOS sollte deren Existenz auch auf molekularbiologischer Ebene über den Proteinnachweis untersucht werden. Dieser könnte auch zur Bestätigung der NOS-Lokalisation dienen. Abschließend könnten transgene Tiere eingesetzt werden, denen die ermittelte NOS-Isoform fehlt. Die NOS defizienten Tiere könnten als Negativkontrolle im Vergleich zu Wildtypen eine biochemische und molekularbiologische Bestätigung der Ergebnisse erbringen.

Gemäß unserer Ergebnisse könnte es sich um eine konstitutive NO-Synthase handeln, da sie unter nicht stimulierten Bedingungen aktiv ist und NO in nanomolaren Bereichen freisetzt. Als konstitutive Isoform wäre die erythrozytäre NOS eher in der Zellmembran lokalisiert. Nicht auszuschließen ist die zusätzliche Existenz einer induzierbaren NOS im Erythrozyten, die in den Versuchen dieser Arbeit möglicherweise inaktiv vorlag. Insgesamt bleiben noch viele Fragen zur Charakterisierung der erythrozytären NO-Synthase offen, deren differenzierte Beantwortung zum Verständnis von Physio- und Pathophysiologie sowie für die Entwicklung neuer Therapien von großer Bedeutung wäre.

In unseren Untersuchungen wurde Nitrit als Marker zur Erfassung der endogenen NO-Produktion der Erythrozyten gewählt. Nitrit ist stabiler als NO selbst und wird kaum durch Stoffwechselprozesse beeinflusst. Ist Sauerstoff vorhanden, wird NO 1:1 zu Nitrit umgesetzt. Bisher wurde Nitrit als inaktives Abbauprodukt von NO angesehen. NO als auch Nitrit können mit oxygeniertem Hämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat reagieren. Neuesten Studien zufolge kann Nitrit unter hypoxischen Bedingungen zu NO reduziert werden.²⁸ Eine Nitritreduktase des Deoxyhämoglobins im Erythrozyten wird aktiviert und reduziert Nitrit zu Methämoglobin. Demnach könnten Erythrozyten unter ischämischen Bedingungen vasodilatativ wirken.²⁸

Der Erythrozyt wurde lange als ausschließlich NO inaktivierende Zelle verkannt. Möglich wäre, dass der Erythrozyt den größten NO-Speicher/Donator des Vollblutes darstellt, und zwar:

1. durch eigene NO-Produktion via NOS
2. durch Freisetzung von NO aus seinen Thiolbindungen
3. durch Reduktion von Nitrit zu Methämoglobin und NO

Somit müssten bisherige Ansichten überdacht werden. Den Nitrit-Pools des Vollblutes käme eine enorme Bedeutung als bioaktive „NO-Quelle“ zu. Bestimmungen der Nitritkonzentrationen der Blutkompartimente (Vollblut, Plasma, Erythrozyten) ergaben erstaunliche Ergebnisse. Demnach würden die Erythrozyten, im Vergleich zum Plasma, mehr als die doppelte Nitritkonzentration beinhalten und somit einen großen, bislang nicht vermuteten Speicherort für Nitrit bzw. NO darstellen. Der Hauptanteil des erythrozytären Nitrits liegt im Cytosol frei vor.²⁸

4.2 Nitrosativer NO-Metabolismus im Erythrozyten

Inzwischen ist bekannt, dass neben dem raschen Abbau von NO bei Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat noch weitere Reaktionswege für NO im Erythrozyten existieren.^{30,84,135} Unter anaeroben Bedingungen kann sich NO an die Häm-Gruppe des Deoxyhämoglobins anlagern und damit Nitrosylhämoglobin (NOHb) bilden.¹⁸ Dieses kann im Erythrozyten zu Nitrosohämoglobin (SNOHb) konvertiert werden.^{71,106} Da die Reaktion mit Deoxyhämoglobin unter anaeroben Bedingungen abläuft, hängt der Anteil des gebildeten Nitrats und Methämoglobins beziehungsweise Nitrosylhämoglobins von der Sauerstoffsättigung des Blutes ab.¹⁶⁸

Des Weiteren kann nach Oxygenierung des Hämoglobins im pulmonalen Kreislauf durch eine NO-Bindung an das Cys-93 der β -Kette S-Nitrosohämoglobin gebildet werden.⁵⁷ Durch eine strukturbedingte Instabilität des Hämoglobins in der Peripherie resultiert eine NO-Abspaltung mit nachfolgender Vasodilatation.⁷¹ Somit konnten Jia et al. erstmalig zeigen, dass Erythrozyten über

NO-Speicher in Form von SNOHb verfügen. Da der Erythrozyt noch über weitaus mehr Sulfhydrylgruppen in seiner Membran sowie im Zytosol verfügt, wären noch weitere NO-Bindungskapazitäten vorhanden. Ob diese auch als SNO-Speicherformen genutzt werden, bleibt bisher offen.

Insgesamt besteht in der aktuellen Literatur über den Stellenwert von SNOHb als NO-Speicher im Erythrozyten noch Uneinigkeit.

Gladwin et al. entwickelten eine Methode, mittels derer es möglich ist, SNOHb separat bestimmen zu können. Da sie nur sehr geringe Mengen an Nitrosohämoglobin sowohl im venösen- als auch im arteriellen Gefäßschenkel fanden, halten sie eine physiologisch relevante Funktion von SNOHb als NO Reservoir für unwahrscheinlich. Rassaf et al. konnten kein SNOHb im humanen Erythrozyten nachweisen. Obwohl sie in Erythrozyten der Ratte SNOHb-Konzentrationen im nanomolaren Bereich fanden, im Einklang mit Stamler et al.,¹²⁴ konnten sie kein Nitrosohämoglobin in Erythrozyten weiterer Säugerspezies, einschließlich des Menschen, detektieren.¹³³ Die Ergebnisse lassen zwei Vermutungen offen: Zum einen könnten methodische Probleme als Ursache der ausbleibenden Detektion verantwortlich sein, zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die SNOHb-Konzentration tatsächlich verschwindend gering ist. Stamler et al. beschrieben Nitrosohämoglobin (ca. 50nm) im Gegensatz zu anderen Thiolen als Verbindung, die unter hypoxischen Bedingungen im Gefäßsystem, besonders in der Mikrostrombahn, über NO-Abspaltung eine Vasodilatation bewirkt.¹²⁴ Weiteren neuen Untersuchungen zufolge ist es möglich, dass erythrozytär vorhandenes Nitrit zu NO reduziert wird und dieses somit einen weiteren NO-Pool darstellen könnte.²⁸

