

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

**Verbesserung der altersabhängigen vaskulären  
Dysfunktion durch diätetische Supplementierung von  
Nitrat**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Andrea Verena Bernard  
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. dent. Jürgen Becker

Meinem Opa, Dr. med. Hans Gronen, in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- C. Rammos, U. Hendgen-Cotta, J. Sobierajski, A. Bernard, M. Kelm, T. Rassaf  
„Dietary Nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk“  
*J Am Coll Cardiol.* 2014 Apr 22;63(15):1584-5
- C. Rammos, U. Hendgen-Cotta, M. Totzeck, J. Sobierajski, A. Bernard, C. Meyer, A. Gödecke, M. Kelm, T. Rassaf  
„Dietary Nitrate reverses age-related diastolic dysfunction“  
79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herz und Kreislaufforschung in Mannheim, April 2013
- A. Bernard, C. Rammos, U. Hendgen-Cotta, J. Sobierajski, M. Kelm, T. Rassaf  
„Verbesserung der altersabhängigen vaskulären Dysfunktion durch diätetische Nitrat-Supplementierung“  
Doktorandenkongress der Medical Research School der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Juli 2013

## Zusammenfassung

Der physiologische Alterungsprozess geht mit vaskulären Veränderungen einher, welche unter anderem zu einer endothelialen Dysfunktion, erhöhtem Blutdruck und Gefäßsteifigkeit führen. Hierbei scheint eine beeinträchtigte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) maßgeblich zu sein. Diätetisches Nitrat kann *in vivo* zu Nitrit und NO bioaktiviert werden und somit als Alternative zur enzymatischen NO-Generierung dienen. Ziel dieser Arbeit war es, zu zeigen, dass eine chronische diätetische Nitratgabe die altersabhängige vaskuläre Funktion durch eine Modulation der endogenen NO-Spiegel beeinflussen kann.

In einer doppelblind randomisierten klinischen Studie erhielten ältere, gesunde Probanden über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich ein Glas Wasser, welchem anorganisches Nitrat zugesetzt wurde. Die Menge an Nitrat entsprach dem Nitratgehalt einer Portion Spinat (ca. 300 g; 150 µmol/kg Körpergewicht). Dagegen erhielt die Kontrollgruppe im Parallelgruppendesign ein Placebogetränk, welches mit NaCl (Kochsalz) versehen war. Die Nitrateinnahme führte zu einer verbesserten endothelialen Funktion und zu einer Reduktion der arteriellen und aortalen Steifigkeit. Ein reduzierter systolischer Blutdruck konnte beobachtet werden, während kein Einfluss auf den diastolischen Blutdruck festgestellt werden konnte. Dies ging mit einer Steigerung der Nitritspiegel im Plasma um das 4-fache einher. In der Kontrollgruppe zeigten sich keine Veränderungen.

Um den diesen Auswirkungen zugrundeliegenden Mechanismus zu untersuchen, wurden zudem in einem tierexperimentellen Ansatz junge und alte C57 Bl 6 Wild-Typ-Mäuse (6 bzw. 22 Monate alt) über 8 Wochen mit diätetischem Nitrat (1 g/l) versorgt und mit gleichaltrigen Kontrolltieren verglichen. Nach dieser Supplementierung von Nitrat stiegen sowohl in den alten als auch in den jungen Mäusen die plasmatischen Nitratspiegel an. Ein Anstieg der plasmatischen Nitritspiegel wurde hingegen nur bei den alten Mäusen festgestellt. Untersuchungen der aortalen Gefäße zeigten keine Änderungen im Nitrit- oder Nitratgehalt. Durch die Supplementierung von Nitrat konnte die Aktivität der Proteinkinase G (PKG) in den Aorten bei alten und jungen Mäusen signifikant gesteigert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine chronische diätetische Supplementierung von Nitrat sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen die plasmatischen Nitritspiegel moduliert. In den hier untersuchten älteren Personen führte die Gabe von anorganischem Nitrat zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, der altersabhängigen vaskulären Gefäßsteifigkeit und zu einer Reduktion des systolischen Blutdrucks. Diätetisches Nitrat scheint daher eine mögliche therapeutische Option zu sein, um die altersabhängige vaskuläre Dysfunktion zu beeinflussen.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACE</b>	Angiotensinkonversionsenzym
<b>ADI</b>	<i>acceptable daily intake</i> (erlaubte Tagesdosis)
<b>AGE</b>	<i>advanced glycation endproduct</i>
<b>AIX</b>	Augmentationsindex
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>AUC</b>	<i>area under the curve</i>
<b>AugP</b>	<i>augmentation pressure</i> (Augmentationsdruck)
<b>BP</b>	<i>blood pressure</i> (Blutdruck)
<b>bpm</b>	<i>beats per minute</i> (Schläge pro Minute)
<b>ca.</b>	circa (lat.)
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Kalzium
<b>CHE</b>	Cholinesterase
<b>COX</b>	Cytochrom-c-Oxidase
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>CK</b>	Kreatinkinase
<b>CK-MB</b>	Kreatinkinase- <i>muscle-brain</i>
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>CLD</b>	Chemilumineszenzdetektion
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CVD</b>	<i>cardiovascular disease</i> (kardiovaskuläre Erkrankung)
<b>DASH</b>	<i>dietary approaches to stop hypertension</i> (diätetische Intervention zur Verhinderung von Bluthochdruck)
<b>DBP</b>	<i>diastolic blood pressure</i> (diastolischer Blutdruck)
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority
<b>Fe</b>	Eisen
<b>FMD</b>	flussmedierte Dilatation

<b>g</b>	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s <sup>2</sup> )
<b>g</b>	Gramm
<b>GGT</b>	Gamma-Glutamyltranspeptidase
<b>GOT</b>	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
<b>GPT</b>	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
<b>GTN</b>	Glycerintrinitrat
<b>eNOS</b>	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
<b>h</b>	<i>hour(s)</i> (Stunde(n))
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HbA1c</b>	glykosyliertes Hämoglobin
<b>HDL</b>	<i>high density lipoprotein</i>
<b>Hkt</b>	Hämatokrit
<b>HF</b>	Herzfrequenz
<b>HPLC</b>	<i>high performance liquid chromatography</i>
<b>HWZ</b>	Halbwertszeit
<b>IMT</b>	<i>intima-media thickness</i> (Intima-Media-Dicke)
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>KRB</b>	<i>kinase reaction buffer</i>
<b>l</b>	Liter
<b>LDH</b>	Laktatdehydrogenase
<b>LDL</b>	<i>low density lipoprotein</i>
<b>L-NMMA</b>	L-NG-Monomethyl-Arginin-Zitrat
<b>mALDH2</b>	mitochondriale Aldehyddehydrogenase 2
<b>min</b>	Minute(n)
<b>mmol</b>	Millimol
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>nM</b>	Nanomolar

<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Nitrit
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Nitrat
<b>NT-pro-BNP</b>	N-terminales <i>pro brain natriuretic peptide</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OC</b>	<i>old control</i> (alte Mäuse, Kontrolle)
<b>ON</b>	<i>old nitrate</i> (alte Mäuse, Nitratdiät)
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>PP</b>	<i>pulse pressure</i> (Pulsdruck)
<b>PWV</b>	<i>pulse wave velocity</i> (Pulswellengeschwindigkeit)
<b>PVASP</b>	phosphoryliertes Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
<b>RR</b>	Riva-Rocci (Blutdruck)
<b>SBP</b>	<i>systolic blood pressure</i> (systolischer Blutdruck)
<b>SD</b>	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
<b>SE</b>	<i>standard error</i> (Standardfehler)
<b>SERCA</b>	<i>sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
<b>t</b>	Zeit
<b>TSH</b>	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VASP</b>	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
<b>vs.</b>	versus (lat.)
<b>YC</b>	<i>young control</i> (junge Mäuse, Kontrolle)
<b>YN</b>	<i>young nitrate</i> (junge Mäuse, Nitratdiät)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die vaskuläre Alterung</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Endotheliale Dysfunktion .....	1
1.1.2	Arterielle Steifigkeit .....	2
<b>1.2</b>	<b>Kardiovaskuläre Erkrankungen</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Arterielle Hypertonie</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Präventionsmaßnahmen</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5</b>	<b>Diätetisches Nitrat</b> .....	<b>5</b>
<b>1.6</b>	<b>Problemstellung</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Klinische Studie</b> .....	<b>9</b>
2.1.1	Studiendesign .....	9
2.1.2	Studienprotokoll .....	9
2.1.3	Studienkollektiv .....	10
2.1.4	Endotheliale Funktion .....	10
2.1.5	Gefäßsteifigkeit.....	11
2.1.5.1	PWV.....	12
2.1.5.2	AIX@75 .....	12
2.1.5.3	IMT (intima-media thickness) .....	12
2.1.6	Hämodynamik.....	13
2.1.7	Blutabnahme.....	13
2.1.8	Bestimmung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma ...	13
2.1.9	Ernährungsfragebogen .....	14
2.1.10	SF-36.....	14
2.1.11	Probenaufarbeitung.....	15
2.1.12	Klinisches Routinelabor .....	15
<b>2.2</b>	<b>Tierexperimentelle Studie</b> .....	<b>17</b>
2.2.1	Versuchstiere und Studiendesign .....	17
2.2.2	Organentnahme.....	17
2.2.3	Bestimmung der RXNO-Konzentration im Gewebe .....	17
2.2.4	cGMP-Bestimmung.....	18
2.2.5	PKG-Aktivität .....	19
2.2.6	Statistische Auswertung .....	20
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Klinische Studie</b> .....	<b>21</b>
3.1.1	Studienkollektiv.....	21
3.1.2	Charakterisierung der Studienpopulation.....	21
3.1.3	Endotheliale Funktion .....	22
3.1.4	Verbesserung der Gefäßsteifigkeit durch Nitateinnahme .....	23
3.1.4.1	PWV.....	23
3.1.4.2	AIX@75 .....	23
3.1.4.3	IMT (intima-media thickness) .....	24
3.1.5	Hämodynamik.....	25

3.1.6	NOx-Analytik.....	25
3.1.7	SF-36.....	26
3.1.8	Klinisches Routinelabor .....	27
<b>3.2</b>	<b>Tierexperimentelle Studie.....</b>	<b>28</b>
3.2.1	Plasmaspiegel von Nitrat und Nitrit.....	28
3.2.2	Gewebemessungen von Nitrat und Nitrit .....	30
3.2.3	cGMP-Bestimmung.....	33
3.2.4	PKG-Aktivität .....	33
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>35</b>
4.1	<b>Bewertung des Studienkollektivs .....</b>	<b>36</b>
4.2	<b>Reversion der endothelialen Funktion durch chronische Nitratgabe</b>	<b>37</b>
4.3	<b>Diätetisches Nitrat verbessert die Gefäßsteifigkeit.....</b>	<b>38</b>
4.4	<b>Die Auswirkungen diätetischen Nitrats auf den Blutdruck .....</b>	<b>40</b>
4.5	<b>Einfluss erhöhter Plasmanitritwerte auf das Gefäßsystem .....</b>	<b>42</b>
4.6	<b>Diätetische Modulation des Nitrat-Nitrit-Signalwegs .....</b>	<b>43</b>
4.7	<b>Die klinische Bedeutung des Nitrats im Wandel .....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>

# 1 Einleitung

Das Lebensalter der Menschen steigt heutzutage kontinuierlich an. Im Jahr 2000 lebten in den USA bereits 35 Millionen Menschen, die 65 Jahre oder älter waren. In den nächsten 15 Jahren wird sich diese Zahl voraussichtlich ungefähr verdoppeln.<sup>1</sup> Mit dem Alter steigt auch das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (*cardiovascular disease*, CVD): So betreffen mehr als zwei Drittel der durch diese verursachten Todesfälle ältere Menschen.<sup>2</sup> Des Weiteren stellen kardiovaskuläre Erkrankungen derzeit mit einem Anteil von ca. 50 % die häufigste Todesursache weltweit dar. Neben einem fortgeschrittenen Alter gibt es verschiedene Faktoren, die das Risiko, eine CVD zu entwickeln, erhöhen. Dazu zählen unter anderem Diabetes mellitus, genetische Faktoren und ein ungesunder Lebensstil.<sup>1, 3</sup> Das Alter ist jedoch zweifelsfrei der einflussreichste Risikofaktor dafür, an einer koronaren Herzkrankheit (KHK), einem Schlaganfall oder einem plötzlichen Herztod zu erkranken.<sup>4</sup> Der endothelialen Dysfunktion und der arteriellen Steifigkeit wird die größte Bedeutung im kardiovaskulären Alterungsprozess zugeschrieben: Auf dem Boden dieser beiden Veränderungen können sich weiterführende Pathologien entwickeln.

Eine entscheidende Rolle für die Entwicklung dieser morphologischen und funktionellen Veränderungen im Alter scheint eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zu spielen. Endothelial kann dieses über die NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet werden. Außerdem kann NO im Organismus aus oral eingenommenem Nitrat über einen Zwischenschritt zu Nitrit reduziert werden.

## 1.1 Die vaskuläre Alterung

### 1.1.1 Endotheliale Dysfunktion

Störungen der essentiellen Endothelfunktionen, zu denen unter anderem die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus<sup>5</sup> und der Gefäßpermeabilität und die Modulation der adhäsiven Eigenschaften zählen, werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Diese ist ein initialer und kausaler Faktor in der Entstehung von Atherosklerose. Durch ein Gleichgewicht von Gefäßkontraktion und -dilatation wird ein adäquater Blutfluss aufrechterhalten. Um diesen gewährleisten zu können, verfügt das Endothel über Mechanismen, die sowohl auf hämodynamische als auch auf humorale Veränderungen reagieren können. Dazu zählt zum Beispiel eine erhöhte Wandschubspannung (*shear stress*), die durch intravasale Druckanstiege oder erhöhte Flussraten bedingt wird. Das Endothel kann selbst vasoaktive Lokalsubstanzen sezernieren, die für den Kontraktionszustand der glatten Gefäßmuskulatur zuständig sind. Zu diesen zählt beispielsweise auch Stickstoffmonoxid (NO). Da NO maßgeblich an der Steuerung

der Gefäßfunktionen beteiligt ist,<sup>6</sup> ist es wahrscheinlich, dass ein Mangel an endothelial gebildetem NO der zugrundeliegende Faktor für die endotheliale Dysfunktion ist. Somit scheint die Bioverfügbarkeit von NO im Alter vermindert zu sein.<sup>7, 8</sup> Dies liegt zum einen an einer verminderten Verfügbarkeit von L-Arginin<sup>9</sup> und zum anderen an der altersbedingten Herabregulierung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase).<sup>10</sup> Daher ist die verminderte Bioverfügbarkeit von NO im Alter einerseits auf einen gesteigerten Abbau und andererseits auch auf eine verringerte Produktion von NO zurückzuführen.

Als nichtinvasiver Goldstandard in der Diagnostik der endothelialen Dysfunktion gilt die Messung der flussabhängigen Dilatation (*flow-mediated dilation*, FMD).<sup>11</sup> Bei alten Menschen ist die FMD reduziert, was darauf hinweist, dass Altern im Allgemeinen mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht.<sup>7</sup> Das Gefäßsystem ist im Alter nicht in der Lage, auf körperliche Belastungssituationen mit einem adäquaten Anstieg des die NO-Synthase-Aktivität widerspiegelnden Plasmanitrits zu reagieren.<sup>7</sup> Um einen weiteren Marker zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion zu etablieren, wurde der Begriff der „Nitritreserve“ eingeführt. Das Prinzip derselben beruht auf dem Wissen, dass ein Mangel an endothelial gebildetem NO für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich ist. Da man NO aufgrund seiner enorm kurzen Halbwertszeit (HWZ) nicht im Plasma messen kann, wird stattdessen sein Hauptabbauprodukt, das Nitrit, als Marker herangezogen.<sup>12</sup> Diese Nitritreserve berechnet sich aus der Differenz zwischen der basalen Nitritkonzentration im Plasma und der Nitritkonzentration nach fahrradergometrischer Belastung.<sup>7</sup> Die Stimulation der eNOS bewirkt bei Menschen mit einer endothelialen Dysfunktion einen geringeren Anstieg der Nitritwerte im Plasma als bei gesunden Menschen. Somit bedingt eine verminderte NO-Synthese eine erniedrigte Nitritreserve, welche als Marker für die endotheliale Dysfunktion dienen kann.<sup>7, 13</sup>

Durch eine Intervention, die es ermöglichen würde, die endogenen NO-Reserven zu erhöhen, könnte die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und somit gegebenenfalls die Progression von kardiovaskulären Krankheiten minimiert werden.

### **1.1.2 Arterielle Steifigkeit**

Mit dem Begriff der arteriellen Steifigkeit lassen sich bestimmte funktionelle, strukturelle und mechanische Eigenschaften des arteriellen Gefäßsystems beschreiben. Es konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz der arteriellen Steifigkeit mit zunehmendem Alter signifikant ansteigt.<sup>14</sup> Mit zunehmender arterieller Steifigkeit nimmt die Elastizität der Gefäße ab, was die Hämodynamik beeinflusst. Besonders der systolische Blutdruck steigt durch den erhöhten peripheren Widerstand an, während der diastolische Wert anfangs ebenfalls ansteigt. Mit der Zunahme der *compliance* fällt der diastolische Blutdruck mit der

Zeit allerdings kontinuierlich ab. Somit ist die systolische Hypertonie die häufigste Form der Hypertonie bei Menschen über 60 Jahren. In Langzeitstudien konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine isolierte systolische Hypertonie in 80 % der Fälle in eine generelle Hypertonie übergeht. Das bedeutet, dass neben dem systolischen Wert auch der diastolische Blutdruckwert erhöht ist.<sup>15</sup> Des Weiteren steigt das Risiko für Schlaganfälle, koronare Herzkrankheit und Herzinsuffizienz erheblich.

Der Goldstandard, um die arterielle Steifigkeit zu quantifizieren, ist die PWV (*pulse wave velocity*, Pulswellengeschwindigkeit).<sup>16, 17</sup> Durch die zunehmende Versteifung der Arterien kommt es zum Anstieg der PWV und des Pulsdrucks (*pulse pressure*, PP). Die erhöhte PWV führt zu einer früheren Reflektion der Pulswelle, wodurch es zu einem erhöhten systolischen Blutdruck kommt. Der diastolische Druck hingegen fällt ab und führt so zu einer Minderperfusion der Koronararterien während der Diastole des Herzens. Infolge der erhöhten systolischen Drücke kommt es unter anderem zu Linksherzhypertrophie, diastolischer Dysfunktion und einer erhöhten Nachlast.<sup>1, 18</sup> Diese stellen wiederum Risikofaktoren für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar.<sup>19, 20</sup>

Eine weitere Komponente, die die Gefäßveränderungen im Alter bedingt, ist eine Verdickung der Gefäßintima und -media.<sup>21</sup> Es wird angenommen, dass eine Verdickung der Intima-Media-Dicke (*intima-media thickness*, IMT) als Vorstufe der Atherosklerose gewertet werden kann. Daher ist eine solche erhöhte IMT als prognostischer Wert für die Entstehung von CVDs anzuerkennen.<sup>1</sup> Die Wandverdickung im Alter ist auf die Intima begrenzt.<sup>1</sup> und kann auf eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO zurückgehen, da NO eine Hyperplasie der Intima verhindern kann und sich somit protektiv auswirkt.<sup>22</sup>

## 1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Veränderungen des Gefäßsystems führen zu einem gehäuften Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen im Alter. Ein hohes Alter ist stark mit CVDs assoziiert und stellt mit 47 % die häufigste Todesursache in Europa dar.<sup>3</sup> Als kardiovaskuläre Erkrankungen werden Krankheiten bezeichnet, die das Herz-Kreislauf-System betreffen. Dazu zählen der Apoplex, der Myokardinfarkt und die koronare Herzkrankheit (KHK). Jedes Jahr sterben ca. 4,1 Millionen Menschen in Europa an kardiovaskulären Erkrankungen.<sup>3</sup> Die Prävention und die Behandlung dieser Erkrankungen bilden daher heutzutage einen wesentlichen Teil der kardiologischen ärztlichen Tätigkeit.

Neben den Mortalitätsraten sprechen auch wirtschaftliche Aspekte für die Notwendigkeit einer effektiveren Eindämmung der CVDs, denn der immense Anstieg dieser Krankheiten ist mit hohen Kosten verbunden. Die direkten und indirekten Kosten für die EU werden so auf ca. 196 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt.<sup>3</sup> Auch angesichts dessen ist es also von höchster Bedeutung, neue

und effektive Ansätze zu entwickeln, die primärpräventiv wirksam sind und das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen somit vermindern können.

