

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

**Der Einfluss oral supplementierten Nitrats auf vaskuläre  
Alterungsprozesse**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Christian Hinzmann

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schneider

Meiner Freundin Lisa in Dankbarkeit gewidmet

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Originalarbeit:

- Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Deenen R, Pohl J, Stock P, **Hinzmann C**, Kelm M, Rassaf T. Age-related vascular gene expression profiling in mice. *Mech Ageing Dev.* 2014;135:15-23.

## Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Ein hohes Lebensalter wird als entscheidender Risikofaktor für solche Erkrankungen postuliert. In diesem kommt es zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, welche als Vorstufe der Arteriosklerose angesehen wird. Außerdem bildet sich eine Versteifung arterieller Gefäßwände aus, die eine systolische Hypertonie hervorruft. Für die Manifestation beider Prozesse scheint eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) eine wichtige Rolle zu spielen. Physiologisches Altern geht mit einer veränderten Regulation zellulärer Signalwege und des Genexpressionsprofils der Zellen einher. Anorganisches Nitrat, das vor allem in grünem Blattgemüse enthalten ist, stellt ein Produkt im Oxidationsstoffwechsel von NO<sup>•</sup> dar. Im Körper kann Nitrat erst zu Nitrit und dann zu NO<sup>•</sup> reduziert werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Modulation des endogenen NO-Pools durch eine orale Supplementierung die altersabhängige vaskuläre Dysfunktion beeinflusst. Zudem sollte geklärt werden, ob ein möglicher Effekt dessen über eine differenzielle Genexpression erklärt werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen sich dabei wie folgt zusammenfassen:

- 1.) Die chronische Zufuhr von Nitrat führt bei alten und jungen Mäusen zu einem Anstieg der Plasmaspiegel von Nitrat. Bei alten Mäusen kommt es zusätzlich zu einem Anstieg von Nitrit.
- 2.) Im Alter sind funktionelle Veränderungen in Form einer erhöhten Pulswellengeschwindigkeit, erhöhten systolischen und mittleren Blutdrucks sowie einer verringerten endothelabhängigen Dilatation an isolierten Aortenringen feststellbar. Eine exogene Zufuhr von Nitrat bewirkt eine Verbesserung der Gefäßfunktion im Alter.
- 3.) Alterationen in der vaskulären Genexpression im Alter sind durch eine orale Supplementierung mit Nitrat beeinflussbar und partiell reversibel.

Eine Applikation anorganischen Nitrats kann Veränderungen, die durch den vaskulären Alterungsprozess hervorgerufen werden, günstig beeinflussen. Im Rahmen der für die Untersuchungen gewählten tierexperimentellen Modells moduliert eine Gabe von Nitrat das Genexpressionsprofil im Alter. Dadurch beeinflusst es zelluläre Signalwege, die in den vaskulären Alterungsprozess involviert sind, positiv. Oral zugeführtes anorganisches Nitrat kann daher bei möglichen therapeutischen Ansätzen für die Verbesserung der Gefäßfunktion im Alter eine entscheidende Rolle spielen.

## Abkürzungen

ACh	Acetylcholin
AGE	advanced glycation products, <i>engl.</i>
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
Atp2b2	plasma membrane calcium-transporting ATPase 2, <i>engl.</i>
BH4	Tetrahydrobiopterin
bpm	beats per minute, <i>engl.</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA, <i>engl.</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz-Detektions-Anlage
cNOS	konstitutive NO-Synthase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTP	Cytidintriphosphat
DAVID	database for annotation, visualization and integrated discovery, <i>engl.</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDD	endothelabhängige Dilatation
EID	endothelunabhängige Dilatation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FDR	false discovery rate, <i>engl.</i>
FMD	flussmedierte Dilatation
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GO	Genontologie
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HF	Herzfrequenz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
I	Iod
iNOS	induzierbare NO-Synthase

itpr2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2, <i>engl.</i>
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KI	Kaliumiodid
l	Liter
LDL	low density lipoprotein, <i>engl.</i>
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LW	Leitungswasser
max.	maximal
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mmol	Millimol
MMP2	Matrix-Metalloprotease 2, <i>engl.</i>
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9, <i>engl.</i>
mRNA	messenger RNA, <i>engl.</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAOH	Natriumhydroxid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
n.d.	nicht detektierbar
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO <sup>·</sup>	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NO <sub>x</sub>	hier: Nitrat und Nitrit
NOS	NO-Synthase
NRW	Nordrhein-Westfalen
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Superoxidradikalanion
O <sup>3</sup>	Ozon
OC	alte Mäuse, Kontrolle
ON	alte Mäuse, Nitrat
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PCR	polymerase chain reaction, <i>engl.</i>
P <sub>dia</sub>	diastolischer Blutdruck
PHE	Phenylephrin
P <sub>mean</sub>	arterieller Mitteldruck
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PP	Blutdruckamplitude
P <sub>sys</sub>	systolischer Blutdruck
PWV	Pulswellengeschwindigkeit
REST	relative expression software tool, <i>engl.</i>
RIN	RNA integrity number, <i>engl.</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNNO	N-Nitrosamin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	real time PCR, <i>engl.</i>
RSNO	S-Nitrosothiol
RXNO	nitrosierte und nitrosylierte NO-Spezies
s	Strecke in Zentimeter
SB	San Benedetto
SD	Standardabweichung (standard deviation, <i>engl.</i> )
SE	Standardfehler (standard error, <i>engl.</i> )
SNP	Natrium-Nitroprussid
SOD	Superoxid-Dismutase
t	Zeit
TGF-β 1	transforming growth factor beta 1, <i>engl.</i>
UV	Ultraviolett
v	Geschwindigkeit
Vis	visible, <i>engl.</i>
vol	Volumenprozent
vs.	versus, <i>lat.</i>
XOR	Xanthinoxidoreduktase
YC	junge Mäuse, Kontrolle
YN	junge Mäuse, Nitrat



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Physiologie des vaskulären Systems .....	1
1.2	Vaskuläre Alterung .....	2
1.2.1	Die altersabhängige endotheliale Dysfunktion.....	2
1.2.2	Altersabhängige arterielle Steifigkeit .....	4
1.3	Altersbedingte vaskuläre Genexpression .....	6
1.4	Oral aufgenommenes Nitrat im NO-Stoffwechsel und seine Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System.....	7
1.5	Fragestellung.....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>11</b>
2.1	Versuchsaufbau und Design .....	11
2.1.1	Versuchstiere und Haltung .....	11
2.1.2	Vorstudie .....	11
2.1.3	Hauptstudie .....	13
2.1.4	Gewinnung von Plasma.....	13
2.1.5	Prozessierung des Plasmas .....	14
2.2	Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat.....	14
2.3	Bestimmung von RXNO .....	15
2.4	<i>Ex vivo</i> -Versuche an isolierten Aortenstücken zur Beurteilung der endothelialen Funktion anhand der endothelabhängigen Dilatation .....	16
2.5	Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) <i>in vivo</i> .....	18
2.6	Messung des zentralen Blutdrucks.....	19
2.7	Analyse der Genexpression .....	20
2.7.1	RNA-Isolation aus Aorten .....	21
2.7.2	Analyse der Genexpression mittels Microarray .....	22
2.7.3	Positivkontrolle mittels RT-PCR .....	23
2.8	Mathematisch-statistische Verfahren.....	25
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1	Ergebnisse der Vorstudie .....	26
3.1.1	Nitrat und Nitrit in unterschiedlichen Trinkwassersorten.....	26
3.1.2	Nitrat und Nitrit im Plasma junger Mäuse nach zwei Wochen .....	26
3.1.3	Veränderungen des Körpergewichts junger Mäuse nach zwei Wochen...	28

3.2	Ergebnisse der Hauptstudie .....	28
3.2.1	Bestimmung von Nitrat und Nitrit im Plasma nach achtwöchiger oraler Supplementierung mit anorganischem Nitrat.....	29
3.2.2	Bestimmung von RXNO im Plasma nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat .....	30
3.2.3	Messung der endothelabhängigen Dilatation an isolierten Aortenringen nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat .....	31
3.2.4	Messung der endothelunabhängigen Dilatation und Vasokonstriktion an isolierten Aortenringen nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat.....	33
3.2.5	Messung der PWV zur Überprüfung des Einflusses einer achtwöchigen oralen Supplementierung von Nitrat auf die Gefäßsteifigkeit.....	35
3.2.6	Messung des zentralen arteriellen Blutdrucks nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat .....	35
3.2.7	Analyse des Einflusses des Alters sowie einer achtwöchigen Supplementierung auf die Genexpression mittels Microarray .....	37
3.2.7.1	Genontologie und Signalweganalysen .....	37
3.2.8	Genexpression mittels RT-PCR .....	48
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
4.1	Der Einfluss verschiedener Trinkwasser mit unterschiedlichem Gehalt an Nitrat und Nitrit auf die Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma junger Mäuse .....	50
4.2	Der Einfluss einer chronischen Supplementierung von anorganischem Nitrat auf den NO-Pool .....	51
4.3	Der Einfluss einer chronischen Supplementierung von Nitrat auf die altersabhängige endotheliale Dysfunktion.....	55
4.4	Der Einfluss oral supplementierten Nitrats auf die arterielle Steifigkeit im Alter.....	58
4.5	Der Einfluss einer oralen Supplementierung von Nitrat auf die Genexpression im Alter .....	60
4.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	64
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>80</b>

## 1 Einleitung

Neben beeinflussbaren Faktoren wie dem Zigarettenrauchen oder der Hypercholesterinämie gilt ein hohes Lebensalter als einer der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>1, 2</sup> Angesichts des demographischen Wandels in der westlichen Welt ist daher in Zukunft mit einer erhöhten Inzidenz und Prävalenz von Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit zu rechnen.<sup>3</sup> Schon heute gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den führenden Todesursachen in westlichen Industrienationen.<sup>4</sup> Damit stellen sie ein erhebliches volkswirtschaftliches Problem dar.

Zwei Phänomene der Gefäßalterung sind die endotheliale Dysfunktion und die arterielle Steifigkeit.<sup>2</sup> Eine verringerte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) scheint bei der Alterung der Gefäße eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>5</sup> Anorganisches Nitrat, welches auch über die Nahrung aufgenommen werden kann, ist im Organismus ein Oxidationsprodukt von NO<sup>•</sup>. Nitrat kann jedoch auch schrittweise zu NO<sup>•</sup> reduziert werden.<sup>6</sup> Ob eine chronische orale Supplementierung von Nitrat die Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> erhöhen und der Entwicklung der vaskulären Alterung entgegenwirken könnte, war bislang nicht bekannt.

### 1.1 Physiologie des vaskulären Systems

Elastische Elemente bewirken eine hohe „Compliance“ der zentralen Arterien, die das Verhältnis von Volumen zu Druckänderungen im Gefäß beschreibt und als ein Maß für die Dehnbarkeit oder Elastizität gilt.<sup>7</sup> Dadurch können die durch den Herzschlag erzeugten Druckschwankungen gedämpft und ein nahezu kontinuierlicher Blutfluss während des gesamten Herzzyklus (Systole und Diastole) sichergestellt werden.<sup>8</sup> Für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion ist ein intaktes Endothel entscheidend: Es nimmt eine Barriere- bzw. Schutzfunktion ein und beeinflusst darüber hinaus vor allem den vaskulären Tonus durch die Produktion von Mediatoren.<sup>9</sup> Zu diesen zählt NO<sup>•</sup>, welches von der im Endothel vorkommenden NO<sup>•</sup>-Synthase (eNOS) kontinuierlich produziert wird.<sup>10</sup> Über mechanische Reize und die Bindung von Liganden an Rezeptoren der Endothelzellen können das Milieu in der Zelle und so die Aktivität der eNOS verändert werden.<sup>11</sup> In einer Adenosintriphosphat (ATP)-unabhängigen Reaktion katalysiert die eNOS die Umwandlung von der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin. Dabei kommt es zur

Bildung von NO<sup>•</sup>. Hierfür werden verschiedene Kofaktoren wie Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Elektronendonator sowie Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) benötigt.<sup>12</sup> NO<sup>•</sup> diffundiert zu den glatten Muskelzellen und aktiviert intrazellulär die lösliche Guanylatzyklase, welche die Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) erhöht. Infolgedessen wird die Proteinkinase G vermehrt aktiviert; es kommt zu einer intrazellulären Abnahme von Ca<sup>2+</sup>, konsekutiv sinken Muskeltonus und Blutdruck.<sup>13</sup> NO<sup>•</sup> wirkt unter anderem auch inflammatorischen Prozessen entgegen, indem es die Leukozytenadhäsion verringert.<sup>14</sup> Daneben hemmt NO<sup>•</sup> die Proliferation glatter Muskelzellen und wirkt so einer Verengung des Gefäßlumens entgegen.<sup>15</sup>

## **1.2 Vaskuläre Alterung**

Der physiologische Alterungsprozess bezeichnet allgemein eine progressive und generalisierte Veränderung von Funktionen des Körpers, die den Organismus gegenüber seiner Umwelt vulnerabel machen und mit einem erhöhten Risiko für Krankheit und Tod einhergehen.<sup>16</sup> Diese Veränderungen betreffen auch das vaskuläre System. Somit wirken schädigende Einflüsse im Alter stärker auf die Gefäße ein, wodurch das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen auch unabhängig von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren steigt.<sup>17</sup>

### **1.2.1 Die altersabhängige endotheliale Dysfunktion**

Die endotheliale Dysfunktion wird durch die Abnahme von vasodilatatorisch wirksamen Mediatoren, wie NO<sup>•</sup>, charakterisiert.<sup>5</sup> Als vasoaktive Substanz beeinflusst NO<sup>•</sup> sowohl den Gefäßtonus der glatten Muskelzellen als auch intraluminal ablaufende Prozesse.<sup>18, 19</sup> Unabhängig von anderen Risikofaktoren tritt die endotheliale Dysfunktion im hohen Lebensalter vermehrt auf.<sup>1</sup> Dies ist größtenteils auf einen gesteigerten oxidativen Stress im Organismus zurückzuführen. Durch die inkomplette Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette der Mitochondrien entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS).<sup>20</sup> Des Weiteren bewirkt die veränderte Regulation von prooxidativen Enzymen im Alter eine vermehrte Generierung von ROS. Die Expression von NAD(P)H Oxidase-p47<sup>phox</sup> ist in den Endothelzellen älterer Menschen im Vergleich zu denen junger Menschen erhöht.<sup>21</sup> Durch eine Bindung an Untereinheiten der

membrangebundenen NADPH-Oxidase stimuliert dieses zytosolische Protein die Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), welche zu den ROS gezählt werden.<sup>21</sup> In der Reaktion von  $O_2^-$  mit  $NO^\cdot$  entsteht Peroxynitrit, wodurch die Konzentration von freiem  $NO^\cdot$  abfällt. Peroxynitrit hemmt die Superoxid-Dismutase (SOD), die ein antioxidatives Enzym darstellt.<sup>22</sup> Darüber hinaus kommt es zur Oxidation von BH4 und dadurch zum sogenannten „eNOS-Uncoupling“: In Ermangelung dieses Kofaktors generiert das Enzym selbst ROS und stellt so eine Quelle oxidativen Stresses dar.<sup>23</sup> Somit kann die verringerte Bioverfügbarkeit von  $NO^\cdot$  in der endothelialen Dysfunktion sowohl auf einen gesteigerten Abbau als auch auf eine verringerte Produktion zurückgeführt werden. Die Fehlfunktion des Gefäßendothels bewirkt die Entwicklung eines prokoagulativen, proliferativen und proinflammatorischen Milieus, das die Entstehung arteriosklerotischer Plaques in allen Stadien begünstigt.<sup>24</sup> Auch in Abwesenheit von proatherogenen Risikofaktoren tritt dieses Phänomen in unterschiedlich starkem Ausmaß im Alter auf und ist als Anzeichen eines physiologischen Alterungsprozesses zu deuten.<sup>2</sup> Dabei ist die erhöhte Vulnerabilität für die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques im Gefäßsystem jedoch keinesfalls mit einer frühen, subklinischen Form der Arteriosklerose gleichzusetzen, sondern muss von dieser unterschieden werden.<sup>25</sup> Um jedoch der Entstehung der endothelialen Dysfunktion im Alter und damit der Genese von kardiovaskulären Erkrankungen vorzubeugen, scheint eine frühe Detektion und ggf. Behandlung von großer Bedeutung zu sein. Die Beurteilung der endothelialen Funktion ist auf verschiedenen Ebenen möglich, wobei die endothelabhängige Dilatation (EDD) einen häufig genutzten funktionellen Ansatz darstellt. Über eine chemische Stimulation durch Agonisten wie Acetylcholin (ACh) oder physikalische Reize, ausgelöst durch eine temporäre Hyperämie, kommt es dabei zur Dilatation der Gefäße, welche hauptsächlich durch  $NO^\cdot$  des Gefäßendothels vermittelt wird.<sup>26, 27</sup> Bereits im Jahr 2002 konnten Halcox et al. eine positive Korrelation von verminderter EDD und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen sogar bei angiographisch unauffälligen Patienten aufzeigen.<sup>28</sup> Zusätzlich weisen Patienten mit endothelialer Dysfunktion eine geringere „Nitritreserve“ als gesunde Probanden auf: Dieser Begriff beschreibt einen physiologischen Anstieg des Nitrits im Plasma nach Stimulation der endothelialen  $NO$ -Synthase. Ein solcher Anstieg lässt sich durch eine reaktive Hyperämie, am Unterarm nach einer Unterbrechung des Blutflusses<sup>29</sup> oder nach körperlicher

Belastung auf einem Fahrradergometer auslösen.<sup>30</sup> Die Nitritreserve kann daher Aufschluss über die endotheliale Funktion geben.<sup>29, 30</sup> Eine Intervention, die der endothelialen Dysfunktion entgegenwirkt, könnte das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Alter reduzieren.

### **1.2.2 Altersabhängige arterielle Steifigkeit**

Unter „arterieller Steifigkeit“ versteht man das Gegenteil von arterieller Dehnbarkeit. Dieser Begriff bezeichnet somit einen Zustand, der mit dem Alter zunimmt.<sup>2</sup> Die arterielle Steifigkeit wird sowohl vom mittleren arteriellen Druck als auch von den Strukturelementen der Gefäßwand sowie dem Tonus glatter Muskelzellen beeinflusst.<sup>31</sup> Eine Erhöhung dieser Steifigkeit hat bedeutende Auswirkungen auf die Hämodynamik: Die Abnahme der Compliance zentraler Arterien sowie eine Erhöhung des peripheren Widerstands lassen den systolischen Blutdruck ( $P_{\text{sys}}$ ) ansteigen.<sup>32</sup> Der diastolische Blutdruck ( $P_{\text{dia}}$ ) steigt zwar durch einen erhöhten Widerstand zunächst ebenfalls; die kontinuierliche Abnahme der Dehnbarkeit bewirkt mit der Zeit jedoch einen Abfall des  $P_{\text{dia}}$ .<sup>32</sup> Durch den altersbedingten Verlust elastischer Anteile fließt in der Systole mehr Blut in die Peripherie ab, anstatt dass es durch die elastische Ausdehnung der Gefäßwand zurückgehalten wird. Dadurch entsteht ein stärkerer Abfall des Flusses und so auch des Drucks im diastolischen Intervall.<sup>33</sup>  $P_{\text{sys}}$  und  $P_{\text{dia}}$  steigen daher beim Menschen bis zum 50. Lebensjahr kontinuierlich an, wobei der  $P_{\text{dia}}$  ab dem 60. Lebensjahr wieder zu fallen beginnt. Die Differenz zwischen systolischem und diastolischem Spitzendruck, die als Blutdruckamplitude (PP) oder Pulsdruck bezeichnet wird, erhöht sich von diesem Zeitpunkt an stetig. Dieser Umstand wird auf die altersbedingte Gefäßversteifung zurückgeführt.<sup>34</sup> Daher ist eine isolierte systolische Hypertonie mit hoher Blutdruckamplitude die häufigste Art der Hypertonie in dieser Altersklasse: Sie erhöht das Risiko derselben für Schlaganfälle, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz maßgeblich.<sup>35</sup>

Eine Versteifung der Gefäßwand nimmt ebenfalls Einfluss auf die Pulswellengeschwindigkeit (PVW).<sup>36</sup> Wenn das Herz während der Systole Blut in den Körperkreislauf auswirft, wird eine Druckwelle erzeugt, die sich schneller als das fließende Blut in die Peripherie ausbreitet.<sup>37</sup> Die Geschwindigkeit der Druckwelle ist dabei in steifen Gefäßabschnitten höher als in dehnbaren. Damit

kann sie Rückschlüsse auf die Beschaffenheit der Gefäßwand zulassen. An Verzweigungen der Gefäße oder bei Änderung des Diameters bzw. der Wandeigenschaften kommt es zur partiellen Reflexion der Druckwellen. Die Pulswellen vereinen sich und erreichen die zentrale Aorta in der Diastole.<sup>8</sup> Dadurch wird der diastolische Druck physiologisch erhöht und die Koronarperfusion wird verbessert.<sup>8</sup> Mit einer erhöhten PWV erreicht die retrograd laufende Druckwelle das Gefäß bereits in der Systole, sodass es zu einem Zuwachs des systolischen Blutdrucks und gleichzeitig der Blutdruckamplitude kommt.<sup>38</sup> So gilt der prädiktive Wert einer erhöhten PVW in der Aorta für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen heute als gesichert.<sup>39, 40</sup>

Altersabhängige Veränderungen von Komponenten der arteriellen Gefäßwand stehen mit einer Erhöhung der arteriellen Steifigkeit in Verbindung. Einige von ihnen konnten in der Vergangenheit bereits konkret beschrieben werden: Sowohl tierexperimentelle als auch klinische Studien zeigen eine dramatische Verdickung der Gefäßintima und -media im höheren Alter<sup>41, 42</sup> auf, die mit einer Erhöhung des luminalen Durchmessers und der arteriellen Steifigkeit einhergeht.<sup>25</sup> Der Gehalt elastischer Proteine nimmt ab, während eine Deposition von versteifenden Matrixproteinen festzustellen ist.<sup>43, 44</sup> Daneben wird eine zunehmende Ablagerung von  $\text{Ca}^{2+}$  in Media und Intima beschrieben.<sup>45</sup> Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase, wie eine vermehrte Ansammlung im Mitochondrium oder Veränderungen der Funktion von Enzymen der Elektronentransportkette, werden außerdem mit einer höheren Zellvulnerabilität der Zelle sowie oxidativem Stress und Alterung in Verbindung gebracht. Eine starke Alteration der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalkaskade in alternden Zellen geht daher mit einer erhöhten Produktion von ROS und einer ineffektiven Respiration im Mitochondrium einher.<sup>46</sup> In alternden Gefäßen zeigt sich außerdem eine Anhäufung von transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$  1), einem profibrotisch wirkenden Zytokin.<sup>47</sup> Es soll vor allem in der Adventitia eine Vermehrung von Kollagen bewirken und somit zur Versteifung der Gefäße im Alter beitragen.<sup>48</sup>

Studien deuten darauf hin, dass eine Verringerung der NO-Spiegel mit einer Zunahme der Steifigkeit der Gefäße zusammenhängt.<sup>49-51</sup> Abgesehen von einer Erhöhung des Gefäßtonus, der glatten Muskelzellen in der Media und somit des Blutdrucks scheint die Abnahme der Konzentration von NO $\cdot$  zudem die Steifigkeit der Gefäße über Umbauprozesse der arteriellen Gefäße zu erhöhen.<sup>51</sup> Chen et al.

demonstrierten, dass NO<sup>•</sup> über die Induktion von einem Transkriptionsfaktor die Expression von Matrix-Metalloprotease 2 (MMP-2) einschränken könnte und so der Degeneration von Extrazellulärmatrix entgegenwirkt.<sup>52</sup> Diese Enzyme, die zur Gruppe der Gelatinasen gehören, sind an Abbauprozessen der extrazellulären Matrix beteiligt.<sup>53</sup> Weitere Hinweise auf einen protektiven Effekt von NO<sup>•</sup> ergeben sich aus einer NO-abhängigen Aktivitätsverminderung von TGF-β 1 in der Gefäßwand.<sup>48, 54</sup>

Welchen Stellenwert eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit für die altersbedingten Umbauprozesse und deren hämodynamische Auswirkungen, vor allem für die der großen Leitungsarterien, einnimmt, wurde insgesamt jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Möglicherweise könnte eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit einer Versteifung der arteriellen Gefäße im Alter entgegenwirken.