Inwieweit die NO-Speicher des Erythrozyten modulierbar oder sättigbar sind, ist noch völlig unklar. Rassaf et al. konnten 2003 nachweisen, dass NO nicht nur lokal wirkt, sondern auch über das Plasma transportiert werden kann und somit im gesamten Kreislaufsystem aktiv ist.¹³³

Im Plasma kann NO mit den dort zirkulierenden Thiolen (Albumin, Glutathion und Cystein) zu RSNO reagieren, die eine bioaktive Transportform von NO im Plasma darstellen.

Ob ein Austausch von bioaktiven NO-Metaboliten zwischen Erythrozyt und Plasma stattfindet, ist derzeit noch nicht geklärt. Ziel der durchgeführten Versuche war es, diese Fragen beantworten zu können. Neue Theorien halten die Existenz von einem in der Erythrozytenmembran lokalisierten AE1-Transporter für möglich, der NO über verschiedene Bindungen an das Plasma überführt.¹²⁴

4.2.1 Biochemischer Nachweis und Differenzierung der S-Nitrosothiole im Erythrozyten

Humanes Vollblut wurde mit exogenem NO versetzt und über eine Zeitreihe inkubiert (siehe Kapitel 2.1.2). Die NO-Metabolite X-NO/RSNO, Nitrit und Nitrat wurden im Vollblut und im Plasma bestimmt. Im Vollblut fand bis zu fünf Minuten nach NO-Zusatz ein hoch signifikanter Anstieg der X-NO vom nanomolaren bis in den mittleren mikromolaren Bereich statt. Im Plasma stieg die RSNO Konzentration in den ersten fünf Minuten nicht-, aber zwischen fünf und 30 Minuten signifikant an. Zeitgleich sank die erythrozytäre X-NO-Konzentration ab. Die Ergebnisse zeigen, dass der Erythrozyt NO speichert und zeitverzögert, bioaktiv an das Plasma abgibt. Dort kann NO, in Form von RSNO gespeichert, transportiert werden. Im Plasma und im Erythrozyten stiegen die Nitritkonzentrationen bis zur ein-minütigen Inkubation an und fielen dann ab, da Nitrit zu Nitrat inaktiviert wurde. Die Nitratkonzentration, welche im Erythrozyten nicht signifikant höher als im Plasma war, stieg in beiden Kompartimenten etwa um das Dreifache über die gesamte Zeitreihe an, da Nitrat das oxidative Endprodukt im NO-Stoffwechsel darstellt. Das intraerythrozytäre Nitrit stieg nicht signifikant an. Der Erythrozyt verstoffwechselt NO über Nitrit zu Nitrat. Obwohl die Wiederfindungsrate 100% betrug, ist nicht auszuschließen, dass die Nitritwerte aufgrund eines Detektionsdefizits zu niedrig bestimmt worden sind.²⁸ Die Berechnung der Werte als Konzentrationsanstieg zum Ausgangswert zeigen, dass der Erythrozyt das exogen hinzugegebene NO zum Hauptteil als X-NO, als verfügbares NO bindet. Neben NO-Anlagerungen an das Cys-93 der β -Kette verfügen Erythrozyten noch über weitere S-Speicherformen. In der Erythrozytenmembran, in der auch G-SH Bindungsstellen vorhanden sind, besitzt

der Erythrozyten große Mengen an Sulfhydrylgruppen. Um differenzieren zu können wieviel NO im Erythrozyten und im Plasma über Thiolgruppen gebunden wird, wurden Vollblut und Plasma mit NEM inkubiert bevor NO hinzugegeben wurde. NEM besetzt die Thiolbindungsstellen. In den Ansätzen ohne vorherige NEM-Inkubation wurde das gesamte gebundene NO gemessen, nach NEM-Inkubation nur das nicht über Schwefel gebundene NO. NEM verringerte die X-NO-Konzentration im Vollblut signifikant um 50%, im Plasma wurde die RSNO-Konzentration nach NEM-Zusatz um 90% signifikant reduziert. Diesen Ergebnissen zu Folge lässt sich abschätzen, dass im Erythrozyten NO zu 50% als SNOHb und zu 50% als NOHb gebunden vorliegt. Hingegen werden im Plasma demnach 90% von NO über Thiole gebunden (RSNO).

Im Plasma hingegen wird der größte Anteil direkt zu Nitrit abgebaut. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Erythrozyten NO speichern und wieder abgeben, dieses also potentiell physiologisch relevant sein könnte, wurden die Vollblutproben im Weiteren mit steigenden NO-Konzentrationen für je fünf Minuten inkubiert, um Modulationsmöglichkeiten, bzw. eine Sättigungskinetik abschätzen zu können. Im Erythrozyten stieg die X-NO-Konzentration mit steigender NO-Konzentrationszugabe an. Dabei schienen die X-NO-Konzentrationen nicht sättigbar zu sein. Auch die erythrozytäre Nitratkonzentration stieg kontinuierlich an. Im Plasma stiegen die RSNO-Konzentrationen auch nicht nach Zusatz von erhöhter NO-Konzentration an. Höhere Konzentrationen im Inkubationsversuch konnten nicht erreicht werden, da dies zu großen Verdünnungen und damit einhergehender Ungenauigkeiten geführt hätte. An die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die zeigen, dass ein NO-Export aus den erythrozytären NO-Speichern an das Plasma stattfindet, könnten sich *in vivo* Versuche anschließen, um eine mögliche physiologische Relevanz nachzuweisen. Dazu könnte NO intravenös appliziert werden und die NO-Metabolite nach gleichem Versuchsaufbau bestimmt werden. Mittels Venenverschlußplethysmographie könnte die systemische Wirkung in Analogie der Wirkung von plasmatischen RSNO gemessen werden. Weitere Differenzierungen von HbNO, und SNOHb könnten sich anschließen.