### **1.3 Arterielle Hypertonie**

Die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der arteriellen Steifigkeit begünstigen die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie. Der Anstieg des Blutdrucks ist ein altersabhängiger Prozess. Ein physiologischer Blutdruck liegt bei systolischen Werten zwischen 120-129 mmHg und bei diastolischen Werten zwischen 80-84 mmHg vor. Ab systolischen Werten von 140 mmHg und diastolischen Werten von 90 mmHg liegt definitionsgemäß bereits eine Hypertonie vor.<sup>23</sup>

Der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie zufolge liegt die weltweite Prävalenz der Hypertonie im Jahr 2013 insgesamt bei 30-45 %.<sup>23</sup> Zwischen den einzelnen Ländern bestehen dabei Unterschiede bezüglich der jeweiligen Prävalenz. In Deutschland ist diese im Ländervergleich mit 55,3 % sehr hoch.<sup>24</sup> Laut Kearney *et al.* wird die Zahl der Menschen, die an einer Hypertonie leiden, im Jahr 2025 auf ca. 1,65 Milliarden ansteigen.<sup>25</sup> Dies liegt darin begründet, dass nahezu jeder ältere Mensch an einer Hypertonie erkrankt.<sup>1</sup> In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Behandlung einer Hypertonie bei älteren Menschen eine Abnahme der kardiovaskulären Letalität um 38 % bewirken kann. Außerdem konnten kardiovaskuläre Ereignisse durch eine Behandlung der Hypertonie um 60 % gesenkt werden.<sup>26</sup> Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der effektiven Behandlung der Hypertonie besonders auch bei alten Menschen eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Mit der Inzidenz dieser Krankheit steigt auch die Anzahl der Menschen, die Medikamente zur Therapie der Hypertonie einnehmen müssen. Von diesen müssen viele nicht nur mit einem, sondern gleich mit mehreren Medikamenten therapiert werden, um den Bluthochdruck einzustellen. Ca. ein Drittel der Patienten benötigt sogar drei oder mehr Medikamente zur korrekten Einstellung ihres Bluthochdrucks.<sup>27</sup>

### **1.4 Präventionsmaßnahmen**

Abgesehen von der medikamentösen Therapie gibt es wenig Strategien, um die altersabhängigen vaskulären Veränderungen beeinflussen zu können. Die ersten Präventionsmaßnahmen greifen in den Lebensstil der Patienten ein. Entsprechend existieren nationale Richtlinien, um beispielsweise der arteriellen Hypertonie vorzubeugen. Zu diesen zählen unter anderem die Kontrolle des Körpergewichts bzw. eine gesunde Ernährung, der gemäßigte Umgang mit Alkohol, der Verzicht auf Tabakprodukte und ein reduzierter Genuss von Salz.<sup>28</sup>

Anderen Ansätzen, die sich mit der nichtpharmakologischen Behandlung der Hypertonie beschäftigen, wurde bereits vor geraumer Zeit nachgegangen. Schon Anfang des 20. Jahrhunderts wurde der Zusammenhang zwischen einer vegetarischen Diät und einer Blutdrucksenkung in verschiedenen Populationen beobachtet.<sup>29, 30</sup> Seitdem beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit dem Einfluss der Ernährung auf die kardiovaskuläre Gesundheit.

So sind bereits verschiedene diätetische Maßnahmen bekannt, die positiven Einfluss auf den Blutdruck nehmen können. Solche konnten auch Appel *et al.* 1997 in der DASH-Studie (*dietary approaches to stop hypertension*) belegen. Diese Studie wurde durchgeführt, um die Veränderungen des Blutdrucks zu erfassen, die eine Diät mit vielen Früchten und viel Gemüse mit sich brachte. Dabei wurde kein spezieller Inhaltsstoff fokussiert, sondern der Effekt von Obst und Gemüse im Allgemeinen beobachtet.<sup>31</sup>

Des Weiteren wurde demonstriert, dass das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen durch einen täglichen Verzehr von Obst und Gemüse sinkt.<sup>32</sup> In einer Metaanalyse von 12 Kohortenstudien mit insgesamt 1,5 Millionen Probanden konnte gezeigt werden, dass durch eine solche mediterrane Diät eine signifikante Reduktion der gesamten und der durch CVDs bedingten Mortalität erreicht werden konnte.<sup>33</sup>

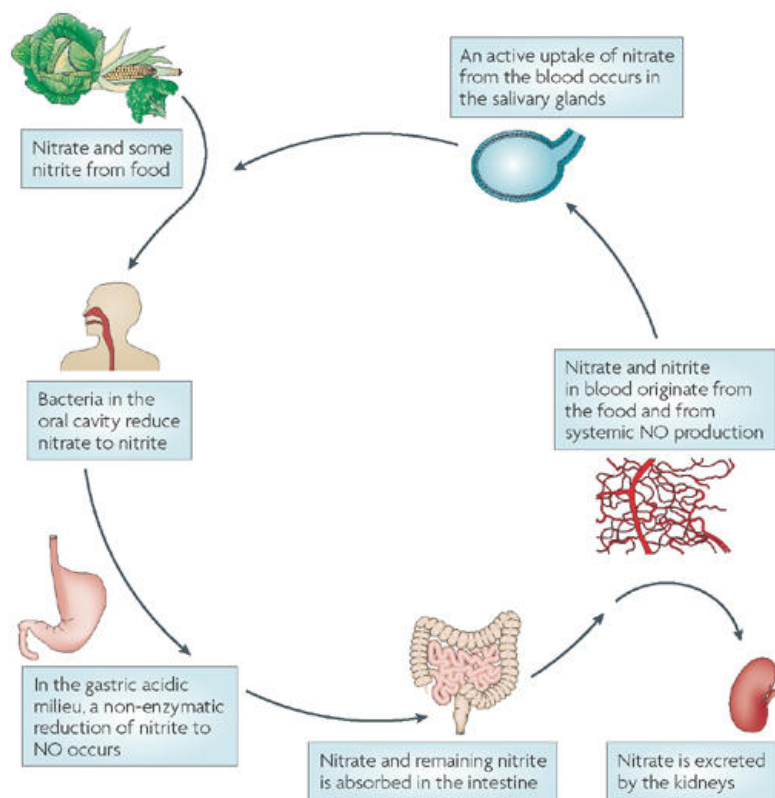
Nachdem so nachgewiesen wurde, dass der Konsum von Obst und Gemüse einen positiven Effekt auf die Senkung des Blutdrucks hat, sollte dem dies auslösenden Mechanismus auf den Grund gegangen werden. In einigen Studien wurde gezeigt, dass besonders der Verzehr von grünem Blattgemüse (Spinat, Salat) und Kreuzblütlern (Broccoli, Rosenkohl, Kohlrabi) das Risiko, an einer KHK oder an einem Schlaganfall zu erkranken, signifikant reduzieren konnte.<sup>34, 35</sup> Da diese Gemüsesorten anorganisches Nitrat in hohen Konzentrationen aufweisen,<sup>36</sup> führten diese Beobachtungen zu der Annahme, dass anorganisches Nitrat zu den positiven Effekten auf das kardiovaskuläre System beisteuern würde.<sup>37</sup> Dieses Nitrat wirkt über die Reduktion zu NO, welches die Gefäßfunktion letztendlich beeinflusst.

## 1.5 Diätetisches Nitrat

Bis vor einigen Jahren wurden Nitrit und Nitrat als inerte Abfallprodukte von NO angesehen: Ihnen wurde keine besondere Funktion zugesprochen. Diese Ansichten haben sich im Laufe der Jahre jedoch gewandelt, denn anders als zuvor angenommen konnte gezeigt werden, dass Nitrat zu Nitrit und schließlich wieder zu NO reduziert werden kann. Hierdurch wurde eine Alternative zum klassischen L-Arginin-NO-Synthase-Signalweg dargestellt. Deshalb ist vor allem Nitrit sowohl ein wichtiger verfügbarer NO-Speicher als auch eine Gewebsspeicherform von bioaktivem NO.<sup>38</sup> Der Nitritspiegel im Plasma, der zu 70 % aus der Oxidation von NO entsteht, weist daher auf die endogene Produktion von NO hin.<sup>39</sup> Neben der

Oxidation des endothelial gebildeten NOs beeinflusst allerdings besonders auch die Nahrungsaufnahme die plasmatische Konzentration von Nitrit. Nimmt man nitratreiche Lebensmittel zu sich, wird das aufgenommene Nitrat durch den enterosalivären Zyklus über mundständige Bakterien zunächst zu Nitrit reduziert und über den Speichel geschluckt (Abb.1). Im Magen-Darm-Trakt wird es dann resorbiert und im Gewebe über verschiedene Reaktionen in bioaktives NO umgewandelt.<sup>40</sup> Ein großer Teil davon wird über die Nieren ausgeschieden.<sup>41</sup> Im Plasma steigen dadurch die Nitrit- und Nitratspiegel an, wodurch der NO-Pool beeinflusst werden kann.<sup>41, 42</sup>

Das exogene, also mit der Nahrung aufgenommene Nitrat spielt eine entscheidende Rolle als Quelle für den Nitrit- und den NO-Pool.<sup>41</sup> In hohen Konzentrationen findet man Nitrat in Lebensmitteln wie Rucolasalat (3,35 mmol pro 80 g), Spinat (2,76 mmol pro 80 g) oder Roter Bete (1,88 mmol pro 80 g).<sup>43</sup> Dem Mechanismus der Blutdrucksenkung durch das oral aufgenommene Nitrat liegt der enterosaliväre Kreislauf zugrunde.<sup>44</sup>



Nature Reviews | Drug Discovery

Abb. 1: **Enterosalivärer Kreislauf:** Reduktion oral aufgenommenen Nitrats zu Nitrit durch kommensale Bakterien im Mund. Im Magen-Darm-Trakt wird das Nitrit schließlich nicht-enzymatisch zu NO reduziert. Das übrige Nitrat und Nitrit kann intestinal in den Blutkreislauf absorbiert werden. Außerdem wird Nitrat über die Nieren ausgeschieden. Des Weiteren kann es in den Speicheldrüsen konzentriert und dem Kreislauf so wieder zugeführt werden. Aus Lundberg et al.<sup>44</sup>



NO ist ein wichtiges intra- und interzelluläres Signalmolekül, das an zahlreichen Regulationsmechanismen im Herz-Kreislauf-System, Immunsystem und Nervensystem beteiligt ist.<sup>45</sup> Zudem ist es ein Vasodilatator und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung des physiologischen Gefäßdrucks.<sup>44, 45</sup> Einerseits wird es durch die NOS endogen synthetisiert, andererseits durch exogene Zufuhr über Nahrungsmittel aufgenommen. In einer Redoxreaktion wird NO aus dem Gefäßendothel durch eine endotheliale NOS aus der Aminosäure L-Arginin gebildet.<sup>46</sup> Nach der Bildung diffundiert es in die benachbarte Gefäßmuskelzelle. Dort kann es den Kalziumsignalweg beeinflussen, indem es wichtige kalziumregulierende Proteine moduliert. Hierzu zählen die *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase* (SERCA), der Ryanodin-Rezeptor und der L-Typ-Kalziumkanal, die für die Relaxation der glatten Muskulatur zuständig sind.<sup>47-49</sup> Außerdem aktiviert NO die NO-sensitive Guanylat-Cyklase (sGC). Diese wiederum katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zum aktiven zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP). Letzteres aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche zur Gefäßrelaxation führt, indem verschiedene Zielproteine phosphoryliert werden. Zu diesen zählen zum Beispiel die Myosin-Leichtketten-Kinase oder der IP3-Rezeptor, der über die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $\text{Ca}^{2+}$ ) reguliert wird.<sup>50</sup> Im Körper existieren für die NO-Bildung neben dem enterosalivären Kreislauf einige NOS-unabhängige Wege: die nichtenzymatische, azidische Disproportionierung sowie die Reaktion von Nitrit mit Desoxyhämoglobin und Desoxymyoglobin unter hypoxischen Gegebenheiten.<sup>44, 51</sup>

Aufgrund der Erkenntnis, dass oral aufgenommenes Nitrat über NO Einfluss auf die Gefäßfunktion ausüben kann, führten Larsen *et al.* eine Studie durch, in der junge, gesunde Probanden 3 Tage lang entweder Nitrat gelöst in Wasser oder ein Placebo erhielten. Diese Studie zeigte, dass das anorganische Nitrat den diastolischen Blutdruck verglichen mit der Placebogruppe um 3,7 mmHg senkte. Bezüglich des systolischen Blutdrucks wurde kein Effekt beobachtet.<sup>52</sup>

Ob eine im Alter bestehende eingeschränkte Gefäßfunktion mithilfe von Nitrat verbessert werden kann, ist nicht klar. Es war von höchster Relevanz, dass die von uns durchgeführte Studie nur minimal in den Lebensstil der Probanden eingreifen würde: Dadurch sollte sichergestellt werden, dass sie möglicherweise zur Entwicklung einer praktikablen, alltagstauglichen Maßnahme zur Primärprävention für kardiovaskuläre Krankheiten dienen kann.

## **1.6 Problemstellung**

Aufgrund des derzeitigen Kenntnisstands über die Wirkung von Nitrat auf das Herz-Kreislaufsystem, ergeben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welchen Effekt hat diätetisches Nitrat auf die endotheliale Funktion älterer Menschen?
2. Wie werden die arterielle und die aortale Gefäßsteifigkeit durch eine chronische Supplementierung von Nitrat beeinflusst?
3. Kann der Blutdruck bei älteren Menschen durch eine Nitrateinnahme gesenkt werden?
4. Wie verändern sich die Nitrit- und Nitratspiegel sowie die nachgeschalteten Signalwege im Plasma und im Gewebe durch eine chronische diätetische Supplementierung von Nitrat?

## **2 Material und Methoden**

Um die Frage zu klären, ob eine diätetische Supplementierung von Nitrat beim Menschen eine Verbesserung der im Alter bestehenden eingeschränkten Gefäßfunktion bewirken kann, wurde eine klinische Studie durchgeführt.

### **2.1 Klinische Studie**

#### **2.1.1 Studiendesign**

Für die klinische Studie wurde ein randomisiertes, doppelblindes, placebokontrolliertes Design gewählt. Dazu wurden sowohl die Probanden als auch das Prüfpräparat bzw. das Placebo von unbeteiligten Personen aus dem Labor randomisiert und jeweils zugeordnet. Die Probanden wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe (n=11) erhielt als Prüfpräparat anorganisches Nitrat (150 µmol/kg Körpergewicht pro Tag). Um die Ergebnisse vergleichen zu können, erhielt die andere Gruppe (n=10) als Placebo täglich Kochsalz (NaCl) (150 µmol/kg Körpergewicht pro Tag).

#### **2.1.2 Studienprotokoll**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte klinische Studie wurde unter der *Clinical Trials*-Nummer NCT01729234 registriert.

Der Ethikantrag, um die Studie durchführen zu können, wurde am 21.12.2011 von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Studiennummer 3719 genehmigt.

Das Studienprotokoll der klinischen Studie setzt sich aus folgenden Teilen zusammen: Probandenrekrutierung, klinische Untersuchung, verschiedene nichtinvasive Untersuchungen der vaskulären Funktion, Blutabnahme und schließlich Ausgabe des Präparats bzw. des Placebos.

Die Teilnehmer der Studie wurden zunächst in einem Aufklärungsgespräch über die Untersuchungen informiert. Anschließend wurde eine internistische Anamnese zur Erfassung von Krankheiten, kardiovaskulären Risikofaktoren und Art und Umfang gegebenenfalls aktueller täglicher Medikationen erhoben. Die Untersuchungen erfolgten jeweils morgens, nachdem die Probanden nüchtern erschienen.

Im Anschluss an eine ca. 10-minütige Ruhephase auf einer Liege wurde der Blutdruck der Probanden in Doppelbestimmung gemessen. Danach wurde eine

Blutentnahme durchgeführt, woraus gängige Laboruntersuchungen und einige für die Studie relevante Parameter wie unter anderem Elektrolyte, Plasmaproteine und Nierenwerte bestimmt wurden. Anschließend erfolgten Untersuchungen zur aortalen und arteriellen Steifigkeit durch eine Applanationstonometrie (SphygmoCor, AtCor Medical, Meinerzhagen, Germany) und die Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis. Diese umfasste die Quantifizierung der endothelabhängigen (FMD) und bei den meisten Probanden auch einer endothelunabhängigen Dilatation nach oraler Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN). Hiernach wurde der Blutdruck erneut gemessen.

Nachdem die körperlichen Untersuchungen beendet waren, füllten die Probanden zum einen einen Ernährungsfragebogen und zum anderen einen Fragebogen, der sich mit dem körperlichen und psychischen Wohlbefinden befasste, aus.

### **2.1.3 Studienkollektiv**

Um altersabhängige Veränderungen der vaskulären Funktion untersuchen zu können, wurden für diese Studie nur Probanden ausgewählt, die über 60 Jahre alt waren. Dabei musste sichergestellt werden, dass die gemessenen Ergebnisse wirklich auf das Prüfpräparat zurückzuführen sind und nicht durch andere Faktoren wie zum Beispiel Medikamente beeinflusst werden konnten. Deswegen wurden im Rahmen dieser Studie nur gesunde Probanden von über 60 Jahren untersucht, die keine kardiovaskulären Erkrankungen aufwiesen und dementsprechend auch keine kardiovaskuläre Medikation einnahmen. Allerdings wiesen die Probanden einen moderat erhöhten *HeartScore* auf. Der *HeartScore* stellt eine Möglichkeit dar, das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko eines Patienten einschätzen zu können. Angepasst an verschiedene Länder, die unterschiedlichen Stufen von kardiovaskulären Risiken unterliegen, basiert der *HeartScore* auf folgenden Faktoren: Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Cholesterinspiegel und systolischem Blutdruckwert.

### **2.1.4 Endotheliale Funktion**

#### **Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der endothelabhängigen und endothelunabhängigen Dilatation der Arteria brachialis**

Das Verfahren der flussvermittelten Dilatation (*flow-mediated dilation*, FMD) beruht auf einer flussvermittelten Vasodilatation nach Hyperämie und dient der Bestimmung der Endothelfunktion. Durch die scherkraftinduzierte Stimulation der eNOS kommt es zu einer Diameterzunahme der Arteria brachialis.<sup>11, 53</sup>

Nach einer 10-minütigen Ruhephase auf einer Liege wurde die Arteria brachialis oberhalb der Bifurkation im Bereich der Ellenbeuge duplexsonographisch dargestellt. Die Aufzeichnungen erfolgten mithilfe eines hochauflösenden 15 MHz

Linear Array-Schallkopfs (Vivid i ultrasound, GE Healthcare, Munich, Germany). Die Messungen erfolgten enddiastolisch EKG-getriggert zur R-Zacke. Die Eindringtiefe des Ultraschalls betrug 3 cm. Der Diameter der Arteria brachialis wurde dadurch festgelegt, dass beide Arterienwände klar vom Lumen abgrenzbar waren.<sup>11</sup> Um eine reaktive Hyperämie zu induzieren, wurde eine Blutdruckmanschette auf suprasystolische Werte aufgepumpt. Die Stauung erfolgte für 5 Minuten. Dann wurde der Diameter der Arterie nach 20, 40, 60, 80 und 100 Sekunden bestimmt. Außerdem wurde der Diameter nach einer darauf folgenden 10-minütigen Ruhephase erneut bestimmt. Im Anschluss wurden dem Probanden 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN, Nitrolingual, Pohl, Deutschland) verabreicht.<sup>53</sup> Vier Minuten später erfolgte die erneute Messung des Diameters und es wurden kontinuierlich drei Herzzyklen aufgenommen. Abschließend wurde der arterielle Blutdruck des Probanden erneut kontrolliert. Die Messung erfolgte offline mittels spezieller Software (MIA Vascular Research Tools). Die Untersuchungen fanden bei Raumtemperatur in einem ruhigen Raum statt.

Durch die ischämische Vasodilatation, auf die ein gesteigerter Blutfluss folgte, kam es zu einer Steigerung der Schubspannung. Scherkraftinduziert wurde über die eNOS vermehrt endotheliales NO freigesetzt wurde. Daher kam es zu einer Vasodilatation der Arteria brachialis.<sup>11</sup>

Verschiedene Faktoren können für eine Einschränkung der FMD verantwortlich sein. Dazu zählen eine reduzierte eNOS-Aktivität, aber auch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder ein vermehrter NO-Abbau. Im Anschluss an die endothelabhängige Dilatation wurde daher auch die endothelunabhängige Dilatation bestimmt. Sowohl die endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Dilatation wurden als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter gemessen.<sup>53</sup>

### **2.1.5 Gefäßsteifigkeit**

Mit dem SphygmoCor (AtCor Medical, Australia) steht ein klinisch validiertes System zur Verfügung, welches die hämodynamischen Veränderungen bei erhöhter arterieller Gefäßsteifigkeit nichtinvasiv erfasst. Es beruht auf der Applanationstonometrie.<sup>54</sup>

Das stiftgrosse Tonometer wird mit leichtem Druck auf der jeweiligen abzuleitenden Arterie (Arteria femoralis, Arteria carotis, Arteria radialis) aufgesetzt. Über einen Sensor können nun die Blutdruckveränderungen gemessen werden; zudem kann so die Pulswelle aufgezeichnet werden. Damit wird ein Durchschnitt der Pulswellen und somit auch ein Qualitätsindex erstellt.

### 2.1.5.1 PWV

Die Pulswellengeschwindigkeit (*pulse wave velocity*, PWV) bezeichnet die Geschwindigkeit, mit der sich die Druckwelle des aus dem linken Ventrikel ausgeworfenen Volumens peripher über das arterielle Gefäßsystem ausbreitet.<sup>17</sup> Zur PWV-Messung erfolgt die Aufzeichnung der Pulswellen an der Arteria carotis und der Arteria femoralis in der Leiste des Probanden. Um die Zeitspanne vom Beginn der Pulswelle in der Systole bis hin zu ihrer Ankunft in der Peripherie bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein EKG aufgezeichnet.<sup>55</sup> Danach wurde die Distanz zwischen dem Messpunkt an der Arteria carotis und dem an der Arteria femoralis mit einem Messband gemessen. Die besagte Geschwindigkeit konnte dann mithilfe der Formel Weg/Zeit in m/s ermittelt werden.<sup>55</sup>

### 2.1.5.2 AIX@75

Ein Maß für die Zunahme des zentralen arteriellen Drucks stellt der Augmentationsindex dar, der durch eine erhöhte Pulswellenreflexion gekennzeichnet ist: Die durch den linken Ventrikel ausgeworfene Druckwelle wird peripher an den Gefäßabgängen reflektiert. Durch die retrograd laufende Druckwelle führt sie zur zusätzlichen Erhöhung des Blutdrucks.<sup>56</sup> Die absolute zentrale Blutdruckzunahme als Folge der Pulswellenreflexion wird als Augmentation in mmHg angegeben. Der durch die reflektierte Welle verursachte Druckanstieg wird als Augmentationsdruck (*augmentation pressure*, AugP) bezeichnet. Die Augmentation dividiert durch die Blutdruckamplitude ergibt den Augmentationsindex. Somit zeigt der Augmentationsindex die Erhöhung des zentralen Blutdrucks durch die reflektierte retrograde Druckwelle auf.<sup>55, 56</sup> Dieser wird wegen seiner Abhängigkeit von der Herzfrequenz (HF) auf eine HF von 75 Schlägen pro minute (bpm) automatisiert umgerechnet.<sup>57</sup> Ein weiteres Maß für die Gefäßelastizität ist der *pulse pressure* (Pulsdruck, PP). Dieser berechnet sich aus der Differenz von systolischem und diastolischem Blutdruckwert.