### **1.3 Altersbedingte vaskuläre Genexpression**

In der Vergangenheit konnten bereits zahlreiche Gene identifiziert werden, welche die Lebenszeitspanne eines Organismus beeinflussen.<sup>16</sup> Trotzdem erscheint es unwahrscheinlich, dass lediglich ein genetisches Programm den Grad der Alterung im Leben eines Individuums bestimmt. Für die biologischen Ursachen des Alterns wurden in der Vergangenheit verschiedene Theorien formuliert. Diese weisen teilweise Verknüpfungen untereinander auf, weswegen es keineswegs so zu sein scheint, dass die Genetik alleiniger Determinant für das Ausmaß der Alterung sei. Zusätzlich wird dieses nämlich von der Anzahl schädigender Prozesse bestimmt, welche im Laufe des Lebens kumulativ auf die Zelle einwirken und so deren Funktion verändern. Die genetische Voraussetzung eines Individuums kann dabei jedoch das Ausmaß, in dem diese Einflüsse den Alterungsprozess voranschreiten lassen, beeinflussen.<sup>16</sup>

Ein Zusammenhang mit der Verringerung des endogenen NO-Pools und altersabhängigen Veränderungen der Blutgefäße wurde somit verdeutlicht. Wie viele andere biologische Prozesse wird der Alterungsprozess über zelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Äußere Stressoren wie Nahrungsrestriktion bewirken unter anderem eine Veränderung der Genexpression, sodass zellprotektive Systeme hochreguliert werden.<sup>55</sup> Anorganisches Nitrat kann ebenfalls als ein effektiver Modifikator der Genexpression in braunem und weißem



Fettgewebe fungieren und den Stoffwechsel positiv beeinflussen.<sup>56</sup> Ob altersabhängige Veränderungen der Genexpression durch eine orale Supplementierung von Nitrat beeinflusst werden können, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

#### **1.4 Oral aufgenommenes Nitrat im NO-Stoffwechsel und seine Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System**

Der Gesundheitszustand eines Lebewesens wird maßgeblich von dessen Ernährungsgewohnheiten beeinflusst. Eine Ernährung, die reich an grünem Blattgemüse ist, kann das Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie dem ischämischen Insult oder der koronaren Herzkrankheit reduzieren.<sup>57, 58</sup> Auf Gemüse basierende Ernährungsformen gehen außerdem mit niedrigeren Blutdruckwerten einher.<sup>59</sup> Dem hohen Anteil anorganischen Nitrats im Gemüse wird eine große Bedeutung für diese Effekte zugeschrieben.<sup>60</sup> In der westlichen Ernährung wird ein Anteil von ungefähr 80 % des exogen aufgenommenen Nitrats über den Verzehr von Gemüse zugeführt.<sup>61</sup> In Europa beträgt die durchschnittliche Aufnahme von Nitrat über die Nahrung zwischen 50 mg und 140 mg pro Tag.<sup>61</sup> Tomaten oder Zwiebeln enthalten pro kg durchschnittlich weniger als 100 mg Nitrat, während Spinat im Mittel um die 2100 mg pro kg enthält.<sup>62</sup> Die biologische Wirksamkeit oral aufgenommenen Nitrats im Herz-Kreislauf-System wird über die Reduktion zu Nitrit und NO<sup>•</sup> erklärt.<sup>62</sup> Von dem über die Nahrung zugeführten Nitrat werden ca. 25 % im gastrointestinalen Trakt aufgenommen und im Mundspeichel konzentriert; der größte Teil davon wird über die Nieren ausgeschieden.<sup>6</sup> Über Nitratreduktasen bewirken kommensale, fakultativ anaerobe Bakterien der Mundhöhle die Reaktion zu Nitrit.<sup>6</sup> Im sauren Magenmilieu wird dieses über weitere Reaktionen zu NO<sup>•</sup> und anderen Nitrosospezies umgewandelt oder tritt als Nitrit im intestinalen Trakt in die Körperzirkulation ein.<sup>6</sup> Daher kommt es nach der Einnahme von Nitrat zu einem Anstieg des Nitrits im Plasma<sup>6</sup>, der beispielsweise durch die Anwendung einer antibakteriellen Mundspülung vermindert wird.<sup>63</sup> Zusätzlich scheinen auch körpereigene Enzyme wie die Xanthin-Oxidoreduktase eine Aktivität im Sinne einer Nitratreduktase aufzuweisen.<sup>64</sup>

Die Reduktion von Nitrit zu NO<sup>•</sup> findet besonders unter hypoxischen Bedingungen statt.<sup>65, 66</sup> Das Myoglobin des Herzmuskels fungiert unter Hypoxie als

Nitritreduktase, sodass die mitochondriale Elektronentransportkette über die Generierung von NO<sup>•</sup> inhibiert und die Bildung von ROS reduziert wird.<sup>66</sup> Am Gefäß wirkt Nitrit unter reduziertem Sauerstoffpartialdruck vasodilatatorisch, da es mit zirkulierenden Desoxyhämoglobin reagiert und zu NO<sup>•</sup> reduziert wird.<sup>65</sup> Über die Reaktion zu NO<sup>•</sup> wirkt Nitrit außerdem Entzündungsprozessen am Gefäß entgegen, welche die EDD verringern.<sup>67</sup> Ca. 75 % des im Körper enthaltenen Nitrits entstehen endogen.<sup>68</sup> Der größte Teil des endothelial gebildeten NO<sup>•</sup> oxidiert zu Nitrit, das mit dem oxygenierten Hämoglobin der Erythrozyten weiter zu Nitrat reagieren kann.<sup>69</sup> Mit Hämoglobin kann NO<sup>•</sup> darüber hinaus auch verschiedene Verbindungen eingehen, die in der Lage sind, wieder freies NO<sup>•</sup> abzugeben.<sup>70, 71</sup> Der NO-Metabolismus wird dabei durch Faktoren wie pO<sub>2</sub>, pH, die Anzahl der Erythrozyten und die Konzentration der ROS beeinflusst.<sup>72, 73</sup> Die Reaktion mit Thiolgruppen von Plasmaproteinen, wie z. B. mit Albumin oder Glutathion, lässt Verbindungen entstehen, die den Transport von NO<sup>•</sup> im Kreislauf und so eine Wirkung desselben fernab vom Ort der Synthese ermöglichen. Diese S-Nitrosothiole (RSNO) stellen stabile Verbindungen dar, können aber in einer Reaktion mit Übergangsmetallen erneut NO<sup>•</sup> freisetzen.<sup>74</sup> Unter physiologischen Bedingungen sind kovalente Bindungen mit Aminen in Form von N-Nitrosaminen (RNNO) fünfmal häufiger, ihre Funktion im NO-Metabolismus bleibt jedoch unbekannt.<sup>74</sup>

Trotz der positiven Effekte auf das Herz-Kreislauf-System wird eine exzessive Aufnahme von Nitrat und Nitrit kritisch gesehen, sodass in der EU und den USA ein maximaler Grenzwert für den Gehalt beider im Trinkwasser festgesetzt wurde.<sup>75</sup> In Nahrung und Trinkwasser enthaltenes Nitrat kann im sauren Magenmilieu die Bildung von N-Nitrosaminen bewirken, denen eine kanzerogene Wirkung nachgesagt wird.<sup>75</sup> Eine Verbindung zwischen einer erhöhten exogenen Zufuhr von Nitrat und dem Auftreten von Magenkarzinomen oder einer erhöhten Mortalität konnte jedoch in über 50 epidemiologischen Studien nicht bestätigt werden.<sup>75</sup> Des Weiteren beruht die Reglementierung auf der potentiellen Gefahr einer vermehrten Bildung von Methämoglobin. In einer Studie aus dem Jahr 1945 wurde der Verdacht geäußert, dass eine hohe exogene Zufuhr von Nitrat bei Kleinkindern zyanotische Zustände auslösen könnte. Nitrit kann Hämoglobin zu Methämoglobin oxidieren, sodass erhöhte Spiegel von Nitrit, hervorgerufen durch die Einnahme hoher Mengen von Nitrat, bei den Kindern eine Methämoglobinämie zur Folge gehabt hätte.<sup>76</sup> Neuere Betrachtungen der Daten lassen jedoch auf eine andere Ursache

schließen: Demnach führten wahrscheinlich infektiöse Gastroenteritiden zu einer erhöhten Konzentration von NO<sup>•</sup> im Gastrointestinaltrakt. Dieses reagierte mit dem Oxyhämoglobin im Blut zu Methämoglobin und führte unabhängig von einer oralen Aufnahme von Nitrat zur Methämoglobinämie.<sup>77</sup> So konnte auch in einer nachfolgenden Studie aus dem Jahr 1948 selbst nach der Gabe hoher Dosen Nitrat keine kritische Bildung von Methämoglobin bei Kleinkindern festgestellt werden.<sup>78</sup> Problematischer ist hingegen die orale Aufnahme von Nitrit: Die Toxizität kann mit der von Cyanid verglichen werden, sodass vor einer zusätzlich zur Nahrung aufgenommenen Supplementierung dringend gewarnt werden muss. Bereits geringe Mengen können eine akut toxische Wirkung entfalten, durch die es zur Methämoglobinämie und Hypotension kommt.<sup>79</sup> Es zeigt sich daher, dass eine kontrollierte Aufnahme von oralem Nitrat nicht die ursprünglich angenommenen Risiken birgt, während mögliche positive Effekte bis jetzt nur in wenigen Studien beleuchtet wurden.

## 1.5 Fragestellung

Eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit gilt als wichtiger Faktor in der Entwicklung der vaskulären Dysfunktion im Alter.<sup>5, 80, 81</sup> Anorganisches Nitrat ist vor allem in grünem Blattgemüse enthalten und kann über die Nahrung eine alternative NO-Quelle darstellen.<sup>82, 68</sup> Die Alterung eines Individuums geht mit einer veränderten Regulierung von zellulären Signalwegen einher und kann durch äußere Faktoren beeinflusst werden.<sup>55</sup> Deshalb befasst sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

1. Kann eine orale Supplementierung von Nitrat über das Trinkwasser die Spiegel von Nitrit und Nitrat im Plasma bei alten und jungen Mäusen gleichermaßen beeinflussen und den NO-Pool erhöhen?
2. Lässt sich die altersabhängige vaskuläre Dysfunktion im Mausmodell beschreiben und führt eine chronische exogene Zufuhr von Nitrat zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion?
3. Zeigt die Analyse der Genexpression in den Aorten alter Mäuse im Vergleich zu der bei jungen Mäuse Hinweise, welche vaskuläre Alterungsprozesse

erklären können, und kann eine Supplementierung von Nitrat Einfluss auf diese Genexpression nehmen?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsaufbau und Design**

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in eine Vor- und eine Hauptstudie. In der Vorstudie wurde der Einfluss verschiedener Trinkwassersorten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Nitrat und Nitrit auf den endogenen NO-Pool der Versuchstiere im Vergleich zu dem von mit Nitrat angereichertem Trinkwasser analysiert. Im Hauptversuch sollten die Auswirkungen einer chronischen Supplementierung von Nitrat auf das Gefäßsystem von jungen und alten Tieren überprüft werden. Dazu wurden nach einer acht Wochen andauernden oralen Gabe anorganischen Nitrats verschiedene *in vivo*- sowie *ex vivo*-Versuche zur Beurteilung der Gefäßfunktion und eine Analyse der Genexpression durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Experimente waren die jungen Tiere im Alter von 8 bis 10 Monaten, die alten Tiere im Alter von 22 bis 24 Monaten.

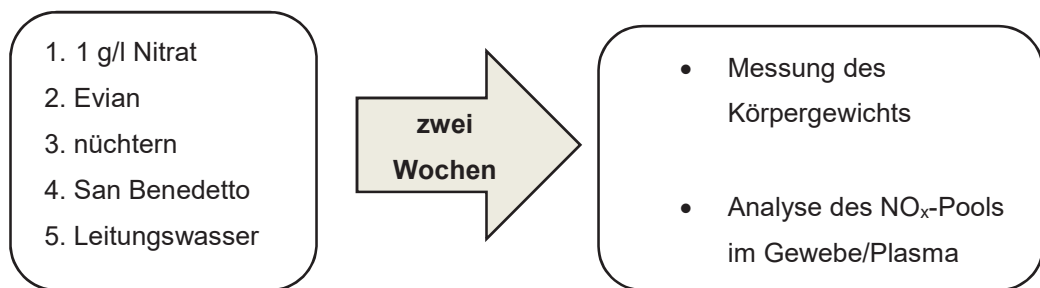
#### **2.1.1 Versuchstiere und Haltung**

Für die Versuche wurden männliche Mäuse vom Stamm C57BL/6 verwendet, die von der Firma Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) bezogen wurden. Nach Ankunft in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität verweilten die Tiere zunächst für eine Woche unter standardisierten Haltebedingungen (20 mbar, 24°C, 40 % Luftfeuchtigkeit, 12 h Tag-/Nachtrhythmus, Futter/Wasser ad libitum). Die Unterbringung erfolgte in Kunststoffkäfigen in Kollektiven von 2-8 Tieren; als Standardfutter wurden für alle Gruppen Futterpellets Typ V1530 der Firma Ssniff verwendet (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Haltung und adäquate Pflege fand in den Räumlichkeiten der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf statt und wurde von deren Mitarbeitern überwacht und durchgeführt. Alle Versuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (84-02.04.2011.A189).

#### **2.1.2 Vorstudie**

Eine Gruppe erhielt mit Nitrat angereichertes Trinkwasser in der Konzentration von 1 g/l. Zwei weitere Gruppen erhielten das Wasser der Marke „Evian“ (Danone

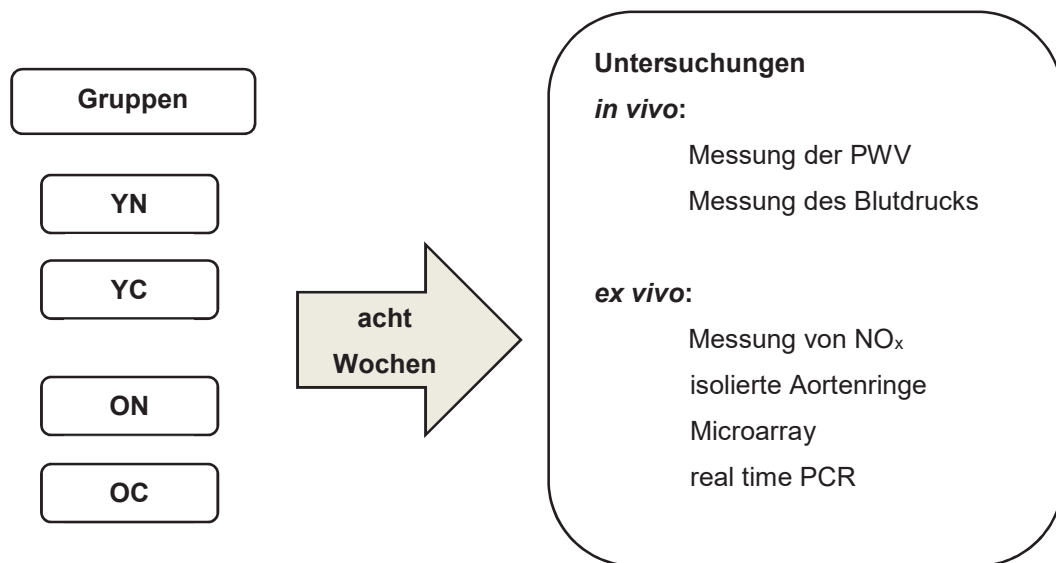
Waters Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland), wobei einer von beiden sechs Stunden vor der Tötung und Probenentnahme die Trinkwasserflaschen von den Käfigen entfernt wurden, wodurch die Trinkmenge begrenzt wurde (nüchtern). Eine weitere Gruppe erhielt das Wasser der Marke „San Benedetto“ (San Benedetto S.P.A., Venedig, Italien), während eine andere Gruppe normales Leitungswasser erhielt (siehe Abb. 2.1). Alle verwendeten Wassersorten wurden vor Versuchsbeginn in einem NO<sub>x</sub>-Analyzer (ENO-20, EiCom, Kyoto, Japan) auf die jeweils enthaltene Konzentration von Nitrat und Nitrit hin untersucht. Nach zwei Wochen, in denen die Mäuse ausschließlich eine Sorte Trinkwasser erhielten, wurden Plasma- und Gewebeproben entnommen und die Tiere getötet. Alle Tiere wurden am ersten sowie am letzten Tag auf einer Feinwaage gewogen; das dabei ermittelte Gewicht wurde jeweils dokumentiert.



**Abb. 2.1: Studiendesign der Vorstudie.** Die Mäuse wurden in 5 Gruppen unterteilt und erhielten demgemäß nur eine bestimmte Trinkwassersorte. Nach zwei Wochen folgte die Messung des Körpergewichts sowie eine Bestimmung des NO<sub>x</sub>-Pools in Plasma und Gewebe.

### 2.1.3 Hauptstudie

Alte und junge Mäuse erhielten im Zeitraum von acht Wochen mit Nitrat angereichertes Leitungswasser (1 g/l). Die Kontrolltiere erhielten pures Leitungswasser. Anschließend wurden die Konzentrationen von zirkulierendem Nitrat, Nitrit und Nitrosospezies bestimmt und die endotheliale Funktion an isolierten Aortenringen sowie die aortale Genexpression mittels Microarray und real time polymerase chain reaction (RT-PCR) charakterisiert. *In vivo* erfolgte die Messung der PWV und des Blutdrucks.



**Abb. 2.2: Studiendesign der Hauptstudie.** Die Mäuse wurden in 4 Gruppen unterteilt, von denen zwei eine orale Supplementierung mit Nitrat erhielten und zwei als Kontrollgruppen fungierten (junge Mäuse, Nitrat=YN; junge Mäuse, Kontrolle=YC; alte Mäuse, Nitrat=ON; alte Mäuse, Kontrolle=OC). Nach acht Wochen erfolgten *in vivo*- sowie *ex vivo*-Versuche.

### 2.1.4 Gewinnung von Plasma

Nach dem letzten Tag der Supplementierung wurden die Tiere mittels gewichtsadaptierter intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kgKG) und Xylazin (10 mg/kgKG) anästhesiert. Dann erfolgte eine transthorakale Punktion des Herzens und die Entnahme von ca. 500-1000 µl Vollblut. Dabei wurden Spritzen verwendet, die zuvor mit Heparin gespült wurden (Heparin-Natrium-2500, Ratiopharm). Anschließend wurden die Proben 1 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert und das so gewonnene Plasma in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C asserviert. Die Plasmaproben

wurden dem weiteren Versuchsaufbau entsprechend am Tag der Analyse prozessiert.

### **2.1.5 Prozessierung des Plasmas**

In der Vorstudie wurden zunächst die Spiegel von Nitrat und Nitrit in den einzelnen Trinkwassersorten bestimmt; nach zwei Wochen, in denen die Mäuse jeweils ein bestimmtes Trinkwasser erhielten, erfolgte die Analyse der gewonnenen Plasmaproben. Nach acht Wochen erfolgte in der Hauptstudie ebenfalls die Messung der Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Wasserproben, welche mit 1 g/l Nitrat angereichert waren, wurden vor der Messung im Verhältnis 1:100 mit Millipore-Wasser verdünnt. Die anderen Trinkwasserproben erforderten keine Vorbehandlung. Am Tag der Messung wurden die Plasmaproben aus beiden Versuchsteilen zunächst auf Eis lichtgeschützt aufgetaut. Dafür wurden als Erstes 50 µl Plasma abgenommen, im Verhältnis 1:1 mit auf -20°C gekühltem Methanol gemischt und anschließend bei 4°C für 10 min mit 10.000 g zentrifugiert. Der proteinfreie Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt und entweder bis zur Analyse bei -20°C eingefroren oder kurzzeitig bei 4°C gelagert.

Das restliche Plasma wurde für die Messung von Nitrosoverbindungen (RXNO) mittels Chemilumineszenz-Detektion (CLD) verwendet. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 10:1 mit 5%iger Sulfanilamidlösung (0,5 g Sulfanilamid gelöst in 10 ml 0,5 M HCl) in einem braunen 1,5 ml-Reaktionsgefäß (lichtgeschützt) für 15 min auf Eis inkubiert. Im Plasma enthaltenes Nitrit und das Sulfanilamid bilden ein stabiles Diazoniumsalz, welches nicht mehr reduziert werden kann, sodass mittels reduktiver Lösung aus den RXNO freigesetztes NO<sup>•</sup> gemessen werden kann.

## **2.2 Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat**

Die Analyse der Spiegel von Nitrat und Nitrit erfolgte mittels HPLC-Technik (ENO-20, Fa.EiCom, Kyoto, Japan) durch eine Kombination aus Flüssigchromatographie und Azokopplung mittels Griess-Reagenz.<sup>74</sup>

Mithilfe eines vorgeschalteten Autoinjektors (Varian ProStar 420 Triathlon Cool, Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland) wurden jeweils 10 µl einer Probe aufgegeben und mittels einer mobilen Phase aus Chloridpuffer (0,3 M NaCl und 0,1



M NH<sub>4</sub>Cl, pH 8,5) mit einem Fluss von 0,33 ml/min durch das System befördert. Dieses setzt sich aus einer Vorsäule (NO-PrePAK, EiCom, Dublin, Irland) zur Beseitigung von noch in der Probe enthaltenen Proteinen und der unmittelbar nachgeschalteten Trennsäule (NO-PAK 4,5 x 50 mm, EiCom, Dublin, Irland) zusammen. Mit einer stationären Phase aus Polystyrol-Divinylbenzol-Harz erfolgt hier die Trennung von Nitrit und Nitrat. Da Nitrat eine höhere Affinität zur Ionenaustauschergruppe hat, werden Nitrit und Nitrat durch Anionen der mobilen Phase zeitversetzt wieder abgelöst und weiter im System transportiert. Dabei passiert Nitrit die sich anschließende Cadmium und Kupfer enthaltende Reduktionssäule (NO-RED, EiCom, Dublin, Irland), ohne eine Reaktion einzugehen. Hier wird Nitrat zu Nitrit reduziert. In dem folgenden Abschnitt reagieren sowohl das primäre als auch das aus Nitrat reduzierte Nitrit in der 35°C warmen Reaktionskapillare mit dem hinzugefügten Griess-Reagenz (5 g/l Sulfanilamid und 0,25 g/l N-(1-naphthyl)ethylendiamin). Zunächst reagiert Nitrit mit dem Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, welches in einer weiteren Reaktion mit N-(1-naphthyl)ethylendiamin einen rötlich-violetten Diazofarbstoff bildet. Bei einer Wellenlänge von 540 nm lässt sich daraufhin die Absorption dieses Farbstoffs mittels eines Vis-Spektrophometers (EiCom, Dublin, Irland) messen und auswerten. Dafür wurde das erfasste Signal über eine PC-Schnittstelle an die dazugehörige Software (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) weitergeleitet und den Angaben des Herstellers entsprechend mittels Kalibrierung durch standardisierte Nitrit- und Nitratlösungen als Fläche unter der Kurve berechnet. Über die gesamte Messung hinweg wurden Separations- und Reduktionssäule und Reaktionskapillare zur Beschleunigung der Reaktion in einem 35°C warmen Säulenofen gehalten, während die zu messenden Proben im Autoinjektor konstant bei 4°C gekühlt wurden.

### **2.3 Bestimmung von RXNO**

Die Quantifizierung von RXNO im Plasma erfolgte mittels CLD. Dabei werden Lichtquanten gemessen, welche bei der Reaktion von NO<sup>•</sup> mit Ozon entstehen. Diese Methode lässt in diesem Versuchsaufbau einen direkten Rückschluss auf die Konzentration von RXNO durch die Messung von aus diesen Verbindungen freigesetztem NO<sup>•</sup> zu. Dem Analysator CLD 88e (Eco Physics, Dürnten, Schweiz)

wurde ein System vorangeschaltet, in dem NO<sup>•</sup> aus der Probe freigesetzt und anschließend der eigentlichen Messeinheit zugeführt wurde. Von den Proben wurden jeweils 330 µl mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in das Reaktionsgefäß der Anlage injiziert. In diesem Kolben befanden sich 20 ml einer reduktiven Reaktionslösung, die von einer Warmwasserkammer umgeben waren und so auf 60°C aufgeheizt wurden; die Lösung besteht aus 0,57 g Iod (I) und 1,62 g Kaliumiodid (KI) in 15 ml Milipore-Wasser und 200 ml Essigsäure. Dies bewirkt die reduktive Freisetzung von NO<sup>•</sup> aus kovalenten Bindungen mit Aminosäureresten der Plasmaproteine. Das gebildete NO<sup>•</sup> wurde mittels eines inerten Trägergases (Helium) zur Reaktionskammer befördert. Das Gas passiert hier zunächst eine nachgeschaltete Glaskammer, die mit 1M Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung gefüllt ist und auf 4°C gekühlt wurde, und gelangt danach in die Reaktionskammer. Diese „NaOH-Falle“ dient dem Abfangen von höheren Stickoxiden aus dem Gas. In die Reaktionskammer wurde zusätzlich aus Sauerstoff generiertes Ozon (O<sup>3</sup>) gepumpt. Dieses Gas reagiert mit NO<sup>•</sup> zu Stickstoffdioxid, das sich dann in einem angeregten Zustand befindet. Bei der Rückreaktion in den Grundzustand werden Lichtquanten emittiert, die vom Gerät erfasst werden können und direkt proportional zur enthaltenen NO-Stoffmenge sind. Die Datenerfassung erfolgte über einen PC mit der Software ChromStar der Firma SCPA aus Weyhe-Leeste, Deutschland.

#### **2.4 *Ex vivo*-Versuche an isolierten Aortenstücken zur Beurteilung der endothelialen Funktion anhand der endothelabhängigen Dilatation**

Für die Charakterisierung der Gefäßfunktion wurden *ex vivo*-Versuche an isolierten Stücken von Mäuseaorten durchgeführt. Dabei wurde die vasomotorische Reaktion auf pharmakologische Reize bestimmt und digital aufgezeichnet. Um eine adäquate Gefäßfunktion der Aorten im Versuch zu gewährleisten, müssen die Tiere zügig und endothelerhaltend operiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Zeit von der Thoraxeröffnung bis zum Aufhängen der Aortenstücke unter 10 min gehalten und mit einer Stoppuhr überprüft. Die Tiere wurden zunächst mit Ketamin/Xylazin (100 mg/kgKG; 10 mg/kgKG) gewichtsadaptiert über eine intraperitoneale Injektion anästhesiert und anschließend auf einem 37°C warmen Operationstisch befestigt. Unter dem Mikroskop wurde der Thorax eröffnet und zunächst das Herz mit einem

kurzen Teil der Aorta ascendens entfernt. Lungen und Ösophagus wurden nach vollständiger Entfernung ebenfalls verworfen. Die Aorta thoracalis wurde an der Grenze zur Aorta abdominalis mit einer Mikroschere durchtrennt und vorsichtig aus dem retroperitonealen Fett ausgelöst. In einer Petrischale mit eiskaltem Krebs-Henseleit-Puffer (118 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 0,8 mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Glucose; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) wurde das Gefäß in drei Stücke von 2-3 mm Länge unterteilt.

Mittels Haken wurden die Stücke jeweils in eine Messeinheit eingehängt und auf eine Kraft von 1 g vorgespannt. Der Versuch erfolgte dann in 3 Messeinheiten simultan.