4.3 Physiologische Relevanz der Bildung, Speicherung und des Transportes von NO im Erythrozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten neben der Fähigkeit zur NO-Bildung auch über bioaktive Speicherformen verfügen, aus denen eine NO-Abgabe an das umgebende Plasma stattfinden kann. Dies ist Voraussetzung, um systemisch wirken zu können. Das Blutvolumen besteht zu 45% aus Erythrozyten. Da diese auf allen vier Ebenen (Bildung, Speicherung, Transport und Abbau) des NO-Stoffwechsels interagieren, könnten sie entscheidend an der Regulation der NO-Konzentration *in vivo* teilnehmen.

Es scheint, dass eine verringerte bioaktive Verfügbarkeit von NO an der Entstehung von verschiedensten Erkrankungen beteiligt ist: Arteriosklerose, arterielle Hypertonie, akutes Koronarsyndrom, Diabetes, Impotenz sowie Störungen der Wundheilung. Zu hohe NO-Konzentrationen hingegen sollen an der Pathogenese der Sepsis sowie des Reperfusionssyndroms beteiligt sein.

NO liegt im Kreislauf an Proteine des Plasmas und der Blutzellen gebunden vor und wird in Abhängigkeit von der HWZ abgegeben. In verschiedenen Studien wurde belegt, dass die Anreicherung von gebundenem NO günstig wirkt. Eine Verminderung von Gefäßverschlüssen, eine antithrombotische Wirkung, eine Verringerung des Ischämischadens sowie eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion wurde unter Einfluß von gebundenem NO nachgewiesen.

Die Modulation der Bioverfügbarkeit von NO bildet in der Medizin einen wichtigen Therapieansatz. Verschiedene Medikamente wie zum Beispiel NO-Donatoren und Stickstoffmonoxid freisetzende Substanzen werden seit mehr als hundert Jahren vor allem als Koronartherapeutika eingesetzt. Den positiven Effekt erzielt NO hierbei durch Vasodilatation, durch Verminderung der Thrombozytenaggregation und durch seine antiproliferative und antioxidative Wirkung. Angewendet werden organische Nitrate, wie zum Beispiel Glyceroltrinitrat, aus denen NO reduktiv freigesetzt wird, oder Substanzen wie Molsidomin, aus denen die Freisetzung oxidativ erfolgt. Der Langzeiteffekt der so

genannten NO-Donatoren ist noch nicht ausreichend erforscht.⁴⁹ Fraglich ist, ob eine Dauertherapie mit dieser Substanzklasse die Prognose bei Arteriosklerose verbessert. Studien dieser Art stehen noch aus. Häufig wird eine Nitrattoleranz beobachtet. Dies bedeutet, dass für die gleiche Wirkung eine stetig höhere Medikamentendosis benötigt wird. Über welche Mechanismen die NO-Donatoren die endogenen NO-Speicher modulieren, ist noch völlig unklar. Durch genauere Kenntnis über diesen Wirkmechanismus und differenzierteres Wissen über die erythrozytären NO-Speicher könnte sich dieser NO-Pool therapeutisch zunutze gemacht werden.

In arteriosklerotisch veränderten Gefäßen ist die Aktivität und NO-Freisetzung der eNOS nahezu aufgehoben. Kompensativ wird die Ansprechbarkeit auf exogen appliziertes NO erhöht. Aortenringe von eNOS-defizienten Mäusen, die eine gesteigerte Sensitivität gegenüber NO aufweisen, dilatierten in Anwesenheit von L-Arginin-stimulierten Ghosts (separierte Erythrozytenmembranen). Durch eine verbesserte Ansprechbarkeit auf NO könnte die Wirkung von erythrozytär gebildetem NO verstärkt werden. Dies könnte in Gefäßabschnitten, in denen eine endotheliale Dysfunktion eine Erniedrigung des bioaktiven NO bedingt, entscheidend sein.

Die physiologische Relevanz einer NO-Synthese des Erythrozyten oder Auswirkungen deren Modulation sind noch völlig unbekannt. Bisher bietet die Literatur lediglich Daten über Einflüsse von endothelial gebildetem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit und die Thrombozytenaggregation.^{131,156} Demnach soll die Änderung der erythrozytären Verformbarkeit von der NO-Konzentration abhängen, wobei niedrige NO-Spiegel die Verformbarkeit begünstigen und hohe NO-Konzentrationen diese verschlechtern.⁶ Somit könnte die im Rahmen entzündlicher Prozesse herabgesetzte Verformbarkeit erklärt werden. Diese Effekte konnten durch Inhibition der iNOS verringert werden.⁶ Es gibt Hinweise, dass NO über Konformationsänderungen der an der Membranstabilität beteiligten Enzyme, wie zum Beispiel Spektrin, Ankyrin und Band-3-Protein Einfluss auf die Verformbarkeit nimmt.¹⁴⁸ Möglicherweise verändert die NO-Produktion des Erythrozyten die Verformbarkeit der Zelle selbst. Eine Modulation der erythrozytären NO-Bildung wäre durch eine intravenöse oder auch orale

medikamentöse Applikation oder durch eine inhalative NO-Therapie denkbar. Durch eine verbesserte Erythrozytenverformbarkeit könnte die Passage durch die vaskuläre Mikrostrombahn erleichtert werden. Somit wäre eine schnellere Sauerstoffversorgung des Gewebes nach ischämischen Ereignissen (Myokardinfarkt, Apoplex) möglich. Innerhalb des Gefäßsystems ist der Metabolismus von Stickstoffmonoxid nicht einheitlich, da sich das Verhältnis der Blutbestandteile, Flusseigenschaften und Scherkräften entlang des Gefäßbettes ändert. In der Mikrostrombahn ist die Erythrozytenverformbarkeit besonders wichtig, da das Endothel der Kapillaren (4-10µm) nur einschichtig ist. Hingegen besitzen die Arteriolen (10-100µm) zwei Muskelzellschichten in der Tunika intima, über die der Blutfluss in den Kapillaren reguliert wird.⁹⁶ Da der Durchmesser des Erythrozyten 7,5µm beträgt, könnte eine erythrozytäre NO-Synthese die ungehinderte Passage durch das Kapillarbett begünstigen. In der Mikrostrombahn sind die Diffusionswege relativ kurz, zugleich ist die eNOS-Aktivität geringer als in größeren Gefäßen. Bei gleichem NO-Verbrauch in den Gefäßabschnitten würde die NO-Bildung des Erythrozyten diese „Lücke“, besonders in pathologischen Bereichen, füllen können.⁵