### 2.1.5.3 IMT (intima-media thickness)

Mittels Sonographie wurde der Abstand von der Tunica intima bis zur Tunica media der Arteria carotis communis der Probanden bestimmt, um atherosklerotische Gefäßveränderungen erfassen zu können.<sup>58</sup> Später wurde der Abstand mithilfe eines Computerprogramms ausgemessen. Die Messungen wurden sowohl vor als auch nach der 4-wöchigen Nitrateinnahme durchgeführt, um eventuelle Veränderungen der Gefäßwanddicke zu erfassen.

### **2.1.6 Hämodynamik**

Um den Effekt der Supplementierung von Nitrat auf den Blutdruck zu untersuchen, wurde dieser zweimalig nach einer Ruhephase von 10 Minuten, die im Liegen verbracht wurde, gemessen.

### **2.1.7 Blutabnahme**

Nach einer 10-minütigen Ruhephase der Probanden erfolgte die Blutentnahme aus der Kubitalvene, welche mit einer Einwegkanüle (W.I.N. 21G, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) punktiert wurde. Als Erstes erfolgte die Bestimmung des Routinelabors mit Blutproben in Vakuurröhrchen (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Großbritannien). Pro Proband wurden 2 EDTA-Röhrchen, 1 Lithium-Heparin-Röhrchen und 1 Serumröhrchen für das Zentrallabor abgenommen.

Im Anschluss daran wurden 2-mal 3,6 ml Blut zur Bestimmung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat entnommen. Die Blutproben wurden in 5 ml-Einwegspritzen (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) entnommen. Anschließend wurden sie direkt in 15 ml-Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland), welche mit 3,6 µl Heparin (Heparin: 10 IE/ml; Liquemin N5000, Wirkstoff: Heparinatrium, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, Wyhlen, Deutschland) befüllt waren und auf Eis lagen, überführt. Außerdem wurden für weitere biochemische Analysen weitere 2 EDTA-Röhrchen und 1 Serumröhrchen mit Blut gefüllt.

### **2.1.8 Bestimmung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma**

Die Messung von Nitrit und Nitrat im Plasma der Probanden wurde mittels HPLC-Technik (NOx-Analyzer ENO-20 EiCom, Kyoto, Japan) durchgeführt. Der NOx-Analyzer ist in der Lage, Nitrit und Nitrat mittels einer Kombination aus Farbstoffbildung (Griess-Reaktion) durch eine Diazokupplung mit Griess-Reagenz und der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) zu messen. Durch eine Umkehrphasenchromatographie werden Nitrit und Nitrat aufgetrennt.<sup>59, 60</sup>

Die dafür zuvor bei -80°C eingefrorenen Plasmaproben wurden lichtgeschützt auf Eis aufgetaut; zur Proteinfällung wurden sie mit auf -20°C gekühltem Methanol im Verhältnis 1:1 vermengt und bei 4°C für 10 Minuten bei 10000x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und in HPLC-Reaktionsgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäß 3810, Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling, Deutschland) überführt. Nun wurden die Proben in den vorgeschalteten Autosampler (Varian ProStar 420 Triathlon Cool, Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland) gestellt und hintereinander bei 4°C gemessen. Durch die mobile Phase aus Chloridpuffer (0,3 M NaCl und 0,1 M NH<sub>4</sub>Cl, pH 8,5) wurde die Probe

mit einem konstanten Fluss durch das System geleitet. Dieses besteht aus 3 Säulen: einer Vorsäule (NO-PrePAK, EiCom, Dublin, Irland), die noch vorhandene Proteine eliminiert, einer Trennsäule (NO-PAK, EiCom, Dublin, Irland) und einer Reduktionssäule (NO-RED, EiCom, Dublin, Irland). In der Trennsäule mit einer stationären Phase aus Polystyrol-Divinylbenzol-Harz kommt es durch die höhere Polymeraffinität des Nitrats zu einer zeitlichen Trennung von Nitrit und Nitrat. Durch Anionen der mobilen Phase werden Nitrit und Nitrat wieder abgelöst und im System weiter transportiert. Das Nitrat wird dann mittels Cadmium-Kupfergranulat in der Reduktionssäule zu Nitrit reduziert. Durch die Bildung von Diazoverbindungen nach Zuführung von Griess-Reagenz (Sulfanilamid und N-(1-naphthyl)ethylendiamin) kann es dann sowohl in seiner primären Form als auch in seiner Form als aus Nitrat reduziertes Nitrit spektrometrisch gemessen werden. Dies erfolgt mithilfe des UV/Vis-Spektrophometers (EiCom, Dublin, Irland), welches die Absorption der Azoverbindung bei 540 nm Wellenlänge misst und es ermöglicht, die Konzentration von Nitrit und Nitrat als AUC (*area under the curve*) über eine PC-Schnittstelle mithilfe der zugehörigen Software (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) zu berechnen.<sup>61</sup> Die Kalibrierung der Software wird dabei mit standardisierten Nitrit- und Nitratlösungen durchgeführt. Auf diese Weise können Nitritwerte bis zu einem Schwellenwert von 1 nmol/l detektiert werden.

### **2.1.9 Ernährungsfragebogen**

Damit ein Überblick über die Ernährungsgewohnheiten der Probanden gewonnen werden konnte, füllten diese insgesamt 4 Ernährungsfragebögen aus. Jeweils an Tag 1, Tag 10, Tag 20 und Tag 30 sollten die Probanden aufschreiben, was sie in den letzten 24 Stunden an Lebensmitteln und Getränken zu sich genommen hatten. Die Fragebögen dienten außerdem zur Kontrolle, falls ein Proband extrem hohe Nitritwerte im Plasma aufwies, damit gegebenenfalls ein Zusammenhang zu dessen Ernährung ausgeschlossen werden konnte.

#### **2.1.10 SF-36**

Jeweils am ersten und auch am zweiten Untersuchungstag füllten die Probanden einen SF-36-Gesundheitsfragebogen (Short-Form-Fragebogen) aus. Dieser bezieht sich auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität der Probanden innerhalb der letzten 4 Wochen und dient der Verlaufsmessung derselben. Er setzt sich aus acht Domänen zusammen, mit denen der individuelle Gesundheitszustand jeweils vor und nach der Intervention erfasst werden sollte:

- *körperliche Funktionsfähigkeit*
- *körperliche Rollenfunktion*
- *körperliche Schmerzen*
- *allgemeine Gesundheitswahrnehmung (\*)*



- *Vitalität (\*)*
- *soziale Funktionsfähigkeit*
- *emotionale Rollenfunktion*
- *psychisches Wohlbefinden (\*)*
- *körperliche Summenskala*
- *psychische Summenskala*

Maximal konnte für jede Skala ein Wert von 100 erreicht werden. Die Werte zwischen 0 und 100 stellen den prozentualen Anteil der höchstmöglichen mit dem SF-36 messbaren gesundheitsbezogenen Lebensqualität in einer Skala an. Ein hoher Wert in einer Skala ist dabei also jeweils positiv zu werten. So deutet ein hoher Wert in der Skala der *körperlichen Funktionsfähigkeit* zum Beispiel auf eine gute körperliche Funktionsfähigkeit hin. Die mit einem Stern (\*) markierten Skalen der *allgemeinen Gesundheitswahrnehmung*, der *Vitalität* und des *psychischen Wohlbefindens* sind allerdings bipolar konstruiert. Das bedeutet, dass die Probanden mit mittleren Skalenwerten keine Einschränkungen bezüglich der jeweiligen Kategorien angaben und bereits solche mittleren Werte in diesen Skalen also positiv zu werten sind. Liegen die Werte hier dagegen sehr hoch, dann schätzten die Probanden ihren Zustand entsprechend als besonders positiv ein.

### **2.1.11 Probenaufarbeitung**

Alle vorbereiteten Lösungen, die Röhrchen der Firma Greiner und die Zentrifugen wurden während der gesamten Aufarbeitung auf 4°C gekühlt. Zur Separation des Plasmas von zellulären Bestandteilen wurden sowohl die mit Heparin antikoagulierten Blutproben als auch die mit EDTA antikoagulierten Blutproben 10 Minuten lang bei 4°C und 800x g zentrifugiert. Das Serumröhrchen wurde zunächst 30 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 10 Minuten lang bei 4°C und 800x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### **2.1.12 Klinisches Routinelabor**

Dem Zentrallabor ließen wir Proben zukommen, um wichtige Parameter im Blut bestimmen zu lassen. Neben einem kleinen Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Hb, Hkt, Thrombozyten), den Elektrolyten (Natrium, Kalium, Kalzium, Phosphat, Magnesium und Eisen), verschiedenen Enzymen (CK/CK-MB, LDH, GOT, GPT, GGT, AP, CHE, Amylase), verschiedenen Plasmaproteinen (Gesamteiweiß, CRP, Troponin, Albumin, Cystatin C, Ferritin, Transferrin, Transferrinsättigung,

Haptoglobin) und den Nierenwerten (Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Bilirubin gesamt) wurden dort auch die Werte von NT-pro-BNP und ACE bestimmt. Außerdem wurden Homocystein, TSH und Cholesterinwerte (Cholesterin, Triglyceride, HDL-/ LDL-Cholesterin) sowie der HbA1c gemessen.

## 2.2 Tierexperimentelle Studie

Um die diesen Beobachtungen aus der klinischen Studie zugrundeliegenden Mechanismen und Signalwege eruieren zu können und festzustellen, ob diätetisches anorganisches Nitrat Einfluss auf den NO-Spiegel im Gewebe nimmt, wurde eine tierexperimentelle Studie durchgeführt.

### 2.2.1 Versuchstiere und Studiendesign

Mit dem Ziel, altersabhängige Unterschiede des NO-Pools zu untersuchen, wurden in einem tierexperimentellen Ansatz junge (6 Monate, YN) und alte (22 Monate, ON) Wild-Typ-Mäuse vom Stamm C57 Bl 6 von der Firma Janvier aus Frankreich verwendet. Die Tiere wurden in den Räumlichkeiten der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter standardisierten Haltebedingungen (20 mbar, 24°C, 40 % Luftfeuchtigkeit, 12 h Tag-/Nachtzyklus, Futter/Wasser *ad libitum*) versorgt. Über 8 Wochen wurden die Versuchstiere über das Trinkwasser mit jeweils 1 g/l diätetischen Nitrats ( $\approx 150$   $\mu\text{mol}$  gemessen an der täglichen Trinkmenge) versorgt und mit gleichaltrigen Kontrolltieren (YC, OC) verglichen. Die Nitrit- und Nitratlevel sowohl im Plasma als auch im kardiovaskulären Gewebe der alten und nitratreich ernährten Tiere wurden via HPLC und ENO gemessen. Alle Versuche wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (AZ 84-02.04.2011.A189).

### 2.2.2 Organentnahme

Um die Nitrit- und Nitratlevel im Gewebe der Tiere messen zu können, wurden den Tieren durch Mitarbeiter des kardiologischen Labors folgende Organe entnommen: Aorten, Herzen, Lebern und Lungen. Dazu wurden die Tiere gewichtsadaptiert mit Ketanest (100mg/kgKG) und Xylazin (10mg/kgKG) narkotisiert und dann mit einer N-Ethylmaleimid-Lösung (NEM) perfundiert. Das NEM wurde täglich frisch angesetzt und beinhaltete 0,63 g NEM, welches in 500 ml PBS im Ultraschallbad aufgelöst wurde. Anschließend wurden 2,5 ml EDTA hinzugegeben. Die Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer -80°C Kühltruhe aufbewahrt.

### 2.2.3 Bestimmung der RXNO-Konzentration im Gewebe

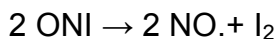
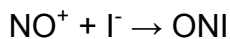
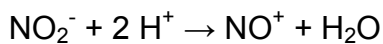
Die CLD (ECO PHYSICS, Switzerland) wird zur Bestimmung der NO-Metaboliten (RXNO) unter anderem im Gewebe eingesetzt. Das Prinzip derselben beruht darauf, dass Lichtquanten gemessen werden, die bei der Reaktion von NO mit Ozon äquimolar zur Nitrit- und Nitrosothiolkonzentration der Probe freigesetzt werden.<sup>62, 63, 64</sup>

Vor jeder Analyse erfolgt eine Eichung der Anlage durch dreifache Aufgabe einer Nitritstandardreihe.

Um NO aus der Probe freisetzen zu können, werden je 100 µl mit einer Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) 3-mal in ein Glasinjektionsgefäß gegeben. Dort sind 40 ml einer iodhaltigen, reduktiven Reaktionslösung enthalten, die sich aus 0,81 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,285 g Iod (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in 7,5 ml HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) und versetzt mit 100 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammensetzt. Die Reaktionslösung wird durch ein zirkulierendes Wasserbad auf 60°C erhitzt.

In diesem sauren Medium wird Nitrit äquimolar zu NO reduziert.

Dabei werden zunächst aus dem in der Probe enthaltenem Nitrit Nitrosoniumionen (NO<sup>+</sup>) freigesetzt, die mit Iodid (I<sup>-</sup>) weiter zu NO reagieren. Nach Zusatz von Sulfanilamid stammte das freigesetzte NO ausschließlich aus den Thiolbindungen.  
62, 65



Das gebildete NO wird nun durch Helium als inertes Trägergas zur Reaktionskammer befördert. Das NO tritt in die Gasphase über und strömt zunächst durch ein Kondensatorsystem, um wässrige Bestandteile zu eliminieren. Danach fließt es durch eine Glaskammer. Diese ist mit gekühlter 1 M Natronlauge (NaOH) gefüllt und dient dem Abfangen von höheren Stickoxiden aus dem Gas. Der Kammer wird aus Sauerstoff generiertes Ozon zugeleitet. Ozon reagiert mit NO zu energetisch angereichertem Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>). Ein Teil des gebildeten NO<sub>2</sub> befindet sich in einem angeregten Zustand (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>). Dessen Energie wird dann als Photon frei:



Die Lumineszenzreaktion findet in der Reaktionskammer statt. Das emittierte Licht ist direkt proportional zur NO-Konzentration der Probe.<sup>62</sup> Das Signal wird als Fläche unter der Kurve gemessen (*area under the curve*, AUC). Zur Datenaufnahme und -integration dient ein PC mit der Software ChromStar der Firma SCPA aus Weyhe-Leeste, Deutschland.

#### 2.2.4 cGMP-Bestimmung

NO kann in der glatten Muskelzelle der Gefäßwand über die Aktivierung der Guanylatzyklase und eine Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat

(cGMP) vasodilatatorisch wirken. cGMP ist im Körper ein wichtiger *second messenger* und aktiviert die Proteinkinase G (PKG), welche andere Proteine, die zur Gefäßrelaxation beitragen, phosphoryliert.<sup>66</sup> Um somit eine Erhöhung der cGMP-Spiegel in den Aorten der Mäuse nachweisen zu können, wurde das Kit RPN 226 von GE Healthcare Life Sciences nach Herstellerangaben verwendet.

Zuerst wurde das Gewebe in 6 % Trichloressig bei einer Verdünnung von 1:10 bei 4°C homogenisiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 4°C und 2000x *g* wurde der entstandene Überstand abgenommen und in Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde er 4-mal mit dem 5-fachen Volumen an Diethylether gewaschen, wobei die obere Etherschicht bei jedem Waschschrift entfernt wurde. Im Anschluss daran wurde das Extrakt in der SpeedVac bei 60°C so lange getrocknet, bis nur ein trockenes Pellet übrig blieb. Dieses wurde dann in 450 µl Assaypuffer aufgelöst.

Die Proteinkonzentration wurde mittels *DC protein assay* (Bio-Rad) nach Herstellerangaben mit einer vorher festgelegten Konzentration aus einer BSA-Standardreihe gemessen.

Zunächst wurde eine Standardkurve angefertigt. Dazu wurde 1 ml des verdünnten Assaypuffers mit 10,24 pmol/ml acetylierten Stock-Standards bis hin zu einer Verdünnung von 512 fmol insgesamt 9-mal verdünnt. Dann wurde zu jeder Probe und zu den Standards die Acetylierungsreagenz hinzugefügt. In die Wells der Platte wurde anschließend das Antiserum pipettiert; Ausnahmen stellten hierbei das Blank und die NSB-Wells (*nonspecific binding*) dar. In Doppelbestimmung wurden dann die Standards und die Proben in die Wells pipettiert. In die für die NSB vorgesehenen Wells kam Assaypuffer hinzu. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden bei 4°C. Danach kam das gelöste cGMP-Konjugat mit Ausnahme des Blanks in alle Wells. Erneut musste die Platte bei 4°C für 1 Stunde inkubieren. Nach dem Waschen wurde sofort das Enzymsubstrat (TMB) in alle Wells pipettiert, um auf einem Plattenshaker 30 Minuten zu inkubieren. Nach der Zugabe von 1 M Schwefelsäure, die den Reaktionsvorgang anhalten sollte, wurden die cGMP-Spiegel der Aorten bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.2.5 PKG-Aktivität**

Um die PKG-Aktivität in Aorten zu messen, wurde das CycLex Cyclic GMP dependent protein kinase (cGK) Assay Kit der Firma MBL International Corporation verwendet.<sup>67, 68, 69, 70, 71</sup>

Das gefrorene Gewebe wurde in dreifachem Volumen DE-Puffer aufgenommen und homogenisiert bzw. gemörsert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurde das Homogenat anschließend bei 30.000x *g* und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde bei den Aorten der Überstand auf Amiconsäulen aufgetragen und erneut zunächst 30 Minuten bei 14000x *g* und anschließend 2

Minuten bei 1000x *g* zentrifugiert. Anschließend wurde er in Eppendorfgefäße überführt, um zur Proteinbestimmung und zum Assay verwendet zu werden.

Zunächst wurde eine Standardverdünnungsreihe mit BSA angefertigt. Dann wurden je 50 µl der zuvor verdünnten Proben und der Standardreihe in die entsprechenden Wells pipettiert. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die vorher nach Herstellerangaben verdünnte Arbeitslösung wurde zu den Standards und Proben pipettiert.

Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte im Photometer bei den Wellenlängen 590 nm und 450 nm vermessen, um die optischen Dichten mithilfe der Referenzwellenlänge zu bestimmen. Die Auswertung erfolgte mit der Photometersoftware.

Vor Durchführung des Assays wurden die *wash solution*, der *kinase reaction buffer* (KRB) und der *cGMP plus kinase reaction buffer* nach Herstellerangaben vorbereitet.

In Doppelbestimmung wurden 10 µl Probe je Well aufgetragen. Außerdem wurde eine Positivkontrolle mit eingeschlossen. Durch Zugabe des *cGMP plus Kinase reaction buffers* wurde die Reaktion in Gang gesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 30°C wurden die Wells gewaschen. Danach wurde *HRP-conjugated detection antibody 10H11* in jedes Well pipettiert und die Platte bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Darauf folgte erneut ein Waschschrift. Nachdem dann die *substrate reagent* in jedes Well aufgetragen worden war, erfolgte eine weitere Inkubationszeit von 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Beobachtung der Farbentwicklung. Dann wurde die Stopplösung in jedes Well gegeben, um anschließend die Messung bei den Wellenlängen von 450 nm und 540 nm durchzuführen.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Sofern dies nicht anders gekennzeichnet wurde, wurden die deskriptiven statistischen Daten als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM) angegeben. Die Daten der tierexperimentellen Studie wurden mithilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und des Post-hoc-Tests (Bonferroni) auf signifikante Unterschiede hin geprüft. Die Werte der klinischen Studie wurden in den einzelnen Gruppen mithilfe eines gepaarten Student's t-Tests überprüft, während die Differenzen zwischen den Gruppen mittels eines ungepaarten t-Tests errechnet wurden. Als statistisch relevant galt ein p-Wert <0,05.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Klinische Studie**

#### **3.1.1 Studienkollektiv**

Insgesamt wurden n=28 Probanden für die Teilnahme an der Studie rekrutiert, von denen n=7 ausgeschlossen werden mussten, da n=5 ihre Teilnahmebereitschaft widerriefen und n=2 die vorgegebenen Kriterien nicht erfüllten. Somit konnten n=21 Probanden entweder in die Nitratgruppe oder in die Placebogruppe randomisiert werden. Die Zuweisung in die jeweilige Gruppe erfolgte doppelblind randomisiert über das kardiologische Labor. Dabei wurden n=11 Probanden der Nitratgruppe und n=10 Probanden der Placebogruppe zugeteilt.

#### **3.1.2 Charakterisierung der Studienpopulation**

Das in die Nitratgruppe eingeteilte Probandenkollektiv bestand aus 4 Frauen und 7 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von  $63\pm 2$  Jahren, einer durchschnittlichen Größe von  $173\pm 3$  cm und einem mittleren Körpergewicht von  $74\pm 5$  kg. Die Gruppe der Personen, die das Placebo zu sich nahmen, bestand hingegen aus 4 Frauen und 6 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von  $63\pm 1$  Jahren, einer durchschnittlichen Größe von  $176\pm 3$  cm und einem mittleren Körpergewicht von  $83\pm 5$  kg.

Zwischen beiden Gruppen bestand somit kein signifikanter Unterschied bezüglich Alter, Körpergröße, Körpergewicht, *HeartScore* und BMI. Bei der Bestimmung der Cholesterinwerte, des CRPs, der Kreatinin- und Triglyceridkonzentration, des HbA1c, des Hämoglobingehalts und der Zahl der Leukozyten konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen ihnen festgestellt werden (siehe Tabelle 1).