Diese erlauben die Untersuchung von jeweils einem Aortenstück. Jede Einheit enthält ein 2 ml fassendes, doppelwandiges Organbad mit Ablasshahn (Graz Tissue Bath System, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany), welches mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllt wird, um ein physiologisches Milieu für die Gefäßstücke herzustellen. Mithilfe eines Wasserbads (E100, Lauda, Lauda-Königshofen, Germany) erfolgt eine Zirkulation von warmem Wasser über die Doppelwandung, das im Versuch die Temperatur des Puffers bei 38°C hält. Zusätzlich wird die Pufferlösung über eine Glasfritte mit Carbogengas (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast, um einen pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten und das Ausfallen von Ca<sup>2+</sup> zu verhindern. Die Aortenstücke werden über zwei Drähte im Organbad eingespannt, wobei einer der beiden Drähte unbeweglich in der Apparatur verankert und der andere mit einem Kraftaufnehmer (F30 isometric Transducer, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) verbunden ist. Der Abstand der Drähte kann über einen Schraubmechanismus reguliert und so die Spannung nachjustiert werden. Das Signal wird von hier an einen Verstärker (Transducer Amplifier Module Type-A, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) weitergeleitet, der wiederum mit einer Datenerfassungseinheit (Powerlab 8/30, AD-Instruments, Sydney, Australien) verbunden ist. Die Kontraktion und die Dilatationseigenschaften können so in Form von Kraftänderungen in einem Computerprogramm (Lab Chart 7.0, AD-Instruments, Sydney, Australia) aufgezeichnet und anschließend interpretiert werden. Pro Versuchstag werden 1 l Krebs-Henseleit-Puffer angemischt. Im Wasserbad wird der Puffer auf einer Temperatur von 38°C gehalten und kontinuierlich begast. Anschließend werden die Organbäder mit dem Puffer gefüllt und wie zuvor beschrieben weiter beheizt und begast. Außerdem wird das

System mit 1g-Gewichten kalibriert. In der nun folgenden 75-minütigen Äquilibrationsphase müssen im Abstand von 15 min das Perfusat im Organbad gewechselt und die Stücke bei Bedarf auf 1 g nachjustiert werden. Im Anschluss daran wird in jedes Organbad Kaliumchloridlösung (KCl, 80 nM) appliziert. Die nachfolgende Depolarisation der Gefäßmuskulatur bewirkt eine maximale Kontraktion und bestätigt so deren Intaktheit. Nach 20 min werden die Organbäder so lange mit Puffer gewaschen, bis erneut eine Spannung von 1 g aufgezeichnet werden kann. Nachträglich folgt der eigentliche Versuch: Nach der Applikation von 2  $\mu$ M Phenylephrin (PHE) wird eine Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur der Aorten ausgelöst, die nach kurzer Zeit ein Maximum erreicht. Anschließend werden kumulative Dosen von ACh verabreicht (1 nM-10  $\mu$ M), welche zur Untersuchung der endothelabhängigen Dilatation dienen und die Darstellung derselben in einer Dosis-Wirkungs-Kurve erlauben. Zu beachten ist, dass höhere Folgekonzentrationen erst mit Erreichen des vorherigen maximalen Effekts verabreicht werden. Im Anschluss an die letzte Applikation werden alle Gefäße erneut gewaschen und auf den Ausgangswert von 1 g zurückgestellt. Im nächsten Abschnitt erfolgt die Applikation von PHE in neun Schritten zu gleichen Konzentrationen wie zuvor ACh (1 nM-10  $\mu$ M). Das System wird daraufhin wieder gewaschen und in die Ausgangsspannung von 1 g gebracht. Im letzten Teil des Experiments wird Natrium-Nitroprussid (SNP) verwendet, um als exogener NO-Donor die Sensitivität der glatten Muskeln auf NO<sup>•</sup> und damit die endothelunabhängige Dilatation (EID) zu testen. Dabei werden die Aortenstücke mit 1  $\mu$ M PHE vorkonstringiert und anschließend aufsteigende Konzentrationen von SNP (0,1 nM-10  $\mu$ M) hinzugefügt. Am Ende des Versuchs wurden die Aortenringe verworfen und die aufgezeichneten Spannungskurven der drei Kanäle gespeichert und am Computer ausgewertet.

## **2.5 Messung der Pulswellengeschwindigkeit (PWV) *in vivo***

Am Ende der chronischen Supplementierung von Nitrat erfolgte zunächst die nichtinvasive Bestimmung der Pulswellengeschwindigkeit zur Untersuchung der vaskulären Beschaffenheit. Zunächst wurden die Tiere mithilfe einer Maskenbeatmung mit 1,5 vol Isofluran in Narkose versetzt und auf einer Wärmeplatte fixiert. Während der kompletten Untersuchung wurde die Körpertemperatur mittels rektaler Temperatursonde überwacht sowie über in der

Wärmeplatte integrierte Elektroden ein EKG nach Eindhoven abgeleitet. Der Hals- und der Brustbereich wurden mittels Rasierer und Enthaarungscreme (Nair Hair Removal Lotion, Vhurch and Dwight Canada Corp) vollständig enthaart. Anschließend wurde hier angewärmtes Ultraschallgel (Echogel 100 Eco-Med-Pharmaceutical Inc., Ontario, Kanada) für den luftblasenfreien Kontakt des Schallkopfs aufgetragen. Für die Messung wurde ein Ultraschallgerät der Firma Visual Sonics (Vevo 2100, High Resolution Imaging System, Visual Sonics, Toronto, Kanada) verwendet.

Im PW-Doppler-Modus kann die Pulswellengeschwindigkeit ermittelt werden, indem die Zeitspannen vom Auftreten der R-Zacke im EKG bis zum Erscheinen der Pulswelle an Aorta ascendens und Arteria femoralis bestimmt werden. Die Differenz dieser Zeitintervalle bezeichnet die Laufzeit der Pulswelle vom proximalen zum distalen Messpunkt. Der Abstand zwischen beiden Punkten wird gemessen und die Pulswellengeschwindigkeit als Strecke (s) in cm geteilt durch die Laufzeit (t) in Sekunden rechnerisch bestimmt:

Geschwindigkeit (v) = Strecke (s) / Zeit (t)

## **2.6 Messung des zentralen Blutdrucks**

Im Hauptversuch erfolgte die invasive Messung des zentralen Blutdrucks in der Aorta ascendens. Dafür wurde ein Tip-Katheter (1,4 French, Milar Instruments, Houston, Texas, USA) verwendet. Dieser verfügt an der Spitze über ein Miniaturbarometer, das eine kontinuierliche Detektion des intravasalen Drucks über Änderungen der elektrischen Spannung ermöglicht. Nach Freipräparierung und Inzision der A. Carotis communis wurde der Katheter in die Aorta ascendens vorgeschoben und der Druck aufgezeichnet. Dazu wurden die Mäuse zunächst mittels Ketamin/Xylazin in tiefe Narkose versetzt. Im Anschluss wurden Brust- und Halsbereich mit einem elektrischen Rasierer von Haaren befreit und die Mäuse mit dem Kopf zum Operateur zeigend auf einem 37°C warmen Operationstisch fixiert. Die Operation startet mit einer ca. 1,5 cm langen kranio-kaudal verlaufenden Inzision des Halses. Unter dem Lichtmikroskop können das subkutane Bindegewebe und die Halsmuskulatur präpariert werden, sodass die Vagina carotica paratracheal aufgefunden und eröffnet werden kann. Die enthaltene Arteria

carotis communis muss dafür zunächst mit Hilfe einer Mikropinzette mobilisiert und bis zur proximalen Aufgabelung frei präpariert werden. Kurz unterhalb der Bifurkation wird die Arterie mit einem Faden legiert und etwas weiter kaudal mit einem Gefäßclip abgeklemmt. Zwischen diesen Punkten wird das Gefäß mit einer Mikroschere inzidiert. Hier wird der Katheter eingeführt. Anschließend wird ein weiterer Faden kaudal der Inzision um das Gefäß gelegt, um diesen zu fixieren und das Gefäß im Anschluss an die Messung wieder verschließen zu können. Nach dem Lösen des Gefäßclips wird der Katheter vorgeschoben, bis eine typische Aortendruckkurve sichtbar ist und die Platzierung in der Aorta ascendens bestätigt. Vor der eigentlichen Messung wird 5 min abgewartet, um ein Einpendeln auf einen stabilen Wert des Blutdrucks zu gewährleisten. Im Anschluss wird das Gefäß mithilfe des kaudalen Fadens verschlossen, um eine letale Blutung zu verhindern. In diesem Versuchsaufbau wurden Herzfrequenz (HF),  $P_{\text{sys}}$  und  $P_{\text{dia}}$  aufgezeichnet. Der arterielle Mitteldruck ( $P_{\text{mean}}$ ) wurde rechnerisch ermittelt:

$$P_{\text{mean}} = P_{\text{dia}} + \frac{1}{2} (P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}})$$

Der Katheter war über ein Druck-Volumen-System (MPVS-300, Millar Instruments, Houston, Texas, USA) mit einem kompatiblen Computerprogramm zur Datenaquisition (Iox, Emka Technologies, Paris, Frankreich) verbunden.

## 2.7 Analyse der Genexpression

Nach der Erhebung von Daten durch Messung *in vivo* und *ex vivo* folgte die Beschreibung der Genexpression. Dazu wurde die mRNA aus vaskulärem Gewebe isoliert; anschließend wurden in einem Microarray Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen den Gruppen herausgestellt. Mögliche Veränderungen im Genexpressionsmuster in den behandelten Gruppen sollten über eine RT-PCR verifiziert werden. Die genetische Analyse erfolgte aus entnommenen Mäuseaorten. Während der Exzision wurden daher der größte Teil des retroperitonealen Fettes sowie Blutrückstände entfernt, damit lediglich Zellen der arteriellen Wand in ihrer differentiellen Genexpression untersucht werden konnten.

Entsprechend der Versuche an isolierten Aortenringen wurden die Tiere anästhesiert und auf dem Operationstisch befestigt (siehe Punkt 2.4). Die Gefäße wurden in diesem Fall nicht sofort verwertet, sondern in einem Kryotube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert, bis die RNA-Isolation durchgeführt wurde.

### **2.7.1 RNA-Isolation aus Aorten**

Für Analysen der Genexpression mittels Microarray sowie real time PCR (RT-PCR) werden genetische Informationen in Form von RNA-Transkripten benötigt. Sie geben Aufschluss darüber, welche spezifischen Gene bzw. DNA-Abschnitte in der Zelle repliziert werden. Zur Isolation von RNA wurde das RNeasy MiniKit der Firma Quiagen aus Hilden in Deutschland verwendet. Basierend auf der Bindung von RNA-Fragmenten an einer Silikagelmembran können diese aus Gewebe extrahiert und im Anschluss in RNase-freiem Wasser gelöst werden. Zu Beginn werden die tiefgefrorenen Aorten mit  $350\ \mu\text{l}$  RLT-Puffer homogenisiert. Diesem wurde zuvor 2-Mercaptoethanol hinzugefügt, um die Lyse der Zellen zu unterstützen. Das Homogenat wird 3 min bei  $14.000\ g$  bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand anschließend in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit  $590\ \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser und  $5\ \mu\text{l}$  Proteinase K resuspendiert. Die Lösung muss bei  $55^{\circ}\text{C}$  für 10 min inkubieren und wird darauffolgend mit 100 % Ethanol versetzt und auf die Membran der RNeasy Spin Columns aufgetragen. Die Säule wird nun auf einem 2 ml-Reaktionsgefäß platziert und für 15 s bei  $10.000\ g$  zentrifugiert, das Eluat wird anschließend verworfen. Gemäß dem Herstellerprotokoll erfolgte danach in mehreren Waschschrinen die Aufreinigung der RNA mit den im Kit enthaltenen Puffern RW1 und RPE. Letzterer muss zuvor mit der vierfachen Menge an 100%igem Ethanol aufbereitet werden. Für die finale Elution der RNA werden  $30\ \mu\text{l}$  RNase-freies Wasser in die Mitte der Membran pipettiert und das Eluat in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Von dem Eluat werden  $5\ \mu\text{l}$  aliquotiert und zur RNA-Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung in einem Spektralphotometer verwendet (Nanodrop 2000, Wilmington, USA). Der Rest der Probe wurde in dieser Studie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

### **2.7.2 Analyse der Genexpression mittels Microarray**

Die differentielle Analyse der Genexpression mittels Microarray wurde in Kooperation mit dem „Genomics & Transcriptomics Labor“ des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Microarrays ermöglichen eine breite Analyse des Genexpressionsmusters eines Organs. Sie erlauben die Analyse mehrerer tausend Gene auf einmal und so die Erstellung eines umfassenden Expressionsprofils. Ein Trägerchip wird vom Hersteller in einer bestimmten Anordnung mit tausenden synthetisch hergestellter Oligonukleotiden bedruckt. Dafür werden die Nukleotide einzeln Base für Base auf Pixel des Mediums aufgetragen. Pro Pixel entsteht je ein Oligonukleotid, die sogenannten „Probes“. Diese entsprechen speziellen Regionen bestimmter Gene, die aus verschiedenen Datenbanken entnommen wurden. Auf dem in dieser Studie verwendeten Array „SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray“ der Firma Agilent sind über 50.000 Gene des Mäusegenoms angeordnet, deren Expressionsmuster in den jeweiligen Proben untersucht werden können. Dazu wird die gewonnene RNA des Probenmaterials zunächst mit einem Bioanalyser (Bioanalyser 2100, Agilent) auf ihre Qualität hin überprüft. Das Instrument erfasst die Kettenlänge von kodierenden mRNA und bildet den RIN-Wert (RNA Integrity Number), welcher Aufschluss über die Intaktheit der Nukleotidketten gibt. Die weiteren Schritte werden gemäß dem Protokoll des Herstellers „One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling)“ durchgeführt. Dabei wird die RNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Während der Replikation werden durch eine T7 RNA-Polymerase mit Cyanin-3 markierte Cytidintriphosphatmoleküle (CTP) in den Strang eingebaut. Die später detektierte Fluoreszenz gibt dann Aufschluss über die Aktivität bestimmter Gene in der Probe. Im nächsten Schritt werden die markierten DNA-Moleküle, die „Targets“, mit dem Microarray hybridisiert. Anschließend wird der Array am Agilent High-Resolution Scanner gescannt. Aus dem gescannten Bild (TIFF-File) werden die einzelnen Rohfluoreszenzwerte mittels Feature Extraction Software (Vers. 10.7) ermittelt und in Genespring GX 11.5 importiert. Durch die anschließende statistische Analyse können dann Unterschiede der Genexpression genau herausgestellt werden.

Um die große Datenmenge eines Microarrays zu bewältigen, bedient man sich bioinformatischer Software. Diese erlaubt es, die differentiellen Gene in bestimmte



funktionelle Gruppen einzuordnen und eine systematische Analyse zu ermöglichen. In der vorliegenden Studie wurde dazu die im Internet frei verfügbare Software „database for annotation, visualization and integrated discovery“ (DAVID) des Laboratory of Immunopathogenesis and Bioinformatics des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, Maryland, USA) genutzt. Statistisch signifikant unterschiedlich exprimierte Gene können hier mittels des „functional annotation tool“ jeweils drei Genontologie-Kategorien (GO-Terme), namentlich „Biologischer Prozess“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“, zugeordnet werden. Außerdem wurden in einer Signalweganalyse die Zuordnungen zu biologischen Signalwegen, welche in verschiedenen Datenbanken gespeichert sind, überprüft. Je nachdem, welchen Anteil eine Gruppe von differentiellen Genen am Referenzgenom des Programms hat, wurde ein p-Wert errechnet, welcher die Bedeutung der Terme für das Experiment widerspiegelt. Diese Berechnung erfolgte mit dem modifizierten Fisher's exact test. Anschließend wurde der negative Logarithmus der p-Werte bestimmt, sodass höhere Werte eine größere Bedeutung widerspiegeln. Als Referenzgenom wurden alle „Probes“ des Arrays verwendet, welche sowohl bei der alten Kontrollgruppe als auch bei der jungen Kontrollgruppe detektiert werden konnten. So wurde für die Datenanalyse ein genetischer Hintergrund gewählt, welcher der Genexpression im Gewebe der Mausaorta entsprach.

### **2.7.3 Positivkontrolle mittels RT-PCR**

Um die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Microarrays zu bestätigen, wurde im Anschluss eine RT-PCR durchgeführt. Hierfür wurden einige differentiell exprimierte Gene ausgewählt und quantifiziert.

Für die Genanalyse in der RT-PCR muss gewonnene RNA ebenfalls in cDNA umgewandelt werden. Dazu wurde das „High Capacity RNA-to-cDNA kit“ von Ambion genutzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet. Durch die Bindung spezifischer Primer werden dabei bestimmte Sequenzen von cDNA repliziert und erlauben es so, ein Gen oder Teile eines Gens *in vitro* zu vervielfältigen. Dadurch lassen sich kleinste Mengen von DNA in einer Probe nachweisen. Die RT-PCR ermöglicht zusätzlich eine semiquantitative Analyse der DNA-Menge in Echtzeit und kann so Aufschluss über die Aktivität eines Gens aus der jeweiligen Probe geben.

Zu diesem Zweck wird nach jedem Zyklus eine Messung der Fluoreszenz durchgeführt, die in ihrer Intensität proportional zur Menge des replizierten DNA-Abschnitts ist. Dazu nutzt man das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Für die Bestimmung der cDNA, respektive der mRNA-Menge, wurde das relative expression software tool (REST) der Firma Qiagen verwendet. Die DNA-Menge erhöht sich mit jedem Zyklus der PCR und somit auch die detektierte Fluoreszenz. Für die Quantifizierung muss der sogenannte Ct-Wert (cycle threshold) der Gene ermittelt werden. Dieser gibt Aufschluss über die Anzahl der Zyklen, bei der sich die Fluoreszenz gerade vom Hintergrundsignal der No-Template-Kontrolle abhebt. Der Ct-Wert des Gens in der behandelten Probe wird zunächst in Relation zu einem nichtregulierten Kontrollgen („House-Keeping-Gen“ oder Referenzgen) gesetzt, wozu in dieser Studie das Gen für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH) genutzt wurde. Dieses wird nicht unterschiedlich reguliert und konnte so mit dem Zielgen verglichen werden. Abschließend werden die Expressionsunterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe herausgestellt.

Pro DNA-Probe wurde jeweils eine Dreifachbestimmung des Ct-Werts durchgeführt, weswegen eine ausreichende Menge des Reaktionsmix hergestellt werden musste. Dazu wurden zunächst 4 µl des jeweiligen TaqMan Assay-Primer mit 16 µl der vorher verdünnten cDNA gemischt. Im Anschluss daran wurden 60 µl des PCR-Mastermix hinzugegeben. Dieser wird aus 40 µl 2x TaqMan Gene Expression Master Mix und 20 µl RNase freiem Wasser hergestellt. Die Mischung wird kurz geschüttelt und für einige Sekunden in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Nun wurden nach Plattenschema jeweils 20 µl der Mischung vorsichtig in 3 Wells einer 96-Well-Platte pipettiert, wobei darauf geachtet werden musste, eine Bläschenbildung zu vermeiden. In entsprechendem Verhältnis wurde ein Reaktionsmix mit der cDNA des Kontrollgens GADPH sowie eine RNA-Kontrolle und eine No-Template Kontrolle hergestellt. Die cDNA wurde dafür durch RNA bzw. RNase-freies Wasser ersetzt. Alle Kontrollen wurden 2-fach bestimmt und entsprechend der Probe zu je 20 µl in zwei Wells der Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit Deckel und Alufolie versiegelt, auf Eis zum Thermocycler transportiert, dort eingesetzt und die PCR durchgeführt.

## 2.8 Mathematisch-statistische Verfahren

Deskriptive statistische Daten wurden, sofern nicht anders vermerkt, in dieser Arbeit als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung oder Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SD oder MW  $\pm$  SE) mit der jeweiligen Anzahl (n) an Versuchstieren angegeben. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde mittels Student's t-test für gepaarte (Vorstudie: Gewicht) und ungepaarte Daten (Vorstudie: Gruppenvergleiche Gehalt von Nitrit- und Nitrat im Plasma) durchgeführt. Die Daten der Hauptstudie (Aortenringe, zentraler Blutdruck, Pulswellengeschwindigkeit, Nitrit- und Nitratgehalt nach achtwöchiger oraler Supplementierung) wurden mit einem One-Way-ANOVA mit post hoc Bonferroni Korrektur analysiert. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Zur Darstellung der endothelabhängigen und -unabhängigen Dilatation (Aortenring-Versuche) in einem kurvenförmigen Verlauf wurden die Daten durch den negativen dekadischen Logarithmus transformiert und anschließend in einer Dosis-Wirkungs-Kurve sigmoidal dargestellt. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Software, Kalifornien, USA) durchgeführt. Probesets des Microarrays wurden mithilfe des moderated Student's t-tests analysiert. Die Schwelle für einen signifikanten Unterschied in der Genexpression zwischen zwei Gruppen wurde auf einen p-Wert von 0,05 gesetzt. Außerdem wurde ein fold change von  $> 1,2$  für die weitere Analyse als biologisch relevant vorausgesetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der Vorstudie

In der Vorstudie wurde der Einfluss verschiedener Trinkwassersorten auf die plasmatischen Spiegel von Nitrat und Nitrit veranschaulicht. Es sollte außerdem festgestellt werden, welches Wasser für die Kontrollgruppen in der Hauptstudie geeignet war.

##### 3.1.1 Nitrat und Nitrit in unterschiedlichen Trinkwassersorten

Zu Beginn der Vorstudie wurden zunächst die Spiegel von Nitrat und Nitrit in den Trinkwassersorten der verschiedenen Gruppen mittels HPLC-Technik bestimmt. Die Mittelwerte sind in der folgenden Tabelle 3.1 abgebildet: Die Ergebnisse zeigen abweichende Konzentrationen der Wassersorten im Vergleich untereinander und im direkten Vergleich zu unbehandeltem Wasser aus der Wasserleitung.

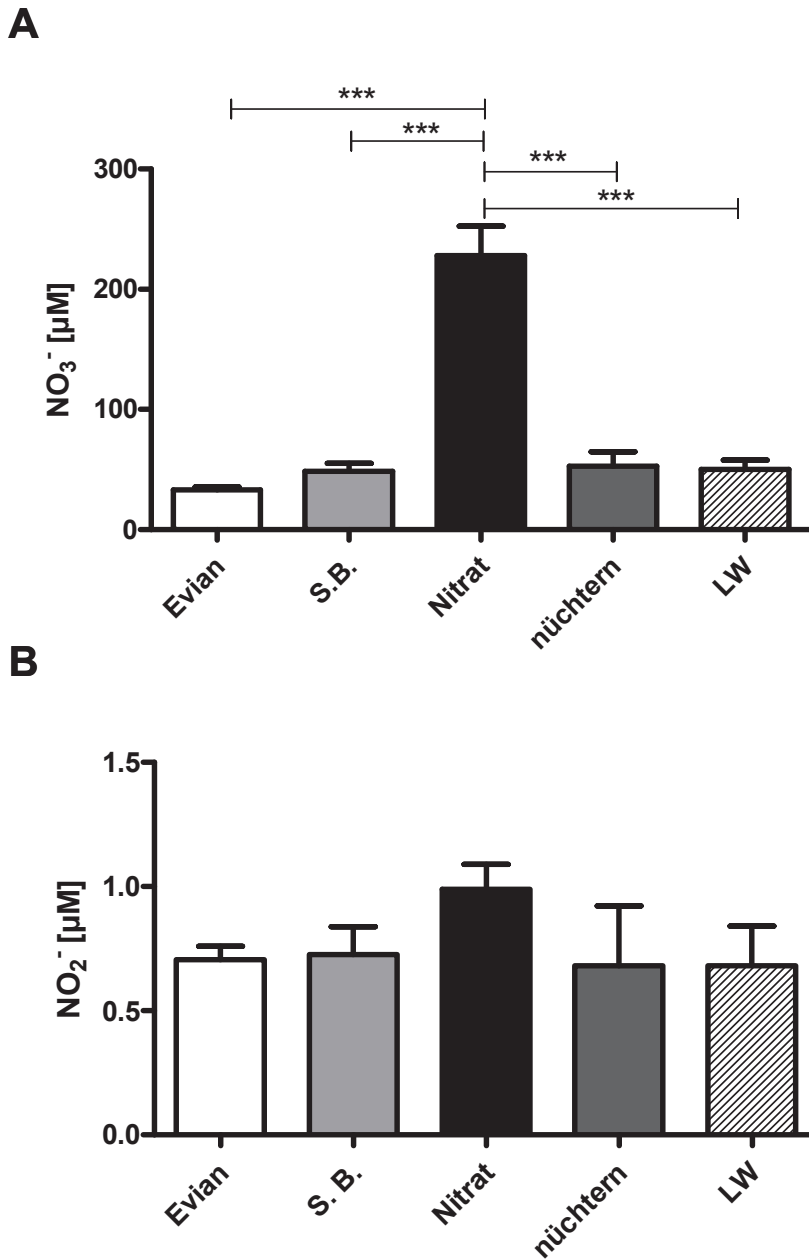
**Tabelle 3.1 Nitrat- und Nitritkonzentration der verschiedenen Wassersorten der Vorversuche**, n.d.=nicht detektierbar (MW±SD)

Wasser	Nitrat		Nitrit	
	µM	mg/l	µM	µg/l
Evian	66 ± 0.77	4.3 ± 0.05	0.016 ± 0.023	1.1 ± 1.5
San Benedetto	157 ± 0.8	9.7 ± 0.05	n. d.	n. d.
Leitungswasser	223 ± 1.7	13.8 ± 0.11	0.034 ± 0.019	2.3 ± 1.3
1 g/l Nitrat	16915 ± 1039.9	1048.8 ± 64.47	0.153 ± 0.071	10.6 ± 4.9

##### 3.1.2 Nitrat und Nitrit im Plasma junger Mäuse nach zwei Wochen

Nach zwei Wochen wurden die Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma der Tiere gemessen, um den Einfluss verschiedener Wassersorten mit einem unterschiedlichen Gehalt an Nitrat und Nitrit bzw. einer hoch dosierten Applikation von Nitrat festzustellen. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den anderen Gruppen ein deutlicher Anstieg des Nitrats im Plasma in der Gruppe, die das mit 1 g/l Nitrat angereicherte Trinkwasser verabreicht bekam. Alle anderen Gruppen unterschieden sich in Bezug auf die Konzentration von Nitrat im Plasma nicht signifikant. Die plasmatischen Spiegel von Nitrit zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Abb. 3.1). Die unterschiedlichen Kontrollwassersorten wirkten sich also trotz einer geringfügig

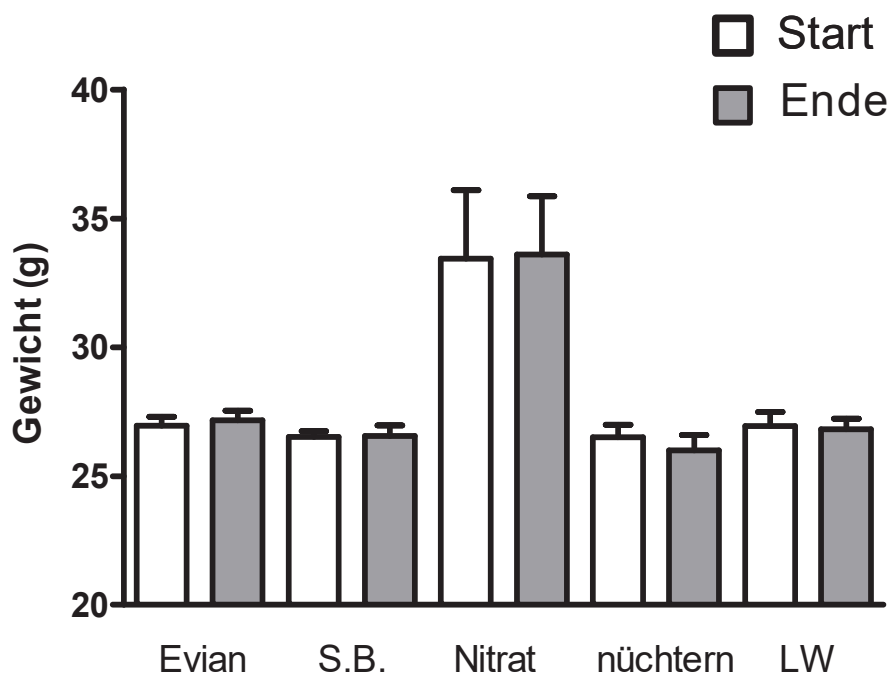
schwankenden Konzentration von Nitrat und Nitrit nicht unterschiedlich auf die Plasmakonzentration aus. Eine hoch dosierte Gabe von Nitrat jedoch führte zu einer deutlichen Erhöhung der plasmatischen Spiegel von Nitrat nach 2 Wochen.



