

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

**Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die
RXNO-Konzentration im menschlichen Plasma:
biochemische Marker des NO-Stoffwechsels und endotheliale
Dysfunktion**

Dissertation

zur Erlangung eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Sandra Hamada

2006

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

Gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm

Koreferent: Prof. Dr. Gödecke

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AHA	American Heart Association
ADA	American Diabetes Association
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenzdetektion
DTT	Dithiotreitol
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenosin-Dinukleotid
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flow-Mediated Dilation (Fluss-vermittelte Dilatation)
FMN	Flavin-Mononukleotid
Hb	Deoxyhämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HCl	Salzsäure
HgCl ₂	Quecksilber-(II)-Chlorid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
JNC	Joint National Committee
L-Cys	L-Cystein
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleinimide
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO [•]	Stickstoffmonoxid (*)
NO ⁻	Nitrosylanion
NO ⁺	Nitrosoniumion
NO ₂ ⁻	Nitrit

NO_3^-	Nitrat
NOHb	Nitrosylhämoglobin
NOS	NO-Synthase
O_2	Sauerstoff
O_2^-	Superoxidanion
ONOO^-	Peroxynitrit
RF	Risikofaktor
RNNO	Nitrosamine
RSNO	S-Nitrosothiole
SE	Standard Error (Standardfehler)
SNO-Alb	S-Nitrosoalbumin
Tab.	Tabelle
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

(*) im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons

Meiner Mutter in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Synthese von Stickstoffmonoxid	9
1.2	Stoffwechsel von Stickstoffmonoxid	10
1.3	Stickstoffmonoxid als intra- und interzellulärer Botenstoff in der Kreislaufphysiologie	12
1.4	Der zirkulierende NO-Pool	13
1.4.1	Bedeutung von RXNO in der humanen Zirkulation	13
1.4.2	Messung des zirkulierenden NO-Pool	15
1.5	NO in der Pathogenese der Arteriosklerose	16
2	Material und Methoden	20
2.1	Messung des zirkulierenden NO-Pool	20
2.1.1	Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz	20
2.1.2	Nicht reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz	22
2.1.3	Fluss-Injektions-Analyse	22
2.2	Probenaufarbeitung	24
2.2.1	Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Nitrit und RXNO mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz	24
2.2.2	Probenaufarbeitung zur Bestimmung von RXNO mittels nicht reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz	24
2.2.3	Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Nitrat mittels Fluss- Injektions-Analyse	25
2.3	Methodische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	25
2.4	Biologische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	27
2.4.1	Erfassung der Tag-zu-Tag Variabilität	27
2.4.2	Erfassung der tageszeitlichen Variabilität	27
2.5	Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO- Konzentration im Plasma	28
2.6	Statistische Auswertung	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Methodische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	30
3.2	Biologische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	35
3.2.1	Erfassung der Tag-zu-Tag Variabilität	35
3.2.2	Ausschluss tageszeitlicher Schwankungen der RXNO-Plasmakonzentration	36
3.3	Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	36
3.3.1	Charakterisierung der Studienpopulation	36
3.3.2	Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitratkonzentration im Plasma	38
3.3.3	Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitritkonzentration im Plasma	38
3.3.4	Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma	38
4	Diskussion	40
4.1	Methodenkritik	40
4.2	Plasmaproteine erhöhen die UV-induzierte NO-Freisetzung aus Nitrat	42
4.3	Tageszeitliche und Tag-zu-Tag Variabilität der plasmatischen RXNO-Konzentration	44
4.4	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel-abhängige Dilatation	44
4.5	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitrat- und Nitritkonzentration im Plasma	46
4.6	Identifizierung eines biochemischen Markers der endothelialen Dysfunktion	47
4.7	Klinische Bedeutung und Ausblick	48
5	Zusammenfassung	50

6	Literaturverzeichnis	51
7	Veröffentlichungen	61
8	Danksagung	62
9	Lebenslauf	63

1 Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. Im Jahr 2003 sind in Deutschland 396.622 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems verstorben. 92.673 Menschen starben an einem akuten Herzinfarkt, 39.286 Menschen an einem Schlaganfall (Statistisches Bundesamt). Die meisten kardiovaskulären Erkrankungen entstehen auf dem Boden arteriosklerotisch veränderter Gefäße. Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen im Sinne einer endothelialen Dysfunktion scheinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose zu spielen. NO ist an der Regulation wesentlicher Endothelfunktionen beteiligt und scheint über eine reduzierte Bioverfügbarkeit Schlüsselprozesse zu beeinflussen, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose wichtig sind^{86;110}. Unklar ist, ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren und der Konzentration an zirkulierenden nitrosierten/nitrosylierten Spezies (RXNOs), Reaktionsprodukte von NO und Plasmaproteinen, besteht. Der Nachweis einer verminderten plasmatischen RXNO-Konzentration könnte zur Früherkennung der Arteriosklerose eingesetzt werden.

1.1 Synthese von Stickstoffmonoxid

Im Jahr 1980 stellten Furchgott und Zawadzki fest, dass Acetylcholin nur in Anwesenheit einer funktionierenden endothelialen Zellschicht eine Relaxation isolierter Gefäße auslöste. Ihrer Vermutung nach setzte das Endothel, durch Acetylcholin induziert, eine kurzlebige Substanz frei, die eine Relaxation der glatten Muskulatur zur Folge hatte. Furchgott et al.³² benannten diese kurzlebige Substanz nach ihrem Ursprung und ihrer Funktion zunächst als EDRF (endothelium derived relaxing factor). Schließlich konnte gezeigt werden, dass diese von den Endothelzellen abgegebene Substanz EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist^{46;54;76}.

Die Bildung von NO wird von der NO-Synthase (NOS) katalysiert. Die NOS setzt in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NADPH die Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und NO um^{31;44}. Das Enzym ist stereospezifisch für das L-Isomer der Aminosäure Arginin³¹. Weitere Kofaktoren für das Enzym sind Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN)⁷¹. Mittlerweile sind verschiedene Isoformen der NOS bekannt. Die Isoformen werden unterteilt in konstitutive (cNOS) und in induzierbare (iNOS) Formen. Die cNOS ist Kalzium- und Calmodulin-abhängig. Dagegen ist die iNOS Kalzium- und Calmodulin-unabhängig⁷¹. Während Calmodulin bei normaler intrazellulärer Kalzium-Konzentration an die iNOS gebunden ist, bindet Calmodulin erst bei erhöhten intrazellulären Kalzium-Konzentrationen an die cNOS. Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration ist abhängig von extrazellulären Signalen wie z.B. der Freisetzung von Azetylcholin, Histamin, Bradykinin, Substanz P und Serotonin⁹.

Es konnten zwei unterschiedliche Formen der konstitutiven NOS nachgewiesen werden, so dass die Isoformen nach den Geweben benannt wurden, in denen sie zuerst nachgewiesen wurden. Mittlerweile wurden die Isoformen in weiteren Geweben identifiziert. Die neuronale konstitutive NOS (ncNOS) wird in Neuronen, aber auch im Skelettmuskel oder im respiratorischen Epithel exprimiert^{7;70}. Die endotheliale konstitutive NOS (ecNOS) wurde außer im Endothel auch im Skelettmuskel, im Herzen, in pulmonalen Epithelzellen und in Neuronen identifiziert^{94;97}. Die iNOS ist insbesondere in Makrophagen zu finden und wird im Rahmen inflammatorischer Prozesse durch Zytokininduktion akut exprimiert.

1.2 Stoffwechsel von Stickstoffmonoxid

NO ist ein farbloses, wasserlösliches Gas. In wässrigen Lösungen ist die Halbwertszeit abhängig vom Sauerstoffpartialdruck und schwankt von 3,8 bis 6,2s⁵³. Stickstoffmonoxid weist ein ungepaartes Elektron auf. Diese Struktur

verleiht dem Molekül Radikalcharakter und erklärt seine hohe Reaktivität. Aufgrund seiner Ladungsneutralität kann NO frei in wässrigen Lösungen und über Zellmembranen diffundieren.

Der NO-Stoffwechsel ist in biologischen Systemen abhängig von den zur Verfügung stehenden Reaktionspartnern. Im Besonderen muss der NO-Stoffwechsel in An- und Abwesenheit von Hämoglobin (Hb) unterschieden werden. In Abwesenheit von Hämoglobin, wie im Plasma, wird unter physiologischen Bedingungen der größte Teil des endothelial gebildeten NO mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit (NO_2^-) oxidiert⁶⁰ (s. Abb. 1.1). Daneben kann NO mit Sauerstoff Stickstoffdioxid (NO_2) und Distickstofftrioxid (N_2O_3) bilden. Diese Stickoxide können entweder mit anderen Molekülen wie z.B. Thiolen oder Aminen reagieren (s. Kapitel 1.4.1) oder zu Nitrit und Nitrat (NO_3^-) hydrolysieren. In biologischen Systemen gehen neben molekularem Sauerstoff das Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (HO^\bullet) Reaktionen mit NO ein⁹⁵. Bei vermehrtem Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies (oxidativer Stress) bekommt das Superoxidanion als Reaktionspartner von NO eine große Bedeutung. NO reagiert nahezu diffusionslimitiert mit O_2^- zu Peroxynitrit (ONOO^-). Mit Wasserstoffperoxid reagiert NO auch zu Peroxynitrit. Peroxynitrit kann als starkes Oxidationsmittel über die Modifikation von Biomolekülen zytotoxisch wirken⁸ oder über eine gesteigerte Lipid-peroxidation die Entstehung von Arteriosklerose begünstigen⁹³. Bei der Reaktion von NO mit Hydroxylradikalen entsteht vor allem Nitrit.

In Anwesenheit von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2) im Erythrozyten werden NO und Nitrit zu Nitrat und Methämoglobin umgesetzt^{24;53} (s. Abb. 1.1). Dieser Reaktionsweg wurde lange Zeit als Hauptabbauweg für NO angenommen und führte zu der Überlegung, dass NO nur in seiner direkten Umgebung wirken kann, bevor es durch die Erythrozyten abgebaut wird. Nitrat stellt das stabile Abbauprodukt des NO-Stoffwechsels dar, das mit dem Urin ausgeschieden wird⁵³. Alternativ zur oxidativen Reaktion von NO mit HbO_2 kann NO mit der Hämgruppe des deoxygenierten Hämoglobins zu Nitrosylhämoglobin (NOHb) reagieren¹¹⁷ (s. Abb. 1.1). Eine weitere

Möglichkeit besteht in der Reaktion von NO oder einem seiner Oxidationsprodukte (NO_2 , N_2O_3) mit dem Cystein-93 der β -Kette des Hämoglobin, wobei ein S-nitrosiertes Derivat des oxygenierten Hämoglobin (SNOHb) entsteht^{39;48}. SNOHb ist an der Regulation des Blutflusses¹⁰⁰ und der Thrombozytenaggregation beteiligt^{77;102}.

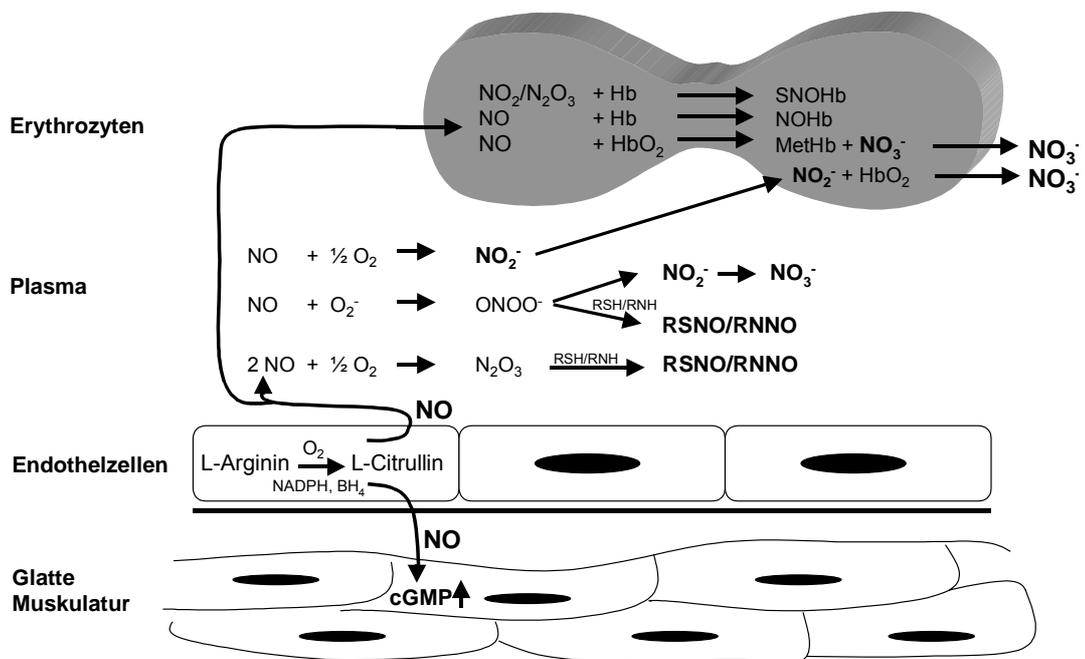


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einiger Stoffwechselwege des NO-Metabolismus. Nach Freisetzung von NO in das Gefäßlumen wird es mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu Nitrit (NO_2^-) abgebaut. Im Erythrozyten reagiert NO_2^- mit oxygeniertem Hämoglobin (oxyHb) zu Nitrat (NO_3^-). Im Plasma reagiert NO mit Superoxidationen (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-), das zu NO_3^- abgebaut wird. Alternativ kann NO über die Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3) mit Thiolen (RSH) oder Aminen (RNH) zu Nitrosothiolen (RSNO) und Nitrosaminen (RNNO) reagieren. Im Erythrozyten entsteht bei der Reaktion von NO mit oxyHb NO_3^- und Methämoglobin (MetHb). Mit deoxygeniertem Hämoglobin (Hb) entsteht Nitrosylhämoglobin (NOHb) oder S-nitrosohämoglobin (SNOHb).