	<b>Kontrolle n = 10</b>	<b>Nitrat n = 11</b>	<b>p-Werte</b>
Alter (y)	63 ± 1	63 ± 2	0,68
Größe (cm)	176 ± 3	173 ± 3	0,46
Gewicht (kg)	83 ± 5	74 ± 5	0,23
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26 ± 1	24 ± 1	0,13
Männer/Frauen (n)	6/4	7/4	0,87
Raucher/Nichtraucher (n)	2/8	1/10	0,5
Cholesterin (mg/dl)	219 ± 13	238 ± 11	0,28
CRP (mg/dl)	<0,3	<0,3	0,48
Kreatinin (mg/dl)	0,8 ± 0,1	0,85 ± 0,1	0,42
Triglyceride (mg/dl)	105 ± 13	125 ± 19	0,37
Hba1c (%)	5,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0,14
Hämoglobin (g/dl)	14,5 ± 0,4	14,1 ± 0,3	0,32
Leukozyten (*10/ $\mu$ l)	6,4 ± 0,4	5,6 ± 0,5	0,27
<i>HeartScore</i>	4,7 ± 3,1	4,7 ± 2,5	0,46

Tabelle 1: Charakterisierung der Kontroll- und der Nitratgruppe (MW+SE)

### 3.1.3 Endotheliale Funktion

Hinsichtlich des basalen Durchmessers der Arteria brachialis zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die FMD der Kontrollgruppe betrug im Mittel  $6,0 \pm 0,2$  % und die der Nitratgruppe  $6,0 \pm 0,2$  %. Nach der 4-wöchigen Einnahme des Placebos bzw. des Nitrats war bei der Kontrollgruppe keine Veränderung zu beobachten ( $6,0 \pm 0,3$  %,  $p=0,97$ ); die FMD der Nitratgruppe stieg hingegen signifikant an (von  $6,0 \pm 0,2$  % auf  $6,5 \pm 0,2$  %,  $p=0,01$ ) (Abb. 2).

Die Messung der NMD, also der endothelunabhängigen Dilatation, zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Kontrollgruppe wies eine NMD von 14 % auf, während die NMD der Nitratgruppe 14,6 % betrug ( $p=0,2$ ).



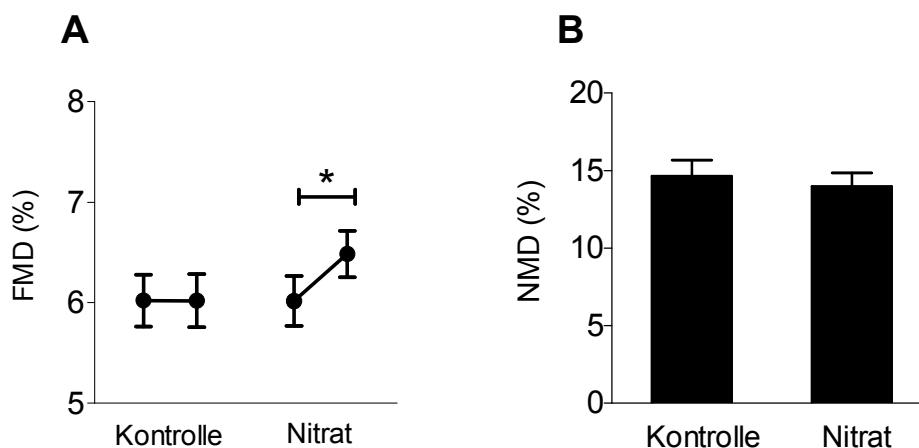


Abb. 2: **Endotheliale Funktion:** Einfluss der Nitrategieinnahme auf die endotheliale Funktion. A) Messung der endothelialen Funktion der Probanden. Durch die Supplementierung von Nitrat konnte die FMD signifikant verbessert werden ( $p=0,01$ ). FMD = flussvermittelte (Vaso-)Dilatation. B) NMD = endothelunabhängige Dilatation; die endothelunabhängige Dilatation unterscheidet sich zwischen den Gruppen nicht ( $p=0,2$ ).

### 3.1.4 Verbesserung der Gefäßsteifigkeit durch Nitrategieinnahme

#### 3.1.4.1 PWV

Auch die aortale Steifigkeit der Gefäße, die mit der Pulswellengeschwindigkeit (*pulse wave velocity*, PWV) gemessen wurde, zeigte unter basalen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede. So betrug sie bei der Kontrollgruppe im Mittel  $9,2 \pm 1$  m/s und nach der 4-wöchigen NaCl-Einnahme  $9,6 \pm 1$  m/s ( $p=0,15$ ). Im Gegensatz dazu konnte die aortale Steifigkeit durch die Supplementierung von Nitrat signifikant gesenkt werden: Hier lag sie basal bei  $10,2 \pm 1$  m/s und fiel nach der 4-wöchigen Einnahme auf  $9,0 \pm 1$  m/s ( $p=0,01$ ) ab (Abb. 3).

#### 3.1.4.2 AIX@75

Ein Maß für die arterielle Steifigkeit der Gefäße stellt der Augmentationsindex dar. Dieser änderte sich in der Kontrollgruppe nach 4-wöchiger Placeboeinnahme nicht (von  $25,3 \pm 2$  auf  $25,5 \pm 2$ ,  $p=0,86$ ). Die arterielle Steifigkeit hingegen konnte mit der Nitratintervention signifikant von  $23,4 \pm 2$  auf  $19,9 \pm 3$  gesenkt werden ( $p=0,01$ ).

Der Pulsdruck (*pulse pressure*, PP) wurde weder in der Kontrollgruppe (von  $56,4 \pm 4$  mmHg auf  $55,6 \pm 3$  mmHg,  $p=0,78$ ) noch in der Nitratgruppe (von  $54,91 \pm 3$  mmHg auf  $51,64 \pm 3$  mmHg,  $p=0,07$ ) signifikant gesenkt.

Der Augmentationsdruck (*augmentation pressure*, AP) wurde in der Kontrollgruppe mit einem Abfall von  $15,3 \pm 2$  mmHg auf  $15,2 \pm 2$  mmHg nicht

signifikant verändert ( $p=0,78$ ). In der Nitratgruppe konnte der AP allerdings signifikant von  $12,7\pm 1$  mmHg auf  $9,8\pm 2$  mmHg gesenkt werden ( $p=0,04$ ) (Abb. 3).

### 3.1.4.3 IMT (intima-media thickness)

Um feststellen zu können, ob sich die Wand der Gefäße der Probanden im Alter verdickt bzw. ob eine solche Veränderung durch eine diätetische Supplementierung von Nitrat wieder rückgängig gemacht werden kann, wurde die Intima-Media-Dicke mittels Ultraschall bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass weder bei der Kontrollgruppe (von  $0,76\pm 0,03$  mm auf  $0,76\pm 0,03$  mm,  $p=0,49$ ) noch bei der Nitratgruppe (von  $0,77\pm 0,02$  mm auf  $0,77\pm 0,02$  mm,  $p=0,28$ ) eine signifikante Änderung der Intima-Media-Dicke verzeichnet werden konnte (Abb. 3).

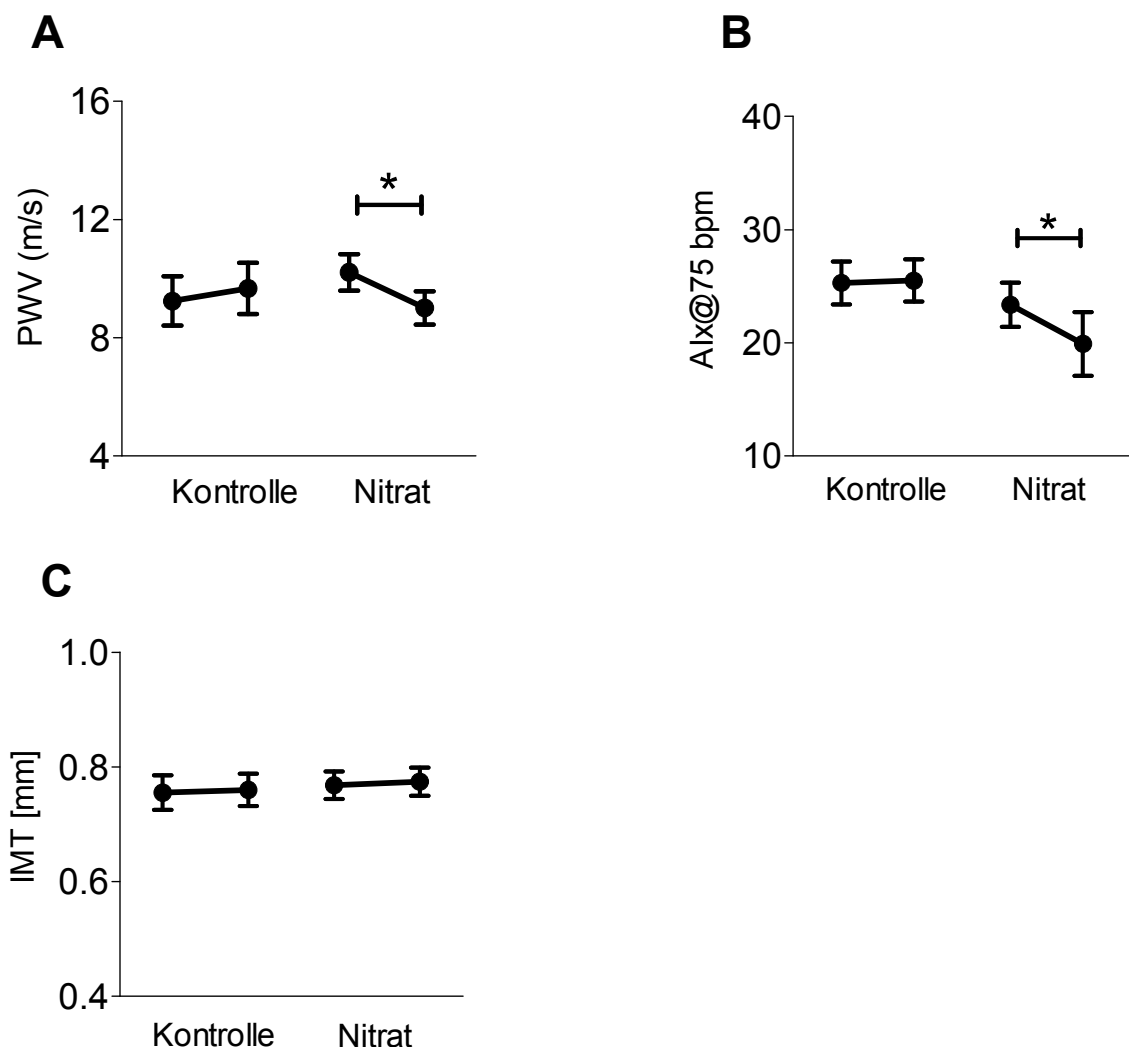


Abb. 3: **Arterielle Gefäßsteifigkeit:** Die Gefäßsteifigkeit der Probanden konnte mit der 4-wöchigen Nitrategie verbessert werden. A) Pulswellengeschwindigkeit (PWV); die aortale Steifigkeit konnte durch die Nitrategie reduziert werden ( $p=0,01$ ). B) Augmentationsindex (AIX); die arterielle Steifigkeit konnte mit der Intervention gesenkt werden ( $p=0,01$ ). C) Intima-Media-Dicke

(IMT); in keiner der beiden Gruppen konnte eine Veränderung der Intima-Media-Dicke festgestellt werden.

### 3.1.5 Hämodynamik

Der systolische Blutdruck der Probanden der Kontrollgruppe änderte sich nicht signifikant: Vor der Intervention betrug er hier im Mittel  $138 \pm 6$  mmHg und nach der 4-wöchigen Placeboeinnahme  $136 \pm 4$  mmHg ( $p=0,71$ ). In der Nitratgruppe wurde der Blutdruck im Mittel von  $137 \pm 4$  mmHg auf  $129,4 \pm 5$  mmHg ( $p=0,01$ ) nach der 4-wöchigen Diät gesenkt.

Beim diastolischen Blutdruck waren weder in der Kontrollgruppe (von  $83 \pm 3$  mmHg auf  $81 \pm 2$  mmHg,  $p=0,51$ ) noch in der Nitratgruppe (von  $80 \pm 3$  mmHg auf  $79 \pm 3$  mmHg,  $p=0,39$ ) signifikante Veränderungen zu beobachten (Abb. 4).

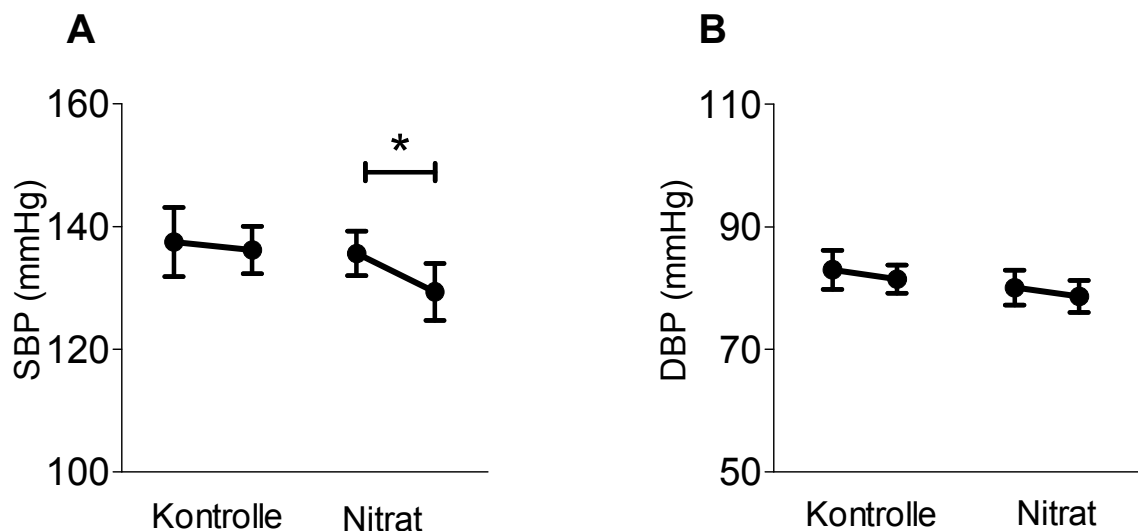


Abb. 4: **Hämodynamik:** Nach chronischer Supplementierung von Nitrat sank der systolische Blutdruck der Probanden. A) *Systolic blood pressure* (SBP); der periphere systolische Blutdruck konnte durch eine chronische diätetische Nitateinnahme signifikant gesenkt werden ( $p=0,01$ ). B) *Diastolic blood pressure* (DBP); es konnte weder in der Kontroll- noch in der Nitratgruppe ein Effekt auf den diastolischen Blutdruck beobachtet werden.

### 3.1.6 NOx-Analytik

Die Nitratlevel im Plasma der Probanden der Kontrollgruppe stiegen mit einer Veränderung von  $31 \pm 6$   $\mu$ M auf  $40 \pm 6$   $\mu$ M ( $p=0,06$ ) nicht signifikant an. In der Interventionsgruppe ließ sich hingegen ein signifikanter Anstieg derselben von  $32 \pm 4$   $\mu$ M auf  $264 \pm 54$   $\mu$ M ( $p=0,01$ ) messen.

Auch bei den gemessenen Nitritwerten konnten in der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (von  $0,1 \pm 0,01$   $\mu$ M auf  $0,11 \pm 0,01$   $\mu$ M,  $p=0,45$ ). Die Nitritwerte im Plasma der Probanden der Nitratgruppe, die basal

bei  $0,09 \pm 0,007 \mu\text{M}$  lagen, stiegen hingegen nach 4-wöchiger Supplementierung von Nitrat signifikant auf  $0,33 \pm 0,07 \mu\text{M}$  ( $p=0,01$ ) an.

Die Werte der im Plasma der Kontrollgruppe detektierten nitrosierten NO-Spezies betragen vorher  $20,9 \pm 2,8 \text{ nM}$  und nachher  $21,1 \pm 3,2 \text{ nM}$  ( $p=0,28$ ). In der Nitratgruppe wurden basal  $17,9 \pm 1,8 \text{ nM}$  gemessen; hier stiegen die Plasmawerte nach 4-wöchiger Nitrategieinnahme signifikant auf  $26,8 \pm 3,3 \text{ nM}$  ( $p=0,01$ ) an (Abb. 5).

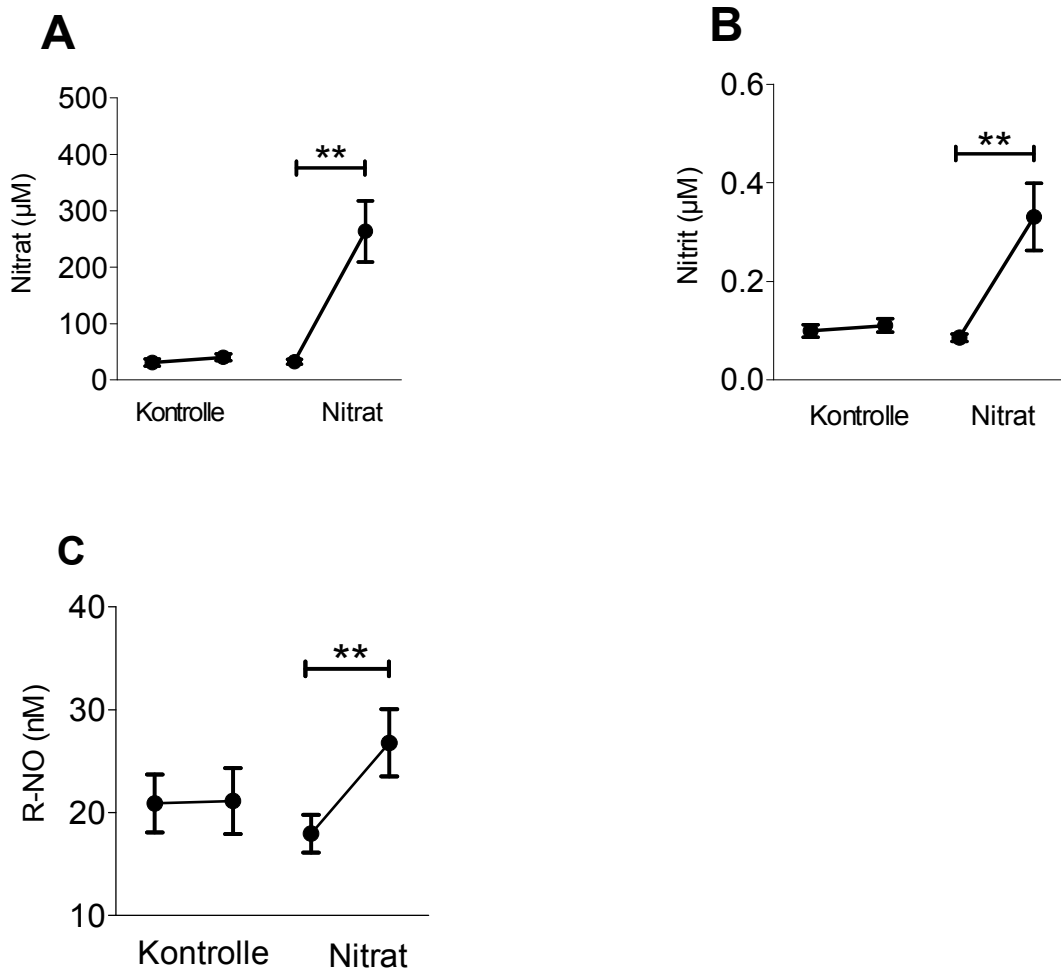


Abb. 5: **Modulation des Plasma-NO-Pools:** A) Die Nitratlevel im Plasma der Probanden stiegen durch die 4-wöchige Nitrategieinnahme signifikant an ( $p=0,01$ ). B) Auch die Plasmanitritkonzentration wurde durch die anorganische Supplementierung von Nitrat signifikant erhöht ( $p=0,01$ ). C) Die nitrosierten NO-Spezies (R-NO) im Plasma stiegen in der Nitratinterventionsgruppe nach 4-wöchiger Einnahme signifikant an ( $p=0,01$ ).

### 3.1.7 SF-36

Mit dem Short-Form-Fragebogen, den die Probanden der Studie ausfüllten, lässt sich die Lebensqualität im Bezug auf die Gesundheit feststellen. In der unten aufgeführten Tabelle 2 werden die mithilfe desselben ermittelten durchschnittlichen Werte der Probanden der Kontrollgruppe (Kontrolle) und der

Nitratgruppe (Nitrat) jeweils vor (V1) und nach (V2) der 4-wöchigen Intervention aufgeführt. Dabei ist festzustellen, dass bezüglich keiner der Skalen Unterschiede zwischen den vor und nach der Intervention ermittelten Werten verzeichnet werden konnten. Auch im Vergleich zueinander weisen die Gruppen keine nennenswerten Abweichungen zwischen den jeweiligen Werten auf (Tab. 2).

	Kontrolle V1	Kontrolle V2	p-Wert	Nitrat V1	Nitrat V2	p-Wert
<i>körperliche Funktionsfähigkeit</i>	92,5±2	92±3	0.73	91,4±3	91,8±2	0.68
<i>körperliche Rollenfunktion</i>	90±10	92,5±5	0.84	93,2±7	100±0	0.34
<i>körperliche Schmerzen</i>	77,9±8	81±7	0.54	86,3±6	89,6±5	0.55
<i>allgemeine Gesundheitswahrnehmung (*)</i>	72,5±3	73,5±5	0.73	79,6±5	85,8±4	0.09
<i>Vitalität (*)</i>	73,5±4	73±5	0.88	73,6±4	75,9±3	0.62
<i>soziale Funktionsfähigkeit</i>	96,3±2	92,5±3	0.08	95,5±3	95,5±3	0
<i>emotionale Rollenfunktion</i>	100±0	100±0	0	95,5±5	100±0	0.34
<i>psychisches Wohlbefinden (*)</i>	85,6±2	86,4±3	0.78	83,6±4	85,8±3	0.54
<i>körperliche Summenskala</i>	50,5±2	51,09±2	0.72	53,1±2	54,6±1	0.30
<i>psychische Summenskala</i>	57,1±1	56,6±1	0.76	55,4±2	56,4±1	0.50

Tabelle 2: **Ergebnisse der Auswertung des SF-36-Fragebogens.** (\*) = bipolare Skalen (siehe Material und Methoden).

### 3.1.8 Klinisches Routinelabor

Insgesamt konnten bei den im Zentrallabor festgestellten Blutwerten keine relevanten Unterschiede festgestellt werden: Weder waren die basalen Werte der beiden Gruppen unterschiedlich, noch konnten signifikante Anstiege oder Abfälle der Werte nach der Intervention mit NaCl oder Nitrat beobachtet werden.