**Abb. 3.1: Plasmakonzentration von Nitrat und Nitrit nach Einnahme unterschiedlicher Trinkwasser in einem Zeitraum von zwei Wochen.** Nach zwei Wochen mit einem bestimmten Trinkwasser wurden Plasmaproben zur Bestimmung der Spiegel von (A) Nitrat und (B) Nitrit abgenommen (Evian n=21, San Benedetto (S.B.) n=8, Nitrat n=12, nüchtern n=5, Leitungswasser (LW) n=5). Im Vergleich zu allen anderen Gruppen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Nitrats im Plasma in der Gruppe, welcher Nitrat zugeführt wurde (\*\*\*) (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler).

### 3.1.3 Veränderungen des Körpergewichts junger Mäuse nach zwei Wochen

Zu Beginn der zwei Wochen, in denen junge Mäuse lediglich eine bestimmte Sorte Trinkwasser erhielten, sowie unmittelbar vor der Blutentnahme am Ende dieses Zeitraums wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Bei keiner der Gruppen waren signifikante Unterschiede zwischen dem Körpergewicht zu Beginn der zwei Wochen andauernden Applikation von Nitrat und dem am Ende derselben feststellbar (vgl. Abb. 3.2). Dies deutet darauf hin, dass es innerhalb der einzelnen Gruppen zu keiner Veränderung des Fressverhaltens gekommen ist.



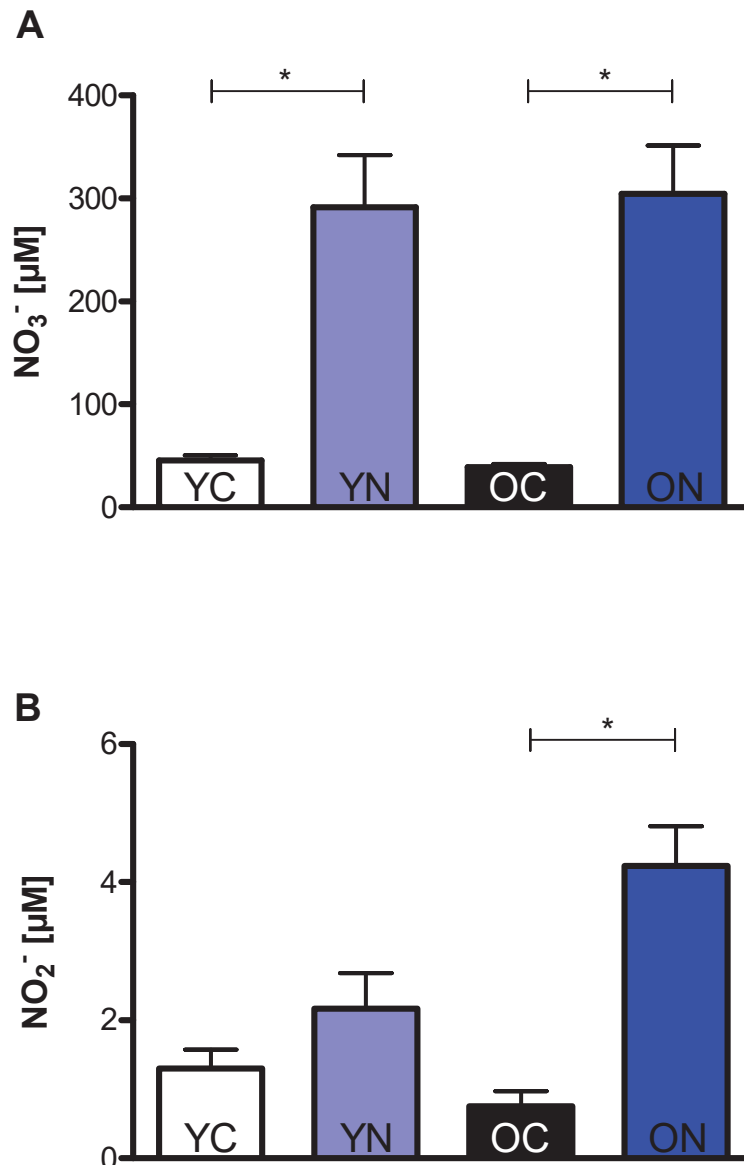
**Abb. 3.2: Messung des Körpergewichts.** Messung des Körpergewichts am ersten Tag (Start) sowie am letzten Tag der oralen Supplementierung von Nitrat (Ende) unmittelbar vor Abnahme des Bluts (Evian n=10, San Benedetto (S.B.) n=8, Nitrat n=12, nüchtern n=5, Leitungswasser (LW) n=5) (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler).

## 3.2 Ergebnisse der Hauptstudie

In der Hauptstudie wurde der Einfluss einer mehrwöchigen oralen Supplementierung von Nitrat bei jungen und alten Tieren überprüft. Dazu wurden die Konzentrationen von Nitrat und Nitrit bestimmt sowie verschiedene *in vivo*- und *ex vivo*-Untersuchungen durchgeführt.

### **3.2.1 Bestimmung von Nitrat und Nitrit im Plasma nach achtwöchiger oraler Supplementierung mit anorganischem Nitrat**

Jeweils eine Gruppe der alten und der jungen Mäuse erhielt im Zeitraum von acht Wochen eine orale Supplementierung mit anorganischem Nitrat. Dafür wurde dieses in einer Konzentration von 1 g/l im Trinkwasser der Tiere gelöst. Die Kontrolltiere erhielten pures Leitungswasser. Nach acht Wochen wurden Nitrat und Nitrit im Plasma der so behandelten alten und jungen Tiere sowie in dem der Kontrollgruppen bestimmt, um den Einfluss einer chronischen oralen Supplementierung bei jungen und alten Tieren zu überprüfen. Sowohl in der Gruppe der alten als auch in der Gruppe der jungen Tiere bewirkte die Supplementierung von Nitrat über das Trinkwasser einen deutlichen Anstieg der Spiegel von Nitrat im Plasma. Ein Anstieg von Nitrit und damit eine mögliche Biokonversion von Nitrat zu Nitrit konnte hingegen nur bei den alten Tieren nachgewiesen werden (\* $p < 0,05$ , siehe Abb. 3.3). Eine orale Supplementierung mit Nitrat konnte also keine Erhöhung der Spiegel von Nitrit im Plasma von jungen Tieren bewirken, obgleich die Konzentration von Nitrat und Nitrit im Plasma alter Tiere durch eine derartige Supplementierung mit Nitrat dauerhaft angehoben werden konnte.



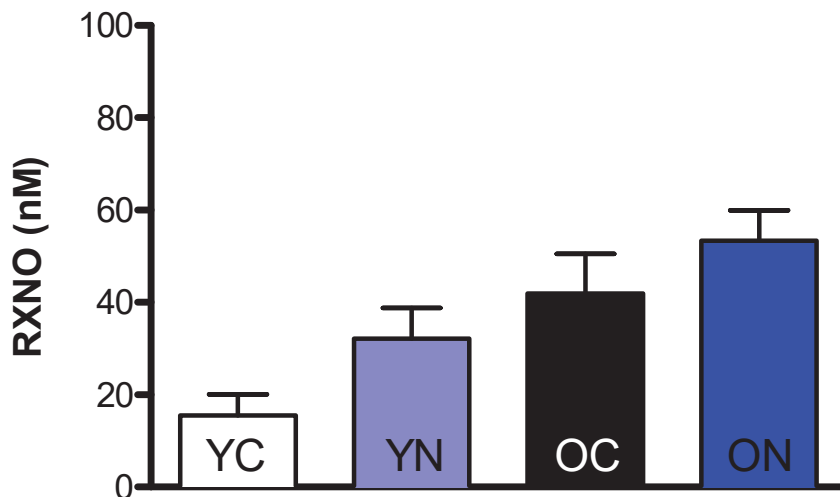
**Abb. 3.3: Plasmakonzentration von Nitrat und Nitrit nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat.** Vergleich der plasmatischen Nitrat- (A) und Nitritspiegel (B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg des Spiegels von Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) im Plasma (A: \*p<0,05 YN vs. YC, ON vs. OC), während nur bei den alten Tieren ein signifikanter Anstieg des Nitrits (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) im Plasma aufgezeigt werden konnte (B: \*p<0,05 OC vs. ON) (n=6 pro Gruppe, Mittelwert ± Standardfehler), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

### 3.2.2 Bestimmung von RXNO im Plasma nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat

Nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat wurde ebenfalls in allen Gruppen die Konzentration der RXNOs im Plasma untersucht. Weder unterschieden sich die Konzentrationen der alten im Vergleich zu denen der jungen



Kontrollgruppe, noch konnte nach einer zusätzlichen oralen Zufuhr von Nitrat ein signifikanter Unterschied der RXNO-Konzentration im Plasma festgestellt werden (siehe Abb. 3.4) Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine orale Supplementierung von Nitrat die Konzentration der Nitrosoverbindungen im Plasma nicht erhöhen konnte.

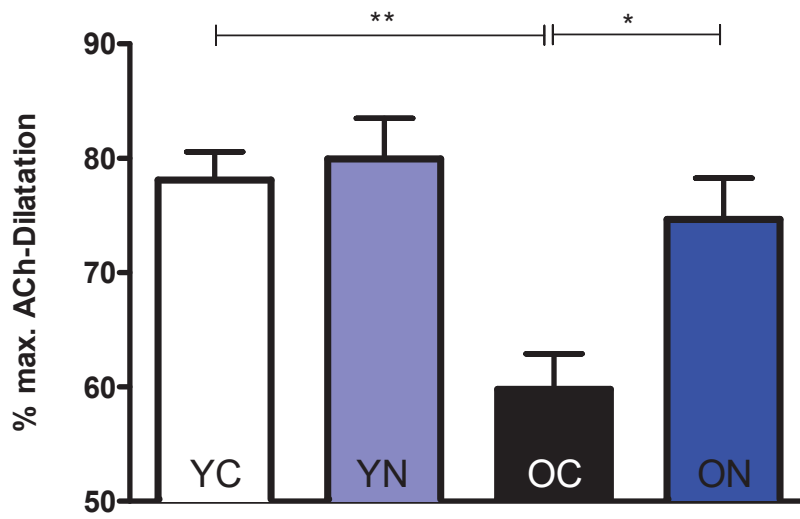
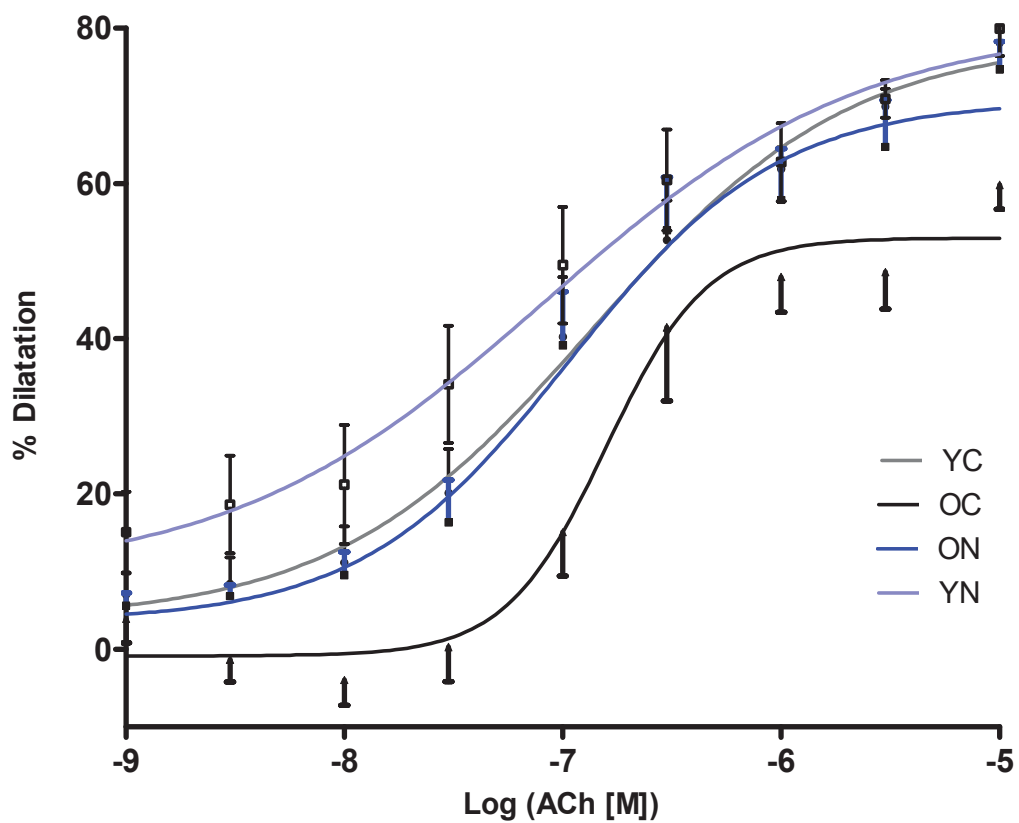


**Abb. 3.4: Plasmakonzentration der RXNOs nach achtwöchiger oraler Supplementierung von anorganischem Nitrat.**

Vergleich der plasmatischen RXNO-Konzentration. Bezüglich der Konzentration an RXNOs im Plasma konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (n=6 pro Gruppe, Mittelwerte mit Standardfehler), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

### 3.2.3 Messung der endothelabhängigen Dilatation an isolierten Aortenringen nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat

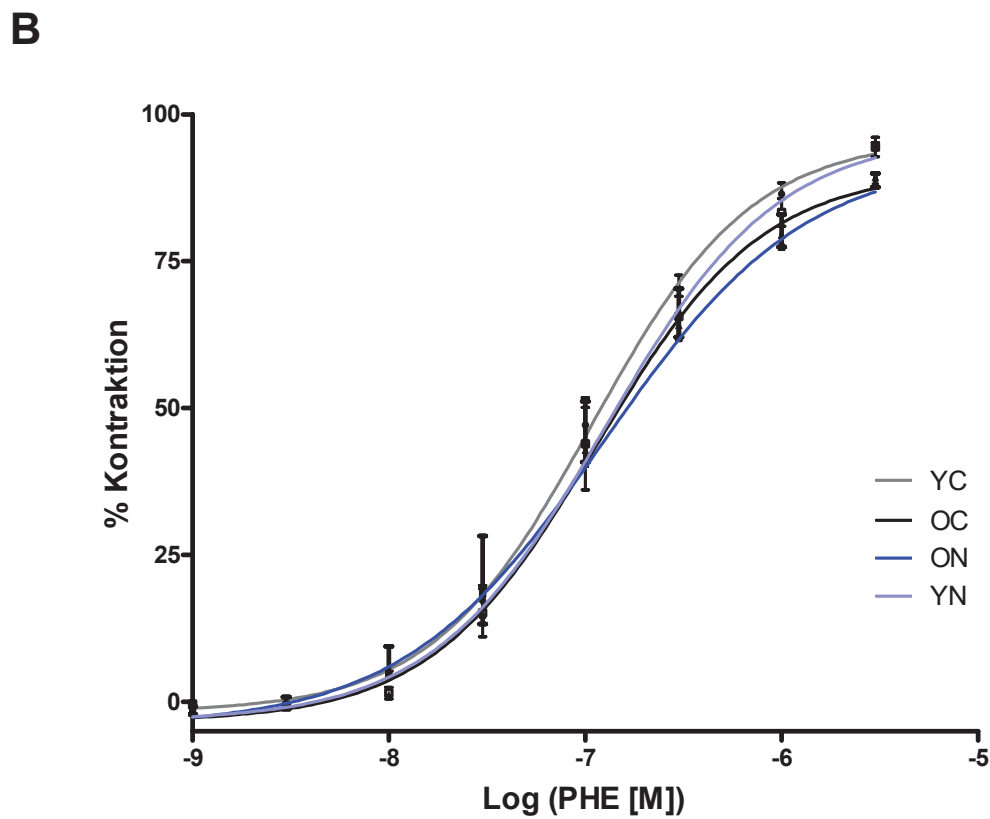
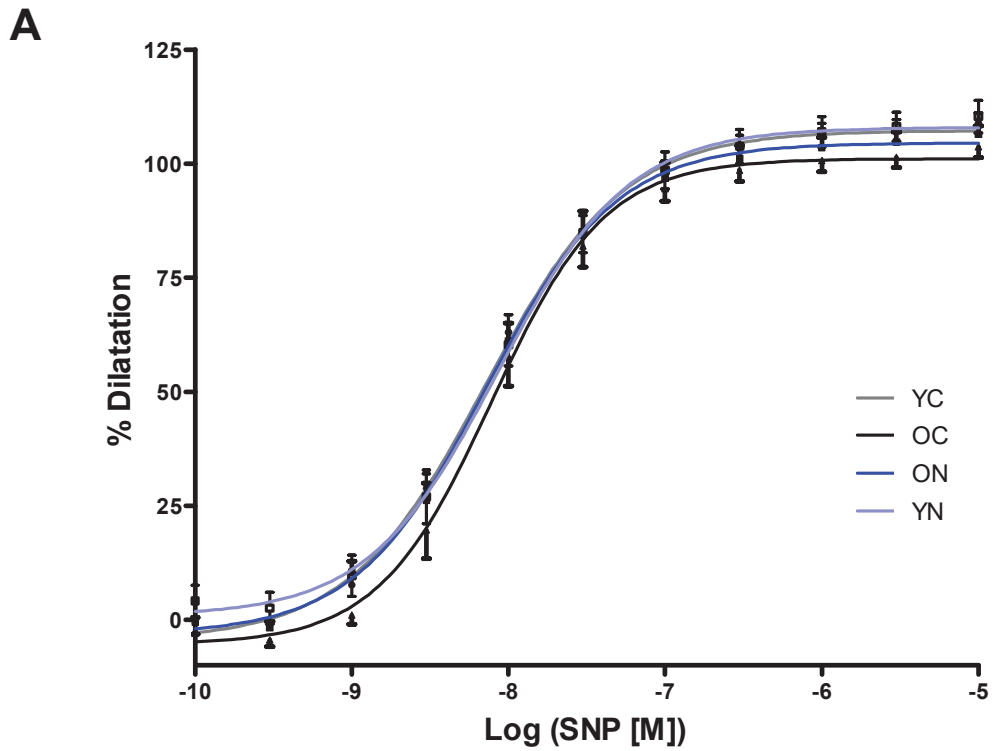
Um den Einfluss einer chronischen oralen Supplementierung von Nitrat auf die vaskuläre Funktion bzw. die altersabhängige vaskuläre Dysfunktion zu untersuchen, wurden *ex vivo*-Versuche an isolierten Aortenringen durchgeführt. Die maximale EDD, ausgelöst durch Applikation von ACh, war in alten Mäusen niedriger als in jungen Mäusen (OC  $60 \pm 2\%$  vs. YC  $78 \pm 3\%$ ,  $**p < 0.01$ , siehe Abb. 3.5 A). Eine orale Aufnahme von Nitrat über das Trinkwasser konnte diese Dysfunktion aufheben (OC  $60 \pm 2\%$  vs. ON  $74 \pm 4\%$ ,  $*p < 0,05$ , siehe Abb. 3.5 A), zeigte bei den jungen Tieren jedoch keinen Effekt. Die vasodilatatorische Antwort auf ACh zeigte keinen Unterschied in den Gruppen YC ( $76 \pm 3\%$ ), YN ( $79 \pm 3\%$ ) und ON ( $74 \pm 4\%$ ) (MW $\pm$ SE).

**A****B**

**Abb. 3.5: Endothelabhängige Dilatation.** (A) Vergleich der maximalen EDD nach Applikation von ACh. (B) Logarithmische Auftragung der Dilatation nach kumulativer Verabreichung mehrerer Dosen ACh (YC, YN, OC, ON: n=5-6; \*p<0,05; \*\*p<0,01; Mittelwert ± Standardfehler), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

### **3.2.4 Messung der endothelunabhängigen Dilatation und Vasokonstriktion an isolierten Aortenringen nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat**

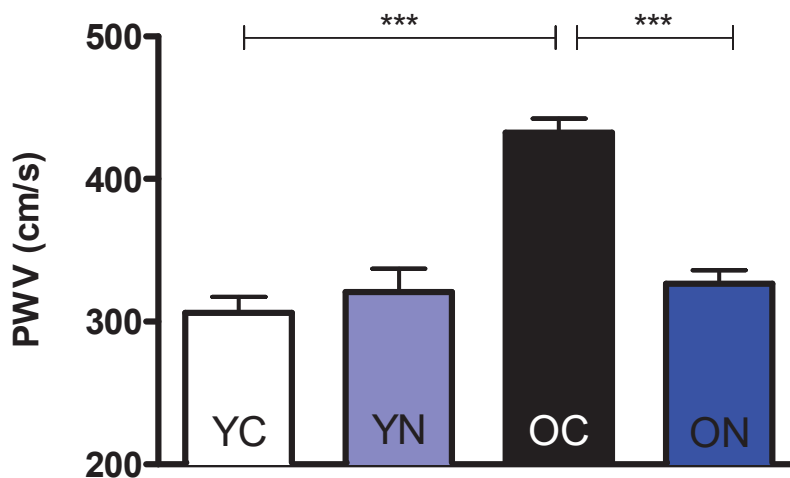
Durch Applikation des exogenen NO-Donors SNP wurde die endothelunabhängige Dilatation überprüft und gab so Aufschluss über die Dilatationsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur (siehe Abb. 3.6 A). Im Alter zeigte sich keine Einschränkung der Dilatationsfähigkeit der Gefäße. Eine verminderte EDD im Alter ist daher nicht auf eine verringerte Sensibilität der glatten Muskulatur zurückzuführen. Des Weiteren bewirkte eine orale Supplementierung von Nitrat keine Veränderung der Sensibilität. Mit der Gabe von PHE wurde eine Vasokonstriktion ausgelöst (siehe Abb. 3.6 B). Die Reaktion bei unterschiedlich hohen Dosierungen von PHE war in allen Gruppen gleich.



**Abb. 3.6: Endothelunabhängige Vasoreaktivität.** (A) Endothelunabhängige Dilatation nach Gabe von SNP. (B) Vasokonstriktion ausgelöst durch Gabe von PHE. Es ist kein signifikanter Unterschied in den jeweiligen Gruppen erkennbar (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

### 3.2.5 Messung der PWV zur Überprüfung des Einflusses einer achtwöchigen oralen Supplementierung von Nitrat auf die Gefäßsteifigkeit

Im Alter konnte eine Zunahme der Pulswellengeschwindigkeit als Marker für die arterielle Steifigkeit bestätigt werden (OC  $433 \pm 10$  cm/s vs. YC  $306 \pm 11$  cm/s  $***p < 0,001$ ). Die Gruppe der mit Nitrat behandelten alten Tiere zeigte eine deutliche Reduktion in der Pulswellengeschwindigkeit (OC  $433 \pm 10$  cm/s vs.  $327 \pm 9$  cm/s  $***p < 0,001$ ) (siehe Abb. 3.7, MW  $\pm$  SD). Als Schlussfolgerung konnte eine altersabhängige Zunahme der Gefäßsteifigkeit angenommen werden.