Diese Hypothese wird durch Beobachtungen bei Erythropoetin überexprimierten Mäusen unterstützt, die nur durch eine kompensativ stark gesteigerte NO-Synthese überleben. Eine Inhibition der NOS führt bei diesen Tieren innerhalb weniger Stunden durch Erythrozytenakkumulation in den terminalen Arteriolen zum Tod. Dies verdeutlicht den Stellenwert der Erythrozytenverformbarkeit in der Mikrostrombahn.¹⁶⁰

Sowohl die Hemmung der NO-Bildung, als auch eine schnelle NO-Inaktivierung durch Hämoglobinzugabe verschlechtert die Erythrozytenverformbarkeit. Diese Ergebnisse könnten helfen, Beobachtungen bei Transfusionsschäden oder das Auftreten von Zirkulationsstörungen während hämolytischer Krisen zu erklären. In beiden Situationen ist eine erhöhte freie Hämoglobinkonzentration anzunehmen, die zu einer Beeinträchtigung der Erythrozytenverformbarkeit führt. Modulationen des NO-Pools durch Inhalation von NO oder L-Arginin zeigen eine Verbesserung bei akuten Gefäßverschlüssen und pulmonal-arterieller Hypertonie.

Die erythrozytäre NO-Produktion könnte im Rahmen hämoreologischer Erkrankungen eine bedeutende Rolle übernehmen.

Es war bekannt, dass auch Thrombozyten in aktiviertem Zustand NO synthetisieren können. Dadurch sollten Änderungen bezüglich der Zellstabilität sowie der Thrombozytenaggregation bewirkt werden können. Chen und Metha zeigten 1998, dass durch Hemmung der erythrozytären NO-Synthase die Aggregabilität zunahm.²⁰ Neueste Untersuchungen wiesen eine Verringerung der Thrombozytenaggregation durch erythrozytär gebildetes NO nach (unveröffentlichte Daten Kleinbongard, kardiologisches Labor Düsseldorf).

Jüngsten Daten zufolge laufen die *in vivo* Reaktionen, die zum NO-Abbau führen, um ein Vielfaches langsamer ab, als durch Bestimmung der *in vitro* Reaktion von Oxyhämoglobin und NO anzunehmen war.⁶¹ Flussdynamische Eigenschaften des Plasmas, die relative Lipophilie des NO-Moleküls und Besonderheiten der erythrozytären Membran deuten darauf hin, dass diese ein Hindernis für den Eintritt von NO darstellt. Möglicherweise verhindert das erythrozytär synthetisierte und freigesetzte NO den NO-Abbau aus anderen Quellen. Denkbar wäre, dass die NO-Bildung der erythrozytären NOS elektromechanische Membranveränderungen bedingt. Unter diesen Voraussetzungen würden Erythrozyten eine völlig neue Rolle im NO-Stoffwechsel einnehmen.

5 Ausblick

Neben dem Endothel bilden die Erythrozyten eine „Quelle“ von intravaskulär gebildetem NO und nehmen durch bioaktiven NO-Export in das Plasma aktiv an der Modulation der NO-Pools teil. Im Rahmen von Herzerkrankungen und Arteriosklerose ist die bioaktive Verfügbarkeit von NO vermindert. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass die Prognose von Herzerkrankungen und Myokardinfarkten durch eine vorhandene Anämie verschlechtert wird. Dies könnte durch eine geringere erythrozytäre NO-Produktion erklärt werden, die mutmaßlich unter Bedingungen in denen die eNOS Aktivität verringert ist, an physiologischer Bedeutung gewinnt, bzw. sogar teilweise kompensativ wirken könnte. Eine Quantifizierung der erythrozytären eNOS-Aktivität könnte Bedeutung in der Diagnose und Risikoabschätzung von kardiovaskulären Erkrankungen einnehmen. Patienten mit NO-Defizit könnten präventiv erkannt werden.

Interventionen zur Verbesserung der Expression einer NO-Synthase im Erythrozyten könnten nicht nur einen wichtigen Eckpfeiler in der Therapie der Arteriosklerose bilden, sondern auch in der Behandlung hämatologischer und septischer Erkrankungen neue therapeutische Möglichkeiten bieten.

6 Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO), ein biologisches Signalmolekül, welches an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen mitwirkt, ist im kardiovaskulären System von besonderer Bedeutung. NO wird von einer NO-Synthase aus L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff gebildet. Im Gefäßsystem wird NO überwiegend von der endothelialen NOS synthetisiert und beeinflusst den Gefäßtonus, die Blutgerinnung, die Adhäsion und die Verformbarkeit von Blutzellen. Es war unbekannt, ob Erythrozyten nicht nur NO abfangen und unter bestimmten Bedingungen transportieren, sondern selbst bilden und somit eine völlig neue Rolle im NO-Stoffwechsel einnehmen könnten.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In *in vitro* Inkubationen von Vollblut und Plasma fand eine enzymabhängige NO-Bildung, gemessen als Nitrit, statt. Diese ließ sich spezifisch durch L-Arginin stimulieren und durch einen Inhibitor vermindern.
- Die exogene Applikation von NO zum Vollblut führte zu einem Anstieg des gespeicherten NO im Erythrozyten. Zeitversetzt, nach Absinken der NO-Speicher im Erythrozyten, wurde NO an das Plasma abgegeben.
- Die NO-Speicher im Erythrozyten konnten konzentrationsabhängig vermehrt, jedoch nicht gesättigt werden.