## 3.2 Tierexperimentelle Studie

Um die Nitrit- und Nitratspiegel im Plasma und im Gewebe nach der chronischen Supplementierung von Nitrat untersuchen zu können, wurde eine tierexperimentelle Studie durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden aufgeführt werden sollen.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Bezeichnungen für die verschiedenen Mäusegruppen unterschiedlich abgekürzt. O (*old*) steht dabei für die alten (= 22 Monate alten) und Y (*young*) für die jungen (= 6 Monate alten) Mäuse, die jeweils entweder der Kontrollgruppe (C) oder der Nitratgruppe (N) angehören.

### 3.2.1 Plasmaspiegel von Nitrat und Nitrit

Nach der Supplementierung von Nitrat stiegen sowohl in alten (OC  $38,8 \pm 3,5 \mu\text{M}$ , ON  $304,4 \pm 46,7 \mu\text{M}$ ,  $p=0,01$ ,  $n=6$ ) als auch in jungen Mäusen (YC  $45,6 \pm 5 \mu\text{M}$ , YN  $291,4 \pm 50,5 \mu\text{M}$ ,  $p=0,01$ ,  $n=6$ ) die plasmatischen Nitratspiegel an. Nur in alten Mäusen jedoch stiegen auch die Nitritwerte im Plasma signifikant an (OC  $0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , ON  $4,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ,  $p=0,01$ ,  $n=6$ ). Bei den jungen Mäusen war kein signifikanter Nitritanstieg zu detektieren (YC  $1,3 \pm 2,7 \mu\text{M}$ , YN  $2,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ ,  $p=0,17$ ,  $n=6$ ) (Abb. 6).

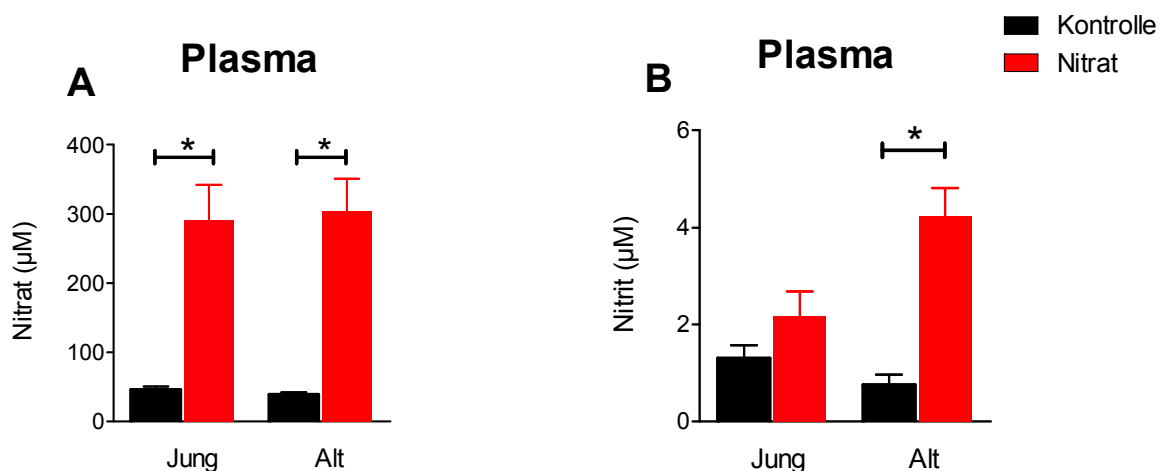


Abb. 6: **Die Plasmawerte von Nitrat und Nitrit in jungen und alten Mäusen vor und nach der 4-wöchigen Nitrataufnahme:** A) Die Nitratwerte im Plasma stiegen sowohl bei den alten ( $p=0.01$ ) als auch bei den jungen ( $p=0.01$ ) Mäusen signifikant an. B) Die plasmatischen Nitritlevel der alten Mäuse stiegen nach der Intervention mit Nitrat signifikant an ( $p=0.01$ ).

Die im Plasma gemessenen Nitrosothiolwerte (R-SNO) stiegen nach der Supplementierung von Nitrat an. Bei den alten Mäusen (OC  $29.1 \pm 12 \text{ nM}$ , ON  $112.8 \pm 46.5 \text{ nM}$ ,  $p=0.12$ ,  $n=5$ ) war dabei jedoch kein signifikanter Anstieg zu

erkennen. Dagegen konnte bei den jungen Mäusen ein signifikanter Anstieg festgestellt werden (YC  $18 \pm 8.8$  nM, YN  $66 \pm 17$  nM,  $p=0.03$ ,  $n=5$ ). Bezüglich der gemessenen Nitrosamine (R-NNO) wurde in der Gruppe der alten Mäuse (OC  $6.7 \pm 2.6$  nM, ON  $44 \pm 20$  nM,  $p=0.1$ ,  $n=5$ ) eine Tendenz beobachtet. In der Gruppe der jungen Mäuse (YC  $3.4 \pm 1.2$  nM, YN  $16.2 \pm 3.7$  nM,  $p=0.01$ ,  $n=5$ ) wurde bezüglich derselben ein signifikanter Anstieg festgestellt.

Die im Plasma gemessenen nitrosierten NO-Spezies (R-XNO) waren nach 8-wöchiger Supplementierung von Nitrat bei den alten Mäusen (OC  $36 \pm 14$  nM, ON  $157 \pm 59$  nM,  $p=0.08$ ,  $n=5$ ) nicht signifikant erhöht. Bei den jungen Mäusen (YC  $21 \pm 9$  nM, YN  $82 \pm 20$  nM,  $p=0.02$ ,  $n=5$ ) war der verzeichnete Anstieg jedoch signifikant (Abb. 7).

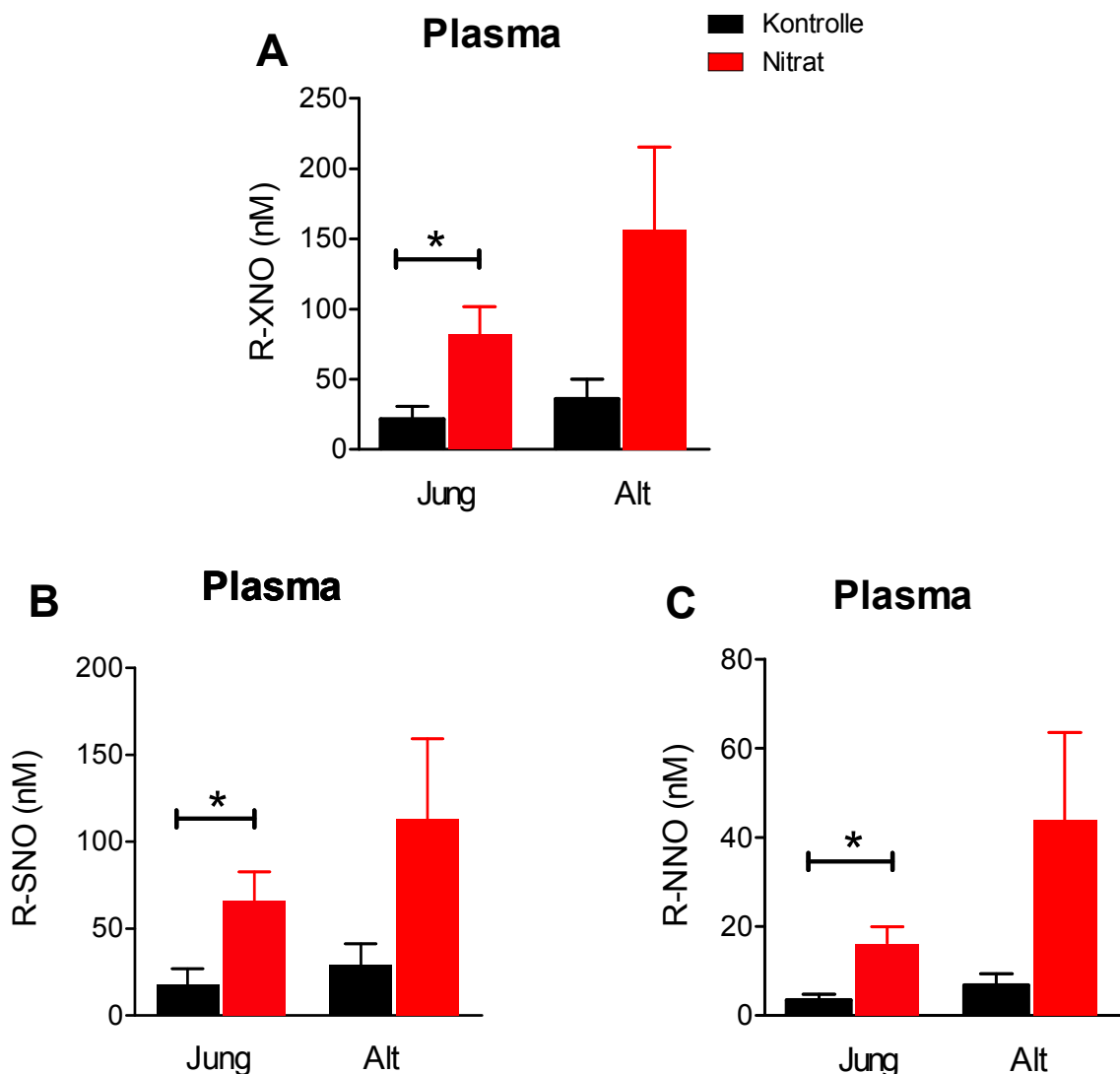


Abb. 7: Die Werte der R-SNO, R-NNO und R-XNO-Level im Plasma der jungen und alten Mäuse: A) Die reduktiven NO-Spezies im Plasma der jungen Mäuse stiegen nach der

Supplementierung von Nitrat signifikant an ( $p=0.02$ ). B) Die Nithrosothiolspiegel im Plasma der jungen Mäuse stiegen nach 4-wöchiger Nitratintervention signifikant an ( $p=0.03$ ). C) Auch die Nitrosaminlevel im Plasma der jungen Mäuse zeigten einen signifikanten Anstieg ( $p=0.01$ ).

### 3.2.2 Gewebemessungen von Nitrat und Nitrit

Die Nitratlevel stiegen weder bei den jungen (YC  $8.1\pm 4.4$   $\mu\text{mol}$ , YN  $10.3\pm 3$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.35$ ,  $n=6$ ) noch bei den alten Mäusen (OC  $8.2\pm 1.5$   $\mu\text{mol}$ , ON  $9.4\pm 2$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.64$ ,  $n=6$ ) an. Auch die Nitritspiegel in den Aorten der jungen Mäuse (YC  $1.5\pm 0.2$   $\mu\text{mol}$ , YN  $1.7\pm 0.3$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.3$ ,  $n=6$ ) zeigten keinen Anstieg. Die Nitritspiegel der alten Mäuse (OC  $1.1\pm 0.05$   $\mu\text{mol}$ , ON  $0.8\pm 0.06$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.002$ ,  $n=6$ ) fielen ab (Abb. 8).

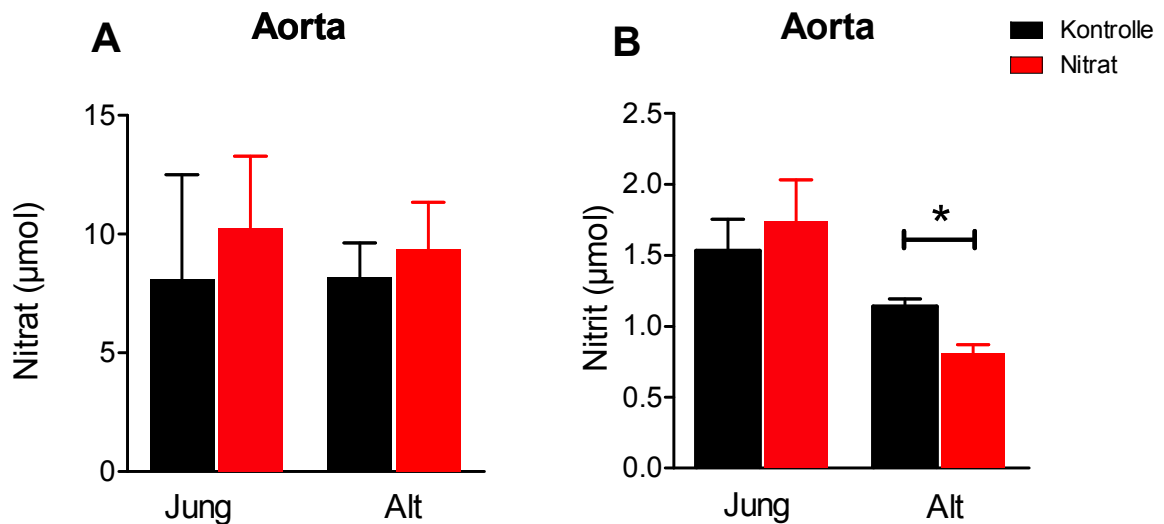


Abb. 8: Die Nitrit- und Nitratlevel in den Aorten der jungen und alten Mäuse vor und nach der 4-wöchigen anorganischen Nitratsupplementierung: A) In den Aorten der jungen und alten Mäuse konnte kein Anstieg der Nitratkonzentration gezeigt werden. B) Die Nitritspiegel in den Aorten zeigten bei den alten Mäusen einen Abfall ( $p=0.002$ ).

In den Herzen der jungen (YC  $31\pm 9.8$   $\mu\text{M}$ , YN  $35.3\pm 6$   $\mu\text{M}$ ,  $p=0.71$ ,  $n=6$ ) und alten Mäuse (OC  $23.4\pm 4.1$   $\mu\text{M}$ , ON  $37.5\pm 6.7$   $\mu\text{M}$ ,  $p=0.1$ ,  $n=6$ ) konnten keine signifikanten Veränderungen der Nitratspiegel festgestellt werden.

Auch die Nitritspiegel in den Herzen der jungen (YC  $1\pm 0.2$   $\mu\text{M}$ , YN  $1.2\pm 0.2$   $\mu\text{M}$ ,  $p=0.26$ ,  $n=6$ ) und alten Mäuse (OC  $0.7\pm 0.1$   $\mu\text{M}$ , ON  $0.8\pm 0.1$   $\mu\text{M}$ ,  $p=0.5$ ,  $n=6$ ) wiesen bei den Messungen keine signifikanten Veränderungen auf (Abb. 9).

Die in den Herzen der jungen Mäuse gemessenen Nitrosothiolwerte (R-SNO) betragen YC  $22.44\pm 8$  nM und YN  $100.9\pm 20$  nM,  $p=0.01$ ,  $n=6$ . Die Werte der alten Mäuse lagen bei OC  $49\pm 6$  nM und ON  $102.3\pm 11$  nM,  $p=0.01$ ,  $n=6$ .



Bei den gemessenen Nitrosaminen (R-NNO) in den Herzen der jungen (YC 50±8 nM, YN 77±4 nM, p=0.03, n=6) und der alten Mäuse (OC 39±8 nM, ON 71±8 nM, p=0.02, n=6) waren signifikante Anstiege erkennbar.

Die nitrosierten NO-Spezies (R-XNO) betragen in den Herzen der jungen Mäuse YC 72±11 nM, YN 161.6±91 nM, p=0.01, n=6, und in denen der alten Mäuse OC 88.2±7 nM, ON 173.4±11 nM, p=0.01, n=6.

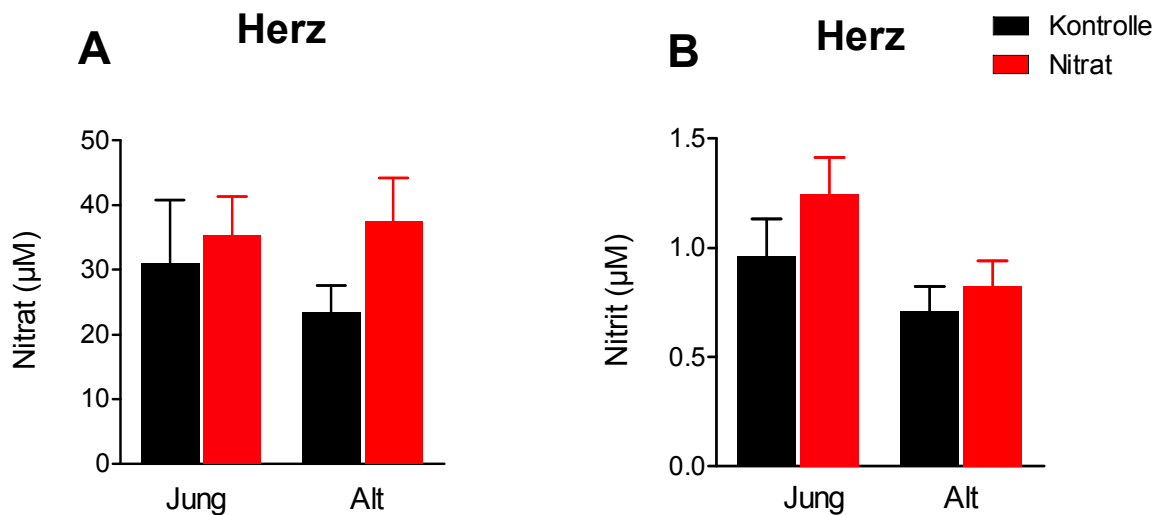


Abb. 9: **Die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat in den Herzen der jungen und alten Mäuse jeweils vor und nach der Supplementierung von Nitrat für 4 Wochen:** A) Auch bei den Nitratleveln im Gewebe der Herzen konnte kein Unterschied bei den jungen und alten Mäusen aufgezeigt werden. B) Die Gewebenitritlevel der Herzen stiegen bei beiden Gruppen nach der Intervention mit Nitrat nicht an.

Bei den Messungen der Lebern konnten bei den jungen (YC 0.67±0.23 µmol, YN 7.7±2.4 µmol, p=0.02) und den alten Mäusen (OC 1.13±0.3 µmol, ON 16.84±6 µmol, p= 0.02) signifikante Anstiege der Nitratspiegel beobachtet werden.

Auch bei den Nitritspiegeln wurden sowohl bei den jungen Mäusen (YC 0.09±0.003 µmol, YN 0.14±0.01 µmol, p=0.01) als auch bei den alten Mäusen (OC 0.11±0.02 µmol, ON 0.24±0.04 µmol, p= 0.02) signifikant erhöhte Nitritwerte festgestellt (Abb. 10).

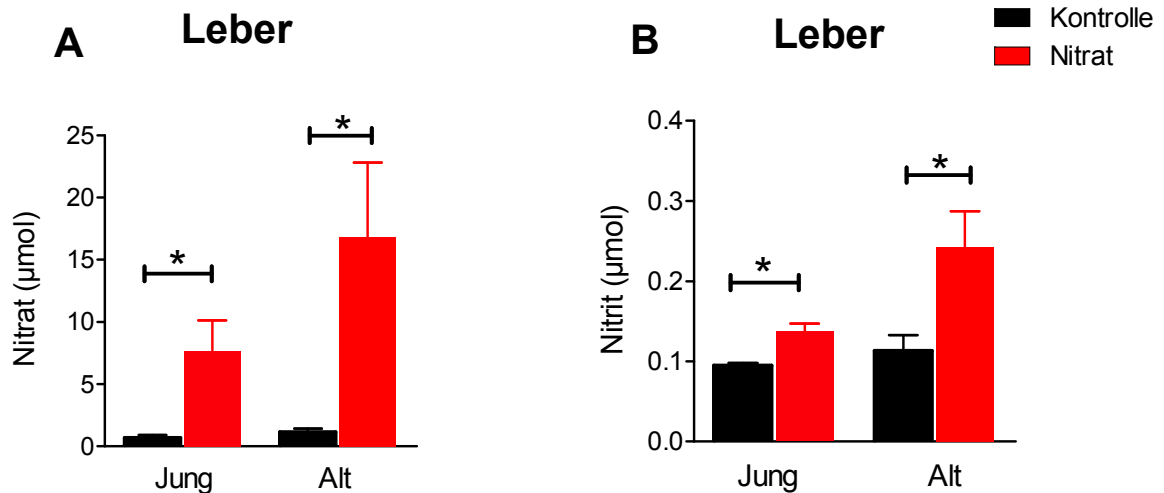


Abb. 10: Die Nitrit- und Nitratwerte im Gewebe der Lebern der jungen und alten Mäuse nach 4-wöchiger Supplementierung von Nitrat: A) Die Nitratwerte in den Lebern der alten ( $p=0.02$ ) und der jungen Mäuse ( $p=0.02$ ) stiegen signifikant an. B) In den Lebern der beiden Gruppen von Mäusen konnte ein Anstieg der Nitritlevel beobachtet werden. Der Anstieg des Gewebenitrits bei den alten ( $p=0.02$ ) und den jungen Tieren ( $p=0.01$ ) war signifikant.

Nach der Supplementierung von Nitrat zeigte sich in den Lungen der alten Mäuse ein signifikanter Anstieg der Nitratwerte (OC  $2.8 \pm 0.7$   $\mu\text{mol}$ , ON  $12.8 \pm 3$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.01$ ). Bei den jungen Mäusen konnten diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden (YC  $4.4 \pm 2.3$   $\mu\text{mol}$ , YN  $4.3 \pm 1.8$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.1$ ).

Die Nitritspiegel der Lungen wiesen in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf. (YC  $0.26 \pm 0.12$   $\mu\text{mol}$ , YN  $0.26 \pm 0.04$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.1$ ; OC  $0.16 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}$ , ON  $0.19 \pm 0.02$   $\mu\text{mol}$ ,  $p=0.3$ ) (Abb. 11).

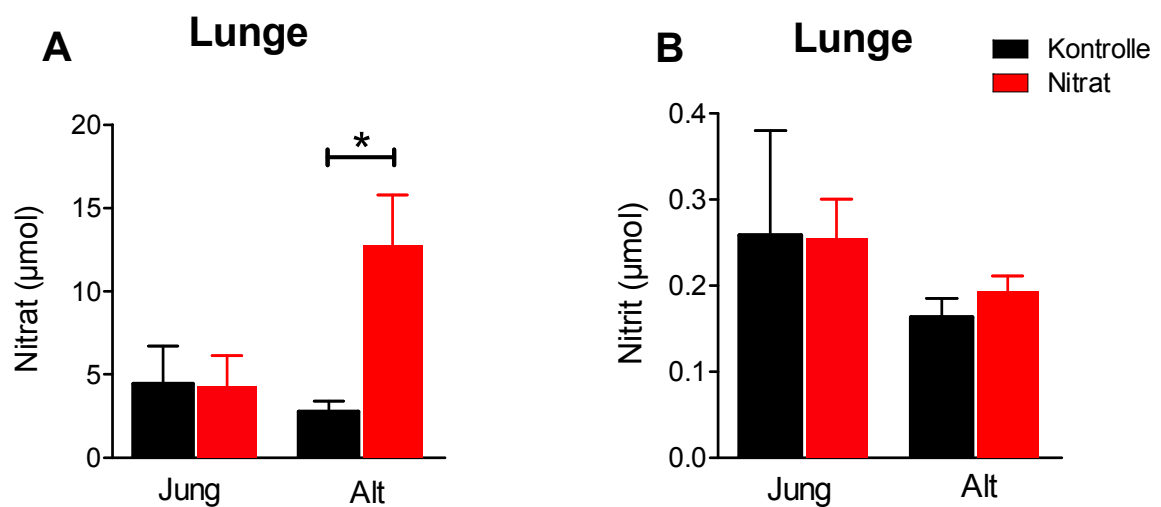


Abb. 11: Die Nitrit- und Nitratspiegel im Gewebe der Lungen vor und nach 4-wöchiger Supplementierung von Nitrat bei den jungen und alten Mäusen: A) In den Lungen der alten

Mäuse konnte nach 4-wöchiger Nitratsupplementierung ein signifikanter Anstieg der Nitratwerte im Gewebe der alten Mäuse gezeigt werden ( $p=0.01$ ). Bei den jungen Mäusen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. B) Die Nitritlevel im Gewebe der Lungen änderten sich bei jungen Mäusen und alten Mäusen nicht.

### 3.2.3 cGMP-Bestimmung

In den Aorten der Tiere konnte nach der Supplementierung von Nitrat sowohl bei den alten (OC  $7.9\pm 0.43$  fmol/mg Protein, ON  $4.4\pm 0.65$  fmol/mg Protein,  $p=0.002$ ) als auch bei den jungen Mäusen (YC  $14.9\pm 0.24$  fmol/mg Protein, YN  $7.29\pm 0.8$  fmol/mg Protein,  $p=0.0001$ ) ein signifikanter Abfall der cGMP-Level beobachtet werden. Auch die cGMP-Level der jungen und alten Kontrollgruppen unterschieden sich bereits unter basalen Bedingungen signifikant voneinander ( $p=0.0001$ ) (Abb. 12).

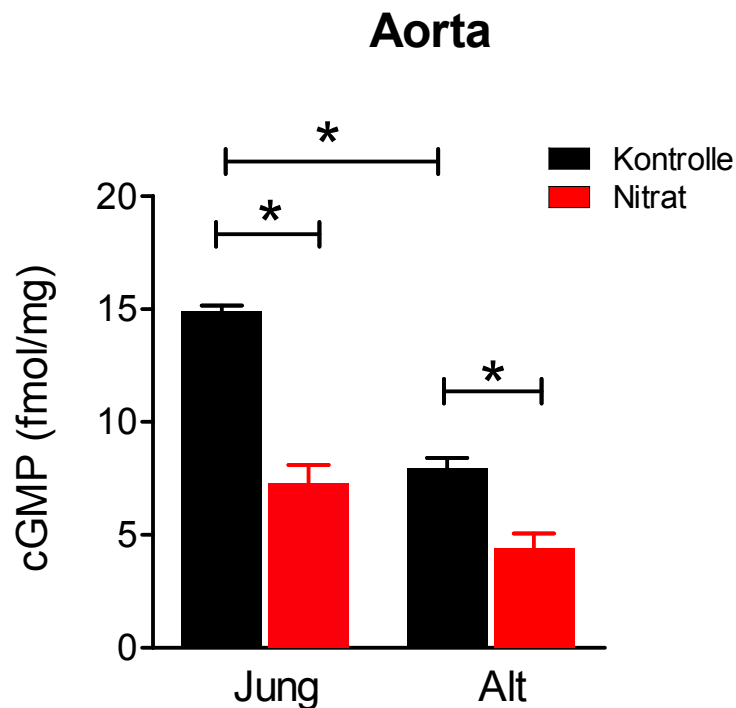


Abb. 12: **Die cGMP-Spiegel der Aorten der beiden Gruppen vor und nach der Supplementierung von Nitrat:** Die cGMP-Level der jungen Mäuse ( $p=0.0001$ ) und der alten Mäuse ( $p=0.002$ ) fielen nach der Nitrataufnahme signifikant ab. Auch die cGMP-Level der beiden Kontrollgruppen wiesen bereits unter basalen Bedingungen signifikante Unterschiede auf ( $p=0.0001$ ).

### 3.2.4 PKG-Aktivität

Die Aktivität der PKG in den Aorten der jungen Mäuse (YC  $4.5\pm 1$  Aktivität/mg Protein, YN  $10.5\pm 2$  Aktivität/mg Protein,  $p=0.02$ ) wurde durch die nitratreiche Ernährung signifikant gesteigert. Auch die PKG-Aktivität in den Aorten der alten

Mäuse (OC  $5.6 \pm 0.7$  Aktivität/mg Protein, ON  $18.4 \pm 3$  Aktivität/mg Protein,  $p=0.001$ ) stieg signifikant an (Abb. 13).

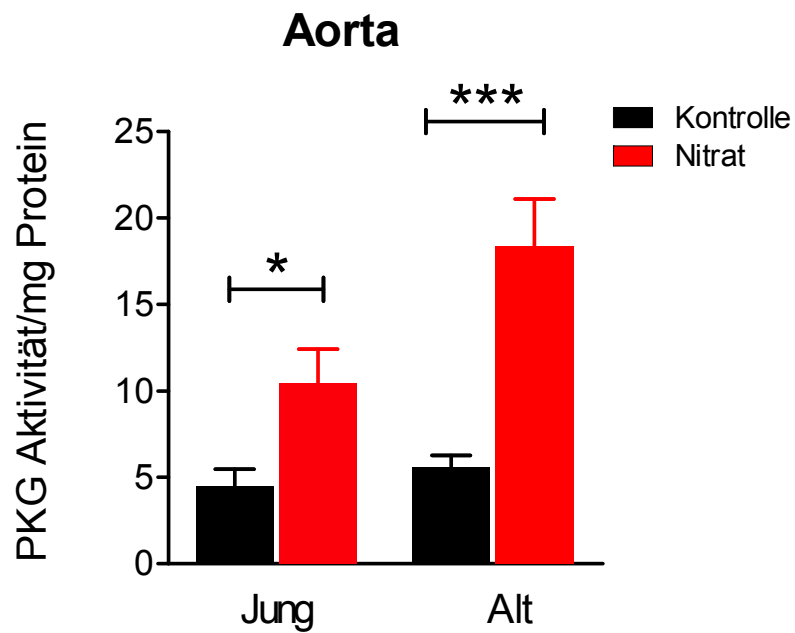


Abb. 13: Die PKG-Aktivität in den Aorten der beiden Gruppen vor und nach der Nitratintervention: Sowohl bei den jungen ( $p=0.02$ ) als auch bei den alten Mäusen ( $p=0.001$ ) konnte ein signifikanter Anstieg der PKG-Aktivität festgestellt werden.

## 4 Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1.) Diätetisches Nitrat nimmt beim Menschen Einfluss auf die altersabhängige endotheliale Dysfunktion.
- (2.) In der klinischen Studie wird die altersabhängige vaskuläre Gefäßsteifigkeit nach 4-wöchiger Nitrateinnahme verbessert.
- (3.) Durch eine chronische diätetische Supplementierung von Nitrat kann der systolische Blutdruck beim Menschen gesenkt werden.
- (4.) In einer tierexperimentellen Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch eine orale Nitrateinnahme Einfluss auf die endogenen NO-Level sowohl im Gewebe als auch im Plasma genommen werden kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, nachzuweisen, dass eine chronische diätetische Nitratgabe altersabhängige vaskuläre Funktionen beeinflussen und die endogenen NO-Spiegel modulieren kann. Hierzu wurden die Gefäßfunktionen im Alter jeweils vor und nach der Intervention mit Nitrat bzw. einem Placebo mittels FMD, Applanationstonometrie und Blutdruck bestimmt. Außerdem wurden in einer tierexperimentellen Studie die Nitrit- und Nitratwerte im Plasma und in verschiedenen Geweben gemessen.

Nitrit und Nitrat spielen im Gefäß- und Immunsystem eine entscheidende Rolle, allerdings kommt der Ernährung als wichtiger Nitrit- und Nitratquelle bislang wenig Aufmerksamkeit zu. Ca. 80 % der täglichen Nitrataufnahme stammt aus dem Verzehr von Gemüse.<sup>72</sup> Aber auch Früchte und verschiedene Arten von Fleisch enthalten einen hohen Anteil an Nitrat. Obwohl der Verzehr dieser Lebensmittel grundsätzlich als gesund gilt, setzte die European Food Safety Authority (EFSA) für eine angemessene tägliche Nitrateinnahme (*acceptable daily intake*, ADI) einen Wert von 3,7 mg/kg (=0,06 mmol/kg) fest. Das bedeutet, dass ein durchschnittlicher 70 kg schwerer Erwachsener demnach eine tägliche Menge von 260 mg (=4,2 mmol) Nitrat zu sich nehmen darf. Mit einer durchschnittlichen und ausgewogenen Ernährung nimmt man ca. 1,2 mmol Nitrat pro Tag auf, wohingegen Vegetarier täglich ca. 4,3 mmol Nitrat aufnehmen.<sup>43</sup>

Die DASH-Diät hingegen, deren positiver Einfluss auf den Blutdruck nachgewiesen werden konnte, beinhaltet eine tägliche Dosis von ca. 1222 mg Nitrat. Diese übersteigt den ADI von 260 mg für einen 70 kg schweren Menschen jedoch um über 500 %.<sup>36</sup> Zudem belegte eine Studie den Benefit, den die Einnahme von hohen Dosen Nitrat mit sich bringt: Dabei wurde der systolische Blutdruck mit einer einmaligen Einnahme von 0,5 l Rote-Bete-Saft gesenkt.<sup>73</sup> Mit

dem Rote-Bete-Saft, der hier als Prüfpräparat verwendet wurde, nahmen die Probanden ca. 1360 mg Nitrat auf. Eine solche Dosis übersteigt den ADI deutlich.<sup>74</sup> Diese Studien zeigen offensichtlich, dass die von der DASH empfohlene Ernährungsweise, die den Verzehr von reichlich Obst und Gemüse vorgibt, teilweise den von der EFSA vorgeschriebenen Grenzwert der täglichen Nitrateinnahme überschreitet. Da durch sie jedoch die gewünschten positiven Effekte, wie unter anderem die Verbesserung der endothelialen Funktion und die Reduktion des Blutdrucks, eintreten, sollten die Grundgedanken hinter den strengen Regulationen für die Nitrit- und Nitrateinnahme noch einmal überdacht und die darauf basierenden Empfehlungen gegebenenfalls revidiert werden.

#### 4.1 Bewertung des Studienkollektivs

Die in der vorliegenden Studie untersuchten älteren Menschen stellen Alter, Gewicht und Größe betreffend ein homogenes Studienkollektiv dar. Im Durchschnitt waren die Probanden 63 Jahre alt. Allerdings wiesen sie insgesamt auch ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen auf, da ihr *HeartScore* durchschnittlich einen Wert von 4.7 betrug. Der *HeartScore* beschreibt das Risiko, an einem kardiovaskulären Ereignis zu erkranken. Somit sind die basalen Messwerte der Probanden nicht allein auf das erhöhte Alter zurückzuführen, sondern sie repräsentieren das Zusammenspiel von Alter und einem zusätzlich erhöhten kardiovaskulären Risiko. Dies ist aber durchaus gewollt, da es nicht die Intention der Studie war, eine selektierte Gruppe älterer Menschen ohne kardiovaskuläres Risiko zu untersuchen, sondern vielmehr Probanden, die den Charakteristika der generellen Population entsprechen. Durch dieses Spezifikum wird die Relevanz der hiesigen Studie für die gesamte Bevölkerung unterstrichen. Zudem ist das kardiovaskuläre Risikoprofil der hier untersuchten Probanden vergleichbar mit Probandenkollektiven anderer Studien, welche sich ebenfalls mit der Untersuchung von gesunden, älteren Menschen ohne kardiovaskuläre Erkrankungen beschäftigten.<sup>75-77</sup>

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze dafür, warum das Altern mit Veränderungen der kardiovaskulären Gesundheit einhergeht. Die erste Hypothese besagt, dass ein hohes Alter mit Krankheit gleichzusetzen ist. Gegen diese Annahme spricht jedoch die Tatsache, dass es auch sehr alte Menschen gibt, die durchaus gesund sind. Eine weitere diesbezügliche Überlegung ist die, dass es eventuell zu der erhöhten Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen im Alter kommt, weil Menschen lange Zeit vielen Risikofaktoren ausgesetzt sind, die die Chance auf eine CVD erhöhen. Somit wirken exogene Noxen auf den Organismus ein, die im höheren Lebensalter additiv zunehmen. Einer weiteren Hypothese zufolge unterliegt das kardiovaskuläre System einem Alterungsprozess, der mit der Zeit die Basis für pathophysiologische Prozesse wie Atherosklerose ändert und somit überlagert.<sup>1</sup>

## 4.2 Reversion der endothelialen Funktion durch chronische Nitratgabe

In der vorliegenden Arbeit wurde die endotheliale Funktion mithilfe der flussmedierten Dilation der Arteria brachialis gemessen. Die FMD gilt als nichtinvasiver Goldstandard in der Beurteilung der endothelialen Funktion.<sup>11</sup> Dass die Messung der FMD von peripheren Leitungsarterien als funktioneller Marker für die NO-Synthese und -Freisetzung dienen kann, konnte durch Untersuchungen gezeigt werden, bei denen die FMD durch intraarterielle Gabe von L-NMMA (L-NG-Monomethyl-Arginin-Zitrat), einem kompetitivem Inhibitor der NOS, unterdrückt werden konnte.<sup>78</sup>

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die im Alter auftretende endotheliale Dysfunktion durch eine 4-wöchige tägliche Nitrateinnahme signifikant verbessert werden kann. Dies wird durch die in der Studie dokumentierte Erhöhung der FMD von 6 % auf 6,5 % nach der Intervention repräsentiert. Die Verbesserung um 0,5 % scheint zwar im ersten Moment gering zu sein, ist jedoch statistisch gesehen signifikant.

Trotz statistischer Signifikanz muss die vermeintlich geringe Verbesserung hinsichtlich einer biologischen Relevanz diskutiert werden. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass selbst Medikamente wie ACE-Hemmer, die eine enorme Wirkung auf das kardiovaskuläre System ausüben, die FMD nach chronischer Verabreichung nur um 1-2 % verbessern können.<sup>79, 80</sup> Somit ist der Effekt, der hier durch die chronische Supplementierung von Nitrat erreicht werden konnte, äußerst relevant: Verglichen mit den Ausgangswerten konnte hier nämlich insgesamt eine fast 10%ige Steigerung der FMD beobachtet werden. Auch anderweitige diätetische Interventionen, wie beispielsweise eine 30-tägige Gabe flavanolhaltigen Kakaos, konnten eine Erhöhung der FMD um 30 % bewirken.<sup>81, 82</sup>

Um technische Variabilitäten zu vermeiden, wurde stets dasselbe Gerät (Vivid i ultrasound, GE Healthcare, Munich, Germany) verwendet und die Auswertung der Ultraschallbilder wurde mit einem standardisierten, etablierten Programm durchgeführt (MIA Vascular Research Tools). Damit selbst geringfügige Unterschiede in der Messmethode ausgeschlossen werden konnten, wurden die Messungen sowohl vor als auch nach der 4-wöchigen Nitratintervention jeweils von derselben Person durchgeführt. Da auch biologische Faktoren wie zum Beispiel der Einfluss, den vasoaktive Medikamente auf die endotheliale Funktion nehmen, zu falschen Messwerten führen können, wurden in der vorliegenden Studie nur Probanden untersucht, die keine die Gefäßfunktion beeinflussenden Medikamente einnahmen. Die Einwirkungen der zirkadianen Rhythmik wurden umgangen, indem die Untersuchungen jeweils vor und nach der Intervention zur gleichen Zeit durchgeführt wurden. Des Weiteren wurde damit, dass die Probanden an beiden Untersuchungstagen nüchtern erschienen, darauf geachtet, dass die individuelle Nahrungsaufnahme derselben keine entscheidende Rolle spielen konnte. Außerdem wurde am Tag der Untersuchung auf Kaffee- und Tabakkonsum verzichtet. Um den psychischen und physischen Stress zu

unterbinden, fanden die Messungen in entspannter Körperhaltung in einem ruhigen, temperierten Raum statt.

Dass der in dieser Studie dokumentierte Effekt des Nitrats nur vorübergehender, akuter Natur ist, kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da die FMD einen Tag nach der letzten Einnahme des Prüfpräparats gemessen wurde. Schon in früheren Studien konnte die akute Verbesserung der endothelialen Funktion nach anorganischer Supplementierung von Nitrat bei jungen gesunden Probanden gezeigt werden.<sup>42, 83</sup> In diesen Akutstudien fiel die FMD 4 Stunden nach der Nitrategieinnahme allerdings wieder auf dem Ausgangswert ähnlichen Werten zurück.<sup>83</sup> Da die FMD in der vorliegenden Studie jedoch einen Tag nach der letzten Nitrategieinnahme gemessen wurde und sie zu diesem Zeitpunkt immer noch signifikant erhöht war, ist von einem langanhaltenden Effekt des Nitrats bei chronischer Einnahme auszugehen.

Im Gegensatz zu den von uns beobachteten Ergebnissen wurden weitere Studien durchgeführt, in denen gesunde Probanden anorganisches Nitrat einnahmen, in denen jedoch kein Effekt desselben auf die endotheliale Funktion (gemessen an der FMD) beobachtet werden konnte. 3 Stunden nach der Einnahme wurde festgestellt, dass zwar eine Reduktion des Blutdrucks und der arteriellen Steifigkeit (gemessen an der PWV) stattgefunden hatte, die endotheliale Funktion allerdings durch die Nitrategieinnahme unbeeinflusst blieb.<sup>84</sup> Der Differenz zwischen diesen und den in unserer Studie dokumentierten Ergebnissen könnte der Umstand zugrundeliegen, dass sich die Probandenkollektive der beiden Studien hinsichtlich des Alters der Probanden stark unterscheiden. Während in unserer hiesigen Studie alte Probanden (durchschnittlich 63 Jahre alt) untersucht wurden, waren die Probanden der anderen Studie zwischen 18 und 45 Jahre alt. Die unterschiedlichen Altersgruppen könnten eine Erklärung dafür sein, dass die Probanden in der zuvor genannten anderen Studie schon basal viel höhere Plasmanitritwerte aufwiesen als die Probanden in der hier vorliegenden Studie. Dies könnte also ein Grund dafür sein, dass sich die FMD der jungen Probanden nicht signifikant steigern ließ. Im Gegensatz dazu wiesen die Probanden in der hier durchgeführten Studie basal sehr niedrige Nitritwerte im Plasma auf, welche jedoch durch die chronische Nitrategieinnahme mit einer damit einhergehenden signifikanten Verbesserung der FMD signifikant anstiegen.

### **4.3 Diätetisches Nitrat verbessert die Gefäßsteifigkeit**

Ein wesentlicher Faktor, der das Auftreten von CVDs erhöht, ist die fortschreitende Steifigkeit der arteriellen Gefäße, die im Alter zunimmt. Der Goldstandard, um die arterielle Steifigkeit zu messen, ist die Pulswellengeschwindigkeit: Sie ist ein unabhängiger Faktor, der dazu dient, das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses voraussagen zu können.<sup>85, 86</sup>



In der vorliegenden Studie konnte die altersabhängige aortale Steifigkeit nach 4-wöchiger Nitrateinnahme verbessert werden. Sindler *et al.* stellten in einer tierexperimentellen Studie bei alten Mäusen eine um 70 % höhere aortale PWV als bei jungen Mäusen fest. Auch hier konnte der altersabhängige Anstieg der PWV mit einer chronischen NO-modulierenden Diät verbessert werden.<sup>87</sup>

Ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der arteriellen Steifigkeit stellt der Augmentationsindex dar. Durch die Supplementierung von Nitrat konnte dieser signifikant gesenkt werden. Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass der Augmentationsindex bei Patienten mit arterieller Hypertonie nach chronischer Nitratdiät gesenkt wurde.<sup>74</sup>

Ein möglicher dem zugrundeliegender Mechanismus liegt in der Reduktion des oxidativen Stresses. Der Effekt des Alterns auf die Gefäße ist nämlich unter anderem darauf zurückzuführen, dass der Alterungsprozess mit einem Anstieg des oxidativen Stresses einhergeht.<sup>88</sup> In der Atmungskette der Mitochondrien kommt es dabei zu einer inkompletten Reduktion von Sauerstoff, wodurch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen.<sup>89</sup> Durch die damit verbundene Erhöhung der  $O_2^-$  Konzentration kommt es zu einer Inaktivierung von NO und damit zu einer vasomotorischen Dysfunktion.<sup>19</sup> Das  $O_2^-$  reagiert mit NO, wodurch Peroxynitrit entsteht. Die Konzentration von freiem NO fällt somit ab. Des Weiteren wird ein antioxidatives Enzym, die Superoxid-Dismutase (SOD), gehemmt.<sup>90</sup> Zusätzlich kommt es zum sogenannten *eNOS-uncoupling*, bei dem ein wichtiger Cofaktor der eNOS, das Tetrahydrobiopterin (BH4), oxidiert wird und die eNOS somit kein NO, sondern ROS generiert.<sup>91</sup>

In einer tierexperimentellen Studie wurde gezeigt, dass Nitrit die Superoxide reduziert und dass die Aktivität der SOD durch eine Nitriteinnahme wieder normalisiert wird. Des Weiteren konnte das Nitrotyrosin, welches einen Marker für oxidativen Stress darstellt, in alten Tieren durch die Einnahme von Nitrit auf das Level von jungen Tieren reduziert werden.<sup>87</sup>

Durch die Reduktion des oxidativen Stresses wird der altersabhängige Anstieg von *advanced glycation endproduct* (AGE) größtenteils verhindert,<sup>92</sup> was einen der Hauptgründe für die erhöhte arterielle Steifigkeit im Alter darstellt.<sup>93</sup>

Diese Erkenntnisse sind klinisch relevant, da die PWV ein prädiktiver Faktor für kardiovaskuläre Ereignisse ist.<sup>94</sup> Eine chronische Supplementierung von Nitrat führt zu einer Reduktion der arteriellen Steifigkeit. Ob hierdurch CVDs und die daraus resultierende Morbidität und Mortalität bei älteren Menschen beeinflusst werden können, ist noch unklar.

Um eventuelle strukturelle Veränderungen der Gefäßwand, die Auswirkungen auf die arterielle Steifigkeit haben könnten, zu bestimmen, wurde die Intima-Media-Dicke (IMT) gemessen. Die Probanden in unserer Studie wiesen sowohl vor als auch nach der Intervention Intima-Media-Dicken der Arteria carotis communis auf,

die vergleichbar mit denen bei anderen gesunden Menschen in ihrer Altersgruppe war.<sup>95</sup>

Zu den Wandveränderungen zählen zum einen eine Vermehrung der Kollagenfasern und eine Verminderung des Elastins.<sup>96, 97</sup> In der hier durchgeführten Studie konnten keine Veränderungen in der Gefäßwanddicke nach der Intervention mit Nitrat nachgewiesen werden. Auch in verschiedenen anderen Studien wurden keine Effekte von Nitrat auf diese Proteine beobachtet.<sup>92</sup> Ob eine längere Interventionsdauer andere Ergebnisse erzielen könnte, muss in weiterführenden Studien geklärt werden. Im Gegensatz dazu wurde in anderen tierexperimentellen Studien beobachtet, dass eingenommenes Nitrit (oral, inhaliert oder intraperitoneal appliziert) über die Bildung von NO in den Gefäßen in der Lage ist, eine Hyperplasie der Intima zu verhindern. Diese Hyperplasie ist mit einer geringeren NO-Bioverfügbarkeit und -Produktion assoziiert.<sup>98</sup>

#### **4.4 Die Auswirkungen diätetischen Nitrats auf den Blutdruck**

In der hier durchgeführten Studie konnten wir signifikante Effekte auf die Reduktion des systolischen Blutdrucks (SBP) durch die diätetische Nitrategie beobachten. Durchschnittlich konnte der SBP im Vergleich zur Kontrollgruppe um 8 mmHg gesenkt werden. Auf den diastolischen Blutdruck konnten keine signifikanten Effekte beobachtet werden. Dieses Phänomen wurde auch in einer Metaanalyse beschrieben, die insgesamt 254 Patienten einschloss, welche als Prüfpräparat entweder anorganisches Nitrat oder Rote-Bete-Saft erhielten. Die Studiendauer reichte von 2 Stunden bis 15 Tage mit einem in diesem Zeitraum applizierten Nitratgehalt von  $\approx 2,5$  bis 24 mmol/Dosis (157–1488 mg). Insgesamt konnte dabei gezeigt werden, dass durch die Supplementierung von Nitrat größere Effekte auf die Reduktion des systolischen Blutdrucks (-4,4 mmHg) als auf die des diastolischen Blutdrucks (-1,1 mmHg) erzielt wurden.<sup>99</sup>

Larsen *et al.* wiesen bereits nach, dass schon eine kurzzeitige Einnahme anorganischen Nitrats Effekte auf den Blutdruck ausüben kann. Es wurde beobachtet, dass der Blutdruck bei jungen ( $\approx 24$  Jahre alten) Probanden nach 3-tägiger Einnahme signifikant sinkt.<sup>52</sup> Diese Effekte wurden auch in weiteren Studien, die mit normotensiven Ratten durchgeführt wurden, dargestellt.<sup>100</sup> Blutdrucksenkende Effekte konnten jedoch nicht nur bei gesunden Probanden erkannt werden, sondern auch bei Patienten, die an milder Hypertonie leiden.<sup>101</sup> Selbst 24 Stunden nach der Einnahme von 250 ml Rote-Bete-Saft, der 3,5 mmol Nitrat ( $\approx 217$  mg) enthielt, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe immer noch ein Abfall des systolischen Blutdrucks um 8,5 mmHg festgestellt werden.<sup>101</sup> Dieser blutdrucksenkende Effekt gleicht dem der Standardmedikamente (Thiazide,  $\beta$ -Blocker, ACE-Hemmer, Kalzium-Antagonisten und AT1-Rezeptor-Blocker), die zur Therapie der Hypertonie verwendet werden. Bei Einnahme eines dieser Medikamente in einer geläufigen Dosis wird der Blutdruck systolisch um 9,1

mmHg gesenkt.<sup>102</sup> Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass Nitrat ebenso potente Fähigkeiten zur Blutdrucksenkung besitzt wie im klinischen Alltag täglich verwendete künstlich hergestellte Medikamente.

Auch in anderen Studien konnten nach einmaliger Einnahme von 0,5 l Rote-Bete-Saft (ca. 1360 mg Nitrat) blutdrucksenkende Effekte sowohl auf den systolischen als auch auf den diastolischen Blutdruck von ca. -10/-8 mmHg beobachtet werden. Dort wurde gezeigt, dass der systolische Blutdruck sogar 24 Stunden nach der Einnahme des Präparats signifikant gesunken war. Wie auch in der hier vorliegenden Studie wurde dabei eine Korrelation zwischen erhöhten Nitritspiegeln im Plasma und gesunkenem Blutdruck beobachtet.<sup>73</sup> Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Reduktion des Blutdrucks plasmanitritmediert ist.

Um zu überprüfen, ob die Senkung des Blutdrucks wirklich durch das oral reduzierte Nitrit, das über das Nitrat eingenommen wurde, verursacht wird, wurden bereits verschiedene Studien durchgeführt.<sup>103, 74</sup> In einer Studie wurden die Probanden dazu aufgefordert, ihren Speichel nicht herunterzuschlucken, sondern auszuspucken.<sup>73</sup> Auf diesem Wege wurde der enterosaliväre Kreislauf unterbrochen und es kam weder zu einer erhöhten Nitritkonzentration im Plasma noch zu einem gesunkenen Blutdruck.<sup>73</sup> Weiterführend wurde belegt, dass das Nitrat, welches durch mundständige Bakterien reduziert wird, schon unter basalen Umständen und ohne exogene Supplementierung von Nitrat zur Regulation des Blutdrucks beiträgt. In einer Studie konnte zudem gezeigt werden, dass der systolische Blutdruck bei einer 7-tägigen, zweimal täglich ausgeführten Benutzung einer antiseptischen Mundspülung um ca. 3 mmHg ansteigt.<sup>104</sup> Zusätzlich wurden dadurch die orale Nitritproduktion um 90 % und die Nitritspiegel im Plasma um 25 % gesenkt. Nach Beendigung der Benutzung der Mundspülung kehrten die beobachteten Parameter wieder auf die Ausgangswerte zurück.<sup>104</sup> Diese Studien verdeutlichen die funktionelle Relevanz des enterosalivären Kreislaufs: Es wird somit suggeriert, dass der Anstieg des Blutdrucks nach Benutzung der Mundspülung darauf zurückzuführen ist, dass durch die Unterbrechung des enterosalivären Kreislaufs weniger NO aus Nitrat und Nitrit generiert werden kann.<sup>104</sup> Dies demonstriert gerade den Zusammenhang von erniedrigten Konzentrationen von Nitrit im Plasma und erhöhtem Blutdruck.

Zusammenfassend konnte durch oben genannte Studien gezeigt werden, dass sowohl endogen generiertes als auch diätetisches Nitrat durch mundständige Bakterien zu Nitrit und schließlich zu NO reduziert werden kann. Dieser Mechanismus ist für eine adäquate Regulation des Blutdrucks von grundlegender Bedeutung. Anhand der oben dargestellten Daten wird deutlich, dass eine Störung der Nitritregulation – beispielsweise durch die Verwendung eines Mundwassers – entscheidende Konsequenzen für das kardiovaskuläre System mit sich bringt.

## 4.5 Einfluss erhöhter Plasmanitritwerte auf das Gefäßsystem

In der hier durchgeführten Studie konnte festgestellt werden, dass sowohl die Nitrat- als auch die Nitritspiegel im Plasma der Probanden nach der 4-wöchigen Supplementierung von Nitrat signifikant gestiegen waren. In der Kontrollgruppe konnten hingegen keine Anstiege derselben beobachtet werden. In einer anderen Studie wurde neben einer Reduktion des Blutdrucks ebenfalls ein Anstieg der Nitrat- und Nitritspiegel im Plasma nach einer Supplementierung mit 24 mmol Nitrat nachgewiesen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die im Plasma erreichten Spiegel abhängig von der jeweiligen Nitratdosis waren.<sup>105</sup> Interessanterweise konnte dargestellt werden, dass die biologischen Effekte nicht mit den Veränderungen der Plasmalevel von Nitrat, aber dafür mit den Veränderungen der Nitritkonzentration im Plasma korrelierten.<sup>105</sup> Ähnliche Effekte konnten in der hier durchgeführten tierexperimentellen Studie beobachtet werden: Sowohl bei den alten als auch bei den jungen Mäusen stiegen die Plasmaspiegel der Nitratkonzentration signifikant an. Ein signifikanter Anstieg der Nitritwerte im Plasma konnte allerdings nur bei den alten Mäusen beobachtet werden. Nach der Nitratgabe stiegen die Nitritspiegel derselben auf fast doppelt so hohe Werte wie die Nitritspiegel der jungen Mäuse nach der Supplementierung. Diese Effekte wurden auch in einer anderen Studie beobachtet, in der eine Supplementierung mit Nitrit erfolgte.<sup>86</sup>

Die geringen basalen Nitritwerte der alten Mäuse scheinen mit einer eingeschränkten Gefäßfunktion im Alter einherzugehen. Allerdings scheinen die alten Mäuse nach der nitratreichen Diät mehr Nitrat zu Nitrit umzusetzen als die jungen Mäuse. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass sich im Speichel der alten Mäuse andere Bakterien befinden, die mehr Nitrat zu Nitrit reduzieren. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Veränderungen des oralen Microbioms die NO-Bioverfügbarkeit beeinflussen können. Ob dies der Mechanismus ist, der den Resultaten der vorliegenden Studie zugrundeliegt, muss in weiterführenden Untersuchungen erörtert werden. Zudem kann angenommen werden, dass eine nitratreiche Ernährung das orale Microbiom so verändert, dass die Reduktion von Nitrat zu Nitrit und NO an Effizienz gewinnt.<sup>87</sup> Dies ist ein möglicher Erklärungsansatz für die Tatsache, dass die Nitritwerte im Plasma der alten Mäuse nach der Nitratdiät fast doppelt so hoch waren wie die entsprechenden Werte im Plasma der jungen Mäuse.

Die Arbeitsgruppe von Kapil konnte bei Post-hoc-Analysen einer Studie außerdem feststellen, dass es geschlechtsspezifische unterschiedliche Reaktionen auf die Einnahme von Nitrat gab. Bei den weiblichen Probanden konnte sowohl systolisch als auch diastolisch ein signifikant niedrigerer basaler Blutdruck als bei den männlichen Probanden beobachtet werden. Darüber hinaus waren die basalen Level der Nitratkonzentration bei beiden Geschlechtern ähnlich; bei den Frauen konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der basalen plasmatischen Nitritkonzentrationen festgestellt werden.<sup>105</sup> Auch diese Erkenntnisse legen die

Vermutung nahe, dass ein starker Zusammenhang zwischen Nitritkonzentrationen im Plasma, dem Blutdruck und einer intakten Gefäßfunktion existiert.

Es ist gut möglich, dass die erhöhten Nitritspiegel bei Frauen und der damit verbundene niedrigere Blutdruck mit einem geringeren Risiko für die Morbidität und Mortalität von KHK einhergehen. Männer haben insgesamt ein doppelt so hohes Risiko, an einer KHK zu erkranken. Die geschlechtlichen Unterschiede die Morbidität betreffend scheinen sich aber im Alter zu verringern, denn die Morbidität der KHK steigt bei Frauen ab dem 45. Lebensjahr rapide an. Dies könnte mit der Menopause der Frauen in höherem Alter zu tun haben.<sup>106</sup> Eventuell fallen auch die basalen Nitritspiegel bei Frauen im Alter auf ein ähnliches Niveau wie das der basalen Nitritspiegel der Männer ab. Hierin könnte das bei Frauen im Alter erhöhte Risiko, an einer CVD zu erkranken, also möglicherweise begründet liegen.

Die Probandinnen unserer Studie waren im Durchschnitt jedoch 63 Jahre alt; der prämenopausale Effekt der basalen Nitritwerte auf den Blutdruck ist somit auszuschließen. Die genauen Mechanismen, die den hier beobachteten Effekten zugrundeliegen, sind daher nicht vollkommen klar. Zukünftig sollte deswegen untersucht werden, welche Rolle geschlechtsspezifische Unterschiede diesbezüglich einnehmen.

#### **4.6 Diätetische Modulation des Nitrat-Nitrit-Signalwegs**

NO wirkt unter anderem über die Steigerung der cGMP-Level vasodilatierend. In den meisten Studien korrelierte der signifikante Anstieg der plasmatischen cGMP-Level mit den positiven Effekten auf die Gefäßfunktionen.<sup>105</sup> Besonders die erhöhten plasmatischen Nitritkonzentrationen waren dabei mit einer erhöhten cGMP-Konzentration im Plasma assoziiert.<sup>107</sup>

Die Bildung von cGMP führt zur Aktivierung der PKG, die besonders in der glatten Muskulatur der Gefäße zu finden ist. Der ausschlaggebende Faktor für die Gefäßdilataion ist daher die PKG, indem sie Proteine phosphoryliert, die die Myosin-Leichtketten-Kinase und die intrazellulären Kalziumlevel beeinflussen.<sup>66</sup> In einigen Studien mit PKG-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass der NO/cGMP-Signalweg in der glatten Gefäßmuskulatur durch den Wegfall der PKG unterbrochen wird.<sup>108</sup> Daher ist die PKG ein unabdingbarer Faktor, um die Vasodilatation über den NO-Signalweg zu ermöglichen.

In der hier durchgeführten Studie konnte nach der Supplementierung von Nitrat ein Abfall der cGMP-Spiegel festgestellt werden. In den Aorten junger Mäuse wurde nach 4-wöchiger Supplementierung von Nitrat ein signifikanter Anstieg der PKG-Aktivität beobachtet. Auch in den Aorten der alten Mäuse, die basal einen ähnlichen PKG-Wert wie die jungen Mäuse aufwiesen, konnte die Aktivität der PKG nach Supplementierung von Nitrat auf mehr als das 3-fache gesteigert

werden. Dies scheint auf einen erhöhten Verbrauch des cGMPs im Gefäßsystem zurückzuführen zu sein. Die cGMP-Werte der jungen Mäuse waren basal deutlich erhöht, was mit einer besseren Gefäßfunktion assoziiert zu sein scheint.

#### 4.7 Die klinische Bedeutung des Nitrats im Wandel

Anorganischem Nitrat wird seit dem Ende der 40er Jahre ein schlechter Ruf zuteil,<sup>109</sup> wofür es zwei Gründe gibt. Zum einen wird es häufig in Zusammenhang mit Methämoglobinämie gebracht. Daher werden die Nitratkonzentrationen im Trinkwasser streng kontrolliert. Die festgelegten Grenzwerte für dasselbe liegen in den meisten Ländern bei 50 mg/l, was ca. 1 mmol/l entspricht. Bei der Methämoglobinämie kommt es zu einer Interaktion von als Zwischenprodukt aus Nitrat entstandenem Nitrit mit dem Eisenatom des Hämoglobins. Dabei oxidiert das Nitrit das Eisen-Ion von  $Fe^{2+}$  zu  $Fe^{3+}$ . Somit entsteht Methämoglobin, welches nicht mehr in der Lage ist, Sauerstoff zu transportieren. In einer Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass die Nitritwerte im Plasma selbst bei hohen Einnahmen von Nitrat, zum Beispiel durch ca. 45 mmol/l Nitrat enthaltenden Rote-Bete-Saft, unter 1  $\mu$ Mol/l blieben.<sup>73</sup> Auch Cosby *et al.* wiesen nach, dass bei gesunden Probanden nach Nitritinfusion systemische Nitritspiegel von 16  $\mu$ mol/l erreicht wurden. Dabei ließ sich jedoch keine bedeutende Methämoglobinämie feststellen.<sup>110</sup> Neuere Erkenntnisse machen deutlich, dass die Methämoglobinämie in den 40er Jahren auf mehr Faktoren als nur auf erhöhte Nitratwerte im Trinkwasser zurückzuführen ist. So litten beispielsweise die meisten Kinder, bei denen Methämoglobinämie auftrat, auch an Diarrhö und Atemwegserkrankungen.<sup>111</sup> Angesichts dessen waren wahrscheinlich eher Darmbakterien, die das Trinkwasser besiedelten, ausschlaggebend für die Produktion des Nitrits, das für die Methämoglobinämie verantwortlich war.<sup>111</sup>

Zum anderen steht Nitrat im Verdacht, durch die Bildung von Nitrosaminen aus Nitrit und Nitrat vor allem in der Blase kanzerogen zu wirken.<sup>112</sup> Allerdings konnte nie nachgewiesen werden, dass Nitrat kanzerogene Wirkungen auf die menschliche Blase ausübt.<sup>113, 114</sup> Das US National Toxicology Program führte dazu eine Studie durch, in der Mäuse und Ratten 2 Jahre lang mit Wasser versorgt wurden, das ca. 750-3000 nmg/l (16-65 nmM) Nitrit enthielt. In dieser konnte festgestellt werden, dass Nitrit im Trinkwasser keine kanzerogenen Wirkungen auf die Nagetiere ausübte.<sup>115</sup> Auch große Studien, die am Menschen durchgeführt wurden, zeigten, dass keine Assoziationen der Nitritwerte mit Krebs bei erhöhtem Verzehr von Obst und Gemüse vorzuweisen waren. Mit 5 Portionen Obst und Gemüse am Tag wurde der *acceptable daily intake* (ADI) dabei meist deutlich überschritten. Genau hierbei konnte jedoch eine Reduktion auf die Entwicklung von chronischen Krankheiten bewiesen werden.<sup>32</sup>

Organisches Nitrat hingegen findet heutzutage im klinischen Alltag Anwendung zur Therapie von Angina Pectoris, Herzinsuffizienz und KHK. In der glatten

Muskelzelle werden organische Nitrate zu NO reduziert. Somit wirken sie vasodilatierend und führen zu einem raschen Abfall des Blutdrucks. Das am häufigsten verwendete organische Nitrat ist das Nitroglycerin (Glycerintrinitrat, GTN). Ein wichtiger limitierender Faktor für die Therapie mit organischen Nitraten ist die Entwicklung der sogenannten Nitrattoleranz. Dabei spielt die mitochondriale Aldehyddehydrogenase-2 (mALDH2) eine entscheidende Rolle: Zur Bioaktivierung von NO ist GTN nämlich auf dieses Enzym angewiesen. Bei der *in vivo*-Metabolisierung des GTNs entstehen aber neben NO auch weitere reaktive Sauerstoffspezies ( $O_2^-$ ), die wiederum die mALDH2 inhibieren und somit zur Nitrattoleranz führen.<sup>116</sup> Aufgrund dessen ist der therapeutische Gebrauch der organischen Nitrate eingeschränkt. Mittlerweile gibt es daher schon den Versuch, alternative Medikamente zu entwickeln. Diese sollen aus einer Kombination von schon vorhandenen Pharmaka und neu entwickelten Substanzen bestehen, die NO freisetzen können. Ein Beispiel dafür sind die Nitrospirine.<sup>117</sup> Als Vorteil anorganischen Nitrats konnte in einer Studie belegt werden, dass es bei der täglichen Einnahme desselben nicht zur Entwicklung einer Nitrattoleranz kommt.<sup>118</sup>

Anorganisches Nitrat dient als Vorstufe des bioaktiven Nitrits, welches von mundständigen Bakterien umgewandelt wird. Allerdings gibt es einige vorteilhafte Gründe dafür, anstelle von Nitrit diätetisches Nitrat zuzuführen. Im Plasma weist Nitrat eine lange Halbwertszeit von 5-7 Stunden und eine Bioverfügbarkeit von 100 % auf.<sup>119, 120</sup> Nitrit hingegen hat eine Halbwertszeit von ca. 30 Minuten und eine Bioverfügbarkeit von ca. 96 %.<sup>121</sup> Durch die lange Bioverfügbarkeit von Nitrat ist es möglich, dass es, therapeutisch eingesetzt, nur einmal täglich eingenommen werden müsste. Dieser Fakt ist von enormer Relevanz, um die *compliance* der Patienten zu erhöhen, und würde somit den klinischen Alltag positiv beeinflussen. Hinzu kommt der immense Vorteil, dass eine nitratreiche Diät zur Therapie bzw. Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen für die Patienten sehr viel attraktiver ist, da es ein natürlicher und kosteneffektiver Weg wäre, diesen Krankheiten entgegen zu treten.

Anorganisches Nitrat spielt allerdings nicht nur bei der Prävention bzw. Therapie der CVD eine Rolle. Es wurde festgestellt, dass NO in den Mitochondrien an die COX (Cytochrom-C-Oxidase) bindet und somit den Sauerstofftransport zu weiter entfernten Mitochondrien ermöglicht. Dies führt wiederum zu einem weitläufigeren Gebiet der Gewebeoxygenierung.<sup>122</sup> In diesem Kontext konnten unter anderem Larsen *et al.* in einer Studie zeigen, dass der Sauerstoffbedarf während körperlicher Anstrengung durch eine Supplementierung von Nitrat sinkt.<sup>123</sup> In einer Metaanalyse, die 254 Patienten einschloss, konnte festgestellt werden, dass die Einnahme diätetischen Nitrats die sportliche Leistungsfähigkeit begünstigt. Diese Ergebnisse wurden bei Freizeitsportlern und dann, wenn die Einnahme des diätetischen Nitrats chronisch über mehrere Tage durchgeführt wurde, häufiger beobachtet.<sup>124</sup>

Somit stellt anorganisches Nitrat eine natürliche, kostengünstigere Alternative zu den bisher entwickelten Medikamenten, die in der Therapie der Hypertonie eingesetzt werden, dar. Es ist in der Lage, sowohl über eine akute als auch über eine chronische Einnahme die im Alter beeinträchtigten Gefäßfunktionen zu verbessern. Zudem ist Nitrat maßgeblich an der Regulation des Blutdrucks und der Gefäßfunktionen beteiligt.



## 5 Schlussfolgerung

Der physiologische Alterungsprozess geht mit vaskulären Veränderungen einher, welche unter anderem zu einer endothelialen Dysfunktion und Gefäßsteifigkeit führen. Hierbei scheint eine beeinträchtigte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) verbunden mit morphologischen und molekularen Veränderungen der Gefäße maßgeblich zu sein. Diätetisches Nitrat kann *in vivo* zu Nitrit und NO bioaktiviert werden und somit als Alternative zur enzymatischen NO-Generierung dienen. Eine zentrale Hypothese der vorliegenden Arbeit war die, dass eine chronische diätetische Nitratgabe den endogenen NO-Pool modulieren kann und dass dadurch altersabhängige vaskuläre Funktionen beeinflusst werden. Diese Hypothese konnte in einer klinischen und einer tierexperimentellen Studie belegt werden.

Das in den Studien verwendete anorganische Nitrat befindet sich in hohen Dosen in diversen Lebensmitteln wie Rote-Bete oder Rucolasalat und ist somit für die generelle Population verfügbar. Die präventive Maßnahme des regelmäßigen Verzehrs dieser Lebensmittel ist neben ihren geringen Kosten für den Patienten auch im Alltag ohne viel Aufwand umzusetzen.

Beim Menschen führte die Nitrateinnahme zu einer Reduktion der arteriellen und aortalen Steifigkeit und zu einer erhöhten FMD. Die Nitritspiegel wurden um das 4-fache erhöht. Außerdem konnte ein reduzierter systolischer Blutdruck, jedoch kein Einfluss auf den diastolischen Blutdruck beobachtet werden.

Nach der Supplementierung von Nitrat stiegen in der tierexperimentellen Studie sowohl in alten als auch in jungen Mäusen die plasmatischen Nitratlevel an. Ein Anstieg des Plasmanitrits konnte jedoch nur in alten Mäusen festgestellt werden. In der Aorta und im Herzen zeigte sich kein signifikanter Anstieg des NO-Pools.

Die Ergebnisse beider Studien zeigen, dass eine chronische diätetische Supplementierung von Nitrat sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen die Nitritspiegel steigern kann. Durch die damit verbundene erhöhte Bioverfügbarkeit von NO können die altersabhängige endotheliale Dysfunktion und die vaskuläre Gefäßsteifigkeit in älteren Personen verringert werden. Diätetisches Nitrat scheint demnach eine mögliche therapeutische Option darzustellen, um die altersabhängige vaskuläre Dysfunktion zu beeinflussen und somit das Risiko zu senken, an kardiovaskulären Krankheiten zu erkranken.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Lakatta EG and Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*. 2003;107:139-46.
2. 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 C and Stroke Statistics S. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129:e28-e292.
3. CardioPulse Articles \* European Cardiovascular Disease Statistics 4th edition 2012: EuroHeart II \* European Heart Journal Elite Reviewers of 2012 \* Top EHJ Editors 2012 \* Highlights from European Society of Cardiology Congress 2013. *Eur Heart J*. 2013;34:3007-13.
4. Lakatta EG. Age-associated cardiovascular changes in health: impact on cardiovascular disease in older persons. *Heart failure reviews*. 2002;7:29-49.
5. Kelm M and Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circulation research*. 1990;66:1561-75.
6. Toborek M and Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic research in cardiology*. 1999;94:295-314.
7. Lauer T, Heiss C, Balzer J, Kehmeier E, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Meyer C, Merx MW, Kelm M and Rassaf T. Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. *Basic research in cardiology*. 2008;103:291-7.
8. Tschudi MR, Barton M, Bersinger NA, Moreau P, Cosentino F, Noll G, Malinski T and Luscher TF. Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98:899-905.
9. Berkowitz DE, White R, Li D, Minhas KM, Cernetich A, Kim S, Burke S, Shoukas AA, Nyhan D, Champion HC and Hare JM. Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*. 2003;108:2000-6.
10. Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rossig L, Vasa M, Zeiher AM and Dimmeler S. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circulation research*. 2001;89:709-15.
11. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R and International Brachial Artery Reactivity Task F. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39:257-65.
12. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M and Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:12814-9.
13. Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C and Kelm M. Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *British journal of sports medicine*. 2007;41:669-73; discussion 673.
14. Mitchell GF, Guo CY, Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Vita JA, Vasani RS and Levy D. Cross-sectional correlates of increased aortic stiffness in the community: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2007;115:2628-36.
15. Sagie A, Larson MG and Levy D. The natural history of borderline isolated systolic hypertension. *N Engl J Med*. 1993;329:1912-7.

16. Lehmann ED, Parker JR, Hopkins KD, Taylor MG and Gosling RG. Validation and reproducibility of pressure-corrected aortic distensibility measurements using pulse-wave-velocity Doppler ultrasound. *Journal of biomedical engineering*. 1993;15:221-8.
17. Cavalcante JL, Lima JA, Redheuil A and Al-Mallah MH. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57:1511-22.
18. Lakatta EG and Levy D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation*. 2003;107:346-54.
19. Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, Sonntag WE and Csiszar A. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2010;65:1028-41.
20. Kaess BM, Rong J, Larson MG, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ, Vasan RS and Mitchell GF. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2012;308:875-81.
21. Nagai Y, Metter EJ, Earley CJ, Kemper MK, Becker LC, Lakatta EG and Fleg JL. Increased carotid artery intimal-medial thickness in asymptomatic older subjects with exercise-induced myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:1504-9.
22. Ahanchi SS, Tsihlis ND and Kibbe MR. The role of nitric oxide in the pathophysiology of intimal hyperplasia. *Journal of vascular surgery*. 2007;45 Suppl A:A64-73.
23. Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of H and Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of C. 2013 ESH/ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood pressure*. 2013;22:193-278.
24. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Whelton PK and He J. Worldwide prevalence of hypertension: a systematic review. *Journal of hypertension*. 2004;22:11-9.
25. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK and He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365:217-23.
26. Amery A, Birkenhager W, Brixko P, Bulpitt C, Clement D, Deruyttere M, De Schaepe-dryver A, Dollery C, Fagard R, Forette F and et al. Mortality and morbidity results from the European Working Party on High Blood Pressure in the Elderly trial. *Lancet*. 1985;1:1349-54.
27. Dusing R. Optimizing blood pressure control through the use of fixed combinations. *Vascular health and risk management*. 2010;6:321-5.
28. American Heart Association Nutrition C, Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M and Wylie-Rosett J. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*. 2006;114:82-96.
29. Donaldson AN. The Relation of Protein Foods to Hypertension. *California and western medicine*. 1926;24:328-31.
30. Sacks FM, Rosner B and Kass EH. Blood pressure in vegetarians. *American journal of epidemiology*. 1974;100:390-8.
31. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH and Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med*. 1997;336:1117-24.
32. Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D and Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96:1577-84.
33. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF and Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *Bmj*. 2008;337:a1344.

34. Joshipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Colditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D and Willett WC. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine*. 2001;134:1106-14.
35. Joshipura KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D and Willett WC. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999;282:1233-9.
36. Hord NG, Tang Y and Bryan NS. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;90:1-10.
37. Lundberg JO, Feelisch M, Bjorne H, Jansson EA and Weitzberg E. Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2006;15:359-62.
38. Zweier JL, Wang P, Samouilov A and Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature medicine*. 1995;1:804-9.
39. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Godecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M and Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free radical biology & medicine*. 2003;35:790-6.
40. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C, Smith L, Golden M and Benjamin N. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nature medicine*. 1995;1:546-51.
41. Lundberg JO and Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free radical biology & medicine*. 2004;37:395-400.
42. Heiss C, Meyer C, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Heinen Y, Luedike P, Keymel S, Ayoub N, Lundberg JO, Weitzberg E, Kelm M and Rassaf T. Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. *Free radical biology & medicine*. 2012;52:1767-72.
43. Lidder S and Webb AJ. Vascular effects of dietary nitrate (as found in green leafy vegetables and beetroot) via the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75:677-96.
44. Lundberg JO, Weitzberg E and Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7:156-67.
45. Moncada S and Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.
46. Palmer RM, Ashton DS and Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-6.
47. Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE and Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature*. 2002;416:337-9.
48. Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C and Cohen RA. S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nature medicine*. 2004;10:1200-7.
49. Lima B, Forrester MT, Hess DT and Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circulation research*. 2010;106:633-46.
50. Komalavilas P and Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:21933-8.
51. Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S, Cannon RO, 3rd, Kelm M, Wink DA, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM, Freeman BA, Lancaster JR, Jr., Feelisch M and Lundberg JO. The emerging biology of the nitrite anion. *Nature chemical biology*. 2005;1:308-14.
52. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO and Weitzberg E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N Engl J Med*. 2006;355:2792-3.

53. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P and Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78:22-7.
54. Davies JM, Bailey MA, Griffin KJ and Scott DJ. Pulse wave velocity and the non-invasive methods used to assess it: Complior, SphygmoCor, Arteriograph and Vicorder. *Vascular*. 2012;20:342-9.
55. Ring M, Eriksson MJ, Zierath JR and Caidahl K. Arterial stiffness estimation in healthy subjects: a validation of oscillometric (Arteriograph) and tonometric (SphygmoCor) techniques. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2014;37:999-1007.
56. Shimizu M and Kario K. Role of the augmentation index in hypertension. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2008;2:25-35.
57. Stoner L, Lambrick DM, Faulkner J and Young J. Guidelines for the use of pulse wave analysis in adults and children. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2013;20:404-6.
58. Naqvi TZ and Lee MS. Carotid intima-media thickness and plaque in cardiovascular risk assessment. *JACC Cardiovascular imaging*. 2014;7:1025-38.
59. Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S and Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing samples. *Methods in enzymology*. 2002;359:158-68.
60. Bryan NS and Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free radical biology & medicine*. 2007;43:645-57.
61. Ishibashi T, Miwa T, Shinkawa I, Nishizawa N, Nomura M, Yoshida J, Kawada T and Nishio M. Quantifying nanomolar levels of nitrite in biological samples by HPLC-Griess method: special reference to arterio-venous difference in vivo. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2008;215:1-11.
62. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M and Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free radical biology & medicine*. 2002;33:1590-6.
63. Marley R, Feelisch M, Holt S and Moore K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free radical research*. 2000;32:1-9.
64. Rassaf T, Feelisch M and Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free radical biology & medicine*. 2004;36:413-22.
65. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain D and Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002;16:1775-85.
66. Hofmann F, Ammendola A and Schlossmann J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *Journal of cell science*. 2000;113 ( Pt 10):1671-6.
67. Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F and Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*. 1996;274:2082-6.
68. Tamura N, Itoh H, Ogawa Y, Nakagawa O, Harada M, Chun TH, Suga S, Yoshimasa T and Nakao K. cDNA cloning and gene expression of human type I alpha cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension*. 1996;27:552-7.
69. Orstavik S, Natarajan V, Tasken K, Jahnsen T and Sandberg M. Characterization of the human gene encoding the type I alpha and type I beta cGMP-dependent protein kinase (PRKG1). *Genomics*. 1997;42:311-8.
70. Li Z, Xi X, Gu M, Feil R, Ye RD, Eigenthaler M, Hofmann F and Du X. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell*. 2003;112:77-86.
71. Yamahara K, Itoh H, Chun TH, Ogawa Y, Yamashita J, Sawada N, Fukunaga Y, Sone M, Yurugi-Kobayashi T, Miyashita K, Tsujimoto H, Kook H, Feil R, Garbers DL, Hofmann F and Nakao K. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein

- kinase pathway in vascular regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:3404-9.
72. Gangolli SD, van den Brandt PA, Feron VJ, Janzowsky C, Koeman JH, Speijers GJ, Spiegelhalter B, Walker R and Wisnok JS. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. *European journal of pharmacology*. 1994;292:1-38.
73. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, Rashid R, Miall P, Deanfield J, Benjamin N, MacAllister R, Hobbs AJ and Ahluwalia A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*. 2008;51:784-90.
74. Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ and Ahluwalia A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension*. 2015;65:320-7.
75. Wannamethee SG, Welsh P, Lowe GD, Gudnason V, Di Angelantonio E, Lennon L, Rumley A, Whincup PH and Sattar N. N-terminal pro-brain natriuretic Peptide is a more useful predictor of cardiovascular disease risk than C-reactive protein in older men with and without pre-existing cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;58:56-64.
76. Tsimikas S, Willeit P, Willeit J, Santer P, Mayr M, Xu Q, Mayr A, Witztum JL and Kiechl S. Oxidation-specific biomarkers, prospective 15-year cardiovascular and stroke outcomes, and net reclassification of cardiovascular events. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60:2218-29.
77. Jablonski KL, Racine ML, Geolfos CJ, Gates PE, Chonchol M, McQueen MB and Seals DR. Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61:335-43.
78. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C and Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-9.
79. Anderson TJ, Elstein E, Haber H and Charbonneau F. Comparative study of ACE-inhibition, angiotensin II antagonism, and calcium channel blockade on flow-mediated vasodilation in patients with coronary disease (BANFF study). *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:60-6.
80. Flammer AJ, Sudano I, Hermann F, Gay S, Forster A, Neidhart M, Kunzler P, Enseleit F, Periat D, Hermann M, Nussberger J, Luscher TF, Corti R, Noll G and Ruschitzka F. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2008;117:2262-9.
81. Monahan KD. Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;527:90-4.
82. Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx M, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H and Kelm M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51:2141-9.
83. Rodriguez-Mateos A, Hezel M, Aydin H, Kelm M, Lundberg JO, Weitzberg E, Spencer JP and Heiss C. Interactions between cocoa flavanols and inorganic nitrate: Additive effects on endothelial function at achievable dietary amounts. *Free radical biology & medicine*. 2015;80:121-8.
84. Bahra M, Kapil V, Pearl V, Ghosh S and Ahluwalia A. Inorganic nitrate ingestion improves vascular compliance but does not alter flow-mediated dilatation in healthy volunteers. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2012;26:197-202.
85. Mattace-Raso FU, van der Cammen TJ, Hofman A, van Popele NM, Bos ML, Schalekamp MA, Asmar R, Reneman RS, Hoeks AP, Breteler MM and Witteman JC. Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke: the Rotterdam Study. *Circulation*. 2006;113:657-63.

86. Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D and Benjamin EJ. Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;121:505-11.
87. Sindler AL, Fleenor BS, Calvert JW, Marshall KD, Zigler ML, Lefer DJ and Seals DR. Nitrite supplementation reverses vascular endothelial dysfunction and large elastic artery stiffness with aging. *Aging cell*. 2011;10:429-37.
88. Donato AJ, Eskurza I, Silver AE, Levy AS, Pierce GL, Gates PE and Seals DR. Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB. *Circulation research*. 2007;100:1659-66.
89. Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T and Leeuwenburgh C. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19:419-21.
90. 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 and Luscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192:1731-44.
91. Li H, Horke S and Forstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014;237:208-219.
92. Fleenor BS, Sindler AL, Eng JS, Nair DP, Dodson RB and Seals DR. Sodium nitrite de-stiffening of large elastic arteries with aging: role of normalization of advanced glycation end-products. *Experimental gerontology*. 2012;47:588-94.
93. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroot RC and Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001;104:1464-70.
94. Vlachopoulos C, Aznaouridis K and Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;55:1318-27.
95. Howard G, Sharrett AR, Heiss G, Evans GW, Chambless LE, Riley WA and Burke GL. Carotid artery intimal-medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. ARIC Investigators. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1993;24:1297-304.
96. Diez J. Arterial stiffness and extracellular matrix. *Advances in cardiology*. 2007;44:76-95.
97. Fleenor BS, Marshall KD, Durrant JR, Lesniewski LA and Seals DR. Arterial stiffening with ageing is associated with transforming growth factor-beta1-related changes in adventitial collagen: reversal by aerobic exercise. *The Journal of physiology*. 2010;588:3971-82.
98. Alef MJ, Vallabhaneni R, Carchman E, Morris SM, Jr., Shiva S, Wang Y, Kelley EE, Tarpey MM, Gladwin MT, Tzeng E and Zuckerbraun BS. Nitrite-generated NO circumvents dysregulated arginine/NOS signaling to protect against intimal hyperplasia in Sprague-Dawley rats. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121:1646-56.
99. Siervo M, Lara J, Ogbonmwan I and Mathers JC. Inorganic nitrate and beetroot juice supplementation reduces blood pressure in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of nutrition*. 2013;143:818-26.
100. Petersson J, Carlstrom M, Schreiber O, Phillipson M, Christoffersson G, Jagare A, Roos S, Jansson EA, Persson AE, Lundberg JO and Holm L. Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. *Free radical biology & medicine*. 2009;46:1068-75.
101. Ghosh SM, Kapil V, Fuentes-Calvo I, Bubb KJ, Pearl V, Milsom AB, Khambata R, Maleki-Toyserkani S, Yousuf M, Benjamin N, Webb AJ, Caulfield MJ, Hobbs AJ and Ahluwalia A. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension*. 2013;61:1091-102.

102. Law MR, Morris JK and Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *Bmj*. 2009;338:b1665.
103. Liu AH, Bondonno CP, Croft KD, Puddey IB, Woodman RJ, Rich L, Ward NC, Vita JA and Hodgson JM. Effects of a nitrate-rich meal on arterial stiffness and blood pressure in healthy volunteers. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2013;35C:123-130.
104. Kapil V, Haydar SM, Pearl V, Lundberg JO, Weitzberg E and Ahluwalia A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free radical biology & medicine*. 2013;55:93-100.
105. 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 and Ahluwalia A. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension*. 2010;56:274-81.
106. Lerner DJ and Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *American heart journal*. 1986;111:383-90.
107. Batchelor AM, Bartus K, Reynell C, Constantinou S, Halvey EJ, Held KF, Dostmann WR, Vernon J and Garthwaite J. Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:22060-5.
108. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, Wang GX, Korth M, Aszodi A, Andersson KE, Krombach F, Mayerhofer A, Ruth P, Fassler R and Hofmann F. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO journal*. 1998;17:3045-51.
109. Walton G. Survey of literature relating to infant methemoglobinemia due to nitrate-contaminated water. *American journal of public health and the nation's health*. 1951;41:986-96.
110. 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 and Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nature medicine*. 2003;9:1498-505.
111. Ward MH, deKok TM, Levallois P, Brender J, Gulis G, Nolan BT, VanDerslice J and International Society for Environmental E. Workgroup report: Drinking-water nitrate and health--recent findings and research needs. *Environmental health perspectives*. 2005;113:1607-14.
112. Njeze GE, Dilibe U and Ilo C. Nitrate and drinking water from private wells: will there be an epidemic of cancers of the digestive tract, urinary bladder and thyroid? *Nigerian journal of clinical practice*. 2014;17:178-82.
113. Zeegers MP, Selen RF, Kleinjans JC, Goldbohm RA and van den Brandt PA. Nitrate intake does not influence bladder cancer risk: the Netherlands cohort study. *Environmental health perspectives*. 2006;114:1527-31.
114. Wang W, Fan Y, Xiong G and Wu J. Nitrate in drinking water and bladder cancer: a meta-analysis. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2012;32:912-8.
115. National Toxicology P. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). *National Toxicology Program technical report series*. 2001;495:7-273.
116. Mayer B and Beretta M. The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles. *British journal of pharmacology*. 2008;155:170-84.
117. del Soldato P, Sorrentino R and Pinto A. NO-aspirins: a class of new anti-inflammatory and antithrombotic agents. *Trends in pharmacological sciences*. 1999;20:319-23.
118. Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, Pluta RM, Hon YY, Grimes G, Partovi K, Pelletier MM, Oldfield EH, Cannon RO, 3rd, Schechter AN and Gladwin MT. Nitrite infusion in humans and



nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation*. 2007;116:1821-31.

119. Wagner DA, Schultz DS, Deen WM, Young VR and Tannenbaum SR. Metabolic fate of an oral dose of <sup>15</sup>N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer research*. 1983;43:1921-5.

120. van Velzen AG, Sips AJ, Schothorst RC, Lambers AC and Meulenbelt J. The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. *Toxicology letters*. 2008;181:177-81.

121. Hunault CC, van Velzen AG, Sips AJ, Schothorst RC and Meulenbelt J. Bioavailability of sodium nitrite from an aqueous solution in healthy adults. *Toxicology letters*. 2009;190:48-53.

122. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP and Lancaster JR, Jr. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:355-60.

123. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO and Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta physiologica*. 2007;191:59-66.

124. Hoon MW, Johnson NA, Chapman PG and Burke LM. The effect of nitrate supplementation on exercise performance in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 2013;23:522-32.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Besonders möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter, Herrn Prof. Dr. med. Tienush Rassaf, bedanken. Seine Begeisterung für die Forschung und die Medizin werden mir immer ein Vorbild sein. Sein offenes Ohr bei Problemen war immer eine hilfreiche Unterstützung. Am meisten möchte ich ihm für seine ansteckende Motivation danken, die mir auch in schwierigen Phasen geholfen hat, nicht aufzugeben und Probleme zu überwinden.

Bei Frau Dr. rer. nat. Ulrike Hendgen-Cotta bedanke ich mich für ihre Hilfe und ihre Ratschläge bei Problemen jeglicher Art sowie für ihre tolle Betreuung im Labor.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. med. Christos Rammos, für seine Unterstützung, seine Ratschläge, seine Geduld und seine aufmunternden Worte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Pia Stock und Herrn Dominik Semmler für ihre Hilfestellungen und ihre Unterstützung im Labor und bei biochemischen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des kardiologischen Labors und bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe ganz herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, vor allem meinen Eltern, für ihre bedingungslose Liebe und Unterstützung. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Der familiäre Rückhalt ist mir eine unersetzliche Stütze in allen Lebenslagen. Danke, dass ihr mich so nehmt, wie ich bin und ich immer auf euch zählen kann.

## **Eidesstattliche Versicherung**

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

Düsseldorf, 28.12.2015

Andrea Verena Bernard