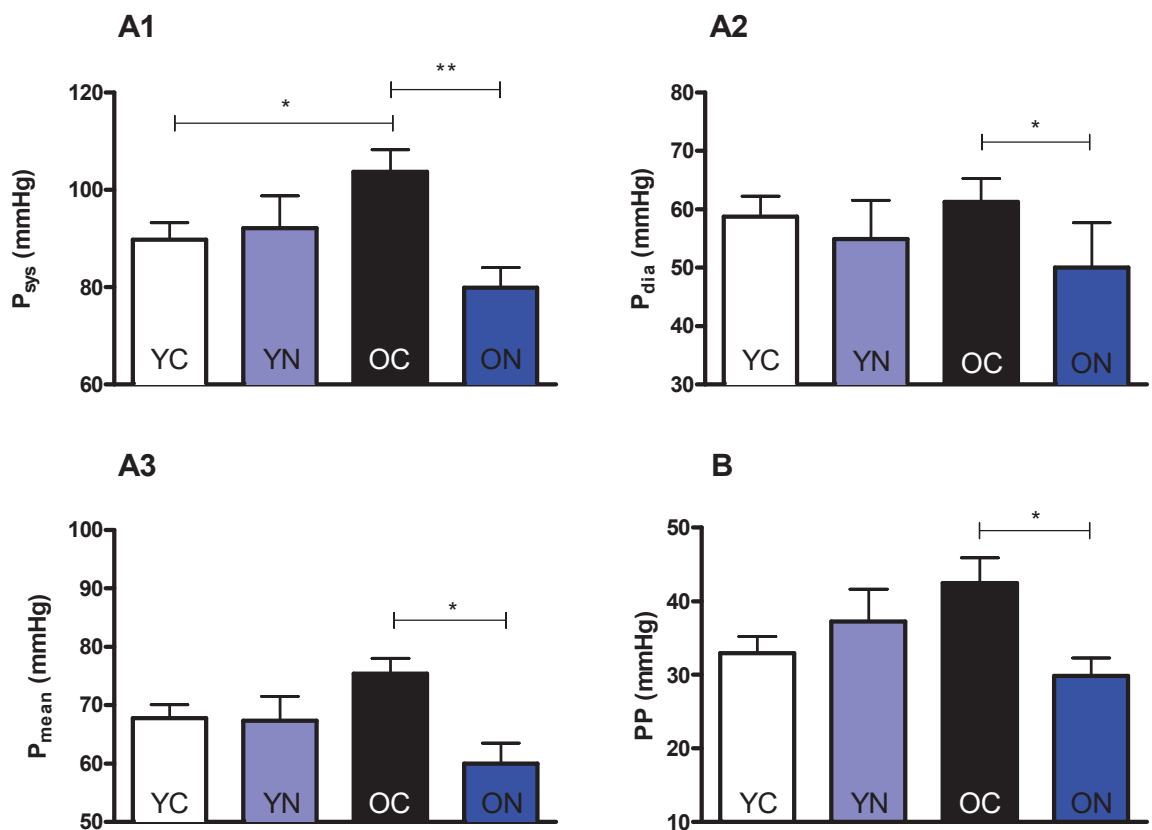
**Abb. 3.7: Pulswellengeschwindigkeit.** In allen Gruppen (YC, YN, OC, ON: alle  $n=6$ ) wurde die Pulswellengeschwindigkeit (PWV in cm/s) bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Zunahme im Vergleich von jungen zu alten Kontrolltieren (OC  $433 \pm 10$  cm/s vs. YC  $306 \pm 11$  cm/s,  $***p < 0,001$ ) sowie eine signifikante Abnahme der PWV im Vergleich zwischen alten Kontrolltieren und mit alten Tieren, welche eine Supplementierung von Nitrat erhielten (OC  $433 \pm 10$  cm/s vs.  $327 \pm 9$  cm/s  $***p < 0,001$ ) (Abbildung Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

### 3.2.6 Messung des zentralen arteriellen Blutdrucks nach achtwöchiger oraler Supplementierung von Nitrat

Die Gruppe der unbehandelten alten Tiere zeigte höhere systolische Blutdruckwerte als die junge Kontrollgruppe (OC  $104 \pm 9$  mmHg vs. YC  $90 \pm 4$  mmHg,  $*p < 0,05$ ), während sich bei den Werten des mittleren arteriellen Drucks und des diastolischen Drucks keine Unterschiede zwischen diesen Gruppen zeigten. Die chronische Gabe von Nitrat konnte sowohl die systolischen Blutdruckwerte (OC  $104 \pm 9$  mmHg vs. ON  $80 \pm 4$  mmHg,  $**p < 0,01$ , siehe Abb. 3.8 A1) als auch den mittleren arteriellen

Druck (OC  $75 \pm 3$  mmHg vs. ON  $60 \pm 3$  mmHg,  $*p < 0,05$ , siehe Abb. 3.8 A3) sowie den diastolischen Druck (OC  $61 \pm 2$  mmHg vs. ON  $50 \pm 3$  mmHg,  $*p < 0,05$ , siehe Abb. 3.8 A2) der alten Tiere deutlich reduzieren. So zeigte sich auch eine Reduktion der PP, die rechnerisch aus den systolischen und diastolischen Werten bestimmt wurde (OC  $42 \pm 3$  mmHg vs. ON  $30 \pm 2$  mmHg,  $*p < 0,05$ , siehe Abb. 3.8 B). In den genannten Gruppen zeigte sich kein Unterschied in der Herzfrequenz (Schläge pro Minute/“beats per minute“, bpm) (YC  $557 \pm 26$  bpm, OC  $551 \pm 53$  bpm, ON  $544 \pm 37$  bpm, YN  $543 \pm 4$  bpm, MW  $\pm$  SE)).

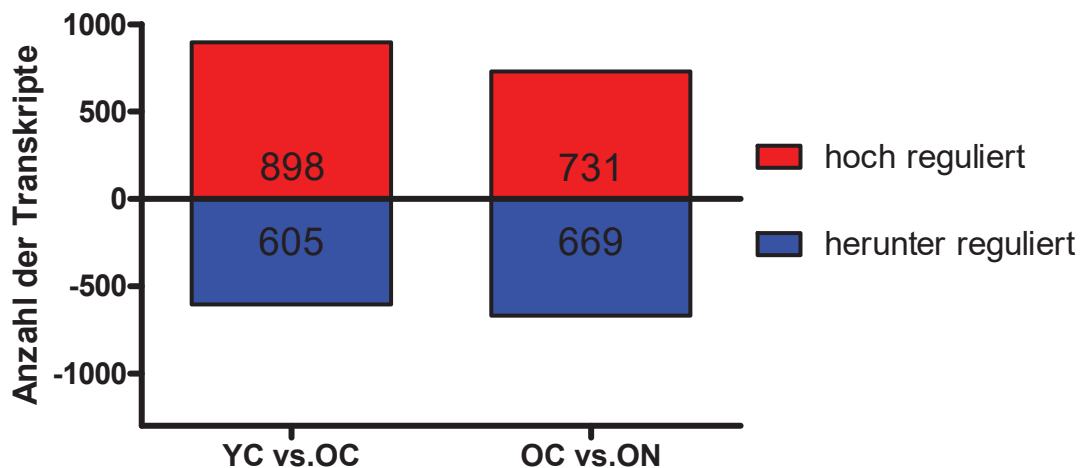
Die Untersuchungen ergaben somit, dass die vermehrte Aufnahme von Nitrat im Alter eine Reduktion der Blutdruckwerte bewirkt, welche mit denen des Kollektivs der jungen Tiere vergleichbar sind.



**Abb. 3.8: Invasive Messung des Blutdrucks und der Blutdruckamplitude.** (A1) P<sub>sys</sub> in mmHg, (A2) P<sub>dia</sub> in mmHg, (A3) P<sub>mean</sub> in mmHg, (B) P<sub>sys</sub>-P<sub>dia</sub> = PP in mmHg (YC und ON: n=5; OC und YN: n=4;  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ; Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat)).

### 3.2.7 Analyse des Einflusses des Alters sowie einer achtwöchigen Supplementierung auf die Genexpression mittels Microarray

Mittels Microarray wurden die verschiedenen Profile der Genexpression, nämlich sowohl die altersabhängigen als auch die durch orale Supplementierung von Nitrat induzierte, dargestellt. Mit dem verwendeten Chip konnten in jedem der beiden Versuchsansätze insgesamt 55682 Gene untersucht werden; davon wurden in den verwendeten Proben 26774 Transkripte detektiert. Im Vergleich zwischen den jungen und den alten Kontrolltieren (YC vs. OC) zeigten sich 1503 differentiell exprimierte Gene. Von diesen wurden 898 hoch und 605 herunter reguliert. Zwischen alten Kontrolltieren sowie mit Nitrat alten Tieren, die Nitrat oral erhielten (OC vs. ON) zeigten sich 1400 differentiell exprimierte Gene; hier wurden 731 hoch und 669 herunter reguliert (siehe Abb. 3.9). Eine Modulation der Genexpression sowohl durch ein höheres Lebensalter als auch durch eine Supplementierung von Nitrat im Alter konnte so dargestellt werden.



**Abb. 3.9: Differentiell exprimierte Transkripte in Aorten.** Verglichen wurde die differentielle Genexpression von jungen und alten Mäusen (YC vs. OC; jeweils n=6), sowie von alten Kontrolltieren und der mit Nitrat supplementierten Gruppe alter Mäuse (OC vs. ON; jeweils n=6) (Alle Transkripte signifikant mit  $p < 0,05$ , insgesamt 26774 Gene detektiert), YC=Junge Mäuse (Kontrolle), YN=Junge Mäuse (Nitrat), OC=Alte Mäuse (Kontrolle), ON= Alte Mäuse (Nitrat). Abbildung modifiziert nach Rammos et al.<sup>132</sup>

#### 3.2.7.1 Genontologie und Signalweganalysen

Für die weitere Datenanalyse wurde die DAVID Bioinformatics Software genutzt. Die differentiell regulierten Gene wurden von diesem Computerprogramm kategorisiert, sodass eine allgemeine Übersicht der Bedeutung der Gene für den

Organismus ermöglicht wurde. Rechnerisch wurden diese Prozesse hierarchisch angeordnet; dadurch konnten stärker regulierte Kategorien hervorgehoben werden. Dabei wurden die Gene verschiedenen GO-Terme zugeordnet und zudem ihre Stellung in verschiedenen biochemischen Signalwegen aufgezeigt. Tabelle 3.2 zeigt die im Alter differenziell am stärksten regulierten GO-Terme. Hier erfolgt eine Unterteilung in die Kategorien „Biologischer Prozess“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“. Tabelle 3.3 präsentiert den Einfluss oral supplementierten Nitrats im höheren Lebensalter mit den jeweils differenziell regulierten GO-Termen. Es wird die gleiche Einteilung wie in Tabelle 3.2 verwendet. Abb. 3.10 und Abb. 3.11 stellen die Zuordnung der differenziell exprimierten Gene zu den jeweiligen Signalwegen dar. Für die Datenanalyse wurden drei verschiedene Datenbanken genutzt („KEGG“, „PANTHER“ und „BIOCARTA“). Tab. 3.2 markiert die altersabhängig differenziell regulierten Gene (YC vs. OC), während in Tab. 3.3 die durch eine Supplementierung von Nitrat bei alten Mäusen differenziell regulierten Signalwege dargestellt sind (OC vs. ON). Exemplarisch sieht man in Tab. 3.4 und Abb. 3.12 eine nähere Betrachtung des Signalwegs „Calcium signaling pathways“. Sowohl altersabhängig als auch durch eine orale Supplementierung ausgelöst gehört dieser zu den am stärksten regulierten Signalwegen (YC vs. OC, 15 differenziell regulierte Gene, 4 herunter reguliert und 11 hoch reguliert; OC vs. ON, 19 differenziell regulierte Gene, 7 herunter reguliert, 12 hoch reguliert). Ebenfalls aufgeführt ist in Tab. 3.5 und Abb. 3.13 der Signalweg „TGF-Beta signaling pathway“, der sowohl durch Alter als auch durch eine Supplementierung mit Nitrat differenziell exprimierte Gene aufwies (YC vs. OC, 12 differenziell exprimierte Gene, 1 herunter reguliert, 11 hoch reguliert; OC vs. ON, 5 differenziell exprimierte Gene, 1 herunter reguliert, 4 hoch reguliert). Bis auf eine Isoform des TGF-Beta-Rezeptors waren alle kodierenden Gene des Signalwegs im Alter vermehrt exprimiert. Eine zusätzliche Gabe von Nitrat bewirkte fünf differenziell exprimierte Gene im Signalweg, wobei keine Übereinstimmung mit altersabhängig differenziell exprimierten Genen vorlag. Es handelte sich jedoch dabei zumeist um Gene, die lediglich für andere Isoformen kodieren und daher ähnliche Funktionen aufweisen könnten. Allein die Genexpression von Activin A Rezeptors Typ 1C (ACVR1C) konnte durch die Supplementierung von Nitrat im Alter reduziert werden. Die Stellung des Genprodukts im Signalweg ist in der jeweiligen Abbildung illustriert. Die Ergebnisse weisen demnach einen Einfluss von höherem Lebensalter und oraler



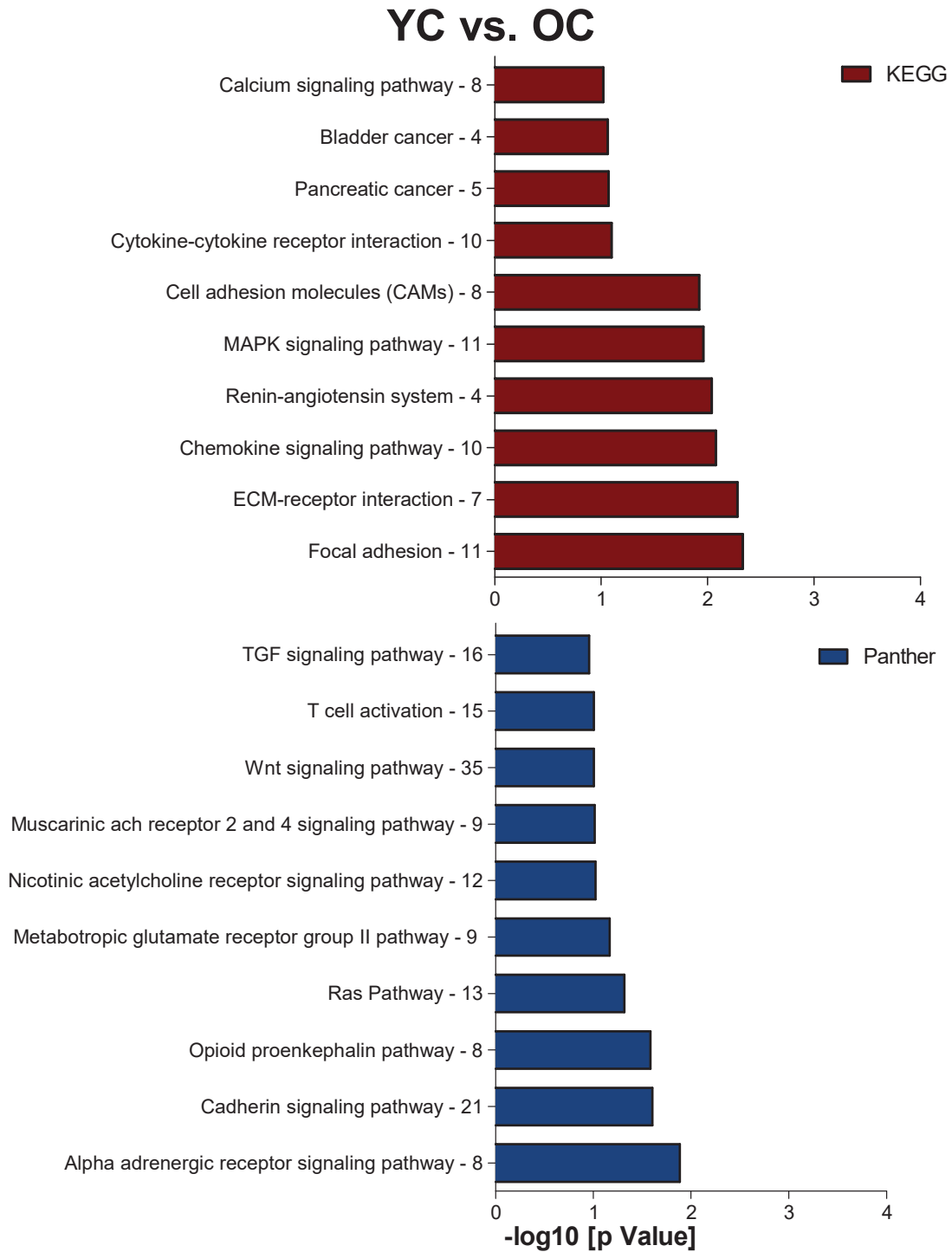
Supplementierung von Nitrat auf teilweise gleiche Signalwege aus, die eine gegenseitige Regulation darstellen könnten.

**Tabelle 3.2: Altersabhängig differentiell regulierte GO-Terme in der Aorta junger und alter Mäuse (YC vs. OC), unterteilt in die Kategorien „Biologischer Prozess“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“.** Die GO-Terme sind nach dem Fisher's exact test mit den am stärksten beeinflussten Termen beginnend absteigend geordnet (-Log [p-Wert]). Differentiell exprimierte Gene mit einem fold change >1,2 und einem p<0,05 wurden in die Analyse einbezogen, FDR="False discovery rate", YC=junge Mäuse (Kontrolle), OC=alte Mäuse (Kontrolle). Tabelle entsprechend DAVID Bioinformatics Software.<sup>133, 134</sup> Tabelle modifiziert nach Rammos et al..<sup>132</sup>

YC vs. OC			
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Biologischer Prozess</b>			
cell adhesion	35	8,49	0,00
biological adhesion	35	8,47	0,00
regulation of cell growth	10	3,44	0,60
regulation of morphogenesis of a branching structure	6	3,17	1,10
multicellular organismal development	69	2,82	2,60
response to wounding	18	2,80	2,60
regulation of multicellular organismal process	29	2,54	4,80
cell-cell adhesion	14	2,52	5,10
extracellular structure organization	11	2,49	5,40
regulation of neurotransmitter secretion	5	2,43	6,20
positive regulation of cell division	6	2,40	6,70
regulation of neurotransmitter transport	5	2,26	9,10
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Zelluläre Komponente</b>			
extracellular region	74	11,24	0,00
extracellular region part	36	5,25	0,01
extracellular matrix	18	3,30	0,64
proteinaceous extracellular matrix	17	2,96	1,40
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Molekulare Funktion</b>			
calcium ion binding	41	6,74	0,00
pattern binding	15	6,11	0,00
polysaccharide binding	15	6,11	0,00
glycosaminoglycan binding	14	5,85	0,00
heparin binding	10	3,74	0,26
carbohydrate binding	19	3,72	0,27
growth factor activity	11	2,62	3,40
carboxypeptidase activity	6	2,42	5,40
binding	231	2,31	6,80
protein binding	133	2,16	9,70

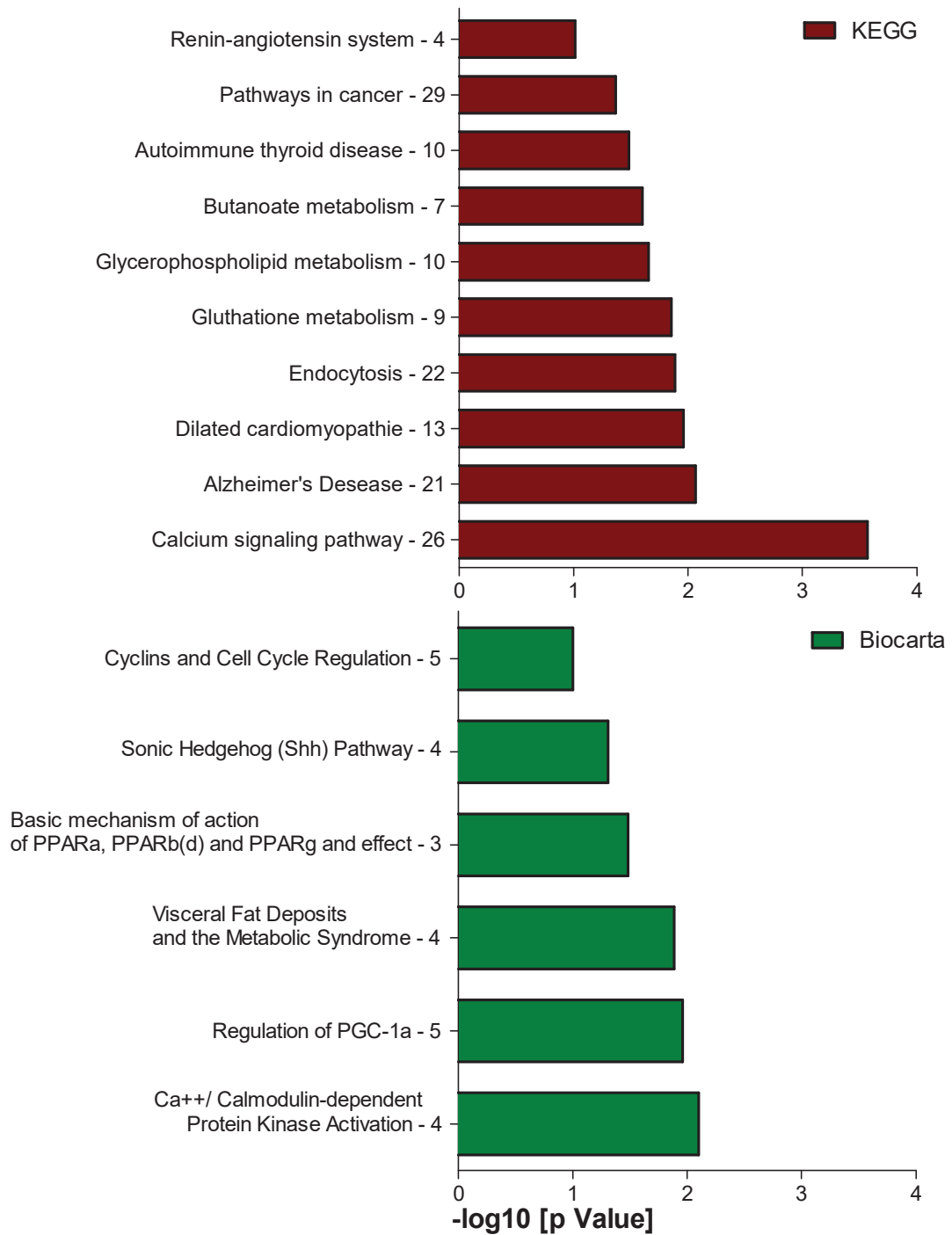
**Tabelle 3.3: Durch eine Supplementierung von Nitrat differentiell regulierte GO-Terme in der Aorta alter Mäuse (OC vs. ON), unterteilt in die Kategorien „Biologischer Prozess“, „Zelluläre Komponente“ und „Molekulare Funktion“.** Die GO-Terme sind nach dem Fisher's exact test (-Log [p-Wert]) mit den am stärksten beeinflussten Termen beginnend absteigend geordnet (-Log [p-Wert]). Differentiell exprimierte Gene mit einem fold change >1,2 und einem p<0,05 wurden in die Analyse einbezogen, FDR=„False discovery rate“ OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat). Tabelle entsprechend DAVID Bioinformatics Software.<sup>133,134</sup>

OC vs. ON			
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Biologischer Prozess</b>			
brown fat cell differentiation	15	7,36	0,00
fat cell differentiation	16	3,85	0,24
oxidation reduction	64	2,70	3,50
lipid localization	18	2,55	4,90
signal transduction	136	2,49	5,50
extracellular structure organization	21	2,47	5,80
nucleoside monophosphate metabolic process	11	2,39	7,00
organic acid transport	15	2,36	7,60
carboxylic acid transport	15	2,36	7,60
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Zelluläre Komponente</b>			
integral to membrane	329	6,33	0,00
membrane part	420	6,30	0,00
membrane	460	6,16	0,00
intrinsic to membrane	340	6,05	0,00
extracellular region	112	4,28	0,07
immunoglobulin complex	6	3,60	0,35
extracellular region part	62	3,36	0,62
plasma membrane	196	3,26	0,77
mitochondrion	128	2,60	3,40
MHC class I protein complex	8	2,40	5,50
intrinsic to plasma membrane	40	2,40	5,50
extracellular space	39	2,28	7,00
integral to plasma membrane	37	2,15	9,40
GO-Term	Anzahl Gene	-log(p-Wert)	FDR
<b>Molekulare Funktion</b>			
antigen binding	19	11,80	0,00
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor	9	3,09	1,30
transmembrane receptor activity	60	3,08	1,30
oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors	10	2,92	1,90
oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	11	2,40	6,10



**Abb. 3.10: Analyse der altersabhängig (YC vs. OC) am stärksten beeinflussten Signalwege in der Aorta.** Dargestellt sind Signalwege aus den Datenbanken „KEGG“ (rot) und „Panther“ (blau), YC=junge Mäuse (Kontrolle), OC=alte Mäuse (Kontrolle). Abbildung modifiziert nach Rammos et al.<sup>132</sup>

## OC vs. ON

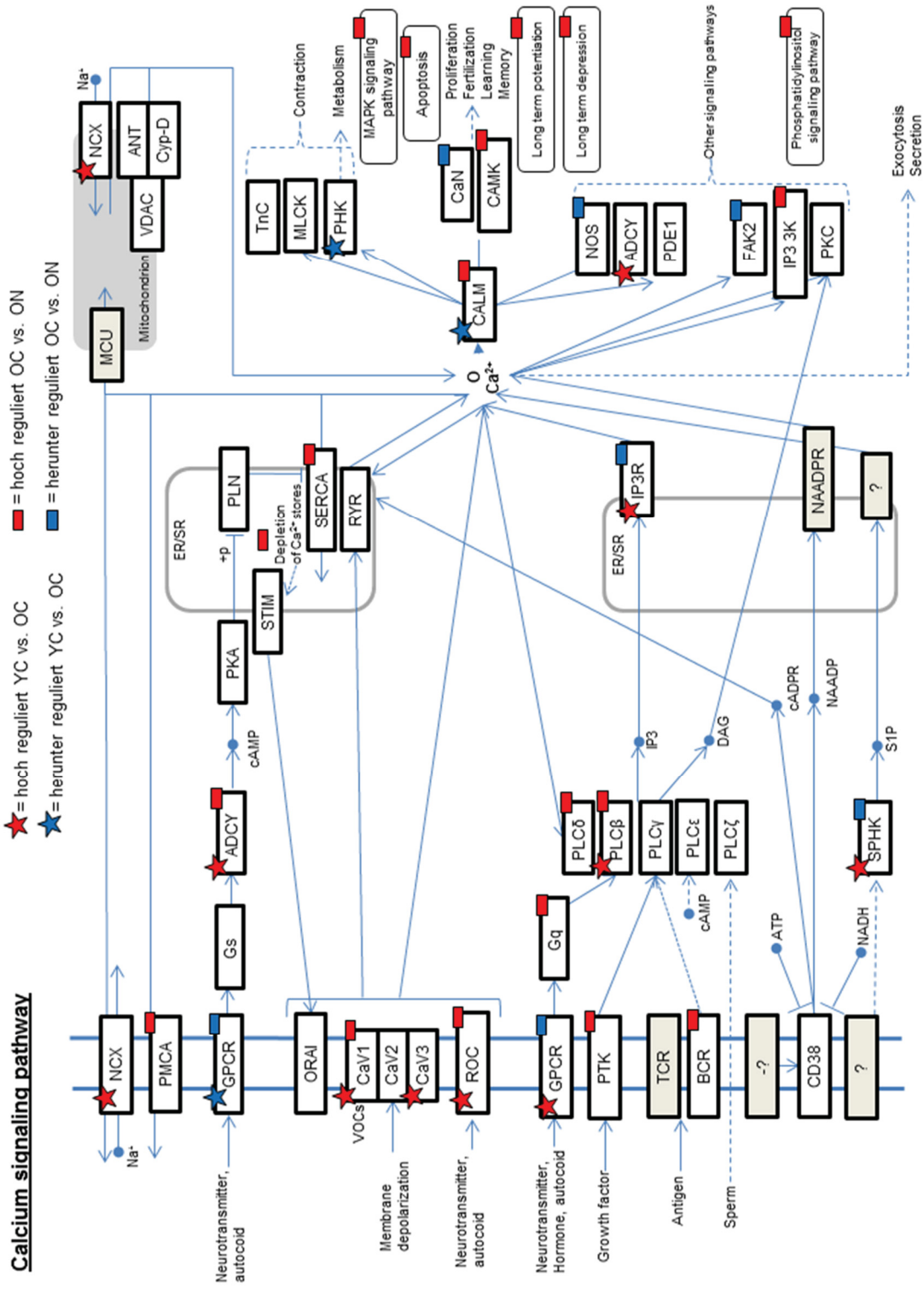


**Abb. 3.11: Analyse der durch eine Supplementierung von Nitrat bei alten Mäusen (OC vs. ON) am stärksten beeinflussten Signalwege in der Aorta.** Dargestellt sind Signalwege aus den Datenbanken „KEGG“ (rot) und „Biocarta“ (grün), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat).