1.3 Stickstoffmonoxid als intra- und interzellulärer Botenstoff in der Kreislaufphysiologie

Das Endothel übernimmt eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion. Es moduliert den aktuellen und bedarfsgerechten

Gefäßtonus, die antithrombotischen und antiadhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, die Architektur der Gefäßwand und die Gefäßpermeabilität¹¹⁰. Der Begriff der endothelialen Dysfunktion bezeichnet die Störung dieser wesentlichen Endothelfunktionen⁵⁵. NO ist an der Regulation aller genannten Endothelfunktionen beteiligt und nimmt über eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Arteriosklerose ein¹¹⁰.

Nach abluminal freigesetztes NO gelangt in die glatten Muskelzellen der Gefäße und bewirkt über die Aktivierung der löslichen Isoform der Guanylatzyklase einen Anstieg des intrazellulären cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat)-Gehalts⁴⁵. Ein Anstieg des cGMP verursacht eine Aktivierung von Proteinkinasen, die eine Dephosphorylierung von intrazellulären Proteinen bewirken und die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zur Folge haben¹¹⁵. Untersuchungen an transgenen Mäusen (eNOS-Knock-out) zeigten einen im Vergleich zu Wildtypmäusen deutlich erhöhten arteriellen Mitteldruck und eine um 50% reduzierte NO_x-Plasmakonzentration³⁷. NO hemmt außerdem die Zellproliferation in glatten Muskelzellen und steuert so der Zunahme der Intimaverdickung entgegen^{35;69}.

Nach luminal freigesetztes NO inhibiert die Thrombozytenaggregation^{78;80} und die Adhäsion von Thrombozyten am Endothel^{43;79}. In neutrophilen Granulozyten senkt NO die adhäsiven Eigenschaften zum Endothel und hemmt deren Migration in die Gefäßwand^{57;64;111}.

1.4 Der zirkulierende NO-Pool

1.4.1 Bedeutung von RXNO in der humanen Zirkulation

In der humanen Zirkulation unterliegt NO einem schnellen Abbau. Im Plasma wird NO mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit und im Erythrozyten mit

Oxyhämoglobin zu Nitrat umgesetzt (s. Kapitel 1.2). Deshalb wurde bislang angenommen, dass NO lediglich an seinem Bildungsort wirkt. Es gibt jedoch Hinweise, dass NO über bioaktive Zwischenprodukte im Kreislauf transportiert wird^{5;48} und so systemisch wirksam werden kann^{30;84}.

Im Plasma bildet NO in Anwesenheit von Thiolen S-Nitrosothiole (RSNOs)⁸⁴. Albumin macht den größten Anteil der Plasmathiole aus (0,5-1mmol/l)⁵¹. Die Nitrosierung von Albumin erfolgt an der freien Thiolgruppe (Cys-34) unter Bildung von SNOAlb. Neben Albumin zirkulieren im Plasma die Thiole Glutathion und Cystein, die ein niedrigeres Molekulargewicht aufweisen und mit NO S-Nitrosoglutathion und S-Nitrosocystein bilden. Über den genauen Mechanismus der Nitrosierungsreaktion besteht allerdings noch Unklarheit. Es wird angenommen, dass NO nicht direkt mit Plasmathiole reagiert, sondern dass Thiole in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren über das Nitrosylkation RSNOs bilden¹⁷. RSNOs scheinen eine potentielle Speicherform von NO im Plasma zu sein, welche bei Bedarf NO freisetzen können^{98;101}. *In vitro* Untersuchungsergebnisse zeigen, dass Cu²⁺-Ionen einen Zerfall von RSNOs unter Bildung von Disulfiden und NO bewirken¹. Durch den Zerfall von RSNOs werden Transnitrosierungsvorgänge eingeleitet, die Thiole wie Glutathion und Cystein zu S-Nitrosoglutathion und S-Nitrosocystein nitrosieren^{81;91}. Über diesen Mechanismus kann NO von Plasmaproteinen hohen Molekulargewichts auf Plasmaproteine kleineren Molekulargewichts übertragen werden und so den Transport von NO zur glatten Muskulatur, zur Thrombozytenoberfläche und in den Intrazellularraum erleichtern⁹¹. In welchem Ausmaß die Reaktionen *in vivo* ablaufen, ist nicht abschließend geklärt. Da Kupferionen in großen Mengen im menschlichen Organismus vorhanden sind (1µmol gelöstes und 15µmol Gesamtkupfer), wird angenommen, dass die endogenen RSNOs durch Kupferionen unter NO-Freisetzung abgebaut werden können.

Die physiologische Bedeutung von RSNOs als Reservoir von NO wird durch Untersuchungen bestätigt, die zeigen, dass RSNOs über eine NO-Freisetzung ähnliche Eigenschaften wie NO aufweisen⁸³. RSNOs bewirken

intravenös appliziert eine Relaxation von Gefäßen⁸³ und eine Inhibition der Thrombozytenaggregation^{47;58;101}.

Neben nitrosierten Thiolen zirkulieren auch nitrosierte Amine (RNNO) im humanen Blutkreislauf. RNNOs entstehen während infektiöser Prozesse⁷⁵, aber auch unter physiologischen Bedingungen im humanen Plasma⁸². In der sauren Umgebung des Magens werden RNNOs durch die Reaktion von Nitrit mit Aminen von Nahrungsbestandteilen gebildet. Potentiell wirken sie kanzerogen⁷⁵. Welche Rolle RNNOs in der Herzkreislaufphysiologie spielen, muss noch untersucht werden.

Da SNOAlb den größten Anteil der Plasmanitrosothiole darstellt, wurde lange Zeit angenommen, dass ihm die größte Bedeutung als NO-Reservoir zukommt⁹⁹. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass neben SNOAlb auch N-nitroso-Proteine, nitrosylierte Eisenverbindungen^{82;116} und Nitrit^{21;56} eine Rolle als NO-Reservoir im Plasma spielen.

1.4.2 Messung des zirkulierenden NO-Pool

In der Literatur werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der Spezies des zirkulierenden NO-Pools beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden verwendet, die die Bestimmung der jeweiligen Spezies aus biologischem Material erlaubten und eine hohe Sensitivität, eine hohe Wiederfindungsrate und einen niedrigen Variationskoeffizienten aufwiesen.

Für die Bestimmung der Nitrat-Konzentration wurde die Fluss-Injektions-Analyse (FIA) verwendet³⁶. Für die Bestimmung der Nitrit- und RXNO-Konzentration wurde die reduktive Gasphasen-CLD eingesetzt²⁹. Die Gasphasen-CLD beruht auf der reduktiven Denitrosierung der jeweiligen NO-Spezies (Nitrit oder RXNO) und der anschließenden Detektion des freigesetzten NO durch die Gasphasen-Chemilumineszenz-Reaktion mit Ozon⁴². Neben der Möglichkeit, die Denitrosierung, wie bei der reduktiven Gasphasen-CLD, mit einer Chemikalie (Iodine/Triiodide-Lösung) durchzuführen, lässt sich NO aus RXNO auch durch UV-Licht abspalten.

Stamler et al.⁹⁹ entwickelten 1992 diese Methode und beschrieben eine basale RXNO-Konzentration von 7µmol/l. Die genaue Konzentration der RXNOs im Plasma wird noch diskutiert, die Angaben schwanken von wenigen nmol/l^{68;82} bis auf 10µmol/l¹¹³. Arbeitsgruppen, die die Gasphasen-Chemilumineszenz⁶⁷, die Griess/Saville-Methode^{41;89} oder die Gas-Chromatographische-Massen-Spektrometrie (GC-MS)¹¹² verwendeten, beschrieben Konzentrationen im niedrig nanomolaren Bereich (s. Tab 1.1). Die unterschiedlichen Angaben könnten in methodischen Problemen der Photolyse-CLD begründet liegen.

biologisches Material	RXNO-Konz. [nmol/l]	Methode	Literaturangabe
humanes Plasma	9200±1600	Photolyse-DAF/CLD	Tyurin, V.A., <i>Circ Res</i> (2001);88:1210-1215
humanes Plasma	7000±5730	Photolyse/CLD	Stamler, J.S., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> (1992);89:7674-7677
humanes Plasma	321±139	Saville/Vanadium(III)/CLD	Ewing, J.F., <i>Free Radic. Biol. Med.</i> (1998);25:621-628
humanes Plasma	220±190	Griess/HPLC	Goldman, R.K., <i>Anal. Biochem.</i> (1998);259:98-103
humanes Plasma	181±150	Saville/GCMS	Tsikas, D., <i>J. Chrom.</i> (1999);726:13-24
humanes Plasma	62±24	Griess/HPLC	Jourd'heuil, D., <i>Free Radic. Biol. Med.</i> (2000);28:409-417
humanes Plasma	40±7	Iodid-Iodine/CLD	Rassaf, T., <i>J. Clin. Invest.</i> (2002);109:1241-1248
humanes Plasma	28±7	Cu(I)-Ionen/Iodid-Iodine/CLD	Marley, R., <i>Free Radic. Res.</i> (1999);32:1-9
humanes Plasma	7±1	Iodid-Iodine/CLD	Rassaf, T., <i>Free Radic. Biol. Med.</i> (2002);33:1590-1596

Tab. 1.1: Darstellung der RXNO-Konzentrationen im humanen Plasma ermittelt durch unterschiedliche Methoden. Diaminifluoreszein (DAF); Chemilumineszenzdetektion (CLD); High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC); Kupfer (Cu).

1.5 NO in der Pathogenese der Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist eine wesentliche Ursache für chronische Gefäßerkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, zerebrovaskuläre Erkrankungen und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration in die Gefäßwand⁸⁶. Im weiteren Verlauf kommt es zur extrazellulären Fettablagerung, sowie zu regressiven Veränderungen der Gefäßwand mit einem bindegewebigen Umbau und Verkalkungen, die als fortgeschrittene Läsionen oder Plaques bezeichnet werden¹⁰³. Diese können entweder zu einer progressiven

hämodynamisch relevanten Einengung führen oder durch ein appositionelles Thrombuswachstum auf dem Boden einer rupturierten Plaque akute ischämische Ereignisse hervorrufen^{33;34}.

Die Ätiologie der Arteriosklerose blieb lange Zeit unklar. Mit den Ergebnissen der Framinghamstudie⁵² wurde 1961 das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert. Zu den kardiovaskulären Risikofaktoren wird die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie, das Rauchen und der Diabetes mellitus gezählt. Spätere Untersuchungen haben gezeigt, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zur Störung der endothelialen Funktion beitragen und die Entwicklung und Progression einer Arteriosklerose begünstigen^{33;34;86}.

Als Schlüsselereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose wird die Störung der endothelialen Funktion angesehen⁸⁶ (s. Kapitel 1.3). NO ist an den wesentlichen Endothelfunktionen beteiligt und scheint durch eine reduzierte Bioverfügbarkeit auch für die Entwicklung der Arteriosklerose mitverantwortlich zu sein.

Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit kann durch eine verminderte Expression der endothelialen NOS, einen Substrat- oder Kofaktorenmangel, eine eingeschränkte Aktivierung der eNOS oder einen beschleunigten NO-Abbau verursacht sein¹⁰. Unter anderem führen kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer gesteigerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wie O_2^- ⁹⁵. In Anwesenheit von O_2^- wird NO vorzeitig zu NO_3^- abgebaut oder es entsteht der Endothel-toxische Metabolit Peroxynitrit^{6;8;106}. Peroxynitrit sorgt für eine Entkopplung der eNOS, die zur Reduktion der NO-Synthese sowie einer gesteigerten O_2^- -Bildung führt⁶³. In Anwesenheit von O_2^- wird außerdem die Bildung von oxidiertem LDL-Cholesterin (oxLDL) in der Gefäßwand erhöht¹⁰⁵. Durch die Aufnahme von oxLDL in Makrophagen kommt es zur Bildung von Schaumzellen¹⁰⁴ und zur Ausschüttung von chemotaktischen Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren⁶⁶. Daraus resultieren eine Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Intimaverdickung⁸⁵. Gleichzeitig führt die Abnahme von biologisch aktivem NO zur Adhäsion von Thrombozyten⁹⁶ und

Leukozyten^{57;111} am Endothel. Die proatherogene Wirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren scheint somit teilweise infolge einer chronischen Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit durch vermehrten oxidativen Stress verursacht zu sein²³.

Lange bevor hämodynamisch relevante Einengungen in Form von Plaques entstehen, sind Einschränkungen der basalen Endothel-abhängigen Vasorelaxation und der Endothel-unabhängigen Vasorelaxation bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachweisbar¹³. Zur Bestimmung der Endothel-abhängigen und NO-abhängigen Vasorelaxation stehen verschiedene invasive (intraarterielle Gabe von Azetylcholin)^{65;90;107} oder nicht-invasive (FMD=Flow Mediated Dilatation, Fluss-abhängige Dilatation)¹⁵ Verfahren zur Verfügung. Allerdings sind diese Verfahren aus Gründen des hohen Zeitaufwands, der Kostenintensivität und der Notwendigkeit einer speziellen Ausbildung des Untersuchers nicht in den klinischen Alltag integriert worden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen einfach aus dem Blut zu bestimmenden biochemischen Marker zu etablieren, der eine Aussage über die endotheliale Dysfunktion macht. Vor dem Hintergrund, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren die Endothelfunktion einschränken, wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren nimmt die Konzentration an zirkulierenden RXNOs im Plasma ab.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden zunächst biologische und methodische Einflüsse auf die Plasma RXNO-Konzentration untersucht, um dann in einem Kollektiv von 110 Probanden die RXNO-, Nitrit- und Nitratkonzentration zu bestimmen und mit der Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zu korrelieren.

Die vorliegende Arbeit soll folgende Fragen klären:

- 1.) Wie lassen sich die Unterschiede der RXNO-Konzentration zwischen der Photolyse-CLD und der reduktiven-CLD erklären?

- 2.) Bestehen tageszeitliche oder Tag-zu-Tag Schwankungen in der plasmatischen RXNO-Konzentration?
- 3.) Besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren und der RXNO-Konzentration im Plasma?

2 Material und Methoden

2.1 Messung des zirkulierenden NO-Pool

Zur Bestimmung des zirkulierenden NO-Pool kamen drei verschiedene Methoden zum Einsatz: die reduktive Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion (CLD), die nicht reduktive Gasphasen-Chemilumineszenzdetektion und schließlich die Fluss-Injektions-Analyse (FIA).

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen.

2.1.1 Reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz

Zur Detektion des NO-Gehalts der untersuchten Plasmaproben wurde ein NO-Analysator der Firma Eco Physics (CLD 88 AM, Dürnten, Schweiz) verwendet. Dem Analysator war eine Apparatur vorgeschaltet, die die Freisetzung von NO aus der Probe und die Zuleitung des gasförmigen Moleküls ermöglichte (s. Abb. 2.1).

In dem Reaktionsgefäß befand sich eine Reaktionslösung bestehend aus Kaliumjodid (1g; Merk, Darmstadt, Deutschland), Jodine (0,38g), HPLC-Wasser (10ml; Merk, Darmstadt, Deutschland) und Essigsäure (55ml; Merk, Darmstadt, Deutschland). Durch ein Heizaggregat wurde die Reaktionslösung auf eine Temperatur von 95°C erhitzt. Diese Lösung setzte NO aus der Plasmaprobe frei. Ein inertes Gas (Helium) durchströmte die Reaktionslösung und transportierte das gasförmige NO durch ein Kühlaggregat und eine gekühlte Natriumhydroxid-Lösung (NaOH, 1mol/l; Chemikalienfalle) in die Reaktionskammer des Analysators. Das Kühlaggregat und die gekühlte NaOH-Lösung verhinderten ein Eindringen von Chemikalien und Wasserpartikeln in den Analysator.

Im Analysator reagierte NO mit Ozon, wobei angeregtes Stickstoffdioxid (NO_2^*) entstand. NO_2^* gab seine überschüssige Energie in Form von Licht ab⁴². Das Licht wurde von einem Photomultiplier erfasst, verstärkt und das resultierende Signal über einen Datenumwandler (Knauer, Berlin, Deutschland) an die Auswertungseinheit weitergeleitet.

Die flüssigen Proben wurden mit einer gasdichten Spritze (Hamilton, Reno, Nevada, USA) durch eine gasdichte Kunststoffmembran in die Reaktionslösung appliziert. Das Probenvolumen betrug 100 bzw. 110 μl .

Zur Datenaufnahme und Datenauswertung diente die Software Euchrom 1.2 (Knauer, Berlin, Deutschland). Bei der Auswertung wurden nur Ausschläge akzeptiert, die über einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 lagen.

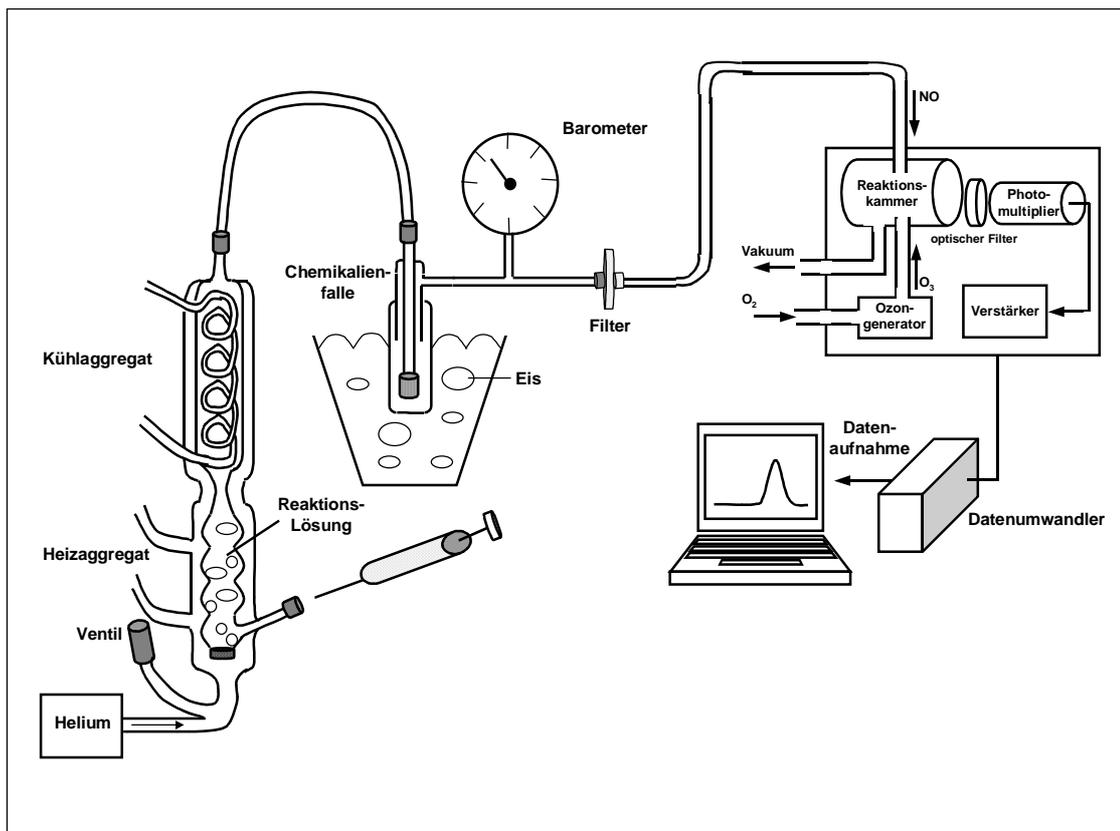


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Gasphasen-Chemilumineszenzanlage. Die zu untersuchende Probe wurde in die Reaktionslösung injiziert. NO (Stickstoffmonoxid) trat in die Gasphase über und gelangte mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators, in der die Lichtreaktion mit O_3 (Ozon) stattfand.

2.1.2 Nicht reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz

Die nicht reduktive Gasphasen-Chemilumineszenz, beschrieben von Stamler et al.⁹⁹, ist eine weitere Möglichkeit zur RXNO-Bestimmung im Plasma. Um NO aus der Plasmaprobe freizusetzen, wird, anstatt der oben beschriebenen Reaktionslösung, UV-Licht eingesetzt.

Eine 400W Halogen Vakuum Lampe (HPA 400W Cleo lamp, Philips, Deutschland) wurde in einem Abstand von 15cm zu dem Reaktionsgefäß (cell type 117, Hellma, Müllheim, Deutschland) positioniert. Die UV-Lampe emittierte Licht über einen Wellenlängenbereich von 270-800nm mit einem Maximum bei 320-400nm. Das Probenvolumen in dem Reaktionsgefäß betrug 2ml. Ein inertes Gas (Helium) durchströmte die Reaktionskammer und transportierte das freigesetzte NO durch eine gekühlte NaOH-Lösung (1M; Chemikalienfalle) in den Analysator. Zur Detektion von NO wurde ein NO-Analysator der Firma Eco Physics (CLD 88 AM, Dürnten, Schweiz) verwendet, in dem die oben beschriebenen Reaktionen stattfanden (s. 2.1.1). Das resultierende Signal wurde durch einen Datenumwandler (Knauer, Berlin, Deutschland) auf einen Rechner übertragen und mit der Software Euchrom 1.2 (Knauer, Berlin, Deutschland) ausgewertet.

2.1.3 Fluss-Injektions-Analyse

Zur Quantifizierung des Nitratgehalts der Plasmaproben wurde in dieser Untersuchung die Fluss-Injektions-Analyse eingesetzt, die von Gharini et al.³⁶ beschrieben wurde.

Die FIA-Anlage bestand aus einem Degaser (2-Kanal-Degaser Populaire, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland), einer HPLC-Pumpe (SunFlow 100, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland), einem automatischen Probenaufnehmer (Triathlon, Spark, Niederlande) und einem UV-Vis-Detektor (SpectraFlow 501, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland). Die Verbindungskapillaren wurden möglichst kurz gehalten und wiesen einen

Innendurchmesser von 0,5mm auf. Lediglich die Reaktionsschleife vom Autoinjektor zum Detektor hatte eine Länge von 90cm. Der automatische Probenaufnehmer zog jeweils 20µl der Probe auf und injizierte sie in das fließende Griess-Reagenz.

Nitrat wurde durch die Zugabe von Nitratreduktase (10U/ml; Roch Life Science, Mannheim, Deutschland) zunächst vollständig zu Nitrit umgesetzt. Das entstandene Nitrit ging eine Farbreaktion in der Reaktionsschleife mit den Bestandteilen des Griessreagenz (10g/l Sulfanilamid, gelöst in 1%iger HCL (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2g/l N-(1-naphtyl)ethylendiamin gelöst in HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland)) ein. Das Griessreagenz diente als Laufmittel und wurde durch die HPLC-Pumpe mit einem konstanten Fluss von 1ml/min durch das System gepumpt. Nitrit reagierte unter sauren Bedingungen in einer Diazotierungsreaktion mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz. Im Anschluss fand die Azokupplung mit N-(1-naphtyl)ethylendiamin statt. In der Messzelle des Photometers wurde die Absorption bei der für den entstandenen Farbstoff charakteristischen Wellenlänge (545nm) bestimmt.

Die Daten wurden durch einen Datenumwandler (Knauer, Berlin, Deutschland) an die Auswerteinheit übertragen und mit Hilfe der Chromatographiesoftware (ChromStar 2.55, Knauer, Berlin, Deutschland) ausgewertet. Die Auswertung der Ausschläge erfolgte nach ihrer Amplitude.

2.2 Probenaufarbeitung

2.2.1 Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Nitrit und RXNO mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz

Die Kubitalvene eines Probanden wurde durch eine Einwegkanüle (W.I.N. 21G, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) punktiert. 2ml Blut wurden mittels Einwegspritzen (Amefa 2ml Luer, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) luftblasenfrei aufgezogen und in schon vorbereiteten Lösungen im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Lösungen enthielten EDTA (2mmol/l) und NEM (10mmol/l, N-Ethylmaleinimide, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). EDTA ist ein Chelator, der zweiwertige Metallkationen bindet und den Kupferionen-vermittelten RXNO-Abbau verhindert²⁹. NEM ist eine Substanz, die durch Alkylierung von Thiolgruppen eine artifizielle Entstehung von nitrosierten Thiolen verhindert²⁹. Alle Lösungen wurden bei 4°C gekühlt. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Vollblut 10min bei 4°C und 800g zentrifugiert. Das Nitrit wurde mittels reduktiver Gasphasen-CLD bestimmt. Zur Bestimmung der RXNOs wurde dem Plasma Sulfanilamidlösung (5%ig) in einem Verhältnis von 1:10 zugegeben und dann mittels reduktiver Gasphasen-CLD analysiert. Sulfanilamid bildet mit Nitrit ein stabiles Diazoniumsalz, das kein NO mehr freisetzen kann²⁹.

2.2.2 Probenaufarbeitung zur Bestimmung von RXNO mittels nicht reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz

Blut gesunder Probanden wurde aus einer Unterarmvene entnommen und in Greiner-Röhrchen (Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gefüllt. Als Antikoagulant wurde Lepirudin (15IU/ml; Refludan, Schering, Berlin, Deutschland) verwendet.

Durch Zentrifugation bei 800g und 4°C für 10min wurde das Plasma gewonnen. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie in den Versuchsprotokollen unter 2.3 beschrieben.

2.2.3 Probenaufarbeitung zur Bestimmung von Nitrat mittels Fluss-Injektions-Analyse

Für die Nitratbestimmung aus Plasma wurden 2ml Blut luftblasenfrei aufgezogen und in einem Verhältnis von 1:5 zu einer Antikoagulationslösung gegeben. Als Antikoagulanzen wurden Heparin (20IU/ml, Liquemin, Roche, Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die Lösungen wurden ständig auf 4°C gekühlt. Zur Gewinnung des Plasmas wurden die Proben 10min bei 4°C und 800g zentrifugiert.

2ml Plasma wurden in Ultrafiltrationsröhrchen mit einer Durchlassgrenze von 10kD (Centricons, Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland) gefüllt und für weitere 120min bei 4°C und 6000g zentrifugiert. Das gewonnene Ultrafiltrat wurde anschließend mittels FIA vermessen.

2.3 Methodische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

Stamler et al.⁹⁹ beschrieben 1992 die nicht reduktive Gasphasen-CLD (Photolyse-Methode) zur RXNO-Bestimmung. Im Gegensatz zur reduktiven Gasphasen-CLD erfolgt die Denitrosierung bei der nicht reduktiven Gasphasen-CLD nicht durch eine Chemikalie, sondern durch UV-Licht. Die von Stamler et al. bestimmte RXNO-Konzentration lag bei 7µmol/l⁹⁹. Im Gegensatz dazu lag die durch die reduktive Methode gemessene Konzentration im niedrig nanomolaren Bereich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 5 Versuchsprotokolle durchgeführt, um die Ursache der unterschiedlichen Größenordnungen zu ermitteln.

Um den Einfluss von UV-Licht auf Plasma zu beschreiben, wurden Plasma und Wasser durch eine UV-Lichtquelle bestrahlt. Als Negativkontrolle wurden

2ml Wasser (Aqua Injectabilia Braun, Melsungen, Darmstadt, Deutschland) und danach 2ml Plasma der UV-Lichtquelle für 10min ausgesetzt. Vor der Bestrahlung und im Anschluss wurden die vorhandenen Nitrat-, Nitrit-, und RXNO-Konzentrationen bestimmt.

Zur Validierung des Systems wurden 2ml Plasma in das Reaktionsgefäß gegeben und das Basissignal erfasst. Dann erfolgte die Bestrahlung für 180s. Die Bestrahlung wurde in Anwesenheit von Oxyhämoglobin (oxyHb) wiederholt. OxyHb bindet spezifisch NO. Die oxyHb-Lösung²² wurde frisch zubereitet und zwischen Reaktionsgefäß und Analysator positioniert. Als Kontrolle wurde NO-Lösung (20µl einer 1,5mmol/l NO-Lösung) in das Reaktionsgefäß injiziert und das resultierende Signal mit und ohne zwischengeschaltete oxyHb-Lösung erfasst.

Um die Substanz zu identifizieren, die NO durch Bestrahlung mit UV-Licht freisetzt, wurden Nitrit und Nitrat aus den Plasmaproben entfernt. Zur Entfernung der N-Oxide diente folgender Ansatz: Plasma wurde (im Verhältnis 3:1) mit einer Lösung aus Nitratreduktase (10U/ml, Roch Life Science Mannheim, Deutschland), Glukose-6-Phosphat (50mmol/l, Roch Life Science, Mannheim, Deutschland), Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (100U/ml Roch Life Science, Mannheim, Deutschland) und NADPH (40µmol/l) für eine Stunde bei 25°C inkubiert⁴⁰. Das Reaktionsprodukt Nitrit wurde durch eine 5%ige Sulfanilamid/HCl-Lösung gebunden²⁹. Die N-Oxidfreie Probe wurde mit UV-Licht bestrahlt und die NO-Freisetzung bestimmt. Im nächsten Schritt wurde in der einen Hälfte der Proben die physiologische Nitrat- (20µmol/l) und in der anderen Hälfte die physiologische Nitrit- (200nmol/l) Konzentration wiederhergestellt. Anschließend wurden die verschiedenen Plasmaproben bestrahlt und die NO-Freisetzung detektiert.

Plasma bzw. Wasser wurden mit jeweils ansteigenden Konzentrationen an Nitrit (0; 0,02; 0,2; 2µmol/l) bzw. Nitrat (0; 2; 20; 200µmol/l) versetzt und der UV-Lichtquelle ausgesetzt, um die Beteiligung von Nitrit und Nitrat an der NO-Freisetzung zu bestimmen. Aliquots der Plasmaproben wurden durch

Aceton (50%Vol, Merck, Darmstadt, Deutschland) deproteiniert, ebenfalls bestrahlt und die NO-Freisetzung detektiert (Daten nicht gezeigt).

Um die Beteiligung von Thiol-Gruppen an der NO-Freisetzung zu erfassen, wurden den Plasmaproben folgende Substanzen zugefügt: Dithiotreitol (DTT, 10mmol/l; eine Substanz, die Thiolgruppen reduziert), L-Cystein (L-Cys, 1mmol/l, Aminosäure, die eine Thiolgruppe aufweist) und N-Ethylmaleinimide (NEM, 10mmol/l; eine Substanz zur Blockade der Thiolgruppen), EDTA (2,5mmol/l; Chelatbildner, der Metallionen katalysierte Transnitrosierung verhindert) und Quecksilber-(II)-Chlorid (HgCl_2 ; 0,2-1%ig, Merck, Darmstadt, Deutschland; eine Substanz, die selektiv S-Nitrosothiole spaltet). Die Plasmaproben wurden jeweils bestrahlt und die NO Freisetzung bestimmt.

2.4 Biologische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

2.4.1 Erfassung der Tag-zu-Tag Variabilität

Um die Tag-zu-Tag Variabilität der RXNO-Konzentration im Plasma zu ermitteln, wurden drei Probanden an fünf Tagen nüchtern einbestellt. Die Blutabnahme erfolgte jeweils zur gleichen Zeit (8 Uhr). Die Blutabnahme sowie die Aufarbeitung des Plasmas erfolgten wie in der Probenaufarbeitung zur Bestimmung von RXNOs im Plasma beschrieben (s. Kapitel 2.2.1). Die RXNO-Konzentration wurde aus dem Plasma mittels reduktiver Gasphasen-CLD bestimmt (s. Kapitel 2.1.1).

2.4.2 Erfassung der tageszeitlichen Schwankung

Um festzustellen, ob die RXNO-Konzentration im Plasma einer relevanten tageszeitlichen Schwankung unterliegt, wurden um 8 und um 12 Uhr des jeweiligen Tages die RXNO-Konzentrationen aus dem Plasma von fünf Probanden bestimmt. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme

nüchtern. Die Plasmagewinnung und Aufarbeitung erfolgte wie in der Probenverarbeitung (s. Kapitel 2.2.1) beschrieben. Die RXNO-Konzentration wurde aus dem Plasma mittels reduktiver Gasphasen-CLD (s. Kapitel 2.1.1) bestimmt.

2.5 Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden, um den Einfluss der Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren auf den zirkulierenden NO-Pool im Plasma zu charakterisieren, gesunde Probanden (n=40) und Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (n=68) untersucht. Bei jedem Probanden wurde eine Kontrolle des Blutdrucks und der Routinelaborwerte vorgenommen (Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyceride, Glukose, CRP). Sämtliche Patienten wurden aus dem Patientengut der Kardiologie der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert. Das Studienprotokoll der vorliegenden Untersuchung setzte sich aus folgenden Teilen zusammen: (1.) der Probandenrekrutierung, (2.) einer Blutabnahme. Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Votum Prof. Dr. med. M. Kelm). Die Probanden wurden zunächst in einem Aufklärungsgespräch um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Daran schloss sich eine Anamneseerhebung und eine körperliche Untersuchung an. Am Morgen der Untersuchung erfolgte zunächst die Blutabnahme. Aus dem Blut wurden die Routinelaborwerte, sowie die Plasmakonzentrationen von Nitrat, Nitrit und RXNO bestimmt. Die Patienten waren nüchtern, hatten nicht geraucht und die Medikamenteneinnahme wurde mindestens 12 Stunden vorher unterbrochen.

Als Risikofaktoren erster Ordnung wurden eine arterielle Hypertonie, ein Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus und eine Hypercholesterinämie

gewertet. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien¹⁶ diagnostiziert, wenn der arterielle Blutdruck bei drei Messungen an drei separaten Tagen $>140/>90$ mmHg betrug oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der ADA¹⁰⁸ diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen die Plasmaglukosespiegel nüchtern ≥ 126 mg/d lagen oder zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten >200 mg/dl bestand. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. Eine Hypercholesterinämie wurde definiert bei Vorliegen eines Gesamtcholesterin >240 mg/dl, eines LDL-Cholesterin >160 mg/dl oder einer bestehenden cholesterinsenkenden Therapie¹⁹. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die innerhalb der letzten fünf Jahre mindestens 20 Zigaretten über ≥ 1 Jahr (1 Packungsjahr) geraucht hatten¹⁴.

2.6 Statistische Auswertung

Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SE) angegeben. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und mit dem post-hoc Test (Bonferroni) auf signifikante Unterschiede geprüft. Als statistisch relevant galt ein p-Wert $\leq 0,05$. Für die statistische Datenverarbeitung wurde die Software SPSS 11.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

Das erste Versuchsprotokoll (s. Kapitel 2.3) diente zur Charakterisierung des Einflusses von UV-Licht auf die im nativen Plasma enthaltenen Konzentrationen des zirkulierenden NO-Pool. Nachdem das Plasma für zehn Minuten einer UV-Licht Bestrahlung ausgesetzt wurde, nahm die Nitratkonzentration von $22,6 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ auf $15,4 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$ ab. Die Nitritkonzentration nahm von $150 \pm 10 \text{nmol/L}$ auf $770 \pm 130 \text{nmol/l}$ zu und die Konzentration an RXNO stieg von $18 \pm 5 \text{nmol/l}$ auf $1662 \pm 658 \text{nmol/l}$. In der wässrigen Negativkontrolle stieg nur die Nitritkonzentration von $14 \pm 2 \text{nmol/l}$ auf $30 \pm 6 \text{nmol/l}$, die Nitratkonzentration blieb annähernd gleich ($1,4 \pm 0,2$ vs. $1,3 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$) (Daten nicht dargestellt).

Um festzustellen, ob die UV-Lichtbestrahlung spezifisch NO freisetzte, wurde eine oxyHb-Lösung, die spezifisch NO bindet, in die Apparatur zwischengeschaltet. Während der Bestrahlung lag die NO-Freisetzung aus dem Plasma bei $19 \pm 3 \text{nmol/l/min}$, die aus der wässrigen Probe lag bei $4 \pm 2 \text{nmol/l/min}$. Die basale NO-Freisetzung aus Plasma lag unter der Detektionsgrenze. In Anwesenheit von oxyHb wurden sowohl das NO-Signal aus der Plasmaprobe als auch das Signal durch exogen hinzugegebenes NO vollständig reduziert (s. Abb. 3.1).

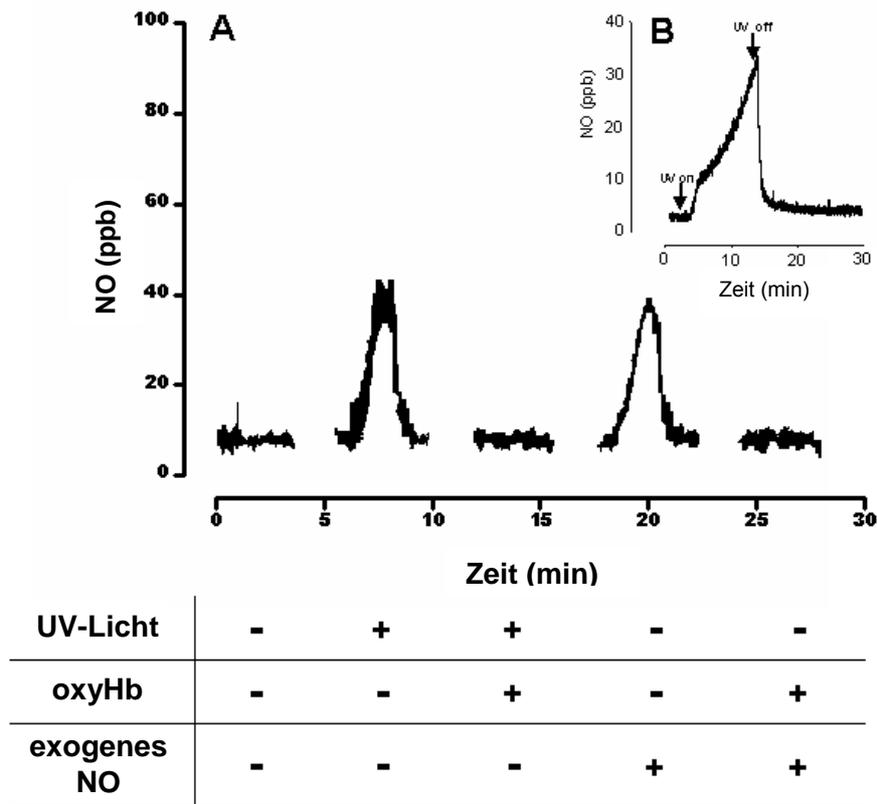


Abb. 3.1 UV-Licht setzt aus Plasma NO frei: A: Die Abbildung zeigt eine Originalaufzeichnung der Photolyse-CLD. Als erstes ist die NO-Freisetzung aus Plasma vor und dann während der UV-Bestrahlung in Ab- und Anwesenheit von oxyHb aufgezeichnet. Danach ist das Signal einer NO-Lösung in Ab- und Anwesenheit von oxyHb dargestellt. B Zeigt die kontinuierliche Aufzeichnung der NO-Freisetzung von Plasma über 10min. Die Pfeile markieren den Beginn und das Ende der UV-Licht Bestrahlung.

Die folgende Untersuchung diente der Identifikation der plasmatischen Substanzen, die NO durch UV-Licht Bestrahlung freisetzen. Im von N-Oxiden depletierte Plasma reduzierte sich die NO-Freisetzung von 19 ± 3 auf 2 ± 1 nmol/l/min. Der Nitrat und Nitrit depletierten Plasmaprobe wurde Nitrat zugegeben, um eine der nativen Plasmaprobe vergleichbare Nitratkonzentration wiederherzustellen ($20 \mu\text{mol/l}$). Dadurch nahm die NO-Freisetzung durch UV-Licht auf 17 ± 5 nmol/l/min zu. Nachdem der N-Oxid-depletierten Plasmaprobe Nitrit zugegeben wurde, um die endogene Nitritkonzentration annähernd wiederherzustellen (200 nmol/l), lag die NO-Freisetzung durch UV-Licht bei 3 ± 1 nmol/l/min (s. Abb. 3.2).

Als Kontrolle diente eine wässrige Probe, aus der Nitrit und Nitrat entfernt wurden. Nach der Bestrahlung kam es zu einem leichten Rückgang der NO-Freisetzung von 4 ± 2 auf 2 ± 1 nmol/l/min (Daten nicht dargestellt).

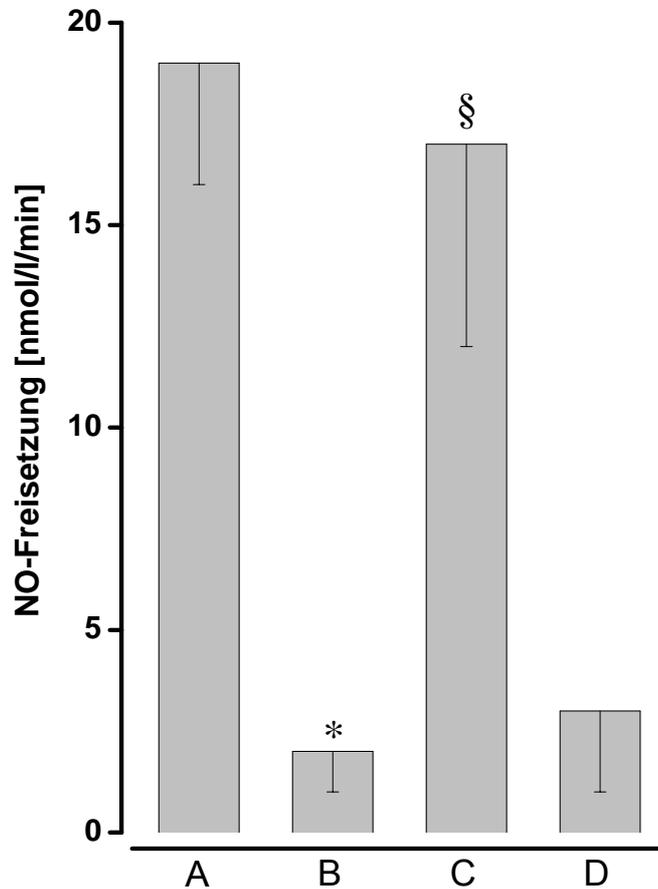


Abb. 3.2 Nitrat ist verantwortlich für die UV-Licht induzierte NO-Freisetzung aus Plasma. A: Plasmakontrolle. **B:** Nitrit und Nitrat depletiertes Plasma. **C:** N-Oxid-depletiertes Plasma nach wiederhergestellten endogenen Konzentrationen an Nitrat ($20\mu\text{mol/l}$). **D:** N-Oxid-depletiertes Plasma nach wiederhergestellten endogenen Nitritkonzentrationen ($0,2\text{nmol/l}$). * signifikante Abweichung zu A. § signifikante Abweichung zu B.

Um die Freisetzung von NO durch UV-Licht aus Nitrit und Nitrat in Plasma und Wasser zu vergleichen, wurde Plasma und Wasser jeweils mit ansteigenden Konzentrationen an Nitrit und Nitrat versetzt und mit UV-Licht bestrahlt. Nach der Zugabe von Nitrat in aufsteigenden Konzentrationen (0 ; 2 ; 20 ; $200\mu\text{mol/l}$) zu Plasma konnte eine Zunahme der NO-Freisetzung von 19 ± 3 auf 465 ± 45 nmol/l/min festgestellt werden. In wässrigen Proben wurde eine Zunahme der NO-Freisetzung (4 ± 2 auf 10 ± 2 nmol/l/min, Daten nicht dargestellt) erst bei einer hohen Nitratkonzentration ($200\mu\text{mol/l}$)

beobachtet (s. Abb. 3.3). Die Applikation von Nitrit in aufsteigenden Konzentrationen (0; 0,02; 0,2; 2 $\mu\text{mol/l}$) hatte weder Einfluss auf die UV-Licht abhängige NO-Freisetzung aus plasmatischen noch aus wässrigen Proben (s. Abb. 3.3). Eine hohe Nitritkonzentration (10 $\mu\text{mol/l}$) in der Probe konnte die NO-Freisetzung im Plasma auf $50 \pm 12 \text{ nmol/l/min}$ und in wässrigen Proben auf $29 \pm 7 \text{ nmol/l/min}$ steigern (Daten nicht dargestellt).

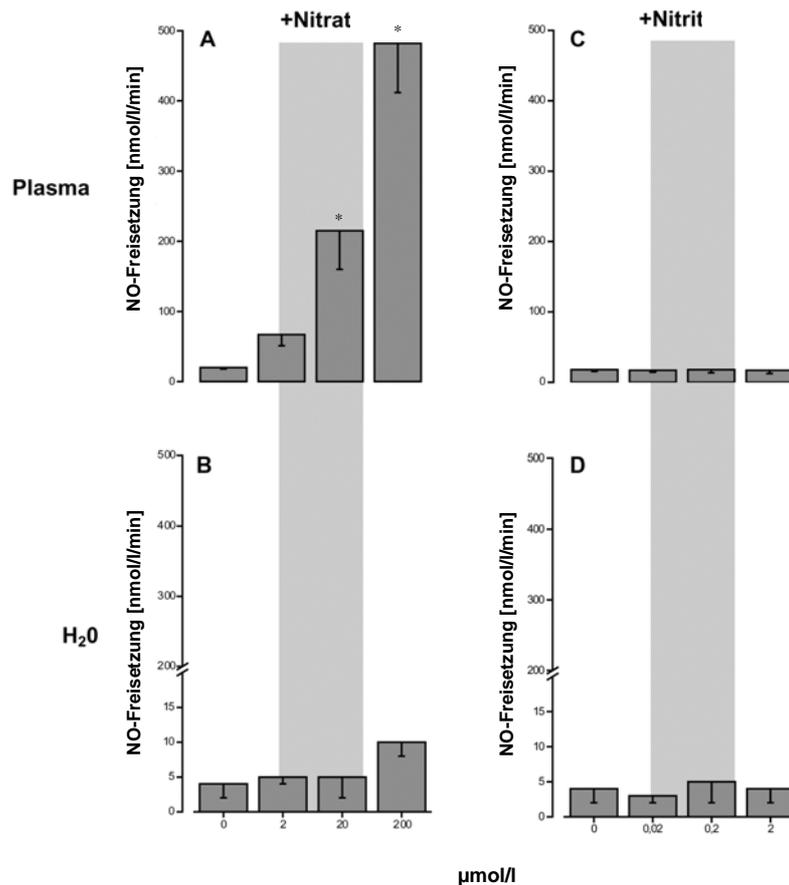


Abb. 3.3 Plasma verstärkt die UV-Licht induzierte NO-Freisetzung aus Nitrat. **A:** Plasma versetzt mit zunehmenden Konzentration an Nitrat. **B:** Wasser versetzt mit zunehmenden Konzentrationen an Nitrat. **C:** Zunehmende Nitritkonzentration in Plasma. **D:** Zunehmende Nitritkonzentration in Wasser. * signifikante Abweichung gegenüber dem Nullwert. Der grau schattierte Bereich kennzeichnet die endogene Nitrit- bzw. Nitratkonzentrationen.

Plasma enthält thiolgruppenhaltige Proteine, die eine Rolle bei der Freisetzung von NO aus Plasma spielen. Um diese Rolle zu charakterisieren, wurden zunächst die Proteine aus dem Plasma durch Fällung entfernt und das proteinfreie Plasma mit UV-Licht bestrahlt. Die NO-Freisetzung verminderte sich von 19 ± 3 auf $1 \pm 1 \text{ nmol/l/min}$ (Daten nicht dargestellt).

Danach wurden den Plasmaproben Substanzen zugegeben, die die Thiolverfügbarkeit erhöhten. Durch Applikation von DTT zu nativem Plasma wurde die NO-Freisetzung von 19 ± 3 auf 43 ± 7 nmol//min gesteigert. Daneben bewirkte auch die Zugabe von L-Cys eine Zunahme der NO-Freisetzung auf 47 ± 4 nmol//min. Das NO-Signal durch die Einzelsubstanzen konnte durch die gleichzeitige Applikation von DTT und L-Cys noch übertroffen werden (68 ± 7 nmol//min). Die UV-Licht-induzierte NO-Freisetzung dieser Probe konnte durch die Zugabe von NEM, einem Thiolblocker, von 68 ± 7 auf 4 ± 1 nmol//min vermindert werden (s. Abb. 3.4).

Durch Zugabe von Quecksilber-(II)-Chlorid (HgCl_2), eine Substanz, die selektiv RS-NO-Verbindungen spaltet, konnte die NO-Freisetzung aus Plasma reduziert werden. Die Verminderung der NO-Freisetzung war abhängig von der HgCl_2 Konzentration in der Probe. Eine 0,2%ige HgCl_2 -Lösung bewirkte eine Abnahme von 19 ± 3 auf 12 ± 2 nmol//min, eine 0,4%ige HgCl_2 -Lösung eine Abnahme auf 9 ± 1 nmol//min und schließlich eine 0,8%ige HgCl_2 -Lösung eine Abnahme auf 7 ± 2 nmol//min (Daten nicht dargestellt). Das Antikoagulanz EDTA beeinflusste die UV-abhängige NO-Freisetzung nicht.

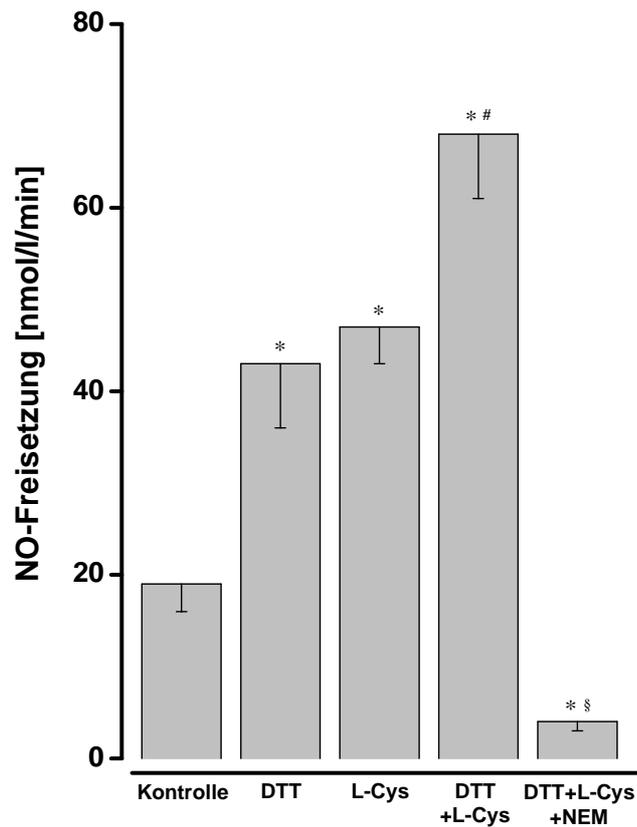


Abb. 3.4 Plasmathiole steigern die NO-Freisetzung aus Nitrat. Von links nach rechts wurden Plasmakontrolle, Plasma+Dithiotreitol (10mmol/l, DTT), Plasma+L-Cystein (1mmol/l, L-Cys), Plasma+DTT+L-Cys und schließlich Plasma+DTT+L-Cys+N-Ethylmaleinimide (10mmol/l, NEM) der UV-Lichtquelle ausgesetzt. *signifikanter Unterschied zur Plasmakontrolle; # signifikanter Unterschied zu Plasma+DTT oder Plasma+L-Cys; § signifikanter Unterschied zu Plasma+DTT+L-Cys.

3.2 Biologische Einflussfaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

3.2.1 Erfassung der Tag-zu-Tag Variabilität

Um auszuschließen, dass die Plasmakonzentration der RXNO-Konzentration eines Probanden signifikant von einem Tag zum anderen schwankte, wurde das Plasma von drei Probanden an fünf aufeinander folgenden Tagen gewonnen und die RXNO-Konzentration im Plasma bestimmt. Die

Untersuchung zeigte keine signifikant abweichenden RXNO-Konzentrationen von Tag zu Tag (Proband 1: 17 ± 2 nmol/l; Proband 2: 29 ± 3 nmol/l; Proband 3: 16 ± 2 nmol/l).

3.2.2 Ausschluss tageszeitlicher Schwankungen der RXNO-Plasmakonzentration

Um eine Beeinflussung der Messung durch mögliche tageszeitliche Schwankungen der RXNO-Konzentration zu charakterisieren, wurde das Plasma von fünf Probanden um 8 Uhr und um 12 Uhr eines Tages gewonnen und die RXNO-Konzentration bestimmt. Es zeigten sich in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung keine signifikanten Unterschiede (8 Uhr: 19 ± 4 nmol/l; 12 Uhr: 18 ± 5 nmol/l).

3.3 Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

3.3.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die Patienten mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten eine Zunahme des BMI, der Triglyceride, der Glukosekonzentration, des arteriellen Mitteldrucks und eine erhöhte Anzahl der Packungsjahre. Das HDL-Cholesterin war zunehmend vermindert (s. Tab. 3.1).

Das Studienkollektiv setzte sich zusammen aus 40 Normalpersonen (21 Frauen, 19 Männer), bei denen Risikofaktoren ausgeschlossen werden konnten. Das mittlere Lebensalter lag bei $41,7 \pm 2,9$ Jahren.

Die Gruppe der Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (n= 68) wurde in 4 Untergruppen aufgeteilt. Die Einteilung erfolgte aufgrund der kumulativen Anzahl an Risikofaktoren. Die Untergruppe der Personen mit einem

Risikofaktor (n= 31) bestand aus 15 Frauen und 16 Männern im Alter von $45,1 \pm 2,7$ Jahren. In der Untergruppe mit zwei Risikofaktoren befanden sich 3 weibliche und 7 männliche Probanden (Alter: $53,5 \pm 4,6$ Jahre). Die Untergruppe mit drei Risikofaktoren setzte sich aus 3 weiblichen und 11 männlichen Probanden zusammen (Alter: $60,6 \pm 2,0$ Jahre). Die Untergruppe mit vier Risikofaktoren bestand aus 1 weiblichen und 12 männlichen Probanden (Alter: $68,4 \pm 2,4$ Jahre). 34 der Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren hatten eine arterielle Hypertonie, 48 waren Raucher, 17 Probanden hatten einen Diabetes mellitus und 42 Probanden hatten eine Hypercholesterinämie.

Parameter	Einheit	0 RF	1 RF	2 RF	3 RF	4 RF	[p]
n		n=40	n=31	n=10	n=14	n=13	
Alter	[Jahre]	$41,1 \pm 2,9$	$45,1 \pm 2,7$	$53,5 \pm 4,6$	$60,6 \pm 2,0$	$68,4 \pm 2,4$	<0,001
Geschlecht	[m/w]	19/21	16/15	7/3	11/3	12/1	
BMI	[kg/m ²]	$23,1 \pm 0,4$	$24,0 \pm 0,5$	$27,3 \pm 0,9$	$27,0 \pm 0,7$	$28,6 \pm 1,1$	<0,001
arterielle Hypertonie		n=0	n=4	n=4	n=13	n=13	
Hypercholesterinämie		n=0	n=9	n=7	n=13	n=13	
Diabetes mellitus		n=0	n=1	n=1	n=4	n=11	
Raucher		n=0	n=17	n=6	n=12	n=13	
mittlerer arterieller Druck	[mmHg]	93 ± 1	90 ± 2	96 ± 3	101 ± 2	100 ± 3	0,002
Packungsjahre		0	$8,9 \pm 2,0$	$13,2 \pm 4,3$	$29,8 \pm 4,1$	$37,9 \pm 4,6$	<0,001
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	200 ± 4	209 ± 8	214 ± 16	245 ± 44	195 ± 20	0,289
LDL	[mg/dl]	137 ± 4	147 ± 7	150 ± 13	144 ± 10	135 ± 12	0,587
HDL	[mg/dl]	68 ± 2	68 ± 4	57 ± 6	48 ± 5	56 ± 3	0,002
Triglyceride	[mg/dl]	90 ± 6	110 ± 91	146 ± 18	432 ± 261	207 ± 59	0,021
Glucose	[mg/dl]	90 ± 1	90 ± 2	97 ± 7	111 ± 9	136 ± 15	<0,001

Tab. 3.1 Studiencharakteristik: Charakterisierung der Normalpersonen und der Patienten mit steigender Anzahl kardiovaskulären Risikofaktoren (RF) (MW \pm SE).

3.3.2 Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitratkonzentration im Plasma

Die mittlere Nitratkonzentration lag im Normalkollektiv bei $21 \pm 3 \mu\text{mol/l}$. In den folgenden Gruppen lagen die Konzentrationen bei $23 \pm 3 \mu\text{mol/l}$ (1 RF), $26 \pm 5 \mu\text{mol/l}$ (2 RF), $32 \pm 7 \mu\text{mol/l}$ (3 RF), $23 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ (4 RF) ($p=0,800$). Die Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant (s. Abb. 3.5).

3.3.3 Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitritkonzentration im Plasma

Die durchschnittliche Nitritkonzentration im Kollektiv mit keinem RF betrug $142 \pm 13 \text{nmol/l}$, $125 \pm 13 \text{nmol/l}$ im Kollektiv mit 1 RF, $131 \pm 23 \text{nmol/l}$ im Kollektiv mit 2 RF, $118 \pm 17 \text{nmol/l}$ im Kollektiv mit 3 RF und schließlich $106 \pm 19 \text{nmol/l}$ ($p=0,821$) im Kollektiv mit 4 RF. Es war eine leichte Abnahme der Nitritkonzentrationen feststellbar, die keine Signifikanz erreichte (s. Abb. 3.5).

3.3.4 Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im Plasma

Die mittlere RXNO-Konzentration im Kollektiv mit keinem RF betrug $39 \pm 2 \text{nmol/l}$. Mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren verringerten sich die Konzentrationen signifikant: $30 \pm 2 \text{nmol/l}$ (1 RF), $24 \pm 3 \text{nmol/l}$ (2 RF), $22 \pm 3 \text{nmol/l}$ (3 RF), $16 \pm 2 \text{nmol/l}$ (4 RF) ($p < 0,001$). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit keinem RF und der Gruppe mit 4 RF (s. Abb. 3.5).

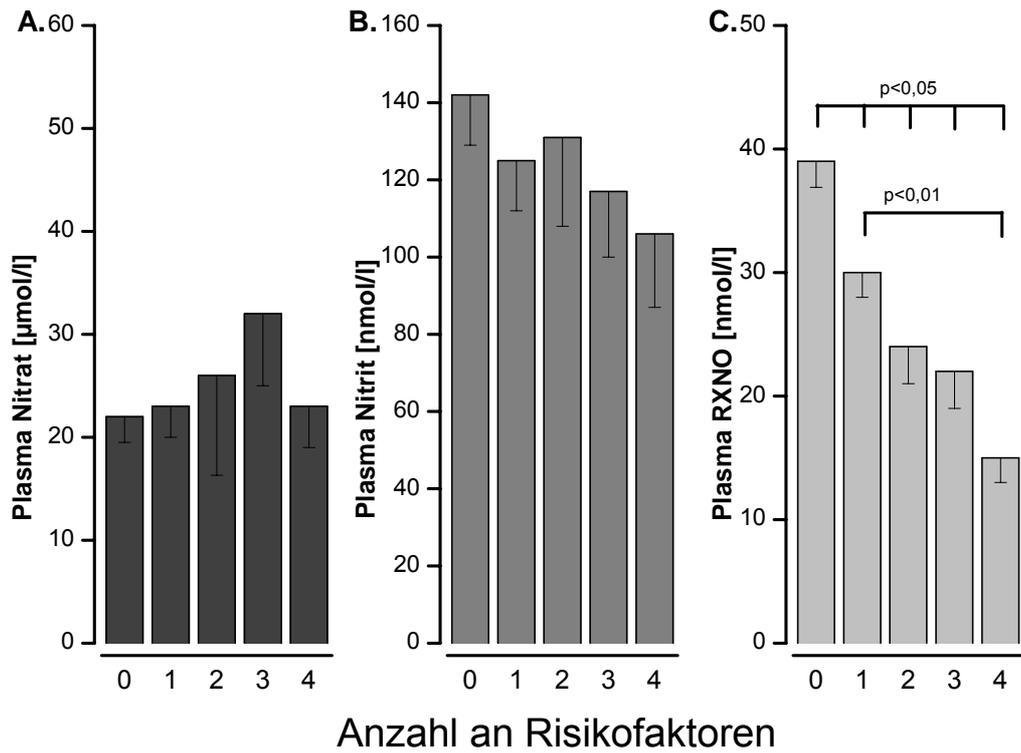


Abb. 3.5 **A:** Plasmanitrat-, **B:** Plasmanitrit-, **C:** RXNO-Konzentration im Plasma aufgetragen gegen die kumulative Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren. 0 Risikofaktoren=Kontrollkollektiv. Mit steigender Anzahl an Risikofaktoren nimmt die RXNO-Konzentration ab.

4 Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- 1) UV-Bestrahlung von Plasma führt zu einer thiolabhängigen NO-Freisetzung aus Nitrat.
- 2) Die plasmatische RXNO-Konzentration unterliegt geringen tageszeitlichen (8-12 Uhr) Schwankungen und weist eine geringe Tag-zu-Tag Variabilität auf.
- 3) Mit zunehmender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren nimmt die RXNO-Konzentration im Plasma signifikant ab.

In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die biochemische Quantifizierung des zirkulierenden NO-Pool eingegangen (4.1-4.3). Danach wird der Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothelfunktion (4.4), die Nitrat-, Nitrit- und RXNO-Konzentration diskutiert (4.5-4.6), abschließend wird ihre klinische Bedeutung erörtert (4.7).

4.1 Methodenkritik

Für die zuverlässige Messung niedriger RXNO-Konzentrationen aus biologischen Proben wurde eine sensitive Methode auf Basis der Chemilumineszenzdetektion verwendet. Im Vergleich zu anderen Methoden zur Bestimmung von RXNO zeichnet sich diese Methode durch eine hohe Sensitivität für RXNO aus. Im Folgenden werden verschiedene Methoden vorgestellt und beurteilt, die in der Literatur zur Bestimmung von RXNO beschrieben werden.

1998 beschrieb Samouilov⁸⁸ eine Methode zur Bestimmung von Nitrosothiolen basierend auf der Chemilumineszenzreaktion. Die Reaktionslösung bestand aus Hydrochinon (0,1mmol/l) und Quinon

(0,01mmol/l) in 1M Trispuffer (pH 10). Die Bestimmung des Nitrosothiolgehalts ist mit dieser Methode möglich, jedoch nicht die Bestimmung des Nitritgehalts. Aufgrund starker Schaumbildung in Anwesenheit hoher Proteinkonzentrationen ist die Zugabe schaumreduzierender Reagenzien, wie 2-Oktanol oder Silikon, zu proteinreichen Proben nötig²⁹.

Fang et al.²⁸ beschrieben eine weitere Methode basierend auf der Chemilumineszenzdetektion. Die reduktive NO-Freisetzung erfolgt durch eine Reaktionslösung bestehend aus 1mmol/l L-Cystein und 100µmol/l Kupferchlorid. Diese Methode erlaubt die Quantifizierung von Nitrosothiolen aus wässrigen Lösungen und aus dem Serum bei einem pH von 3,5. Bei physiologischem pH ist eine Bestimmung von Nitrosothiolen nicht möglich. Solche Bedingungen können in biologischem Material, durch Reduktion von Nitrit zu NO, zu einer artifizialen Nitrosierung von Thiolen führen und erhöhte Nitrosothiolkonzentrationen erzeugen²⁹. Nitrit kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden.

Eine weitere Methode, die sich die Chemilumineszenzdetektion zu Nutze macht, wurde von Ewing et al.²⁷ beschrieben. Die Arbeitsgruppe verwendete das klassische Saville-Verfahren, um aus Nitrosothiolen Quecksilber-katalysiert Nitrosoniumionen freizusetzen, die weiter zu Nitrit reagierten. Nitrit wurde durch eine Reaktionslösung bestehend aus Vanadium-(III)-Chlorid (0,1mol/l VCl_3 in 2mol/l HCl) zu NO reduziert und mittels Chemilumineszenzreaktion detektiert. Die Messgenauigkeit der Methode nahm bei niedrigen Nitrosothiolkonzentrationen ab, da sich diese in Anwesenheit hoher Nitritkonzentrationen schlecht abgrenzen ließen. Ein weiteres Problem bestand darin, dass die Reaktionslösung 50-70% des in der Probe vorhandenen Nitrats zu NO reduzierte und dies zu einer Überschätzung der Nitritkonzentrationen führte²⁹. Außerdem sorgte die Saville-Methode nicht für eine vollständige Freisetzung von NO aus Nitrosothiolen und unterschätzt somit die Nitrosothiolkonzentration²⁰.

Im Vergleich zu den beschriebenen Methoden erwies sich die Chemilumineszenz-Methode basierend auf einer jodidhaltigen Reaktionslösung als überlegen. Die zunächst von Marley et al.⁶⁷ verwendete Reaktionslösung wurde insofern modifiziert, dass kein Kupfer-(II)-sulfat vor der Probenaufgabe zugegeben wurde und keine schaumreduzierenden Substanzen nötig waren. Ein Austausch der Reaktionslösung war erst nach 15, 10 bzw. 3 Probenaufgaben bei wässrigen, plasmatischen bzw. hämoglobinhaltigen Proben nötig. Somit bewährte sich die Methode als besonders schnell und wenig störanfällig. Sowohl Nitrit als auch RXNO konnten aus wässrigen und aus biologischem, proteinhaltigem Material bei physiologischem pH-Wert mit hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit bestimmt werden. Eine Extraktion oder Deproteinierung war nicht nötig. Durch die Zugabe von Sulfanilamid konnte zwischen Nitrit und RXNO unterschieden werden²⁹.

4.2 Plasmaproteine erhöhen die UV-induzierte NO-Freisetzung aus Nitrat

Die in der Literatur beschriebene RXNO-Konzentration im Plasma schwankt von nicht detektierbar über 40nmol/l bis zu 10µmol/l⁸⁷. Eine Erklärung für die großen Schwankungen der RXNO-Konzentration könnte in der verwendeten Methode zur Bestimmung der NO-Spezies begründet liegen. Mit der oben beschriebenen Chemilumineszenzdetektion liegt die RXNO-Konzentration für gesunde Personen im niedrig nanomolaren Bereich (39 ± 3 nmol/l) und steht im Einklang mit Ergebnissen neuerer Studien^{11;38;68}. Arbeitsgruppen, die über eine höhere RXNO-Konzentration berichteten, verwendeten die Photolyse-Methode. Die Photolyse-Methode bedient sich der UV-Strahlung, um die RXNO-Bindung zu spalten und NO freizusetzen. Die Verwendung der Photolysereaktion könnte eine Fehlerquelle der Methode darstellen, da sie nicht spezifisch für Nitrosothiole zu sein scheint⁸⁷. Wie in der Literatur beschrieben setzt UV-Licht NO nicht nur aus Nitrosothiolen frei, sondern auch aus Nitrit, Nitrosaminen und Dinitrosyl-Eisen-Komplexen². Im Abschnitt

2.3 der vorliegenden Arbeit werden die zur Bestimmung der Spezifität der Photolysereaktion für Nitrosothiole nötigen Untersuchungsschritte beschrieben.

Es konnte gezeigt werden, dass UV-Bestrahlung von Plasma zu einer messbaren NO-Freisetzung führte. Gleichzeitig kam es in der Plasmaprobe neben der Bildung von RXNO und Nitrit zu einer Abnahme der Nitratkonzentration. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Nitrat zu Plasma, nicht jedoch zu wässrigen Proben, zu einem Ansteigen der UV-abhängigen NO-Freisetzung führte. Die Entfernung von Nitrat aus Plasma bewirkte eine starke Verringerung der UV-abhängigen NO-Freisetzung. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass das im Plasma vorhandene Nitrat die Quelle der photolytischen NO-Freisetzung sein könnte. Gleichzeitig scheinen die im Plasma vorhandenen Proteine, die in wässrigen Lösungen nicht vorhanden sind, ebenfalls eine Rolle bei der NO-Freisetzung aus Plasma zu spielen.

Um die Beteiligung der Plasmaproteine bzw. der Thiolgruppen an der UV-abhängigen NO-Freisetzung aus dem Plasma nachzuweisen, wurde die Thiolverfügbarkeit im Plasma moduliert. Die Zugabe von L-Cystein und Dithiothreitol zur Plasmaprobe führte zu einem Anstieg der UV-abhängigen NO-Freisetzung. N-Ethylmaleinimide, ein Thiolalkylanz, sowie HgCl_2 führten zu einer Abnahme der NO-Freisetzung. Eine wässrige Nitratlösung zeigte in Anwesenheit von L-Cystein, verglichen mit der NO-Freisetzung bei Abwesenheit des Thiols, eine Zunahme der UV-abhängigen NO-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Durch Zufügen von HgCl_2 zu der wässrigen Nitrat/L-Cystein-Lösung konnte eine Reduktion der NO-Freisetzung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Demnach konnte aus einer nitrathaltigen Lösung in Anwesenheit von Thiolen durch UV-Licht NO freigesetzt werden, ohne dass in der ursprünglichen Lösung RSNOs vorhanden waren. Die Reduktion der UV-abhängigen NO-Freisetzung durch HgCl_2 ist folglich nicht abhängig von der Spaltung der RSNOs durch Quecksilber, sondern vielmehr durch eine Modifikation der Thiolverfügbarkeit zu erklären. Dieses überraschende Untersuchungsergebnis bestätigt die Validität der

Analysemethodik und die bestimmten RXNO-Konzentrationen im Plasma der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden.

4.3 Tageszeitliche und Tag-zu-Tag Variabilität der plasmatischen RXNO-Konzentration

Bevor die Querschnittsstudie mit Normalprobanden und Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren begonnen wurde, wurden die Tag-zu-Tag Variabilität und die tageszeitliche Variabilität der RXNO-Konzentration bei gesunden Probanden bestimmt. Die RXNO-Konzentration unterlag einer geringen, nicht signifikanten Tag-zu-Tag Variabilität. Die tageszeitliche Variabilität der RXNO-Konzentration wurde nur für die Morgenstunden bestimmt, da dieser Zeitraum für die spätere Querschnittsstudie von Bedeutung war. Die RXNO-Konzentration unterlag in diesem Zeitraum keiner signifikanten Schwankung. Über die Schwankung zu anderen Tageszeiten kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Aussage gemacht werden. Trotz der zufriedenstellenden Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse zur Messung der RXNO-Konzentration, haben wir uns entschieden, die Originalregistrierungen von einem verblindeten zweiten Untersucher analysieren zu lassen, um einen Untersucherbias ausschließen zu können.

4.4 Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel-abhängige Dilatation

In früheren Veröffentlichungen wurden invasive Methoden wie die koronare Angiographie verwendet, um die Endothel-abhängige Gefäßantwort auf die Infusion von Azetylcholin⁶⁵ zu bestimmen. Bei gesunden Probanden führte dieser Reiz über die Stimulation der NO-Synthese zu einer Vasodilatation der Koronargefäße. Bei Patienten mit einer dokumentierten koronaren

Herzkrankheit führte die Infusion von Azetylcholin zu einer verminderten Vasodilatation bzw. zu einer Vasokonstriktion. Die vasokonstriktorische Antwort ist durch den Verlust der Fähigkeit zur NO-Synthese und einen überwiegenden Einfluss muskarinerger Rezeptoren auf Ebene der glatten Gefäßmuskulatur zu erklären⁶⁵.

Nicht-invasive Verfahren, wie die hochauflösende Duplexsonographie der A. brachialis, konnten diese Beobachtung unterstützen. Celermajer et al.¹⁵ konnten zeigen, dass die NO-abhängige, Fluss-vermittelte Dilatation (FMD=Flow Mediated Dilatation) bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, vermindert war. Hierbei ging eine erhöhte Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren mit einer reduzierten FMD einher. Unter der Voraussetzung, dass die FMD im wesentlichen NO-vermittelt ist⁴⁹, kann bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren von einer Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit ausgegangen werden. Allerdings ist die Messung der FMD eine zeitaufwendige Methode, die eine spezielle Ausbildung erfordert und großer Erfahrung des Untersuchers bedarf. Deshalb ist die Methode nicht in den klinischen Alltag integriert worden.

Zahlreiche Untersuchungen sprechen dafür, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über eine gesteigerte Radikalenbildung zu einem beschleunigten NO-Abbau führen¹⁰. Neben dem NO-Abbau scheinen Radikale (oxidativer Stress) auch zu einer Hemmung der NO-Synthese beizutragen⁶³. Mittlerweile wurde für die wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktoren wie der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie, die Hypercholesterinämie und das Rauchen der Nachweis erbracht, dass sie zu einer Verminderung von bioaktivem NO führen, indem sie durch freie Radikalenbildung die NO-Synthese vermindern und den NO-Abbau beschleunigen^{3;62;73;109}. Da NO an der Vermittlung wesentlicher Endothelfunktionen beteiligt ist, die der Entstehung einer Arteriosklerose entgegen wirken, scheint die Minderung der NO-Bioverfügbarkeit eine wesentliche Rolle für die Entwicklung einer Arteriosklerose zu spielen²⁵.

4.5 Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Nitrat- und Nitritkonzentration im Plasma

Die Bestimmung eines Markers der endothelialen Dysfunktion aus dem Blut könnte für eine vereinfachte Diagnostik sorgen. Darüber hinaus wäre eine Standardisierung (Zentrallabor) sowie eine Reduktion der Kosten möglich. Mit diesem Ziel stieg in den letzten Jahren das Interesse an der Identifizierung eines NO-Markers für die endotheliale Dysfunktion.

Um einen NO-Marker aus dem Blut identifizieren zu können, ist eine genaue Kenntnis der Hauptreaktionswege von NO in der humanen Zirkulation wichtig. Vom Endothel nach luminal freigesetztes NO reagiert im Plasma mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit. Nitrit und NO können in Erythrozyten diffundieren und dort mit Oxyhämoglobin zu Nitrat reagieren. NO kann im Plasma direkt mit freien Aminen Nitrosamine (RNNO) oder mit Thiolen Nitrosothiole (RSNO) bilden. Es werden niedermolekulare NO-Spezies wie S-Nitrosocystein oder S-Nitrosoglutathion von hochmolekularen NO-Spezies wie S-Nitrosoalbumin oder N-Nitrosoalbumin unterschieden.

In publizierten und unpublizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Nitrit ein Marker der regionalen und systemischen endothelialen NO-Produktion im Menschen und anderen Säugetieren ist^{21;60}. In einer Querschnittstudie an 351 Blutspendern konnte gezeigt werden, dass Nitrit mit steigender Anzahl an Risikofaktoren signifikant abfällt (nicht publizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Die Variabilität innerhalb einer Risikofaktorgruppe war jedoch so groß, dass der positive sowie negative prädiktive Wert der Nitrit-Messung zur Diskriminierung von gesunden und kranken Probanden gering war.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Nitritkonzentration im Plasma und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren. Es konnte lediglich eine tendenzielle Abnahme der Nitritkonzentration im Plasma verzeichnet werden. Eine mögliche Erklärung

für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien könnte die geringere Anzahl an Studienteilnehmern in der vorliegenden Untersuchung sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stehen im Einklang mit Ergebnissen, die Nitrit als Indikator einer lokalen, kurzfristigen Änderung der Aktivität der NOS beschreiben^{53;59}. Ob die Nitritkonzentration als langfristiger Parameter der NO-Bioverfügbarkeit geeignet ist, muss noch geklärt werden.

Auch die plasmatische Nitratkonzentration zeigte in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und dem Kontrollkollektiv. Die Nitratkonzentration im Plasma unterliegt nicht allein der endogenen NO-Synthese, sondern kann z.B. durch die Nahrungsaufnahme stark beeinflusst werden⁵³. Außerdem liegt Nitrat in sehr hohen Hintergrundkonzentrationen (mikromolarer Bereich) im Plasma vor, wodurch die Bestimmung von Änderungen, die auf die endogene NO-Synthese (nanomolarer Bereich) zurückzuführen sind, nur eingeschränkt möglich ist. Daraus ergibt sich, dass Nitrat nicht als biochemischer Marker einer eingeschränkten NO-Bioverfügbarkeit geeignet ist.

4.6 Identifizierung eines biochemischen Markers der endothelialen Dysfunktion

Im Gegensatz zur Nitrit- und Nitratkonzentration im Plasma zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die RXNO-Konzentration im Plasma von Personen mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren signifikant abfällt.

In früherer Studien wurde gezeigt, dass NO über die Bildung langlebiger Intermediate, wie L-Nitrosocystein, Nitrosoglutathion und SNOAlb, im menschlichen Kreislauf zirkuliert^{67;99}. Weitere Untersuchungen belegten die physiologische Relevanz von RXNO, indem sie nachwiesen, dass infundierte Nitrosothiole und auch Nitrosothiole, die nach Infusion von NO gebildet

wurden, vergleichbare hämodynamische Effekte auf das Gefäßsystem der Unterarmstrombahn hatten wie NO⁸³. In Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die systemische Infusion eines NO-Syntheseinhibitors zu einem Anstieg des Blutdrucks und zu einem Abfall der RXNO-Konzentration führte. Andere Studien zeigten, dass RXNO für eine Inhibition der Thrombozytenaggregation sorgt²⁰. Daraufhin wurde vermutet, dass RXNO eine systemisch wirksame bioaktive Speicherform von NO darstellt⁸⁴.

Vor diesem Hintergrund stehen die Befunde der vorliegenden Arbeit im Einklang mit der Hypothese, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer eingeschränkten NO-Bioverfügbarkeit führen. Eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit und eine damit einhergehende reduzierte plasmatische RXNO-Konzentration könnte somit als biochemischer Marker einer endothelialen Dysfunktion dienen. Diese Hypothese wurde durch weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigt, die einen Zusammenhang zwischen der FMD und der RXNO-Konzentration im Plasma nachwiesen (unveröffentlichte Daten).

4.7 Klinische Bedeutung und Ausblick

In den letzten Jahren konnte der Nachweis erbracht werden, dass die endotheliale Dysfunktion in Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren eine frühe Stufe in der Entstehung der Arteriosklerose darstellt^{4;26;74;118}. Die endotheliale Funktion wurde bisher mittels FMD bestimmt¹². Celermajer et al.¹³ konnten zeigen, dass es bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren zu einer Reduktion der FMD kommt. Die FMD konnte als ein prognostischer Wert für Patienten mit koronarer Herzkrankheit etabliert werden⁷². Der endothelialen Dysfunktion sollte auch deshalb eine besondere Bedeutung geschenkt werden, weil einige Studien darauf hinweisen, dass eine endotheliale Dysfunktion teilweise rückführbar sein kann^{18;92;114}.

Trotzdem ist die FMD-Messung nicht in den klinischen Alltag integriert worden.

NO ist an der Vermittlung wesentlicher Endothelfunktion beteiligt und beeinflusst über eine reduzierte Bioverfügbarkeit Schlüsselprozesse, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose von Bedeutung sind. Mittels eines geeigneten und einfach zu bestimmenden Markers des NO-Stoffwechsels, könnte die Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion erleichtert werden.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren die RXNO-Konzentration, eine bioaktive Speicherform von NO⁸⁴, vermindert ist. Dieser Zusammenhang bietet die Möglichkeit, über die Bestimmung der RXNO-Konzentration die Entstehung bzw. das Fortschreiten einer Arteriosklerose zu erfassen und eine frühzeitig Therapie einzuleiten.

Die Therapie der Arteriosklerose basiert zu großen Teilen auf einer Reduktion von kardiovaskulären Risikofaktoren. Bei einigen Therapieansätzen hat sich gezeigt, dass sie neben ihren ursprünglich bekannten Wirkungen auch die NO-Bioverfügbarkeit erhöhen können und dadurch direkten Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion nehmen. Ein Teil der schon seit längerem bekannten prognostisch günstigen Eigenschaften von Angiotensin-Converting-Enzyme(ACE)- und Cholesterolsynthese-Enzym-(CSE) Hemmern kann einer gesteigerten NO-Bioverfügbarkeit zugeschrieben werden^{50;61;114}. Diese Befunde sprechen dafür, dass die endotheliale Dysfunktion das kausale Bindeglied und somit eine therapeutische Zielgröße in der Prophylaxe und Therapie einer Arteriosklerose darstellt⁵⁵. Die vorliegende Arbeit weist den Zusammenhang zwischen der Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren und der RXNO-Konzentration nach. Durch die Bestimmung der RXNO-Konzentration könnte es möglich sein, die endotheliale Dysfunktion in die individualspezifische Risikostratifizierung mit einzubeziehen. Zudem könnten Behandlungserfolge nun durch einen einfachen Bluttest objektiviert werden.

5 Zusammenfassung

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren die Endothelfunktion beeinträchtigen und u.a. über die verminderte NO-Synthese bzw. über einen gesteigerten NO-Abbau eine proatherogene Wirkung vermitteln. Ergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass NO als RXNO im Kreislauf transportiert wird und systemisch wirksam werden kann. Zur Bestimmung der RXNO-Konzentration kann die RX-NO-Bindung chemisch reduktiv oder durch UV-Licht gespalten werden. Die mit der Photolyse-Methode gemessenen RXNO-Konzentrationen werden in der Literatur um ein Hundertfaches höher angegeben als die der reduktiven Verfahren. Folgende Hypothesen wurden untersucht: (I) Aufgrund eines systematischen Messfehlers überschätzt die Photolyse-Methode die RXNO-Konzentration im Plasma. (II) Mit zunehmender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren nimmt die RXNO-Konzentration im Plasma ab.

Zur Überprüfung der ersten Hypothese wurde die Photolyse-Methode mit der reduktiven CLD verglichen. Zur Überprüfung der zweiten Hypothese wurden die plasmatischen Nitrat-, Nitrit-, und RXNO-Konzentrationen bestimmt und auf einen Zusammenhang mit der unterschiedlichen Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (I) Plasmathiole führen zu einer Erhöhung der Photolyse-induzierten NO-Freisetzung aus plasmatischem Nitrat.
- (II) Mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren nimmt die RXNO-Konzentration im Plasma ab.

Die Bestimmung der RXNO-Konzentration mittels reduktiver Gasphasen-Chemilumineszenz aus dem Plasma könnte als einfacher Bluttest zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren dienen und den Einstieg in eine frühzeitige Therapie ermöglichen. Darüber hinaus könnten über die RXNO-Konzentration Behandlungserfolge objektiviert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Al-Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR, Flitney FW. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol.* 1997;121:1047-1050.
2. Alpert C, Ramdani N, George D, Loscalzo J. Detection of S-nitrosothiols and other nitric oxide derivatives by photolytic-chemiluminescence spectrometry. *Anal Biochem.* 1997;245:1-7.
3. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E, Bonadonna RC. Insulin causes endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2002;105:576-582.
4. Arcaro G, Zenere BM, Travia D, Zenti MG, Covi G, Lechi A, Muggeo M. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction in hypercholesterolaemic subjects. *Atherosclerosis.* 1995;114:247-254.
5. Arnette DR, Stamler JS. NO⁺, NO[•], and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys.* 1995;318:279-285.
6. Arteel GE, Schroeder P, Sies H. Reactions of peroxynitrite with cocoa procyanidin oligomers. *J Nutr.* 2000;130:2100S-2104S.
7. Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:10089-10093.
8. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.
9. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 1995;27:331-340.
10. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in cardiovascular diseases; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
11. Cannon III RO, Schechter AN, Panza JA, Ognibene FP, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Shelhamer JH, Gladwin MT. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J Clin Invest.* 2001;108:279-287.
12. Celermajer DS. Testing endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32:S29-S32.

13. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-1474.
14. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Vascular endothelial responses, prostanoids, and flow: Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149-2155.
15. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;340:1111-1115.
16. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR. Seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Hypertension*. 2003;42:1206-1252.
17. Clancy RM, Miyazaki Y, Cannon PJ. Use of thionitrobenzoic acid to characterize the stability of nitric oxide in aqueous solutions and in porcine aortic endothelial cell suspensions. *Anal Biochem*. 1990;191:138-143.
18. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubb M, World M, Deanfield JE. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1379-1385.
19. Cleeman JI. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel 3). *JAMA*. 2001;285:2486-2497.
20. deBelder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S, Vallance PJ. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res*. 1994;28:691-694.
21. Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32:423-429.
22. Di Iorio EE. Preparation of derivates of ferrous and ferric hemoglobin. In: Hemoglobins. Antonini E, Bernadi C, Chiancone E, eds. 1981. Academic Press Inc., Orlando, FL.
23. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney jr JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med*. 1997;337:408-416.

24. Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem.* 1981;14:351-358.
25. Egashira K. Clinical importance of endothelial function in arteriosclerosis and ischemic heart disease. *Circ J.* 2002;66:529-533.
26. Egashira K, Suzuki S, Hirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Imaizumi T, Takeshita A. Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Different responses to acetylcholine and substance P. *Hypertension.* 1995;25:201-206.
27. Ewing JF, Janero DR. Specific s-nitrosothiol (thionitrite) quantification as solution nitrite after vanadium (III) reduction and ozone-chemiluminescent detection. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:621-628.
28. Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, Macdonald T, Gaston B. reductive assays for s-nitrosothiols: implications for measurements in biological systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;252:535-540.
29. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourd'heuil D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 2002;16:1775-1785.
30. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, Ostrovsky L, Fairhead T, Reinhardt P, Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest.* 1998;101:2497-2505.
31. Fukuto JM, Mayer B. The Enzymology of Nitric Oxide Synthase. In: *Methods in Nitric Oxide Research.* Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
32. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3:2007-2018.
33. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326:242-250.
34. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med.* 1992;326:310-318.
35. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphat inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1989;83:1774-1777.
36. Gharini P, Preik-Steinhoff H, Kleinbongard P, Lauer T, Kelm M. Nitritmessung in Plasmaproben mit FIA. *Laborpraxis.* 2003;27:24-25.

37. Gödecke A, Decking UKM, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon H-J, Gödecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998;82:186-194.
38. Goldman RK, Vlessis AA, Trunkey DD. Nitrosothiol quantification in human plasma. *Anal Biochem*. 1998;259:98-103.
39. Gow AJ, Stamler JS. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*. 1998;391:169-173.
40. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol*. 1999;301:49-61.
41. Griess JP. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ber Deutsch Chem Ges*. 1879;12:426-428.
42. Hampl V, Walters CL, Archer SL. Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone. In: *Methods in nitric oxide research*. Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
43. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*. 1989;65:1-21.
44. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1990;30:535-560.
45. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9265-9269.
46. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*. 1987;61:866-879.
47. Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*. 1981;218:739-749.
48. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. 1996;380:221-226.
49. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thüillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of

- human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319.
50. John S, Schlaich M, Langenfeld M, Weihprecht H, Schmitz G, Weidinger G, Schmieder RE. Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Circulation*. 1998;98:211-216.
 51. Jourdain D, Hallen K, Feelisch M, Grisham MB. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:409-417.
 52. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of risk in the development of coronary heart disease six-year-follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 1961;55:33-50.
 53. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:273-289.
 54. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;154:236-244.
 55. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion: therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist*. 1999;40:1300-1307.
 56. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GÄ, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:790-796.
 57. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric Oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4651-4655.
 58. Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith REA, Radomski M, Martin JF, Moncada S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*. 1994;344:1458-1460.
 59. Lauer T, Köster P, Preik M, Kelm M. Einfluss kompetitiver Substrathemmung des L-Arginin-NO-Stoffwechsels auf die Stickstoffmonoxidfreisetzung nach rezeptorvermittelter Stimulation des endothelialen NO-Synthase im menschlichen Kreislauf. *Z Kardiol*. 2000;89:74.
 60. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric

oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:12814-12819.

61. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation*. 1998;97:1129-1135.
62. Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation*. 1997;95:588-593.
63. Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interaction between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001;103:1282-1288.
64. Lefer AM. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:771-776.
65. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986;315:1046-1051.
66. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cells function. *FASEB J*. 1992;6:2591-2599.
67. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A chemiluminescence-based assay for s-nitrosoalbumin and other plasma s-nitrosothiols. *Free Radic Res*. 2000;32:1-9.
68. Marley R, Patel RP, Orié N, Caeser E, Darley-Usmar V, Moore K. Formation of nanomolar concentrations of S-nitroso-albumin in human plasma by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2001;31:688-696.
69. Nakaki T, Nakayama M, Kato R. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1990;189:347-353.
70. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett*. 1993;316:175-180.
71. Nathan C. NO as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992;6:3051-3064.
72. Neunteufl T, Heher S, Katzenschlager R, Wöfl G, Kostner K, Maurer G, Weidinger F. Late prognostic value of flow-mediated dilation in the brachial artery of patients with chest pain. *The American Journal of Cardiology*. 2000;86:207-210.

73. Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, Zehetgruber M, Söregi G, Lehr S, Huber K, Maurer G, Weidinger F, Kostner K. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:277-283.
74. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali J-R. Impairment of coronary vascular reserve and ACh-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes.* 1993;42:1017-1025.
75. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res.* 1994;305:253-264.
76. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-526.
77. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation.* 1998;97:263-267.
78. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol.* 1987;92:181-187.
79. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;7:1057-1058.
80. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:1482-1489.
81. Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:5913-5918.
82. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1590-1596.
83. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO; experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res.* 2002;91:470-477.
84. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002;109:1241-1248.

85. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis a perspectives for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801-809.
86. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
87. Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, di Simplicio P. Physiological levels of s-nitrosothiols in human plasma. *Circ Res*. 2001;89:E47.
88. Samouilov A, Zweier JL. Development of chemiluminescence-based methods for specific quantitation of nitrosylated thiols. *Anal Biochem*. 1998;258:322-330.
89. Saville B. Scheme for the colorimetric determination of microgram amounts thiols. *Analyst*. 1958;83:670-672.
90. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
91. Scharfstein JS, Keaney jr JF, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, Loscalzo J. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest*. 1994;94:1432-1439.
92. Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, Touyz RM. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan. *Circulation*. 2000;101:1653-1659.
93. Schmidt D, Shen Z, Zhang R, Colles SM, Wu W, Salomon RG, Chen Y, Chisolm GM, Hazen SL. Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biological active oxidized lipids and sterol in serum. *Biochemistry (Mosc)*. 1999;38:16904-16915.
94. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star RA. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*. 1994;94:2231-2236.
95. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991;91:31S-38S.
96. Sneddon JM, Vane JR. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:2800-2804.
97. Snyder SH. More jobs for that molecule. *Nature*. 1994;372:504-505.

98. Stamler JS. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*. 1994;78:931-936.
99. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:7674-7677.
100. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. 1997;276:2034-2037.
101. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, Loscalzo J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:444-448.
102. Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related disease. *Nutr Rev*. 1996;54:1-30.
103. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.
104. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. *Circulation*. 1994;89:2462-2478.
105. Steinbrecher UP. Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1988;959:20-30.
106. Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V. Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ*. 2001;8:515-527.
107. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes jr DR, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation*. 2000;101:948-954.
108. The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:S5-S20.
109. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy M-A, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm

- resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation*. 1997;95:2617-2622.
110. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol*. 1999;94:295-314.
 111. Tsao PS, McEvoy EC, Drexler H, Butcher EC, Cooke JP. Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation*. 1994;89:2176-2182.
 112. Tsikas D, Sandmann J, Gutzki F-M, Stichtenoth DO, Frölich JC. Measurement of S-nitrosoalbumin by gas chromatography-mass spectrometry; II. Quantitative determination of S-nitrosoalbumin in human plasma using S-[¹⁵N]nitrosoalbumin as internal standard. *J Chromatogr*. 1999;726:13-24.
 113. Tyurin VA, Liu S-X, Tyurina YY, Sussman NB, Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Kagan VE. Elevated levels of s-nitrosoalbumin in preeclampsia plasma. *Circ Res*. 2001;88:1210-1215.
 114. Varin R, Mulder P, Tamion F, Richard V, Henry J-P, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. Improvement of endothelial function by chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in heart failure. *Circulation*. 2000;102:351-356.
 115. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;12:115-118.
 116. Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Gladwin MT. Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11477-11482.
 117. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Petersson A-S, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res*. 1993;73:1121-1127.
 118. Zeiher AM, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation*. 1995;92:1094-1100.

7 Veröffentlichungen

A. Publikationen

Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, **Hamada S**, Gharini P, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Thiols enhance NO formation from Nitrate photolysis. Free Radical Biology & Medicine. 2003; 35: 1551-1559.

Heiss C, Lauer T, Dejam A, Kleinbongard P, **Hamada S**, Rassaf T, Matern S, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. Journal of the American College of Cardiology. 2006, 47: 573-579.

B. Abstracts

Hamada S, Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T, Gharini P, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Non-enzymatic NO formation in human plasma through nitrate photolysis. In: Gesellschaft für NO Forschung und Club NO Francais. 1st Joint French-German NO Meeting. NO: from Chemistry to Therapeutics. Strasbourg, 2003, 41.

Dejam A, Kleinbongard P, Rassaf T., **Hamada S**, Gharini P, Rodriguez J, Feelisch M, Kelm M. Thiols enhance NO formation from nitrate photolysis. Free Radical Biology & Medicine. SFRBM's 10th Annual Meeting, 2003, Vol 35 (1), 444.

8 Danksagung

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

Herrn Dr. med. A. Dejam danke ich für die Betreuung meiner Doktorarbeit, für die Einführung in die experimentelle Arbeit und für sein kritisches Korrekturlesen.

Herrn Dr. med. C. Heiß möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Querschnittsstudie und für die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse danken.

Frau Dr. rer. nat. P. Kleinbongard bin ich für ihre konstruktive Kritik und hilfreichen Vorschläge bei der Durchführung und der Verfassung der vorliegenden Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Frau Dr. med. P. Gharini danke ich für ihre große und bereitwillige Unterstützung während der experimentellen Arbeit.

Frau MTA S. Matern und Frau MTA G. Schoder möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der Arbeit im kardiologischen Labor danken.

Frau S. Keymel danke ich für ihre hilfreichen Anregungen und für ihr kritisches Korrekturlesen.

Den größten Dank möchte ich meiner Mutter, Fr. K. Reuters aussprechen, die mich in unschätzbare Weise während meines Studiums unterstützt hat und mir durch ihr selbstloses Verhalten einen unbeschwerlichen Weg ermöglicht hat.

9 Lebenslauf

Name: Sandra Hamada
Wohnort: Jakob-Schlüter Weg 22, 41379 Brüggen
Geburtsdatum: 26.12.1979
Geburtsort: Viersen

Schulbildung

1983-1984 Lady of Lourdes Pre-School, Washington D.C.
1984-1985 Ecole Francaise International de Washington
1986-1990 Katholische Grundschule, Born
1990-1999 St. Wolfhelm Gymnasium, Waldniel, mit Erlangung der
allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung

1999-2006 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine
Universität, Düsseldorf
2002-2005 Doktorandin im kardiologischen Labor der Heinrich-
Heine Universität, Düsseldorf
2003-2004 Studentische Hilfskraft im kardiologischen Labor der
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
Examina: 09/2001 Ärztliche Vorprüfung
09/2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktische Ausbildung

07-08 1999 Krankenpflegepraktikum, St. Antonius Hospital, Waldniel
03-04 2000 Krankenpflegepraktikum, St. Antonius Hospital, Waldniel

WS 2001/02 Teilnahme am Sonographiekurs des Medizindidaktischen
Pilotprojektes der HHU

Famulaturen

09/2003 Innere Medizin, Allg. Krankenhaus, Viersen
08/2003 Anästhesiologie St. Cornelius Hospital, Dülken
03/2004 Praxis für Allgemeinmedizin und Psychotherapie
08-09 2004 Notfallmedizin Mt. Sinai Hospital Chicago, Illinois (USA)

Praktisches Jahr 04/2005-03/2006

1. Terial Chirurgie, HHU Düsseldorf
2. Terial Anästhesiologie, HHU Düsseldorf
3. Terial Innere Medizin, HHU Düsseldorf

Beruflicher Werdegang

05/2006 Approbation
11/2006 Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I des
Universitätsklinikums Aachen

Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im menschlichen Plasma: biochemischer Marker des NO-Stoffwechsels und endotheliale Dysfunktion

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren (RF) die Endothelfunktion beeinträchtigen und u.a. über die verminderte Stickstoffmonoxid(NO)-Synthese bzw. über einen gesteigerten NO-Abbau eine proatherogene Wirkung vermitteln. Ergebnisse der letzten Jahre weisen darauf hin, dass NO als RXNO (nitrosierte und nitrosylierte NO-Spezies) im Kreislauf transportiert wird und systemisch wirksam werden kann. Zur Bestimmung der RXNO-Konzentration kann die RX-NO-Bindung chemisch reduktiv oder durch Ultraviolett(UV)-Licht gespalten werden. Die mit der Photolyse-Methode gemessenen RXNO-Konzentrationen werden in der Literatur um ein Hundertfaches höher angegeben als die der reduktiven Verfahren. Folgende Hypothesen wurden untersucht: (I) Aufgrund eines systematischen Messfehlers überschätzt die Photolyse-Methode die RXNO-Konzentration im Plasma. (II) Mit zunehmender Anzahl kardiovaskulärer RF nimmt RXNO-Konzentration im Plasma ab.

Zur Überprüfung der ersten Hypothese wurde die Photolyse-Methode mit der reduktiven Chemilumineszenzdetektion (CLD) verglichen. Zur Überprüfung der zweiten Hypothese wurden die plasmatischen Nitrat-, Nitrit-, und RXNO-Konzentrationen bestimmt und auf einen Zusammenhang mit der unterschiedlichen Anzahl kardiovaskulärer RF untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (I) Plasmathiole führen zu einer Erhöhung der Photolyse-induzierten NO-Freisetzung aus plasmatischem Nitrat.
- (II) Mit steigender Anzahl an kardiovaskulären RF nimmt die RXNO-Konzentration im Plasma ab.

Die Bestimmung der RXNO-Konzentration mittels reduktiver CLD aus dem Plasma könnte als einfacher Bluttest zur Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion bei Patienten mit kardiovaskulären RF dienen und den Einstieg in eine frühzeitige Therapie ermöglichen. Darüber hinaus könnte über die RXNO-Konzentration Behandlungserfolge objektiviert werden.