Erythrozyten stellen neben dem Endothel eine neue „Quelle“ von intravaskulär synthetisiertem und gespeichertem NO dar. Durch den NO-Export an das Plasma beeinflussen sie aktiv den zirkulierenden NO-Pool.

Die Ergebnisse könnten Grundlagen zur Modulation einer pathologisch veränderten NO-Verfügbarkeit und möglicherweise zur Therapie damit verbundener Krankheitsbilder dienen.

7 Literaturverzeichnis

1. Al Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR, Flitney FW. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol.* 1997; 121: 1047-1050.
2. Aoki T. Continuous flow determination of nitrite with membrane separation and chemiluminescence detection. *Anal Biochem.* 1990; 4: 128-130.
3. Arnette DR, Stamler JS. NO⁺, NO[•], and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implication of regulation of physiological functions by S-nitrosation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 318: 279-285.
4. Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 10089-10093.
5. Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 421-427.
6. Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart C.* 2001; 280: H2848-H2856.
7. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 1620-1624.
8. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature.* 1993; 364: 584.
9. Beckmann JS, Wink DA & Crow JP. Methods in nitric oxide research. *Feelisch M & Stamler J (eds)*, pp. 61-70 John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1996.
10. Berkels R, Bertsch A, Zuther T, Dhein S, Stockklauser K, Rösen R. Evidence for a NO synthase in porcine platelets which is stimulated during activation/aggregation. *Eur J Haematol.* 1997; 58: 307-313.

11. Bhattacharya S, Patra SC, Roy SB, Kahn NN, Sinha, AK. Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes. *Arch Physiol Biochem.* 2001; 109: 441-449.
12. Boese M, Mordvintcev PI, Vanin AF, Busse R, Mulsch A. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex. *J Biol Chem.* 1995; 270: 29244-29249.
13. Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1897-1918.
14. Bonner FT & Stedman G. Methods in nitric oxide research. *Feelisch M & Stamler J(eds)*; pp. 3-18 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1996).
15. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 1995; 17: 331-340.
16. Butler AR, Megson IL, Wright PG. Diffusion of nitric oxide and scavenging by blood in the vasculature. *Biochem Biophys Acta.* 1998; 1425: 168-176.
17. Butler AR, Rhodes P. Chemistry, analysis and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem.* 1997; 249: 1-9.
18. Cantilena LRJr, Smith RP, Frasur S, Kruszyna H, Kruszyna R, Wilcox DE. Nitric oxide haemoglobin in patients receiving nitroglycerin as detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Lab Clin Med.* 1992; 120: 826-827.
19. Chakraborty S, Girish GV, Sinha AK. Impaired binding of insulin to erythrocyte membrane receptor and the activation of nitric oxide synthase by the hormone in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130: 294-300.
20. Chen LY & Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 32: 57-56
21. Chen LY, Mehta JL. Downregulation of nitric oxide synthase activity in human platelets by nitroglycerin and authentic nitric oxide. *J Investig Med.* 1997; 45: 69-74.
22. Chilian WM, Gutterman DD. Prologue: new insights into the regulation of the coronary microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 48: H2585-H2586.

23. Clancy RM, Miyazaki Y, Cannon PJ. Use of thionitrobenzoic acid to characterize the stability of nitric oxide in aqueous solutions and in porcine aortic endothelial cell suspensions. *Anal Biochem.* 1990; 191: 138-143.
24. Cox RD. Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal Chem.* 1980; 52: 332-335.
25. De Belder A, Radomski M, Hancock V, Brown A, Moncada S, Martin J. Megakaryocytes from patients with coronary atherosclerosis express the inducible nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15: 637-641.
26. De Belder AJ, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide and the pathogenesis of heart muscle disease. *Europ Clin Invest.* 1995; 25: 1-8.
27. De Graaf JC, Banga JD, Moncada S, Palmer RM, Groot PG de, Sixma JJ. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation.* 1992; 85: 2284-2290.
28. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier M, Hsu L, Machado R, Shiva S, Powe GG, Kelm M, Gladwin TM, Schlechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood.* 2004; epub, ahead of print.
29. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N & Gogas H. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1995; 15: 1435-1446.
30. Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorgan Biochem.* 1981; 14: 351-358.
31. Durak I, Cimen MYB, Kacmaz M, Gören D, Öztürk H S. Aspirin induces erythrocyte nitric oxide synthase activity *in vivo*. *Clin Chim Acta.* 2001; 314: 265-267.
32. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Nisha S, Bryan NS, Jourdain D, Kelm M. Concomitant s-, n-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO *in vivo*. *Faseb J.* 2002; 16: 1775-1785.
33. Feelisch M, Stamler J. *Methods in nitric oxide research.* 1996. Chichester.
34. Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature.* 1994; 368: 62-65.

35. Feldman PL, Griffith OW.& Stuehr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News*. 1993; 20: 26-38.
36. Feron O, Saldana F, Michel JB, Michel T. The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle. *J Biol Chem*. 1998; 273: 3125-3128.
37. Foley E, O'Farrell PH. Nitric oxide contributes to induction of innate immune responses to gram-negative bacteria in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2003; 17: 115-125.
38. Folts JD, Stamler J, Loscalzo J. Intravenous nitroglycerin infusion inhibits cyclic blood flow responses caused by periodic platelet thrombus formation in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*. 1991; 83: 2122-2127.
39. Fontijn A, Sabadell AJ, Ronco RJ. Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Anal Chem*. 1970; 42: 579.
40. Ford PC, Wink DA & Stanbury DM. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett*. 1993; 326: 1-3.
41. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, Ostrovski L, Fairhead T, Reinhardt P, Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest*. 1998; 101: 2497-2505.
42. Franchini A, Conte A, Ottaviani E. Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol*. 1995; 5: 463-478.
43. Freedman J E, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney J F, Vita J A. Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation*. 1998; 98: 1481-1486.
44. Frey Ad, Farres J, Bollinger CJ, Kallio PT. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68: 4835-4840.
45. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989; 3: 2007-2018.
46. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288: 373-376.
47. Furchgott RF. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*. 1983; 53: 557-573.

48. Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic funktion for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 10378-10383.
49. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.* 2002; 55: 250-260.
50. Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 418: 291-296.
51. Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamagna C. Erythrocyte Stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high NOS activity and release an NOS-inducing soluble factor. *J Exp Med.* 1995; 182: 677-688.
52. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 1998; 273: 11038-11043.
53. Gladwin MT. Relative role of heme nitrosylation and β -cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 9943-9948.
54. Gow AJ, Buerk DG, Ischiropoulos HA. A novel reaction mechanism for the formation of S-Nitrosothiols in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272: 2841-2845.
55. Greenwood NN, Earnshaw A. Chemistry of the Elements. *Pergamon Press*, New York. 1984.
56. Griendling K, & Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 1996; 10: 283-292.
57. Gross SS & Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and haemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 9967-9969.
58. Grube R, Kelm M, Motz W, Strauer BE. Measurement of oxides of nitrogen in biological fluids: implication for studies in vivo. In: The biology of nitric oxide, Vol 4: *Enzymology, biochemistry and immunology*. Moncada S, Feelisch M, Busse R, Higgs EA, eds. 1994. Portland Press, London.
59. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature.* 1986; 320: 454-456.
60. Guslandi M. Nitric oxide: an ubiquitous factor in the gastrointestinal tract. *Dig Dis.* 1994; 12: 28-36.

61. Halm, MP, Chichery M P, Chichery R. Effect of nitric oxide synthase inhibition on the manipulative behaviour of *Sepia officinalis*. *Comp Biochem Physiol C*. 2003; 134: 139-146.
62. Hampl V, Walters CL, Archer SL. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: Methods in nitric oxide research. *Feelisch M, Stamler JS, eds*. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
63. Heslop RB& Jones K. Inorganic Chemistry. 1976. Elsevier, Amsterdam.
64. Hickey M, Granger D. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand*. 2001; 173:119-126.
65. Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ. Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 10992-10996.
66. Hofseth LJ, Hussain SP, Wogan GN, Harris CC. Nitric oxide in cancer and chemoprevention. *Free Radic Biol Med*. 2003; 34: 955-968.
67. Holmes AJ, Williams DLH. Reactions of S-Nitrosothiols with ascorbat: clear evidence of two reactions. *Chem Comm*. 1998; 16: 1711-1712.
68. Ignarro IJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Sci Am*. 1990; 535: 560.
69. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*. 1987; 61: 866-879.
70. Ischiropoulos H., Zhu L, Beckmann S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1992; 208: 446-457.
71. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J & Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996; 380: 221-226.
72. Jourdeuil D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 409-417.
73. Jubelien BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens*. 1996; 9: 1214-1219.

74. Kamimura Y, Fujii T, Kojima H, Nagano T, Kawashima K. Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci.* 72: 2151-2154.
75. Kang ES et al. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS-proteins. *J Lab Clin Med.* 2000; 135: 444-451.
76. Karlsson K, Marklund SL. Heparin-induced release of extra-cellular superoxide dismutase to human blood plasma. *Biochem J.* 1987; 242: 55-59.
77. Katzoff A, Ben Gedalaya T, Susswein AJ. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in Aplysia. *J Neurosci.* 2002; 22: 9581-9594.
78. Keaney JF, Jr, Simon DI, Stamler JS, Jaraki O, Scharfstein J, Vita JA, Loscalzo J. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J Clin Invest.* 1993; 91: 1582-1589.
79. Kelm M & Yoshida K. Methods in nitric oxide research. *Feelisch M & Stamler J(eds)*; pp. 47-58 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1996).
80. Kelm M, Feelisch M, Deussen A, Schrader J & Strauer BE. The role of nitric oxide in the control of coronary vascular tone in relation to partial oxygen pressure, perfusion pressure and flow. *Cardiovasc Pharmacol J.* 1991; 17: 95-99.
81. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects. Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. *Portland Press.* London, Colchester.
82. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper H, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 1988; 154: 236-244.
83. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res.* 1990; 66: 1561-1575.
84. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411: 273-289.
85. Kindgen-Milles D, Arndt JO. Nitric oxide as a link in the generation of pain from veins in humans. *Pain.* 1996; 64: 139-142.

86. Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein containing sample. *Methods Enzymol.* 2002; 359: 158-168.
87. Kleinbongard P., Physiologische Relevanz des L-Arginin-Stoffwechsels im Blut der Säugetiere. Dissertation Fakultät Biologie der Ruhr-Universität Bochum. 2003
88. Kleinman WA, Richie JP, Jr. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 2000; 60: 19-29.
89. Kolb H, Kolb-Bachhofen V. Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator? *Immunol Today.* 1998; 19: 556-561.
90. Kooy N & Royall J. Agonist-induced peroxynitrite production by endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1994; 310: 353-359.
91. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachhofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? *Nitric Oxide.* 1997; 1: 107-120.
92. Kroncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachhofen. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 2001;1: 1407-1420.
93. Lancaster jr JR. Simulation of the diffusion and reaction of the endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 8137-8141.
94. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 8: 12814-12819.
95. Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem.* 1991; 266: 23790-23795.
96. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation.* 2001; 104: 735-740.
97. Liao JC, Hein W, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 18709-18713.

98. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR, Jr. Diffusion-limited reaction of nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem.* 1998; 273: 18709-18713.
99. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR, Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 2175-2179.
100. Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature.* 1992; 358:676-677.
101. Malinski T. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem biophys Res Commun.* 1993; 193: 1076-1082.
102. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res.* 2000; 32: 1-9.
103. Marley R, Patel RP, Orié N, Ceaser E, Darley-Usmar V, Moore K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 688-696.
104. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT. Structure and chromosomal localisation of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem.* 1993; 268: 17478-17488.
105. Martin MJ, Jimenez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des.* 2001; 7: 881-908.
106. Mc Mahon TJ, Moon RE, Luschinger BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawlowski JR, Watke P, Singel DL, Piantadosi CA, Stamler JS. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat Med.* 2002; 8: 711-717.
107. Megson IL, Flitney FW, Bates J & Webster R. Repriming of vascular smooth muscle photorelaxation is dependent upon endothelium-derived nitric oxide. *Endothelium.* 1995; 3: 39-46.
108. Mehta JL, Chen LY, Kone BC, Mehta P, Turner P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets. *J Lab Clin Med.* 1995; 3: 370-377.
109. Metha JL, Metha P, Li D. Nitric oxide synthase in adult red blood cells: Vestige of an earlier age or a biologically active enzyme? *J Lab Clin Med.* 2000; 135: 430-431.

110. Meyding-Lamade U, Seyfer S, Haas J, Dvorak F, Kehm R, Lamade W, Hacke W, Wildemann B. Experimental Herpes simplex virus encephalitis: inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in mouse brain tissue. *Neurosci Lett.* 2002; 318: 21-24.
111. Minning DM, Gow AJ, Bonaventura J, Braun R, Dewhirst M, Goldberg DE, Stamler JS. Ascaris haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature.* 1999; 401: 497-502.
112. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995; 9: 1319-1330.
113. Moncada S. & Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329: 2002-2012.
114. Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop M, Soubrier F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 198: 1027-1033.
115. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993; 316: 175-180.
116. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls and controls. *Cell.* 1994; 78: 915-918.
117. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6: 3051-3064.
118. Necchi D, Virgili M, Monti B, Contestabile A, Scherini E. Regional alterations of the NO/NOS system in the aging brain: a Biochemical, histochemical and immunohistochemical study in the rat. *Brain Res.* 2002; 933: 31-41.
119. Özüyaman B, Gödecke A, Küsters S, Kirchhoff E, Scharf RE, Schrader J. Endothelial nitric oxide synthase plays a minor role in inhibition of arterial thrombus formation. *Endothelium and Vessel Development.* Schattauer Verlag, Stuttgart, 2005.
120. Palmer RM. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg.* 1993; 128: 396-401.
121. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988; 333: 664-666.

122. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524-526.
123. Paunel AN, Dejam A, Thelen S, Kirsch M, Horstjann M, Gharini P, Meertz M, Kelm M, de Groot H, Kolb-Bachofen V, Suschek CV. Enzyme-independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38: 606-615.
124. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*. 2001; 409: 622-626.
125. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*. 1998; 97: 263-267.
126. Preik-Steinhoff H, Kelm M. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with high-performance anion-exchange chromatography and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl*. 1996; 685: 348-352.
127. Pryor WA, Saquadrino GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol Lung*. 1995; 268: L699-L722.
128. Pufahl RA, Marletta MA. Oxidation of NG-Hydroxyl-L-Arginine by nitric oxide synthase: evidence of the involvement of the heme in catalysis. *Biochem Biophys Res Comm*. 1993; 193: 963-970.
129. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thrombosis and Haemostasis*. 1993; 70: 36-41.
130. Radomski, MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci*. 1990; 87: 5193-5197.
131. Radomski, MW, Palmer RM, Moncada S. The antiaggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987; 92: 639-646.
132. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002a; 33: 1590-1596.

133. Rassaf T, Bryan NS, Maloney RE, Specian V, Kelm M, Kalyanaram B, Rodriguez J, Feelisch M. No adducts in mammalian red blood cells: too much or too little? *Nature medicine*. 2003; 9: 481-483.
134. 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. *Circulation Research*. 2002; 91: 470-477.
135. Reccia FA, Vogel TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart C*. 2000; 279: H852-H856.
136. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci*. 1989; 86: 3375-3378.
137. Richter N, Peterson AS, Wennmalm A, Schimke I. Detection of an approximately 100kD protein with strong immunoreactivity to antibodies specific for inducible nitric oxide synthase (iNOS) but without NOS activity in neutrophils of patients suffering from sepsis: results of a preliminary study. *Inflamm Res*. 1999; 48: 651-656.
138. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis – an update. *N Engl J Med*. 1986; 324: 488-500.
139. Rubanyi GM. The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22: S1-S14.
140. Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci*. 1995; 57: 2049-2055.
141. Scharfstein JS, Keaney JF, Jr., Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, Loscalzo J. In vivo transfer of nitric oxide plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest*. 1994; 94: 1432-1439.
142. Schmachtenberg O, Bacigalupo J. Calcium mediates the NO-induced potassium current in the toad and rat olfactory receptor neurons. *J Membr Biol*. 2000; 175: 139-147.
143. Schumacher T, Leschniewski M, Brause M, Kelm M. L-Hydroxyarginin als Indikator einer Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase bei septischen Patienten. *Z Kardiol*. 2001; 90: 73.

144. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of ascorbate and protein thiols in the release of nitric oxide from S-nitroso-albumin and S-nitroso-glutathion in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 1997; 1997: 633-642.
145. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, Peach MJ. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1992; 267: 15274-15276.
146. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest.* 1994; 94: 2231-2236.
147. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91: 31S-38S.
148. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992; 266(5): 68-77.
149. Snyder SH. More jobs for that molecule. *Nature.* 1994; 372: 504-505.
150. Stamler JS et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997; 276: 2034-2037.
151. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 7674-7677.
152. Stamler JS, Loscalzo J. Capillary zone electrophoretic detection of biological thiols and their S-nitrosated derivatives. *Anal Chem.* 1992; 64: 779-785.
153. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 444-448.
154. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutrition Rev.* 1996; 1: 1-30.
155. Stamler JS. Redox signalling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell.* 1994; 78: 931-936.

156. 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*. 1999; 50: 629-637.
157. Stuehr DJ, Kwon NS, Gross SS, Thiel BA, Levi R, Nathan CF. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 161: 420-426.
158. Suschek CV, Schnorr O, Kolb-Bachofen V. The role of iNOS in chronic inflammatory processes in vivo: is it damage-promoting, protective, or active at all? *Curr Mol Med*. 2004; 4: 763-775.
159. Takahashi T. Pathophysiological significance of neuronal nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract. *J Gastrol*. 2003; 38: 421-430.
160. Teichert AM, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB, Phillips MJ, Marsden PA. In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278: H1352-H1361.
161. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Bol Med*. 1994; 16: 383-391.
162. Vallance P, Patton S, Bhagat K, MacAllister R, Radomski M, Moncada S, Malinski T. Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet*. 1995; 345: 153-154.
163. Vanderwinden JM. Role of nitric oxide in gastrointestinal function and disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 1994; 57: 224-229.
164. Vaughn MW, Huang KT, Kuo L, Lio JC. Erythrocytes possesses intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem*. 2000; 275: 2342-2348.
165. Venturini CM, Palmer RMJ, Moncada S. Vascular smooth muscle contains a depletable store of vasodilator which is light-activated and restored by donors of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 266: 1497-1500.
166. Vliet, van der A, Hoen PA, Wong PS, Bast A, Cross CE. Formation of S-nitrosothiols via direct nucleophilic nitrosation of thiols by peroxynitrite with elimination of hydrogen peroxide. *J Biol Chem*. 1998; 273: 30255-30262.
167. Walter U. Physiological role of cGMP and the cGMP dependent-protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1989; 113: 41-88.

168. Wennmalm A, Benthin G, Petersson AS. Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red blood cell haemoglobin. *Br J Pharmacol*. 1992; 106: 507-508.
169. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrullin. *American Journal of Physiology*. 1981; 241: 473-480.
170. Wink DA, Beckman JS, Ford PC. Kinetics of nitric oxide reaction in liquid and gas phase. In: *Methods in nitric oxide research*. Feelisch M, Stamler J, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
171. Wink DA, Cook JA, Kim SY, Vodovotz Y, Pacelli P, Krishna MB, Russo A, Mitchell JB, Jourdeuil D, Miles AM, Grisham MB. Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates. Chemical aspects involved in the balance between oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem*. 1997; 272: 11147-11151.
172. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer JK: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 1991; 254: 1001-1003.
173. Yang BC, Nichols WW, Mehta JL. Cardioprotective effect of red blood cells on ischemia and reperfusion injury in isolated rat heart: release of nitric oxide as potential mechanism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 1996; 1: 297-305.
174. Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res*. 1995; 77: 87-96.

8 Lebenslauf

Name: Almut Geßmann
Geburtsdatum: 17. Mai 1976
Geburtsort: Leverkusen
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1982-1986 Gemeinschafts-Grundschule Sandberg,
Monheim
1986-1995 Otto-Hahn-Gymnasium, Monheim

Hochschulausbildung:

09/1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2002-04/2003 Praktisches Jahr:
1. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2. Texas Heart Institute Houston, Texas,
USA
3. Kantonsspital Luzern, Schweiz
05/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Laufbahn:

10-11/03 Hospitation in der Gynäkologie/
Geburtshilfe im Universitätsspital Basel,
Schweiz
01/2004 Assistenzärztin der Gynäkologie/
Geburtshilfe, Krankenhaus Bethanien,
Moers

Publikationen:

1. 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).

2. 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 im humanen Vollblut (NO-Forum, Magdeburg, 2001).
3. 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)

9 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas, für seinen Einsatz, seine Unterstützung und die Möglichkeit selbständiges, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen, bedanken. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement sind mir ein Vorbild.

Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard danke ich ganz besonders für die Einführung und die große Unterstützung beim experimentellen Arbeiten. Ihre unermüdliche Geduld und Diskussionsbereitschaft haben mir sehr geholfen diese Arbeit erfolgreich zu beenden. Für ihr kritisches Korrekturlesen und ihr großes Engagement danke ich ihr ausgesprochen.

Herrn Dr. med Tienush Rassaf danke ich für seine konstruktiven Vorschläge und Ideen, die mich unterstützten und motivierten.

Frau MTA Simone Matern, Frau MTA Gabi Dömer und Frau BTA Claudia Ferfers danke ich für ihre Hilfe und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im kardiologischen Labor.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern und Studenten mit denen ich im Kardiologischen Labor zusammenarbeiten durfte. Durch sie bleibt neben der fachlich sehr interessanten Arbeit die Zeit im Kardiologischen Labor ein bleibender Eindruck und eine schöne Erinnerung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir durch uneingeschränkte Unterstützung, Geduld und Verständnis den Weg durch das Studium und den Berufsstart ermöglichten, sowie Joachim Raabe, der mir mit großer Unterstützung und mit Verständnis immer zur Seite stand.

Abstract zur Dissertationsschrift:

***In vitro* Untersuchungen**
Zur Bildung, Speicherung und Transport
von NO in humanem Vollblut:
relative Bedeutung von Plasma und Erythrozyt
vorgelegt von
Almut Geßmann

Stickstoffmonoxid (NO), ein biologisches Signalmolekül, welches an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen mitwirkt, ist im kardiovaskulären System von besonderer Bedeutung. NO wird von einer NO-Synthase aus L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff gebildet. Im Gefäßsystem wird NO überwiegend von der endothelialen NOS synthetisiert und beeinflusst den Gefäßtonus, die Blutgerinnung, die Adhäsion und die Verformbarkeit von Blutzellen. Es war unbekannt, ob Erythrozyten nicht nur NO abfangen und unter bestimmten Bedingungen transportieren, sondern selbst bilden und somit eine völlig neue Rolle im NO-Stoffwechsel einnehmen könnten.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In *in vitro* Inkubationen von Vollblut und Plasma fand eine enzymabhängige NO-Bildung, gemessen als Nitrit, statt. Diese ließ sich spezifisch durch L-Arginin stimulieren und durch einen Inhibitor vermindern.
- Die exogene Applikation von NO zum Vollblut führte zu einem Anstieg des gespeicherten NO im Erythrozyten. Zeitversetzt, nach Absinken der NO-Speicher im Erythrozyten, wurde NO an das Plasma abgegeben.
- Die NO-Speicher im Erythrozyten konnten konzentrationsabhängig vermehrt, jedoch nicht gesättigt werden.

Erythrozyten stellen neben dem Endothel eine neue „Quelle“ von intravaskulär synthetisiertem und gespeichertem NO dar. Durch den NO-Export an das Plasma beeinflussen sie aktiv den zirkulierenden NO-Pool.

Die Ergebnisse könnten Grundlagen zur Modulation einer pathologisch veränderten NO-Verfügbarkeit und möglicherweise zur Therapie damit verbundener Krankheitsbilder dienen.

Düsseldorf, Januar 2006


Prof. Dr. med. M. Kelm