**Tabelle 3.4: Differentiell exprimierte Gene im Signalweg „Calcium signaling pathway“.**

Tabelle entsprechend DAVID Bioinformatics Software.<sup>133,134</sup>

YC vs. OC	Gensymbol	p-Wert	Fold Change	Regulation
adenosine A2a receptor	Adora2a	0,403	1,4	herunter
adenosine A2b receptor	Adora2b	0,587	1,4	herunter
adenylate cyclase 1	Adcy1	0,038	2,5	hoch
adrenergic receptor, alpha 1b	Adra1b	0,573	1,2	hoch
angiotensin II receptor, type 1b	Agtr1b	0,428	1,7	hoch
calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1S subunit	Cacna1s	0,485	1,4	hoch
calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	Cacna1g	0,534	1,4	hoch
calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	Cacna1h	0,334	1,6	hoch
calmodulin-like 3	Calml3	0,472	2,7	herunter
oxytocin receptor	Oxtr	0,574	1,5	hoch
phosphorylase kinase gamma 1	Phkg1	0,481	1,2	herunter
prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1)	Ptger1	0,257	1,4	hoch
purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7	P2rx7	0,552	1,8	hoch
solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 3	Slc8a3	0,230	1,4	hoch
sphingosine kinase 1	Sphk1	0,519	1,4	hoch
OC vs. ON				
ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, plasma membrane 2	Atp2b2	0,021	1,3	hoch
PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta	Ptk2b	0,014	1,2	herunter
adenylate cyclase 7	Adcy7	0,001	1,4	hoch
adrenergic receptor, alpha 1a	Adra1a	0,018	1,5	herunter
adrenergic receptor, beta 3	Adrb3	0,006	1,9	herunter
calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	Cacna1d	0,016	1,4	hoch
calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	Camk4	0,020	1,4	hoch
coagulation factor II (thrombin) receptor	F2r	0,001	1,3	hoch
guanine nucleotide binding protein, alpha 14	Gna14	0,046	1,6	hoch
inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2	Itpr2	0,001	1,3	herunter
nitric oxide synthase 2, inducible	Nos2	0,021	1,2	herunter
phospholipase C, beta 4	Plcb4	0,008	1,4	hoch
phospholipase C, delta 1	Plcd1	0,000	1,2	hoch
platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	Pdgfrb	0,009	1,2	hoch
prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1)	Ptger1	0,029	1,2	hoch
protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma isoform	Ppp3cc	0,039	1,3	herunter
purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3	P2rx3	0,040	1,3	hoch
ryanodine receptor 2, cardiac	Ryr2	0,010	1,4	hoch
sphingosine kinase 2	Sphk2	0,043	1,2	herunter



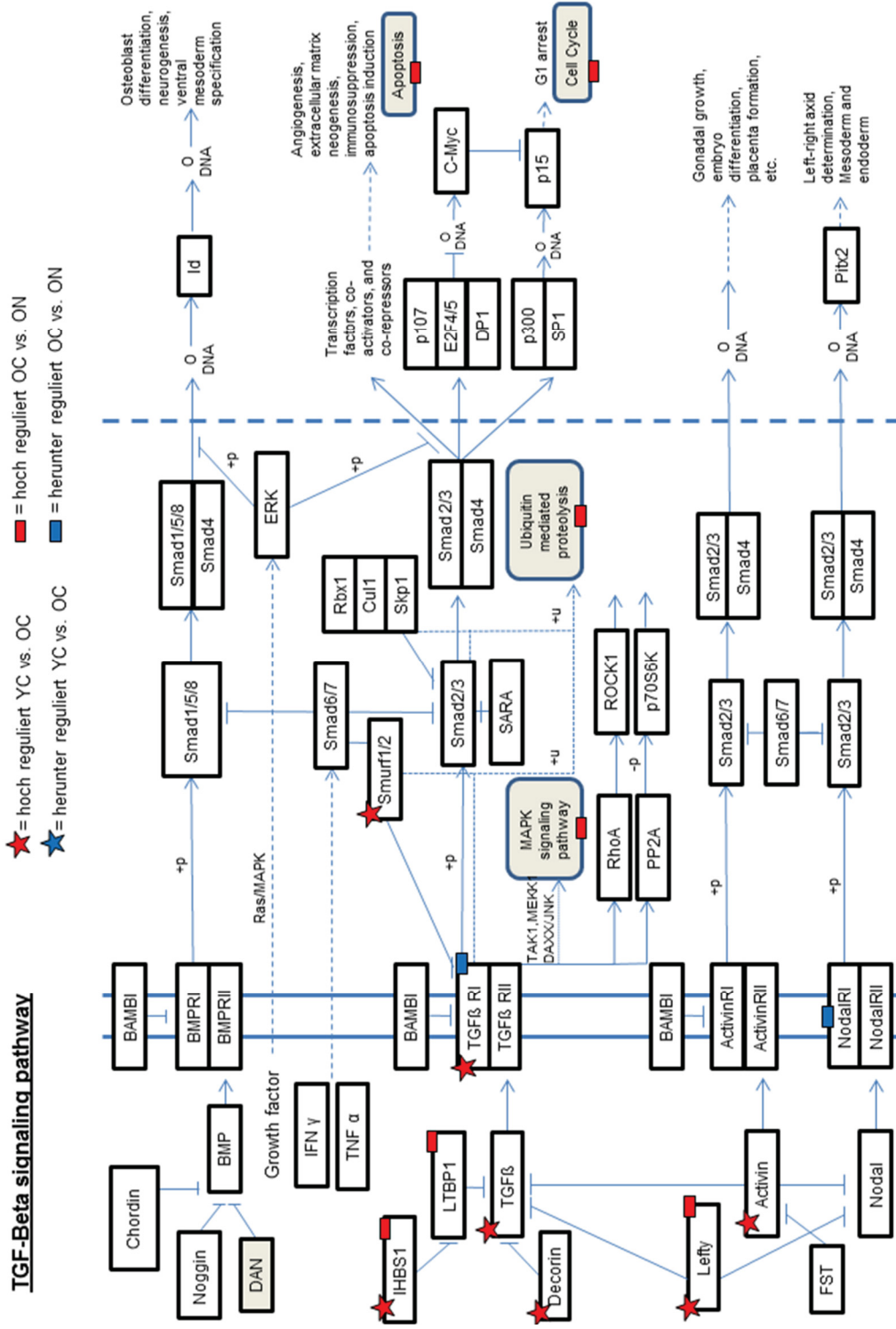
**Abbildung 3.12: Differenziell exprimierte Gene im Singalweg „Calcium signaling pathway“.** Detaillierte Darstellung des Signalwegs. Rote Sterne=hoch reguliert (YC vs. OC), blaue Sterne=herunter reguliert (YC vs. OC), rote Rechtecke=hoch reguliert (OC vs. ON), blaue Rechtecke=herunter reguliert (OC vs. ON), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat). Abbildung entsprechend DAVID Bioinformatics Software. <sup>133, 134</sup>

**Tabelle 3.5: Differentiell exprimierte Gene im Signalweg „TGF-Beta signaling pathway“.**  
Tabelle entsprechend DAVID Bioinformatics Software.<sup>133, 134</sup> Tabelle modifiziert nach  
Ramos et al..<sup>132</sup>

<b>YC vs. OC</b>	<b>Gensymbol</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Fold Change</b>	<b>Regulation</b>
activin A receptor, type 1B	Acvr1B	0.40	1,5	hoch
cartilage oligomeric matrix protein	comP	0.12	1,7	hoch
Decorin	Dcn	0.59	1,2	hoch
inhibin beta-A	Inhba	0.48	1,4	hoch
left-right determination factor 2	Lefty2	0.57	1,2	hoch
SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	Smurf1	0.53	1,2	hoch
thrombospondin 2	thbs2	0.29	1,3	hoch
transforming growth factor, beta 1	Tgfb1	0.25	1,3	hoch
transforming growth factor, beta 2	Tgfb2	0.46	1,5	hoch
transforming growth factor, beta 3	Tgfb3	0.59	1,3	hoch
transforming growth factor, beta receptor I	Tgfr1	0.42	1,3	hoch
transforming growth factor, beta receptor III	Tgfr3	0.33	1,2	herunter
<b>OC vs. ON</b>				
activin A receptor, type IC	ACVR1C	0,003	1,5	herunter
left right determination factor 1	LEFTY1	0,001	1,2	hoch
thrombospondin 3	Thbs3	0,017	1,2	hoch
Cartilage intermediate layer protein 1	CILP	0,047	1,4	hoch
latent transforming growth factor beta binding protein 4	LTBP4	0,006	1,2	hoch



### TGF-Beta signaling pathway



**Abbildung 3.13: Differenziell exprimierte Gene im Singalweg „TGF-Beta signaling pathway“.** Detaillierte Darstellung des Signalwegs. Rote Sterne=hoch reguliert (YC vs. OC), blaue Sterne=herunter reguliert (OC vs. OC), rote Rechtecke=hoch reguliert (OC vs. ON), blaue Rechtecke=herunter reguliert (OC vs. ON), YC=junge Mäuse (Kontrolle), YN=junge Mäuse (Nitrat), OC=alte Mäuse (Kontrolle), ON=alte Mäuse (Nitrat). Abbildung entsprechend DAVID Bioinformatics Software.<sup>133, 134</sup> Abbildung modifiziert nach Rammos et al.<sup>132</sup>

### 3.2.8 Genexpression mittels RT-PCR

Im Anschluss an die Genexpressionsanalyse im Microarray wurde die Expression von zwei Genen aus dem „TGF-Beta signaling pathway“ (Lefty 1 und Tgfb1) zusätzlich mittels RT-PCR quantifiziert, um die differentielle Expression genauer zu analysieren. Dabei konnte eine Vervielfältigung der mRNA von Lefty1 um den Faktor 2,02 in den Aorten alter gegenüber denen junger Tieren gemessen werden. Die Genexpression von Tgfb1 zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Eine Applikation von Nitrat bei alten Tieren bewirkte hingegen eine Erhöhung der Expression der mRNA von Tgfb1 um den Faktor 2,73, während sich keine Unterschiede in der Expression von Lefty 1 zeigte (\*p<0,05).

## 4 Diskussion

Hohes Lebensalter markiert einen der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, welche die häufigsten Todesursachen in modernen Gesellschaften darstellen.<sup>83</sup> Eine im Alter auftretende vaskuläre Dysfunktion wird als Prädisposition hierfür angesehen, wobei ein Zusammenhang derselben mit einer verringerten Bioverfügbarkeit von NO<sup>•</sup> angenommen wird.<sup>2, 84</sup> Anorganisches Nitrat ist ein Produkt im NO-Stoffwechsel und kann im Körper über Nitrit zu NO<sup>•</sup> reduziert werden.<sup>6</sup> Ziele der vorliegenden Arbeit waren es, mithilfe eines tierexperimentellen Ansatzes zunächst den Einfluss einer Ernährung mit unterschiedlichem Nitrat- und Nitritgehalt auf die Spiegel im Plasma darzustellen. Zudem sollte der Einfluss einer chronischen oralen Supplementierung von Nitrat auf die altersabhängigen Gefäßveränderungen funktionell und auf der Ebene der Genexpression charakterisiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Eine orale Supplementierung mit Nitrat über das Trinkwasser kann die Plasmaspiegel von Nitrat bei alten und jungen Mäusen und dadurch ebenfalls den endogenen NO-Pool erhöhen. Bei alten Tieren bewirkt die zusätzliche Zufuhr von Nitrat zusätzlich einen signifikanten Anstieg des Nitrits im Plasma.
2. Altersabhängige Veränderungen der arteriellen Gefäße lassen sich funktionell mit der Messung der Pulswellengeschwindigkeit und des Blutdrucks sowie durch Untersuchungen an isolierten Aortenringen nachweisen. Eine exogene Zufuhr von Nitrat bewirkt eine Verbesserung der Gefäßfunktion im Alter
3. Die Analyse der Genexpression in den Aorten alter Mäuse im Vergleich zu der in denen junger Mäuse zeigt Hinweise, welche vaskuläre Alterungsprozesse erklären könnten. Eine Supplementierung von Nitrat wirkt ebenfalls modulierend auf die Genexpression im Alter. Zudem zeigt sie zum Teil gegensinnige Regulationen in bestimmten Signalwegen, welche einen protektiven Effekt erklären könnten.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse in Kontext mit der gängigen Literatur diskutiert. Zunächst soll dabei die Bedeutung oral aufgenommenen Nitrats im NO-

Stoffwechsel beleuchtet werden. Anschließend wird auf die funktionellen und genetischen Veränderungen der Gefäße im Alter und den Einfluss der exogenen Supplementierung von Nitrat eingegangen werden. Im letzten Teil der Diskussion sollen mögliche Wirkmechanismen des über das Trinkwasser zugeführten Nitrats dargestellt und ein Ausblick auf zukünftige Forschungsschwerpunkte gegeben werden.

#### **4.1 Der Einfluss verschiedener Trinkwasser mit unterschiedlichem Gehalt an Nitrat und Nitrit auf die Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma junger Mäuse**

Der Anteil des über die Nahrung aufgenommenen Nitrats und Nitrits zeigt unmittelbare Auswirkungen auf die Konzentration im Plasma und somit auf den Stoffwechsel.<sup>6, 60</sup> In zahlreichen vorherigen Humanstudien wurden diesbezüglich vor allem die akuten Effekte einer hoch dosierten Einnahme von Nitrat in verschiedener Darreichungsform untersucht; die Interventionsgruppen erhielten dabei Dosen von zwischen 3 mmol und 22,5 mmol.<sup>85-87</sup> Studien, die eine chronische Einnahme von Nitrat untersuchten, beobachteten die Auswirkungen einer nitratreichen Nahrung über einen Zeitraum von 3-15 Tagen.<sup>60, 88, 89</sup> Hier zeigten sich positive Effekte bei Dosen von zwischen 3 mmol und 18 mmol, die in Form von in Wasser gelösten Nitratsalzen<sup>60</sup>, aber auch durch die Einnahme von nitratreichem Gemüse verabreicht wurden<sup>88, 89</sup>. Damit wurde die von der WHO empfohlene maximale Tagesdosis von 3,7 mg/kgKG, respektive 0,06 mmol/kgKG, in den meisten dieser Studien überschritten.<sup>61</sup>

Mit dem vorliegenden Studiendesign sollte zunächst überprüft werden, ob eine chronische Gabe von hoch dosiertem Nitrat im Mausmodell ebenfalls eine Erhöhung der Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma hervorrufen würde. Dazu wurde Nitrat in der Konzentration 1 g/l in Leitungswasser gelöst und den Tieren über das Trinkwasser zugeführt. Die Menge an aufgenommenem Nitrat entsprach dabei pro Maus ca. 150 µmol, was auf den Menschen bezogen vergleichbar mit einer nitratreichen Ernährung ist.<sup>90</sup> Ein signifikanter Anstieg des Nitrats im Plasma konnte nachgewiesen werden. Innerhalb der Kontrollgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede der Spiegel von Nitrat oder Nitrit im Plasma festgestellt. Auch im Fall der Gruppe „Nüchtern“ zeigten sich im Vergleich zu den anderen Kontrollgruppen

keine signifikanten Unterschiede. Vor Beginn der Vorstudie wurde der Gehalt von Nitrat und Nitrit in drei verschiedenen Kontrollwassern bestimmt (vgl. Tabelle 3.1). Hier zeigten sich Schwankungen von über 150  $\mu\text{M}$ , wobei im Leitungswasser die höchsten Werte detektiert wurden. In der Vorstudie wurde die Konzentration von Nitrat von vier Proben Leitungswasser gemessen, welche einen mittleren Wert von  $223 \pm 1,77 \mu\text{M/l}$  aufwies und damit eine sehr viel geringere Schwankungsbreite zeigte, als zwischen den Kontrollwassern detektiert wurde. Aus diesem Grund erhielten in der Hauptstudie die Kontrolltiere Leitungswasser, das Wasser der Interventionsgruppen wurde mit dem gleichen Leitungswasser angemischt. Im Plasma zeigen sich die maximalen Spiegel von Nitrat ca. 15-30 min nach der oralen Aufnahme; die Halbwertszeit im Blut beträgt ca. 6 Stunden.<sup>91</sup> In der Gruppe „Nüchtern“ wurde die Aufnahme von Trinkwasser 6 Stunden vor der Entnahme der Proben unterbunden. Diese Gruppe zeigte jedoch bezüglich der Spiegel von Nitrat im Plasma keine Unterschiede im Vergleich zu den anderen Gruppen der Vorstudie. Daher konnte ein Akuteffekt im Sinne verringerter Spiegel von Nitrat durch eine kurzzeitig verringerte Aufnahme des Trinkwassers vernachlässigt werden. Zusammenfassend hat die Vorstudie bewiesen, dass eine Modifikation im 150  $\mu\text{M}$ -Bereich keine signifikanten Änderungen der  $\text{NO}_x$ -Spiegel nach zwei Wochen bewirken und dass Akuteffekte weitgehend ausgeschlossen werden können. Daher wurde in der Hauptstudie auf industriell verarbeitetes Wasser verzichtet und gewöhnliches Leitungswasser verwendet.

#### **4.2 Der Einfluss einer chronischen Supplementierung von anorganischem Nitrat auf den NO-Pool**

Die Spiegel der NO-Spezies im Plasma werden sowohl durch endogene Produktion als auch durch exogene Faktoren wie die Ernährung beeinflusst.<sup>68</sup> Nitrit entstammt dabei zum Großteil der endogenen Produktion über oxidiertes  $\text{NO}^{\cdot}$ , welches von der eNOS gebildet wird. Die Modulation der Konzentrationen von anorganischem Nitrat im Plasma hängt dagegen weit stärker von der exogenen Zufuhr ab.<sup>61, 92</sup> Durch verschiedene Risikofaktoren, aber auch unabhängig davon im höheren Lebensalter entwickelt sich eine endotheliale Dysfunktion mit Veränderungen der Gefäßhomöostase und Verminderung der Bioverfügbarkeit von  $\text{NO}^{\cdot}$ .<sup>2, 93, 94</sup> Unter

anderem kommt es dabei zur Einschränkung der Funktion der eNOS<sup>23</sup>, welche über die Synthese von NO<sup>•</sup> vor allem die Spiegel von Nitrit im Plasma beeinflusst.<sup>95</sup> In der vorliegenden Studie wurden Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma junger und alter Mäuse nach einer achtwöchigen Supplementierung von oralem Nitrat über das Trinkwasser in der Konzentration 1 g/l bestimmt. Die vorliegenden Daten zeigten keinen signifikanten Unterschied der basalen Konzentrationen von Nitrat und Nitrit im Plasma zwischen der Gruppe der jungen und alten Kontrolltiere auf. Es konnte lediglich eine Tendenz zu leicht reduzierten Spiegeln von Nitrat im Plasma in der Gruppe der alten Tiere verzeichnet werden. Eine dem entsprechende Beobachtung machten Lauer et al., die ebenfalls feststellten, dass die Spiegel alter und junger Probanden einander glichen.<sup>30</sup> Sindler et al. demonstrierten hingegen einen um 46 % geringeren Anteil des plasmatischen Nitrits bei alten Mäusen im Vergleich zu einer jungen Kontrollgruppe.<sup>96</sup> Dieses Ergebnis wurde über die verminderte endogene Produktion von NO<sup>•</sup> im Zuge der endothelialen Dysfunktion erklärt. Gleiche Tendenzen zeigten Arbeiten von Bryan et al.. In diesen konnten im Vergleich zu den Kontrollgruppen niedrigere Spiegel von Nitrit im Plasma von eNOS-Knockout-Mäusen detektiert werden, einem transgenen Mausstamm, welcher keine Gene für die eNOS exprimiert.<sup>97</sup> Stokes et al. induzierten über eine cholesterinreiche Ernährung eine endotheliale Dysfunktion. Sie konnten bei solchen Tieren ebenfalls erniedrigte Spiegel des plasmatischen Nitrits demonstrieren.<sup>67</sup> Die vergleichbaren Kontrollgruppen in den drei genannten Studien wiesen jedoch geringere Werte von Nitrit im Plasma auf als die in der vorliegenden Arbeit. So lagen die basalen Plasmakonzentrationen von Nitrit in Studien von Sindler et al. und Bryan et al. unter 0,5 µM, während Stokes et al. Werte von unter 0,8 µM nachweisen konnten.<sup>67, 96, 97</sup> Mit einem Wert von  $1,3 \pm 0,27$  µM Nitrit im Plasma zeigte die junge Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit einen deutlich höheren Wert. Auch die Gruppe der alten Kontrolltiere war hier mit  $0,8 \pm 0,53$  µM im Vergleich zu den Gruppen mit postulierter verringerter NO-Produktion der anderen Studien erhöht. Diese Unterschiede können in einem unterschiedlichen Gehalt von Nitrat und Nitrit der Kontrollfutter begründet liegen. Möglicherweise nehmen demnach bei entsprechender Dauer einer oralen Aufnahme von Nitrat bereits geringe Schwankungen durch verschiedene Standardfutter und Trinkwasser einen Einfluss auf die Spiegel im Plasma. Unterstützt wird diese These auch durch die Unterschiede zwischen den Konzentrationen im Plasma der Kontrollgruppe in der

Vorstudie, die Leitungswasser erhielt (LW), und denen im Plasma der jungen Kontrollgruppe im Hauptversuch (YC) nach acht Wochen. Beide Gruppen erhielten das gleiche Wasser und Futter. Trotzdem zeigten sich bezüglich der Spiegel des plasmatischen Nitrits klare Unterschiede ( $\text{NO}_2$ : LW  $0,7 \pm 0,16 \mu\text{M}$ ; YC  $1,3 \pm 0,27 \mu\text{M}$ ). Es ist nicht auszuschließen, dass diese Veränderungen auf den kumulativen Effekt des Standardfutters und Leitungswassers in der um sechs Wochen längeren in der Hauptstudie zurückzuführen sind. Um diese Frage zu klären, hätten vorab Untersuchungen der basalen Spiegel unter kompletter Depletion von Nitrat und Nitrit erfolgen und auch eine Gruppe von alten Tieren in diese Kontrolle eingeschlossen werden müssen. So hätte der Einfluss der Kontrollfutter und Wasser auf junge und alte Tiere weitgehend ausgeschlossen werden können.

Des Weiteren zeigen die ermittelten Daten, dass der Einfluss oral aufgenommenen Nitrats vor allem auf die stärker endogen regulierten Werte von Nitrit im Plasma bei alten Tieren höher ist als bei jungen Tieren. Sowohl in der Vorstudie als auch in der Hauptstudie konnten die plasmatischen Spiegel von Nitrat durch eine interventionelle orale Supplementierung angehoben werden, wobei nur in der Gruppe der alten Tiere eine signifikante Änderung der Werte von Nitrit verzeichnet werden konnte. Auch die Daten der Studie von Sindler et al. zeigten bei alten Tieren einen stärkeren Effekt einer Supplementierung mit Nitrat auf die Spiegel von Nitrit im Plasma als bei jungen Tieren.<sup>96</sup> Dies könnte möglicherweise in einen Zusammenhang mit einer Veränderung der Aktivität von körpereigenen Nitratreduktasen gestellt werden. Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist ein in eukaryotischen Zellen vorhandenes Enzym. Unter Normoxämie bewirkt es eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit, während es vor allem unter Hypoxämie eine Reduktion von Nitrit zu  $\text{NO}^{\cdot}$  ermöglicht. Des Weiteren stellt es auch selbst eine Quelle oxidativen Stresses dar.<sup>98 99</sup> In einer Studie von Newaz et al. konnten bei gealterten Ratten eine erhöhte Aktivität und Expression des Enzyms in der Aorta festgestellt werden. Dies wurde in Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration von ROS und einer konsekutiven Erhöhung des systolischen Blutdrucks gebracht.<sup>99</sup> Andererseits konnte eine Arbeit von Ghos et al. zeigen, dass durch eine Gabe von Nitrat bei hypertensiven Probanden eine weitaus stärkere Blutdrucksenkung als bei normotensiven Probanden erreicht wurde. Mechanistisch wurde eine Steigerung der Aktivität der XOR der Erythrozyten als Grund für eine durch orale Supplementierung hervorgerufene Blutdrucksenkung vermutet. In

einem Vorversuch mit hypertensiven Ratten konnten Gosh et al. über eine 1,5-fache Erhöhung der Spiegel von Nitrit im Blut eine Reduktion des Blutdrucks bewirken, während kein Effekt bei normotensiven Versuchstieren gezeigt werden konnte. Der aufgetretene Effekt wurde durch Inhibition der XOR mittels Allopurinol induziert, sodass eine Mehraktivität der XOR zwar über die Bildung von ROS eine vaskuläre Dysfunktion begünstigt, jedoch darüber hinaus eine Intervention durch orale Supplementierung mit Nitrat und Nitrit effektiver wird. Im vorliegenden Versuchsaufbau zeigten die alten Tiere im Vergleich zu Jungtieren ebenfalls deutlich erhöhte Blutdruckwerte. Zwar konnte keine erhöhte Genexpression der XOR in den Zellen der Aortenwand festgestellt werden. Eine Steigerung der Aktivität in den Erythrozyten, so wie Gosh et al. sie beschreiben, und so auch ein stärkerer Anstieg des Nitrits im Plasma durch eine Supplementierung von Nitrat wären jedoch durchaus denkbar.

Wie im vorliegenden Versuch geschieht die Konversion von zugeführtem Nitrat zu Nitrit bei einer oralen Aufnahme von Nitrat zum Teil über den enterosalivären Kreislauf, der eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit durch mundständige Bakterien beinhaltet.<sup>6</sup> In einer Studie zeigten neugeborene Kinder bis zum Säuglingsalter von 2 Monaten eine deutlich verringerte Aktivität der oralen Nitratreduktase als Erwachsene mit einem mikrobiologisch nachgewiesenen gleichen Bakterienspektrum der Mundhöhle.<sup>100</sup> Bei Patienten mit gastroösophagealen Reflux konnte hingegen eine erhöhte Aktivität der Nitratreduktase nachgewiesen werden.<sup>101</sup> Altersabhängig ist daher über eine Vermehrung von mundständigen Bakterien eine erhöhte Aktivität der Nitratreduktase denkbar, welche zu einem stärkeren plasmatischen Anstieg von Nitrit nach Ingestion von Nitrat führen würde. Um dies zu verifizieren, muss in zukünftigen Versuchen eine quantitative sowie qualitative Bestimmung des Keimspektrums bei alten und jungen Tieren vor einer chronischen Gabe von Nitrat durchgeführt werden. Um den Einfluss körpereigener Nitratreduktasen feststellen zu können, sollten Versuchsreihen mit kompletter Keimdepletion durch eine Mundspülung erfolgen. Bei chronischer Supplementierung von Nitrat könnte damit der Stellenwert des enterosalivären Kreislaufs für die Effekte einer oralen Supplementierung von Nitrat bzw. die Bedeutung der körpereigenen Regulation präziser dargestellt werden.



### 4.3 Der Einfluss einer chronischen Supplementierung von Nitrat auf die altersabhängige endotheliale Dysfunktion

Eine Reihe von kardiovaskulären Risikofaktoren, wie zum Beispiel hohes Lebensalter, sind mit einer Einschränkung der endothelialen Funktion assoziiert. Diese kann für die Entwicklung von Arteriosklerose prädisponieren.<sup>80, 93</sup> Die flussmedierte Dilatation (FMD) oder die chemisch vermittelte endothelabhängige Dilatation durch die Gabe von ACh *in vivo* bzw. *ex vivo* am isolierten Gefäß stellen geeignete Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der endothelialen Funktion dar.<sup>1, 28 96</sup> In der vorliegenden Arbeit wurden die EDD und EID an isolierten Mäuseaorten bestimmt. Die maximal erreichbare Dilatation nach ACh-Gabe war dabei mit  $60 \pm 2$  % bei alten Tieren signifikant niedriger als bei jungen Tieren, bei denen sie  $78 \pm 3$  % betrug. Sindler et al. zeigten in ihrer Studie ähnliche reduzierte EDD bei 26-28 Monate alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen.<sup>96, 102</sup> Außerdem wiesen sie nach, dass die maximale Dilatation durch ACh nach einer Gabe des NOS-Inhibitors N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) bei jungen Tieren stärker als bei alten Tieren gesenkt wurde. Dieses Ergebnis verdeutlicht einen Verlust von bioverfügbarem NO<sup>•</sup> durch eine verringerte Aktivität der eNOS im Alter.

Gleichwohl konnte in den in dieser Arbeit vorliegenden Daten kein Unterschied innerhalb der verschiedenen Gruppen in der EID festgestellt werden. Die Gabe des exogenen NO-Donors SNP bewirkte sowohl in den Kontroll- als auch in den behandelten Gruppen eine gleichartige Dilatation. Damit konnte ein Verlust der Sensitivität bzw. ein Funktionsverlust der glatten Muskelzellen der arteriellen Gefäße im Alter ausgeschlossen werden.<sup>96</sup> Oral supplementiertes Nitrat löste in der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der endothelialen Funktion aus und konnte die maximale Dilatation nach ACh-Gabe bei der alten Kontrollgruppe nahezu auf Werte der jungen Kontrollgruppe anheben. Bei jungen Mäusen konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen durch eine Gabe von Nitrat festgestellt werden. Sindler et al. zeigten ebenfalls, dass es zu keiner Verbesserung der EDD bei jungen Mäusen kam, nachdem diese über vier Wochen mit Nitritsalzen behandelt worden waren.<sup>96</sup> Die positive Wirkung von Nitrat auf die EDD alter Patienten konnte in einer Humanstudie der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt werden. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung der FMD der Arteria brachialis bei älteren Patienten mit moderatem kardiovaskulärem Risiko, nachdem diese vier Wochen lang zusätzlich

zur Nahrung Nitrat aufnehmen. Die Dosis von 150  $\mu\text{mol/kgKG}$  entsprach dabei durchschnittlich einer Portion Spinat von 300 g und ging mit einer Erhöhung der plasmatischen Spiegel von Nitrat und Nitrit einher.<sup>103</sup> Eine weitere Humanstudie konnte hingegen weder bei jungen noch bei alten Patienten eine akute Verbesserung der EDD nach einmaliger Einnahme von 8 mmol Nitrat aufzeigen, wenngleich es zu einer Erhöhung der  $\text{NO}_x$ -Spiegel sowie zu einer Reduktion des Blutdrucks kam.<sup>104</sup> Versuche an menschlichen Probanden demonstrieren damit ebenfalls, dass eine orale Supplementierung von Nitrat oder Nitritsalzen zwar bei alten Individuen eine Verbesserung der EDD bewirkt, ein Effekt bei jungen jedoch ausbleibt.

Die EID wird durch eine zusätzliche Einnahme von Nitrat nicht beeinflusst, sodass ein Effekt auf die Dilatationsfähigkeit der glatten Muskelzellen und damit eine veränderte Regulation des Gefäßtonus ausgeschlossen werden kann. Folglich scheint die Supplementierung von Nitrat bei alten Mäusen und menschlichen Probanden eine Verbesserung der endogenen NO-Bioverfügbarkeit zu bewirken. Ausgehend von der Theorie, dass der Verlust von  $\text{NO}^{\cdot}$  über die Reaktion mit ROS geschieht, könnte die Erhöhung der Bioverfügbarkeit über die Steigerung der plasmatischen Spiegel von Nitrit also über 4 verschiedene Prinzipien erfolgen.

- (I) Antioxidative Mechanismen könnten hoch reguliert bzw. gesteigert werden.
- (II) Die endogene Produktion von freien Radikalen könnte durch eine Supplementierung von Nitrat reduziert werden.
- (III) Oral aufgenommenes Nitrat kann lediglich über die Erhöhung der Spiegel von Nitrat und Nitrit im Plasma einen Pool für  $\text{NO}^{\cdot}$  bilden. Der Verlust von bioverfügbaren  $\text{NO}^{\cdot}$  durch die Reaktion von selbigen mit freien Radikalen könnte so ausgeglichen und die Gefäßfunktion im Alter verbessert werden.
- (IV) Die endogene Produktion von  $\text{NO}^{\cdot}$  könnte durch eine Supplementierung von Nitrat gesteigert werden.

In vergangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von ROS in den Aorten alter Mäuse höher war als in denen junger Mäuse.<sup>96, 105</sup> Sindler et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass die NADPH-Oxidase als prooxidatives Enzym vermehrt exprimiert wurde, während die Aktivität der SOD reduziert war. Eine Erhöhung von Nitrit im Plasma führte zu einer Abnahme des oxidativen Stresses, wobei die Expression der NADPH-Oxidase vermindert wurde und eine

Steigerung der SOD-Aktivität nachgewiesen werden konnte.<sup>96</sup> Demnach konnte hier eine Steigerung antioxidativer Mechanismen nachgewiesen und die Produktion von ROS erniedrigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten durch eine orale Zufuhr von Nitrat keine Unterschiede in der Genexpression dieser Enzyme dargestellt werden, wobei auch posttranslationale Modifizierungen durch eine Erhöhung des zirkulierenden Nitrits und damit eine Änderung der Enzymfunktion vorstellbar wären.<sup>106</sup>

Ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Steifigkeit der Gefäße und der Reduktion von ROS wurde in der Folgestudie von Sindler et al. herausgestellt. Im Alter kam es zu einer Vermehrung von versteifendem Kollagen, einer Anhäufung von TGF- $\beta$  und einer Reduzierung von Elastin der extrazellulären Matrix. Außerdem konnte eine erhöhte Konzentration von advanced glycation end products (AGEP) in der Gefäßwand festgestellt werden.<sup>105</sup> Diese Verbindungen entstehen über die nichtenzymatische Glykolisierung von Proteinen, welche eine Quervernetzung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix bewirken und dadurch zu einer Zunahme der Steifigkeit führen.<sup>107</sup> *In vitro*-Experimente an isolierten Aortenringen zeigten außerdem, dass eine erhöhte Konzentration von ROS mit der Bildung von AGEPs einherging. Eine kurzzeitige Supplementierung von Nitrit konnte sowohl den oxidativen Stress als auch die Konzentration von ROS in den Aorten alter Mäusen reduzieren.<sup>105</sup> Interessanterweise konnte in einer weiteren Studie jedoch gezeigt werden, dass Nitrit selbst keine antioxidativen Effekte aufweist und so zu keinem direkten Abfangen von ROS führt.<sup>108</sup> Demnach muss es zunächst zu einer Reduzierung zu NO<sup>\*</sup> kommen, um freie ROS zu neutralisieren.<sup>22</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Gesamtkonzentration der RXNOs im Plasma gemessen. Eine orale Zufuhr von Nitrat konnte allerdings nur eine Tendenz zu höheren RXNOs bei alten und jungen Tieren zeigen (vgl. Abb. 3.4). Dagegen wies eine Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe einen deutlichen Anstieg bei einer gleichen Supplementierung nach einem Zeitraum von nur sieben Tagen nach.<sup>90</sup>

Altersabhängig wird die endogene NO-Synthese über die Oxidation des eNOS-Kofaktors BH4 eingeschränkt<sup>23</sup>; in einer anderen Studie konnte jedoch ebenfalls eine im Alter verringerte Expression dieses Enzyms festgestellt werden.<sup>96</sup> Die Erhöhung des endogenen Nitrits konnte keine Steigerung der Expression bei alten Mäusen bewirken. Aerobes Training hingegen kann, möglicherweise über eine erhöhte Scherkraft am Gefäß, die Genexpression der eNOS bei alten

Versuchstieren erhöhen.<sup>96, 109</sup> Die achtwöchige zusätzliche Gabe von Nitrat in der vorliegenden Studie bewirkte ebenfalls keine Veränderung der Genexpression der eNOS, wobei auch die von Sindler et al. beschriebene altersabhängige Reduzierung der Genexpression nicht nachgewiesen wurde. Demnach ergaben sich hier keine Hinweise, dass die Erhöhung des plasmatischen Nitrats und Nitrits eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit über eine erhöhte Expression der eNOS zur Folge hatte.

#### **4.4 Der Einfluss oral supplementierten Nitrats auf die arterielle Steifigkeit im Alter**

Die Versteifung der Gefäße stellt ein typisches Merkmal des Alterns dar und ist gemessen an der PWV ein starker Prädiktor für kardiovaskuläre Pathologien.<sup>2, 110</sup> Die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie ist dabei eng mit der Beschaffenheit der Gefäße verknüpft: Die essentielle Hypertonie tritt vorwiegend vor dem 50. Lebensjahr auf und geht mit einer Erhöhung des systolischen und diastolischen Drucks einher. Charakteristisch für die Versteifung zentraler herznaher Arterien ist die isolierte systolische Hypertonie, die so mit höherem Lebensalter vermehrt auftritt.<sup>35, 111</sup> Wahrscheinlich bewirkt ein erhöhter  $P_{\text{sys}}$  wiederum eine Degeneration der arteriellen Wand, sodass es so wiederum zu einer Erhöhung der Gefäßsteifigkeit kommt.<sup>112</sup>

In der vorliegenden Studie wurden daher invasive Messungen sowohl des zentralen Blutdrucks als auch der PWV durchgeführt. Die Messung der arteriellen PWV als Maß der Gefäßsteifigkeit zeigte dabei bei alten Tieren erhöhte Werte. Andere tierexperimentelle Studien konnten diese altersabhängige Erhöhung der arteriellen Gefäßsteifigkeit bei gesunden, älteren Versuchstieren ebenfalls bestätigen.<sup>96, 113</sup> Die Supplementierung von Nitrat über 8 Wochen hatte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion der PWV bei alten Tieren zur Folge. Diese Reduktion ging mit einer Erhöhung des plasmatischen Nitrits einher. Sindler et al. zeigten ebenfalls, dass eine Gabe von Nitritsalzen über einen Zeitraum von 4 Wochen die PWV bei alten Mäusen reduzieren konnte.<sup>96</sup> Diese Wirkung konnte auch in einer Humanstudie der eigenen Arbeitsgruppe bei älteren Probanden nachgewiesen werden, nachdem sie über 4 Wochen eine Therapie mit oral supplementiertem Nitrat erhielten.<sup>103</sup> Weitere Studien zeigten außerdem, dass bereits nach einmaliger Einnahme von Nitrat ein akuter Abfall der PWV bei gesunden Probanden und

Patienten mit Grad 1-Hypertonie möglich ist.<sup>114 104</sup> Liu et al. hingegen konnten keine signifikante Reduktion der PWV durch die Einnahme von 220 mg Nitrat in Form einer Spinatportion feststellen, obgleich die PP als Marker für die arterielle Steifigkeit reduziert war.<sup>115</sup> Parallel wurde in allen drei Akutstudien neben dem Abfall von Markern für die arterielle Steifigkeit eine Reduktion des Blutdrucks durch eine Nitrateinnahme festgestellt.<sup>104, 114, 115</sup>

Diese Tatsache ist nicht verwunderlich, da neben den Wandeigenschaften der Gefäße auch Blutdruck und regulierter Gefäßtonus die Steifigkeit bzw. Dehnbarkeit wesentlich beeinflussen.<sup>36, 116</sup> Eine akute Veränderung der Zusammensetzung der Proteine in der Gefäßwand durch die einmalige Einnahme von Nitrat scheint in diesen Arbeiten allerdings höchst unwahrscheinlich. Die vasodilatatorische Blutdrucksenkung über die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und schlussendlich zu NO<sup>•</sup> ist demnach der entscheidende Mechanismus.<sup>86</sup> Auch die vorliegenden Daten konnten eine Reduktion des mittleren arteriellen sowie des systolischen und diastolischen Blutdrucks bei alten Mäusen durch Nitrat aufzeigen. Der vasodilatatorische Effekt einer akuten Gabe von Nitrit ist seit Langem bekannt und wird auf die nichtenzymatische Reduktion zu NO<sup>•</sup> zurückgeführt. Daher kann nach der Gabe von Nitrit ein Abfall des P<sub>mean</sub> festgestellt werden.<sup>65, 117, 118</sup> Die hohe Dosierung von Nitrat in verschiedenen Gemüsesorten lässt einen Anstieg des Nitrits im Plasma erwarten.<sup>63 61</sup> Der Einfluss anorganischen Nitrats im Hinblick auf eine Absenkung des Blutdrucks ist in Humanstudien hinreichend belegt.<sup>60, 85, 86 87-89</sup>

Im Gegensatz zu Liu et al. und Bahara et al. sowie zu Studien, welche lediglich Veränderungen des Blutdrucks durch eine Applikation von Nitrat bei ausschließlich jungen, gesunden Probanden untersuchten, konnte die chronische Zufuhr in der vorliegenden Arbeit keinen Effekt auf Blutdruck oder arterielle Steifigkeit bei jungen Tieren zeigen.<sup>60, 85-89, 104, 115</sup> Sindler et al. beobachteten in ihrer Arbeit ebenfalls einen längeren Zeitraum einer zusätzlichen Zufuhr von Nitrit und konnten, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt, keine Effekte auf die Parameter der Gefäßsteifigkeit bei jungen Tieren nachweisen, obwohl über eine direkte Supplementierung von Nitrit ein signifikanter Anstieg des Nitrits im Plasma gezeigt werden konnte.<sup>96</sup> Ebenfalls wurde demonstriert, dass die Gefäße von jungen und alten Mäusen gleichermaßen dilatierten, wenn NO<sup>•</sup> über einen exogenen Donor zugeführt wurde.<sup>96</sup> Ausgehend von diesem Wissen müssten akute NO-vermittelte Effekte aber bei alten und jungen Tieren gleichermaßen feststellbar sein.

Daher ist es denkbar, dass die chronische Gabe von Nitrat oder Nitrit weniger eine dauerhafte Vasodilatation mit konsekutivem Abfall von Blutdruck und Steifigkeit, wie sie in Akutstudien gezeigt werden konnte, bewirkt.<sup>104, 114, 115</sup> Tatsächlich scheinen vielmehr Umbauprozesse des alternden, arteriellen Gefäßes durch die Supplementierung initiiert zu werden. Diese Vermutung wird von einer Arbeit von Fleenor et al. untermauert: Hier konnte eine Veränderung der Zusammensetzung der Gefäßwand sowie eine Reduktion der Steifigkeit nach vierwöchiger Gabe von Nitrit bei alten Tiere dargestellt werden.<sup>105</sup>

#### **4.5 Der Einfluss einer oralen Supplementierung von Nitrat auf die Genexpression im Alter**

Um Gene zu identifizieren, deren differentielle Regulation dem Alterungsprozess zugrunde liegen bzw. welche die Entwicklung des alternden Phänotyps begünstigen, wurde ein Microarray zur Analyse der Genexpression durchgeführt. Microarrays erlauben die Identifikation und Analyse der Aktivität von tausenden von Genen aus einer Probe. Daher stellen sie ein effizientes Werkzeug dar, um über Expressionsunterschiede der Gene Einsicht in die Biologie von Krankheitsprozessen zu erhalten. Es ist offensichtlich, dass über die reinen Unterschiede der Genexpressions keine komplette Beurteilung der Transkription in den Zellen der arteriellen Gefäße möglich ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsunterschiede anhand verschiedener GO-Terme sowie in Signalweganalysen beschrieben, um so die Koordination einer differentiellen Genexpression besser verstehen zu können.

Unter den zehn am stärksten beeinflussten Signalwegen im Alter der KEGG-Datenbank befanden sich dabei zwei Kategorien, welche mit der Entwicklung von Malignomen assoziiert waren (siehe Abb. 3.10 YC vs. OC: „Bladder Cancer“, „Pancreatic Cancer“). Tatsächlich kann einerseits ein hohes Lebensalter die Entwicklung von Tumoren fördern. Es scheint dabei vor allem zu einer Veränderung der Homöostase des Immunsystems sowie des endokrinen Systems zu kommen. Dies bewirkt eine erhöhte Aktivität von Tumorpromotoren und führt so zu einer Anhäufung von DNA-Mutationen und Instabilität des Genoms.<sup>119, 120</sup> Andererseits könnte eine veränderte Genexpression von Genen aus dieser Familie in den arteriellen Gefäßen eine erhöhte Rate von Zellteilungen aufzeigen. Dies könnte als

Zeichen der Hyperplasie der Intima und Hypertrophie von vaskulären Strukturen gedeutet werden. Zusätzlich kann eine altersbedingte vermehrte Zellproliferation auftreten, um einen konsekutiven Zellverlust zu kompensieren, was zu einer Verdickung der Intima und Umbauprozessen der Gefäßwand führt.<sup>121, 122</sup> Eine orale zusätzliche Zufuhr von Nitrat bewirkte bei alten Tieren ebenfalls eine differentielle Expression von Genen, welche die Progression von bösartigen Erkrankungen (Malignomen) beeinflussen. Signalwege, die mit Tumorerkrankungen assoziiert sind, zählen zu den zehn am stärksten veränderten Signalwegen der KEGG-Kategorie (siehe Abb. 3.11 OC vs. ON: „Pathways in Cancer“). Die vorliegenden Daten weisen also möglicherweise über die Signalweganalyse auf eine steigende Prädisposition für Tumorerkrankungen in höherem Lebensalter hin. Die mechanistische Grundlage für die Entwicklung von Umbauprozessen, welche die vaskuläre Dysfunktion begünstigen, ist einer unkontrollierten Zellproliferation, wie sie im Rahmen von malignen Erkrankungen vorkommt, ähnlich. Die Ernährung beeinflussende Interventionen wie die kalorische Restriktion können die Inzidenz und Progression von bösartigen Erkrankungen über eine Modulation der Genexpression reduzieren, sodass ein ähnlicher protektiver Effekt einer Supplementierung von Nitrat denkbar wäre.<sup>123</sup>

Ebenfalls zu den am stärksten beeinflussten Signalwegen der KEGG-Kategorie im Alter gehört der Signalweg Renin-Angiotensin Systems. Dieser wird auch durch eine orale Supplementierung im Alter tangiert. Dementsprechend ist eine gegensinnige Regulierung denkbar. Angiotensin II ist vermehrt in den Aorten alternder Ratten, doch auch in denen des Menschen zu finden. Bei jungen Individuen kann es arterielle Umbauprozesse in Gang setzen, die dem vaskulären Phänotyp im Alter ähneln.<sup>124, 125</sup> Eine Hochregulation des Renin-Angiotensin-Systems kann außerdem chronische Entzündungsreaktionen am Gefäß auslösen und damit den oxidativen Stress erhöhen. Dies unterstützt die Entstehung von Arteriosklerose maßgeblich.<sup>17</sup> Eine Verschlechterung der Gefäßfunktion im Alter könnte also auch in einer Alteration dieses Signalwegs begründet liegen.

In der „Panther“-Datenbank zeigte sich eine starke Beeinflussung des „TGF-Beta-signaling Pathways“ im Alter, wobei ebenfalls durch die Gabe von Nitrat Gene dieses Signalwegs differentiell exprimiert wurden. TGF-Beta ist ein Zytokin und nimmt Einfluss auf verschiedene vaskuläre Umbauprozesse. Es ist einer der wichtigsten Regulatoren der extrazellulären Matrix und zudem in die Entstehung

kardiovaskulärer Erkrankungen involviert.<sup>126</sup> Abb. 3.13 demonstriert eine detaillierte Darstellung der differentiell exprimierten Gene des Signalwegs, wobei sowohl der Einfluss des Alters als auch der der Gabe von Nitrat dargestellt sind. Im Vergleich zu Jungtieren zeigten alte Mäuse eine erhöhte Expression der Gene von drei verschiedenen Isoformen des Zytokins sowie eines spezifischen Rezeptors, was mit einer zunehmenden Versteifung der Gefäße im Alter zusammenhängen könnte.<sup>47</sup> Um dieses Ergebnis weiter zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich für die Genexpression von zwei Genen des Signalwegs (Lefty1 und Tgfb1) exemplarisch RT-PCR- Untersuchungen durchgeführt. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von Lefty1 um den Faktor 2,02, während für Tgfb1 eine gesteigerte Expression im Alter nicht bestätigt werden konnte. Erstaunlicherweise bewirkte eine erhöhte Zufuhr von Nitrat im Alter hingegen eine Steigerung der Expression von Tgfb1, während in der Expression von Lefty1 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Da in der RT-PCR nur ausschnittsweise die Expression von zwei ausgesuchten Genen untersucht wurde, ist dieses Ergebnis nur bedingt mit den Resultaten des Microarrays vergleichbar: Außer im Fall der Expression von ACVR1C zeigte die Analyse der Genexpression mittels Microarray unter der oralen Supplementierung von Nitrat bei alten Mäusen eine Steigerung der Expression der Gene im TGF-Beta-Signalweg im Vergleich zu alten Kontrollmäusen. Mittels RT-PCR konnten zunächst keine gegenteiligen Resultate festgestellt werden. Für eine genaue Analyse hätten jedoch möglicherweise mehrere differentiell exprimierte Gene aus dem Genearray nachträglich in der RT-PCR untersucht werden müssen, um die Tendenz des Expressionsprofils im Genearray zu bestätigen oder gegebenenfalls zu falsifizieren.

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass es im Alter zu einer vermehrten Expression von Genen des TGF-Beta-Signalwegs kommt. Deren Aktivität konnte im vorliegenden Versuch jedoch nicht durch eine chronische Applikation von Nitrat reduziert werden. Fleenor et al. demonstrierten kürzlich eine Anreicherung von TGF-Beta1 in den Aorten 26-28 Monate alter Mäuse im Vergleich zu 4-6 Monate alten Kontrolltieren. Eine drei Wochen andauernde Gabe von Nitrit bewirkte zwar eine Reduktion der arteriellen Steifigkeit, zeigte jedoch ebenfalls keinen Effekt auf die Konzentration von TGF-Beta oder Kollagen Typ 1.<sup>105</sup> Die vorliegende Arbeit liefert damit zunächst keine Hinweise darauf, dass es durch eine



erhöhte Zufuhr von Nitrat allgemein zu einer Reduktion der Genexpression von Proteinen dieses Signalwegs kommt.

In der KEGG-Kategorie konnte ebenfalls ein starker Einfluss des Alters und einer erhöhten Aufnahme von Nitrat im Alter auf die Genexpression im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg festgestellt werden. Es kommt in höherem Lebensalter zu einer Ansammlung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Intima und Media von arteriellen Gefäßen, die mit einer Umwandlung von perivaskulären Stammzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen einherzugehen scheint.<sup>127</sup> Diese Kalzifizierung der Arterien trägt damit über eine Verringerung der Elastizität zu den altersabhängigen hämodynamischen Veränderungen entscheidend bei.<sup>127</sup> Intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  fungiert in den meisten Zellen als Signalmolekül, unter anderem im Endothel. Hier reguliert es verschiedene Zellfunktionen, wie z. B. die Sekretion vasoaktiver Substanzen.<sup>128</sup> Yuan et al. zeigten in einer 2009 veröffentlichten Arbeit, dass die Expression von Genen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs mit der Progression der Arteriosklerose zusammenhängt. Untersuchungen der Genexpression von Aorten von Apolipoprotein E (ApoE)-defizienten Black-6-Mäusen und Mäusen des Stamms C3H, der weitgehend resistent für die Entwicklung von Arteriosklerose ist, zeigten in Signalweganalysen die stärksten Unterschiede im  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg. Mechanistisch konnte außerdem festgestellt werden, dass oxidiertes LDL, welches proatherogen über die Induktion von proinflammatorischen Genen wirkt, seine Wirkung über eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern endothelialer Zellen erreicht.<sup>129</sup> In der Analyse der Genexpression konnte supplementiertes Nitrat im Alter beispielsweise die Genexpression des „Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2“ (itpr2) reduzieren, der für die Freisetzung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem endoplasmatischen Retikulum entscheidend ist.<sup>128</sup> Außerdem konnte eine Steigerung der Expression der „plasma membrane calcium-transporting ATPase 2“ (Atp2b2) durch Nitrat bewirkt werden, welche  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol entfernt.<sup>128</sup> Möglicherweise kann diese Veränderung eine antiatherogene Wirkung von Nitrat aufzeigen.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalweg spielt des Weiteren eine wichtige Rolle in der Induktion der Apoptose. Die Akkumulation von  $\text{Ca}^{2+}$  im Mitochondrium bewirkt eine Erhöhung der Konzentration von ROS. So kann sie die Atmungskette sowie das mitochondriale Membranpotential beeinflussen, was die Zelle in einen proapoptotischen Zustand versetzt.<sup>46</sup> Lu et al. untersuchten die Expression verschiedener Gene in Gehirngewebe alter Menschen. Dabei fanden sie unter anderem Veränderungen in

der Expression des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs, welche eine Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Alter bewirken könnten.<sup>130</sup> Die Untersuchung der Genexpression dieser Arbeit zeigt möglicherweise ein Abbild dieses Prozesses, der durch oral zugeführtes Nitrat jedoch ebenfalls beeinflusst wird.

Es lassen sich also verschiedene mögliche Zusammenhänge zwischen einer veränderten Genexpression im Alter und phänotypischen Veränderungen aufstellen. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass eine Supplementierung von Nitrat im Alter in die Genregulation von Signalwegen eingreift, die für den Alterungsprozess bedeutsam zu sein scheinen. Diese Ergebnisse können aber lediglich mechanistische Hinweise liefern und bedürfen weiterer Analysen. Die vorliegende Expressionsanalyse beschränkt sich nicht auf einzelne Zelltypen der Gefäße, sondern beschreibt das Genom der gesamten arteriellen Wand. Parakrine Regulationsmechanismen zwischen verschiedenen Zellen beeinflussen die Zellfunktion jedoch maßgeblich und können im vorliegenden Versuchsdesign nicht differenziert werden.<sup>131</sup> Inwiefern außerdem die vermehrte oder erniedrigte Transkription eines einzelnen Gens einen gesamten Signalweg reguliert, bleibt in einer globalen Genanalyse ungeklärt. Zum anderen handelt es sich beim Prozess der Alterung um einen dynamischen Prozess. Daher können Analysen der Genexpression einer Gruppe alter und junger Tiere diesen nur punktuell abbilden. Eine Erweiterung der Versuchsobjekte beispielsweise um Gruppen mittelalter, sehr junger und sehr alter Tiere würde eine detailliertere Analyse erlauben und sollte bei zukünftigen Untersuchungen in Betracht gezogen werden.

#### **4.6 Zusammenfassung und Ausblick**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine orale Supplementierung von Nitrat in höherem Lebensalter die Spiegel von Nitrit im Plasma erhöhen und die Gefäßfunktion der jungen Kontrolltiere entsprechend verbessern kann. Die Analyse der Genexpression von alten Tieren im Vergleich zu der solcher alter Tiere, die zusätzlich zu ihrer Nahrung Nitrat über das Trinkwasser erhielten, zeigte Alterationen in Signalwegen, die mit dem Alterungsprozess am Gefäß in Verbindung gebracht werden können. Die differentielle Regulation von Genen, beispielsweise des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs, weist auf einen Wirkmechanismus hin, der in Zukunft weiter untersucht werden könnte. Hier scheint eine Supplementierung von Nitrat in die

Genexpression von Proteinen einzugreifen, die mit der Entwicklung der Arteriosklerose und damit auch einer verschlechterten Funktion des Endothels zusammenhängen. Nitrat wirkt damit als ein Modifikator der Genexpression im Alter und scheint zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion beizutragen. Eine Verbindung der globalen Genexpressionsanalyse und der funktionellen Daten ermöglicht es jedoch nur, diskrete Erklärungsansätze zu formulieren. Des Weiteren handelt es sich bei dem vorliegenden Versuch um eine Analyse im Mausmodell, welche nur bedingt auf die Gegebenheiten des menschlichen Stoffwechsels übertragbar ist. In Folgestudien gilt es nun, die aufgeführten Hinweise weiter zu vertiefen, um die Regulation von Genen durch eine hoch dosierte orale Aufnahme von Nitrat zu verifizieren oder weitere Wirkmechanismen aufzudecken.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24(6):1468-1474.
2. Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation.* 2003;107(1):139-146.
3. Odden MC, Coxson PG, Moran A, Lightwood JM, Goldman L, Bibbins-Domingo K. The impact of the aging population on coronary heart disease in the united states. *Am J Med.* 2011;124(9):827-833 e825.
4. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2010;121(7):e46-e215.
5. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168-175.
6. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(3):395-400.
7. Simon A, Levenson J. Use of arterial compliance for evaluation of hypertension. *Am J Hypertens.* 1991;4(1 Pt 1):97-105.
8. Mitchell GF. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: Implications for end-organ damage. *J Appl Physiol. (1985).* 2008;105(5):1652-1660.
9. Bachschmid MM, Schildknecht S, Matsui R, Zee R, Haeussler D, Cohen RA, Pimental D, Loo B. Vascular aging: Chronic oxidative stress and impairment

- of redox signaling-consequences for vascular homeostasis and disease. *Ann Med*. 2013;45(1):17-36.
10. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-666.
  11. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*. 1995;27(3):331-340.
  12. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593-615.
  13. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther*. 2005;108(3):225-256.
  14. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995 Jul;96(1):60-68.
  15. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1990;189(6):347-353.
  16. Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell*. 2005;120(4):437-447.
  17. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE, Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: New perspectives. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010;65(10):1028-1041.
  18. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989;2(8670):997-1000.
  19. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol*. 1999;94(5):295-314.
  20. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: Implications for the mitochondrial theory of aging. *Faseb J*. 2005;19(3):419-421.
  21. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE, Seals DR. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation

- to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circ Res*. 2007 Jun 8;100(11):1659-1666.
22. van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Luscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med*. 2000;192(12):1731-1744.
  23. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: Implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;263(3):681-684.
  24. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(3):631-638.
  25. Lakatta EG. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part iii: Cellular and molecular clues to heart and arterial aging. *Circulation*. 2003;107(3):490-497.
  26. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
  27. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Creager MA. Flow-induced vasodilation of the human brachial artery is impaired in patients <40 years of age with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1996;78(11):1210-1214.
  28. Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation*. 2002;106(6):653-658.
  29. Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T, Kelm M. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(2):295-301.
  30. Lauer T, Heiss C, Balzer J, Kehmeier E, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Meyer C, Merx MW, Kelm M, Rassaf T. Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(3):291-297.
  31. Bank AJ, Wang H, Holte JE, Mullen K, Shammass R, Kubo SH. Contribution of collagen, elastin, and smooth muscle to in vivo human brachial artery wall stress and elastic modulus. *Circulation*. 1996;94(12):3263-3270.

32. Smulyan H, Safar ME. Systolic blood pressure revisited. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29(7):1407-1413.
33. McVeigh GE, Hamilton PK, Morgan DR. Evaluation of mechanical arterial properties: Clinical, experimental and therapeutic aspects. *Clin Sci (Lond)*. 2002;102(1):51-67.
34. Franklin SS, Gustin Wt, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The framingham heart study. *Circulation*. 1997;96(1):308-315.
35. Sagie A, Larson MG, Levy D. The natural history of borderline isolated systolic hypertension. *N Engl J Med*. 1993;329(26):1912-1917.
36. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. Expert consensus document on arterial stiffness: Methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2588-2605.
37. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):554-566.
38. Laurent S, Boutouyrie P. Arterial stiffness: A new surrogate end point for cardiovascular disease? *J Nephrol*. 2007;20 Suppl 12:S45-50.
39. Inoue N, Maeda R, Kawakami H, Shokawa T, Yamamoto H, Ito C, Sasaki H. Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in middle-aged and elderly japanese men. *Circ J*. 2009;73(3):549-553.
40. Willum-Hansen T, Staessen JA, Torp-Pedersen C, Rasmussen S, Thijs L, Ibsen H, Jeppesen J. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. *Circulation*. 2006 Feb 7;113(5):664-670.
41. Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, Kemper MK, Becker LC, Lakatta EG, Fleg JL. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98(15):1504-1509.
42. Michel JB, Heudes D, Michel O, Poitevin P, Philippe M, Scalbert E, Corman B, Levy BI. Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on aging processes. II. Large arteries. *Am J Physiol*. 1994;267(1 Pt 2):R124-135.
43. Sawabe M. Vascular aging: From molecular mechanism to clinical significance. *Geriatr Gerontol Int*. 2010;10 Suppl 1:S213-220.

44. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother.* 2003;57(5-6):195-202.
45. Elliott RJ, McGrath LT. Calcification of the human thoracic aorta during aging. *Calcif Tissue Int.* 1994;54(4):268-273.
46. Ureshino RP, Rocha KK, Lopes GS, Trindade CB, Smaili SS. Calcium signaling alterations, oxidative stress and autophagy in aging. *Antioxid Redox Signal.* 2014 1;21(1):123-137.
47. Wang M, Zhao D, Spinetti G, Zhang J, Jiang LQ, Pintus G, Monticone R, Lakatta EG. Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (tgf-beta1) and tgf-beta1-type ii receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1503-1509.
48. Fleenor BS, Marshall KD, Durrant JR, Lesniewski LA, Seals DR. Arterial stiffening with ageing is associated with transforming growth factor-beta1-related changes in adventitial collagen: Reversal by aerobic exercise. *J Physiol.* 2010;588(Pt 20):3971-3982.
49. Wilkinson IB, MacCallum H, Cockcroft JR, Webb DJ. Inhibition of basal nitric oxide synthesis increases aortic augmentation index and pulse wave velocity in vivo. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;53(2):189-192.
50. McVeigh GE, Allen PB, Morgan DR, Hanratty CG, Silke B. Nitric oxide modulation of blood vessel tone identified by arterial waveform analysis. *Clin Sci (Lond).* 2001;100(4):387-393.
51. Fitch RM, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX. Nitric oxide synthase inhibition increases aortic stiffness measured by pulse wave velocity in rats. *Cardiovasc Res.* 2001;51(2):351-358.
52. Chen HH, Wang DL. Nitric oxide inhibits matrix metalloproteinase-2 expression via the induction of activating transcription factor 3 in endothelial cells. *Mol Pharmacol.* 2004;65(5):1130-1140.
53. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003;92(8):827-839.
54. Koyanagi M, Egashira K, Kubo-Inoue M, Usui M, Kitamoto S, Tomita H, Shimokawa H, Takeshita A. Role of transforming growth factor-beta1 in



- cardiovascular inflammatory changes induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 1):86-90.
55. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504-512.
  56. Roberts LD, Ashmore T, Kotwica AO, Murfitt SA, Fernandez BO, Feelisch M, Murray AJ, Griffin JL. Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Diabetes*. 2014 Sep 23.
  57. JSHIPURA KJ, ASCHERIO A, MANSON JE, STAMPFER MJ, RIMM EB, SPEIZER FE, HENNEKENS CH, SPIEGELMAN D, WILLETT WC. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA*. 1999;282(13):1233-1239.
  58. JSHIPURA KJ, HU FB, MANSON JE, STAMPFER MJ, RIMM EB, SPEIZER FE, COLDITZ G, ASCHERIO A, ROSNER B, SPIEGELMAN D, WILLETT WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med*. 2001;134(12):1106-1114.
  59. Appel LJ, Brands MW, Daniels SR, Karanja N, Elmer PJ, Sacks FM. Dietary approaches to prevent and treat hypertension: A scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension*. 2006;47(2):296-308.
  60. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N Engl J Med*. 2006;355(26):2792-2793.
  61. Hord NG, Tang Y, Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(1):1-10.
  62. Lidder S, Webb AJ. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):677-696.
  63. Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide*. 2008;19(4):333-337.
  64. Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlen C, Olsson A, Stensdotter M, Petersson J, Holm L, Weitzberg E, Lundberg JO. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol*. 2008;4(7):411-417.

65. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003 Dec;9(12):1498-1505.
66. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(29):10256-10261.
67. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(5):H1281-8.
68. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):156-167.
69. May JM, Qu ZC, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(6):C1946-1954.
70. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by s-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 1997;276(5321):2034-2037.
71. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson AS, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res*. 1993;73(6):1121-1127.
72. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):273-289.
73. Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating no pool: Assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(4):413-422.

74. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of n-nitroso and s-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(11):1590-1596.
75. Powlson DS, Addiscott TM, Benjamin N, Cassman KG, de Kok TM, van Grinsven H, L'Hirondel JL, Avery AA, van Kessel C. When does nitrate become a risk for humans? *J Environ Qual.* 2008;37(2):291-295.
76. Comly HH. Landmark article Sept 8, 1945: Cyanosis in infants caused by nitrates in well-water. By Hunter H. Comly. *JAMA.* 1987;257(20):2788-2792.
77. Avery AA. Infantile methemoglobinemia: Reexamining the role of drinking water nitrates. *Environ Health Perspect.* 1999;107(7):583-586.
78. Cornblath M, Hartmann AF. Methemoglobinemia in young infants. *The J Pediatr.* 1948;33(4):421-425.
79. Lundberg JO, Larsen FJ, Weitzberg E. Supplementation with nitrate and nitrite salts in exercise: A word of caution. *J Appl Physiol.* 2011;111(2):616-617.
80. Vita JA, Keaney JF, Jr. Endothelial function: A barometer for cardiovascular risk? *Circulation.* 2002;106(6):640-642.
81. Ganz P, Vita JA. Testing endothelial vasomotor function: Nitric oxide, a multipotent molecule. *Circulation.* 2003;108(17):2049-2053.
82. Hord NG. Dietary nitrates, nitrites, and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep.* 13(6):484-492.
83. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Judd SE, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Mackey RH, Magid DJ, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER 3rd, Moy CS, Mussolino ME, Neumar RW, Nichol G, Pandey DK, Paynter NP, Reeves MJ, Sorlie PD, Stein J, Towfighi A, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129(3):399-410.
84. Soucy KG, Ryoo S, Benjo A, Lim HK, Gupta G, Sohi JS, Elser J, Aon MA, Nyhan D, Shoukas AA, Berkowitz DE. Impaired shear stress-induced nitric

- oxide production through decreased NOS phosphorylation contributes to age-related vascular stiffness. *J Appl Physiol*(1985). 2006 Dec;101(6):1751-1759.
85. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N, MacAllister R, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*. 2008;51(3):784-790.
  86. Kapil V, Milsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, Arghandawi S, Pearl V, Benjamin N, Loukogeorgakis S, Macallister R, Hobbs AJ, Webb AJ, Ahluwalia A. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: Role for nitrite-derived no. *Hypertension*. 2010;56(2):274-281.
  87. Bondonno CP, Yang X, Croft KD, Considine MJ, Ward NC, Rich L, Puddey IB, Swinny E, Mubarak A, Hodgson JM. Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: A randomized controlled trial. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(1):95-102.
  88. Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Pavey TG, Wilkerson DP, Benjamin N, Winyard PG, Jones AM. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(4):R1121-31.
  89. Sobko T, Marcus C, Govoni M, Kamiya S. Dietary nitrate in japanese traditional foods lowers diastolic blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2010;22(2):136-140.
  90. Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Totzeck M, Kropp M, Schicho A, Stock P, Rammos C, Niessen M, Heiss C, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M, Rassaf T. Dietary nitrate supplementation improves revascularization in chronic ischemia. *Circulation*. 2012;126(16):1983-1992.
  91. Weitzberg E, Lundberg JO. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr*. 2013;33:129-159
  92. Kleinbongard P1, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan

- NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(7):790-796.
93. Kinlay S, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*. 1997;80(9A):111-161.
94. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-3561.
95. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf RE, Willers R, Schechter AN, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med*. 2006;40(2):295-302.
96. Sindler AL, Fleenor BS, Calvert JW, Marshall KD, Zigler ML, Lefer DJ, Seals DR. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging Cell*. 2011;10(3):429-437.
97. Bryan NS, Calvert JW, Gundewar S, Lefer DJ. Dietary nitrite restores no homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(4):468-474.
98. Abud EM, Maylor J, Udem C, Punjabi A, Zaiman AL, Myers AC, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1239-1244.
99. Newaz MA, Yousefipour Z, Oyekan A. Oxidative stress-associated vascular aging is xanthine oxidase-dependent but not nad(p)h oxidase-dependent. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2006;48(3):88-94.
100. Kanady JA, Aruni AW, Ninnis JR, Hopper AO, Blood JD, Byrd BL, Holley LR, Staker MR, Hutson S, Fletcher HM, Power GG, Blood AB. Nitrate reductase activity of bacteria in saliva of term and preterm infants. *Nitric Oxide*. 2012;27(4):193-200.
101. Nasser-Moghaddam S, Nokhbeh-Zaeem H, Saniee P, Pedramnia S, Sotoudeh M, Malekzadeh R. Oral nitrate reductase activity and erosive gastro-esophageal reflux disease: A nitrate hypothesis for gerd pathogenesis. *Dig Dis Sci*. 2012;57(2):413-418.

102. Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Deanfield JE. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24(2):471-476.
103. Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Bernard A, Kelm M, Rassaf T. Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(15):1584-1585.
104. Bahra M, Kapil V, Pearl V, Ghosh S, Ahluwalia A. Inorganic nitrate ingestion improves vascular compliance but does not alter flow-mediated dilatation in healthy volunteers. *Nitric Oxide.* 2012;26(4):197-202.
105. Fleenor BS, Sindler AL, Eng JS, Nair DP, Dodson RB, Seals DR. Sodium nitrite de-stiffening of large elastic arteries with aging: Role of normalization of advanced glycation end-products. *Exp Gerontol.* 2012;47(8):588-594.
106. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2005;1(5):290-297.
107. Diez J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol.* 2007;44:76-95.
108. Montenegro MF, Amaral JH, Pinheiro LC, Sakamoto EK, Ferreira GC, Reis RI, Marcal DM, Pereira RP, Tanus-Santos JE. Sodium nitrite downregulates vascular nadph oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(1):144-152.
109. Tanabe T, Maeda S, Miyauchi T, Iemitsu M, Takanashi M, Irukayama-Tomobe Y, Yokota T, Ohmori H, Matsuda M. Exercise training improves ageing-induced decrease in enos expression of the aorta. *Acta physiologica Scandinavica.* 2003;178(1):3-10.
110. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: A systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(13):1318-1327.
111. McEniery CM, Yasmin, Wallace S, Maki-Petaja K, McDonnell B, Sharman JE, Retallick C, Franklin SS, Brown MJ, Lloyd RC, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Increased stroke volume and aortic stiffness contribute to isolated systolic hypertension in young adults. *Hypertension.* 2005;46(1):221-226.

112. McEniery CM, Wilkinson IB. The pressures of aging. *Hypertension*. 2013;62(5):823-824.
113. Qiu H, Depre C, Ghosh K, Resuello RG, Natividad FF, Rossi F, Peppas A, Shen YT, Vatner DE, Vatner SF. Mechanism of gender-specific differences in aortic stiffness with aging in nonhuman primates. *Circulation*. 2007;116(6):669-676.
114. Ghosh SM, Kapil V, Fuentes-Calvo I, Bubb KJ, Pearl V, Millsom AB, Khambata R, Maleki-Toyserkani S, Yousuf M, Benjamin N, Webb AJ, Caulfield MJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension*. 2013 May;61(5):1091-1102.
115. Liu AH, Bondonno CP, Croft KD, Puddey IB, Woodman RJ, Rich L, Ward NC, Vita JA, Hodgson JM. Effects of a nitrate-rich meal on arterial stiffness and blood pressure in healthy volunteers. *Nitric Oxide*. 2013;35:123-130.
116. Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: From physiology to pharmacology. *Hypertension*. 2004;44(2):112-116.
117. Modin A, Bjorne H, Herulf M, Alving K, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitrite-derived nitric oxide: A possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand*. 2001;171(1):9-16.
118. Maher AR, Millsom AB, Gunaruwan P, Abozguia K, Ahmed I, Weaver RA, Thomas P, Ashrafian H, Born GV, James PE, Frenneaux MP. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation*. 2008;117(5):670-677.
119. Anisimov VN. Biology of aging and cancer. *Cancer Control*. 2007;14(1):23-31.
120. Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. *Nature*. 2007;448(7155):767-774.
121. Khan SJ, Pham S, Wei Y, Mateo D, St-Pierre M, Fletcher TM, Vazquez-Padron RI. Stress-induced senescence exaggerates postinjury neointimal formation in the old vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298(1):H66-74.
122. Eghbalieh SD, Chowdhary P, Muto A, Ziegler KR, Kudo FA, Pimiento JM, Mirmehdi I, Model LS, Kondo Y, Nishibe T, Dardik A. Age-related neointimal

- hyperplasia is associated with monocyte infiltration after balloon angioplasty. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012;67(2):109-117.
123. Meynet O, Ricci JE. Caloric restriction and cancer: Molecular mechanisms and clinical implications. *Trends Mol Med*. 2011;20(8):419-27.
  124. Wang M, Takagi G, Asai K, Resuello RG, Natividad FF, Vatner DE, Vatner SF, Lakatta EG. Aging increases aortic mmp-2 activity and angiotensin ii in nonhuman primates. *Hypertension*. 2003;41(6):1308-1316.
  125. Wang M, Zhang J, Spinetti G, Jiang LQ, Monticone R, Zhao D, Cheng L, Krawczyk M, Talan M, Pintus G, Lakatta EG. Angiotensin ii activates matrix metalloproteinase type ii and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *Am J Pathol*. 2005;167(5):1429-1442.
  126. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. Tgf-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):196-206.
  127. Kovacic JC, Moreno P, Nabel EG, Hachinski V, Fuster V. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 2 of a 2-part review: Clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*. 2011;123(17):1900-1910.
  128. Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2000;48(1):13-22.
  129. Yuan Z, Miyoshi T, Bao Y, Sheehan JP, Matsumoto AH, Shi W. Microarray analysis of gene expression in mouse aorta reveals role of the calcium signaling pathway in control of atherosclerosis susceptibility. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(5):H1336-43.
  130. Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 2004;429(6994):883-891.
  131. Rainger GE, Nash GB. Cellular pathology of atherosclerosis: Smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2001;88(6):615-622.
  132. Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Deenen R, Pohl J, Stock P, Hinzmann C, Kelm M, Rassaf T. Age-related vascular gene expression profiling in mice. *Mech Ageing Dev*. 2014;135:15-23.
  133. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*. 2009;4(1):44-57.



134. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.

## 6 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Tienush Rassaf für die Überlassung des Themas und für die Chance, selbstständiges, wissenschaftliches Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen. Seine motivierenden Worte verhalfen mir stets, nicht den Fokus zu verlieren und mich immer wieder neu für das Thema zu begeistern.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Frau Dr. Ulrike Hendgen-Cotta und Herrn Dr. Christos Rammos. Beide halfen mir in gleichem Maß außerordentlich, mich in das Thema einzuarbeiten, und standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Durch ihre uneingeschränkte Unterstützung wurde ich sowohl hervorragend praktisch angeleitet, was mir ein selbstständiges Arbeiten ermöglicht hat, als auch bei aufkommenden Fragen und theoretischen Problemen ernst genommen und nicht allein gelassen. In besonderem Maße möchte ich mich jedoch für die freundliche und zuvorkommende Art der beiden bedanken, mit der sie mir von Anfang an begegnet sind. Die Zusammenarbeit mit beiden werde ich stets in positiver Erinnerung behalten.

Großer Dank gebührt ebenfalls den anderen Mitarbeitern des kardiologischen Labors, im Besonderen Frau Dipl. Biologin Pia Stock und Herrn Dominik Semmler, die mich direkt mit dem praktischen Umgang mit den Materialien im Labor vertraut machten und für jede Frage meinerseits offen waren. Gerne erinnere ich mich außerdem an die anregenden Gespräche mit beiden zurück, die mir die Arbeit sehr erleichterten.

Mein größter Dank gebührt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, die mich nicht nur im Zuge der Dissertation, sondern im ganzen Studium begleitet haben und eine unverzichtbare emotionale Hilfe waren.

In allerhöchstem Maße möchte ich mich hier bei meiner lieben Freundin und Kommilitonin Lisa F. bedanken. Sie war für mich meine Partnerin und beste Freundin zugleich, ohne deren Fürsorge und Liebe ich diese Arbeit niemals hätte abschließen können. Vor allem in entbehnungsreichen Zeiten stand sie an meiner Seite und motivierte mich ständig, weiterzumachen und an das Projekt zu glauben. Ich werde ihr ihre Aufopferung und Unterstützung niemals vergessen und bin ihr dafür ewig dankbar.

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift