

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

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

**Plasmatische Nitrit-Reserve als Marker einer vaskulären  
Dysfunktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Sarah Jasmin Laureen Mangold

2008

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

„Weise ist der, der von jedem Menschen lernen kann.“  
*(Persisches Sprichwort)*

## Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
AHA	American Heart Association
CLD	Chemilumineszenz-Detektion
CRP	C-Reaktives Protein
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flow Mediated Dilation (Fluss-vermittelte Dilatation )
GTN	Glyzeroltrinitrat
HCl	Salzsäure
HDL-C	High Density Lipoprotein-Cholesterin
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
I <sup>-</sup>	Iodid
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1)
IL-6, IL-18	Interleukin-6, Interleukin-18
IMT	Intima Media Thickness (Intima-Media-Dicke)
JNC	Joint National Committee
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL-C	Low Density Lipoprotein-Cholesterin
L-NAME	L - N <sup>ω</sup> - Nitroarginin Methylester
L-NMMA	N <sup>G</sup> - Monomethyl - L - Arginin
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MOD	Magneto Optical Disc
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

MW	Mittelwert
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NYHA	New York Heart Association
NaOH	Natriumhydroxid
NO $\cdot$	Stickstoffmonoxid (*)
NO $^+$	Nitrosoniumion
NO $_2$	Stickstoffdioxid
NO $_2^-$	Nitrit
n.s.	nicht signifikant
O $_2^-$	Sauerstoff
O $_2^{\cdot-}$	Superoxidanion (*)
O $_3$	Ozon
ONOO $^-$	Peroxynitrit
oxLDL	oxidated low density lipoprotein
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1)
PBS	Saliner Phosphatpuffer
PW-Doppler	Pulsed Wave-Doppler
SAA	Serum Amyloid A
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SE	Standard Error (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
TIF	Taggered Image Format
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
t-PA	tissue-type Plasminogen Activator
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (Gefäßzell- adhäsionsmolekül-1)
VCl $_3$	Vanadium(III)-Chlorid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheits- organisation)

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1. Arteriosklerose .....	9
1.2. Marker einer vaskulären Dysfunktion .....	11
1.2.1. Serologische Biomarker .....	11
1.2.2. Funktionelle Biomarker.....	14
1.2.3. Strukturelle Biomarker.....	15
1.2.4. Genetische Biomarker.....	15
1.2.5. Plasmatisches Nitrit als Biomarker .....	16
1.2.6. Definition der plasmatischen Nitrit-Reserve .....	18
1.3. Problemstellung .....	20
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1. Studienprotokoll .....	22
2.2. Studienkollektiv .....	23
2.3. Untersuchungsprotokoll der fahrradergometrischen Belastung.....	25
2.4. Biochemische Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma.....	26
2.4.1. Blutentnahme .....	26
2.4.2. Probenaufarbeitung.....	26
2.4.3. Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels Gasphasen-Chemilumineszenz .....	29
2.4.4. Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma mittels Vanadium(III)-Chlorid-Fluss-Injektions-Analyse .....	31
2.5. Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der Endothel- abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis .....	34
2.5.1. Untersuchungsprotokoll.....	35
2.5.2. Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers .....	36
2.6. Mathematisch-statistische Methoden .....	38

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1.	Charakterisierung der Studienpopulation .....	40
3.2.	Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite.....	42
3.3.	Lagerung nitrit - und nitrathaltiger Proben.....	43
3.3.	Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	45
3.4.	Korrelation zwischen NO-Metaboliten, Endothel-abhängiger und Endothel-unabhängiger Vasodilatation.....	46
3.5.	Plasmatische Nitrit-Reserve als biochemischer Marker einer vaskulären Dysfunktion .....	47
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
4.1.	Methodenkritik.....	49
4.1.1.	Quantifizierung der zirkulierenden NO-Metabolite.....	49
4.1.2.	Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mittels Fluss-vermittelter Dilatation.....	54
4.1.3.	Ausbelastungskriterien der fahrradergometrischen Interven- tion .....	58
4.2.	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Konzentration zirkulierender NO-Metabolite.....	59
4.3.	Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel- abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien.....	64
4.4.	Klinische Bedeutung und Ausblick .....	66
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>68</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>80</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>81</b>

# 1. Einleitung

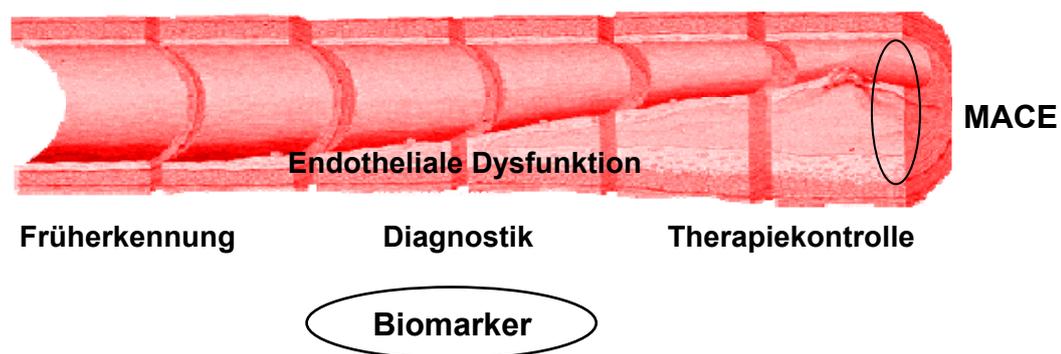
## 1.1. Arteriosklerose

Herzkreislauferkrankungen stellen heutzutage die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar<sup>1;2</sup>. Im Jahre 2004 sind allein in Deutschland 368.472 (45,0%) Menschen an den Folgeerkrankungen des Herzkreislaufsystems verstorben, 84.163 (10,3%) davon allein an chronisch ischämischer Herzkrankheit und 61.736 (7,5%) an akutem Myokardinfarkt (statistisches Bundesamt). Kardiovaskuläre Erkrankungen haben im Jahre 2002 mit einem Anteil von 15,8% der Gesamtkrankheitskosten insgesamt 35,4 Milliarden Euro für stationäre und ambulante Behandlungen, durch Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und vorzeitigem Tod von Erwerbstätigen an Kosten verursacht.

Die Hauptursache der meisten kardiovaskulären Erkrankungen stellt die Arteriosklerose dar. So sind bis zu 50% der kardiovaskulären Todesursachen Folge einer koronaren Herzerkrankung. Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung aller Arterien. Aus pathologischer Sicht handelt es sich dabei um eine entzündliche Erkrankung der arteriellen Blutgefäße mit Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in die Gefäßintima<sup>3</sup>. Früheste arteriosklerotische Veränderungen ließen sich zum Teil bereits im Kindesalter nachweisen<sup>4</sup>. Durch zusätzliche extrazelluläre Fettablagerungen und regressive Veränderungen der Gefäßwand mit bindegewebigem Umbau und Verkalkungen im Laufe der Jahre kommt es zur Entstehung arterieller Plaques<sup>5</sup>. Diese können entweder zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Einengung der Gefäße führen oder durch ein appositionelles Thrombuswachstum auf dem Boden eines rupturierten Plaques akute ischämische Ereignisse wie Myokardinfarkt und Schlaganfall hervorrufen<sup>6;7</sup>.

Die betroffenen Patienten kommen zumeist erst im fortgeschrittenen Stadium beim Auftreten von Beschwerden in die Klinik, mit bereits eingetretenen Organschädigungen, wie z.B. koronarer Herzerkrankung, peripherer arterieller und cerebrovaskulärer Verschlusskrankung sowie

Nephrokalzinose. Die Diagnostik und Therapie erfolgt zu diesem Zeitpunkt mit aufwendigen und kostenintensiven, interventionellen und chirurgischen Revaskularisationsverfahren, sowie mit einer stetig wachsenden medikamentösen Begleittherapie. Dies wirft aus sozioökonomischer Sicht Probleme auf, da zum einen die Patienten durch das Auftreten von Organschäden in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind und sie zum anderen der Volkswirtschaft nur noch beschränkt oder gar nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Entwicklung der Arteriosklerose beginnt allerdings zu einem viel früheren Zeitpunkt. Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktion im Sinne einer endothelialen Dysfunktion spielen eine zentrale Rolle sowohl in der Entstehung als auch der Progression einer Arteriosklerose<sup>8</sup> und sind bereits viele Jahre vor manifesten Organschädigungen nachweisbar<sup>9;10</sup>.



**Abbildung 1:** Arteriell Gefäß mit Darstellung des Verlaufs der Arteriosklerose. Das Schlüsselereignis in der Entwicklung der Arteriosklerose ist die endotheliale Dysfunktion. Die Biomarker finden Einsatz sowohl in der Früherkennung, der Diagnostik als auch in der Therapiekontrolle sowie in der Prognostik der Major Adverse Cardiac Events (MACE).

Aus diesem Grund wurden daher in den vergangenen Jahren enorme Anstrengungen zur Entwicklung und Etablierung von Biomarkern einer vaskulären Dysfunktion unternommen, die (1.) zur Früherkennung der Arteriosklerose vor dem Auftreten von bedeutenden Organschäden, (2.) zur individuellen Therapiekontrolle und (3.) zur prognostischen Abschätzung des kardiovaskulären Risikos des einzelnen Patienten eingesetzt werden können.

## **1.2. Marker einer vaskulären Dysfunktion**

Die Beurteilung des arteriosklerotischen Krankheitsprozesses und der daraus resultierenden Organschädigung war lange Zeit durch aufwendige Methoden, die häufig mit hohem Zeitaufwand, geringer Sensitivität und hohen Kosten vergesellschaftet waren, charakterisiert.

Durch ein immer weiterreichendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und der Entwicklung von sensitiven, spezifischen und einfacheren Technologien, ist die Möglichkeit einer Früherkennung und Therapiekontrolle kardiovaskulärer Erkrankungen immer attraktiver geworden. Hieraus resultierte in den letzten Jahren die Entwicklung von zum Teil vielversprechenden attraktiven Markern einer vaskulären Dysfunktion. Um allerdings Einzug in die klinische Routinediagnostik zu erlangen, muss ein geeigneter Marker folgende Kriterien erfüllen<sup>11</sup>: Er muss (1.) zusätzliche zu bereits bestehenden Markern unabhängige Informationen über das kardiovaskuläre Risiko und dessen Prognose liefern, (2.) den klinischen Schweregrad der Erkrankung wiedergeben, (3.) mit einer hohen Zuverlässigkeit und Genauigkeit bestimmbar sein, (4.) eine hohe Sensitivität, Spezifität und einen hohen Vorhersagewert aufweisen und (5.) über eine weitreichende Verfügbarkeit und praktische Anwendung verfügen. Die bisher etablierten Marker lassen sich unterteilen in die serologischen Biomarker, die funktionellen, strukturellen und genetischen Marker.

### **1.2.1. Serologische Biomarker**

Die Bestimmung von serologischen Biomarkern ermöglicht eine Beurteilung biologischer Prozesse, die in der Pathophysiologie einer Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen. Zahlreiche mögliche Biomarker, die bei Entzündungsreaktionen, der Fibrinolyse und beim oxidativen Stress eine wichtige Rolle spielen, zeigten bereits gute Ansätze in der Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse und sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Klinische Epidemiologie serologischer Biomarker kardiovaskulärer Erkrankungen. Anordnung nach Biomarkern von Entzündung, Fibrinolyse, Oxidativem Stress und veränderten Lipiden mit Auftragung der jeweiligen Kriterien eines Biomarkers.

<b>Biomarker</b>	Überzeugende prospektive Studien	Standardisierte Analysemethodik	Additiv zum Lipid Screening	Additiv zum Framingham Risk Score
<b>Entzündung</b>				
hsCRP	++++	+++	+++	++
ICAM-1	++	+ / -	+	-
IL-6	++	-	+	-
IL-18	++	-	+	-
Myeloperoxidase	+	-	+ / -	-
CD40 Ligand	+	-	-	-
<b>Fibrinolyse</b>				
t-PA/PAI-1	++	+ / -	-	-
Fibrinogen	+++	+ / -	++	-
Homocystein	+++	+++	+ / -	-
D-Dimer	++	+	-	-
<b>Oxidativer Stress</b>				
oxLDL	+ / -	-	-	-
<b>veränderte Lipide</b>				
Lipoprotein (a)	+++	+ / -	+ / -	-
LDL Partikelgröße	++	+ / -	+ / -	-

hsCRP=high sensitivity C-Reactive Protein; ICAM-1=Intercellular Adhesion Molecule-1; IL-6, IL-18=Interleukin 6 und 18; t-PA=tissue type Plasminogen Activator; PAI-1=Plasminogen Activator Inhibitor; oxLDL=oxidated Low Density Lipoprotein

Das C-reaktive Protein (CRP) ist einer der best charakterisierten verfügbaren Biomarker inflammatorischer Prozesse, der sich als potentieller Marker kardiovaskulärer Ereignisse herausstellte<sup>12</sup>. Es zählt zu den Akut-Phase Proteinen und spielt in der humoralen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Seine Expression fand sich unter anderem in der glatten Gefäßmuskulatur, besonders in der krankhafter Koronararterien<sup>13</sup>. CRP beeinflusst direkt die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Fibrinolyse und die endotheliale Dysfunktion<sup>14</sup>. Die Messung von CRP kann mit Hilfe mehrerer standardisierter, validierter und kostengünstiger Analysemethoden durchgeführt werden. Mehr als 20 prospektive, epidemiologische Studien belegen, dass hsCRP einen unabhängigen Vorhersagewert von Myokardinfarkt, Apoplex, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und plötzlichem Herztod aufweist, sogar bei noch scheinbar gesunden Individuen<sup>15</sup>. Es ist spezifisch für die Vorhersage vaskulärer Ereignisse und zeigte in mehreren Studien additive

Informationen zur Bestimmung des LDL-Cholesterins und des Risikoprofils gemäß des Framingham Risk Scores. Allerdings stellt die Bestimmung von hsCRP keinen Ersatz für die HDL- und LDL-Cholesterin Bestimmung dar, sondern dient eher zur Verlaufskontrolle, z.B. während einer Statin-Therapie. Der Einsatz von Statinen, Fibraten und anderen lipidsenkenden Therapien führte nachweislich zur gleichzeitigen Senkung der hsCRP-Spiegel. Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, dass eine Senkung der hsCRP-Spiegel auch zu einer Senkung des kardiovaskulären Risikos führen. Andere Parameter inflammatorischer Prozesse wie das Interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), Interleukin-6 und -18 (IL-6, IL-18), Myeloperoxidase und CD40-Ligand lieferten bisher keine zusätzlichen Vorteile in der Prognose des kardiovaskulären Risikoprofils gegenüber den bereits bestehenden Biomarkern.

Eine durch gestörte Fibrinolyse gesteigerte Thromboseneigung spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese eines arteriellen Gefäßverschlusses. Verursacht wird die gesteigerte Thrombosierung durch ein Ungleichgewicht zwischen dem tissue-type Plasminogen-Aktivator (t-PA) und seinem endogenen Inhibitor Plasminogen-Aktivator Inhibitor (PAI-1). Experimentelle Daten geben Hinweis darauf, dass erhöhte PAI-1-Spiegel zu einem gesteigerten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse führen<sup>16</sup>. Ähnliche prospektive Daten zeigen, dass basale Plasmaspiegel von t-PA erstmalig auftretende Myokardinfarkte und Schlaganfälle vorhersagen<sup>17;18</sup>. t-PA kann potentiell als ein relativ sensitiver Marker der endothelialen Dysfunktion in Ergänzung zur Messung der Endothel-abhängigen Dilatation eingesetzt werden<sup>19</sup>. Die D-Dimere, als Marker des Fibrinumsatzes, weisen wiederum erhöhte Konzentrationen bei Personen mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko auf<sup>20</sup>. Die Bestimmung von Homocystein stellte sich diagnostisch bei den Personen als relevant heraus, bei denen die klassischen Risikofaktoren nicht diagnostizierbar waren. Lipoprotein (a) und oxidiertes LDL (oxLDL) als diagnostische Parameter veränderter Lipide bzw. von oxidativem Stress zeigten in ihrem Vorhersagewert zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse keine besonderen Vorteile.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass mit Ausnahme des hsCRP, keiner dieser Biomarker additive Informationen zu bestehenden Risikoabschätzungen wie dem Framingham Risk Score lieferte. Außerdem weisen die wenigsten kosteneffektive Analysemethoden auf, die durch einen angemessenen Grad der Standardisierung und Genauigkeit für den klinischen Gebrauch einsetzbar sind. Zusätzlich gibt es bisher keinen eindeutigen Nachweis dafür, dass die Senkung einer dieser Biomarker, hsCRP miteinbezogen, das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse verringert<sup>12</sup>.

### **1.2.2. Funktionelle Biomarker**

Attraktive funktionelle Marker kardiovaskulärer Erkrankungen umfassen die Bestimmung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe invasiver und nicht-invasiver Untersuchungstechniken. In der Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion stellt die Messung der Endothel-abhängigen Vasodilatation derzeit die zentrale Säule dar<sup>21</sup>. Die nach intraarteriell appliziertem Acetylcholin induzierte Gefäßerweiterung gilt in diesem Zusammenhang als invasiver und die Messung der Fluss-abhängigen Dilatation (FMD) der Arteria brachialis mittels hochauflösenden Ultraschalls als nicht-invasiver Goldstandard<sup>22;23</sup>. Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung der Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion in der Früherkennung der Arteriosklerose, der Therapiekontrolle und der Risikostratifizierung bei Patienten mit KHK<sup>24;25</sup>. Beide hier genannten Verfahren haben aber noch keinen Einzug in die klinische Routinediagnostik erhalten. Als Gründe hierfür kommen vor allem der hohe Zeitaufwand und die Höhe der Kosten der benötigten Untersuchungsgeräte, sowie die Notwendigkeit erfahrener und gut ausgebildeter Untersucher in Betracht.

### 1.2.3. Strukturelle Biomarker

Als strukturelle Marker kardiovaskulärer Erkrankungen sind die Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMT) und der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) zu nennen (vgl. Tbl.2). Die Messung der IMT hat sich als eine sichere nicht-invasive und relativ kostengünstige Methode etabliert, welche arteriosklerotische Wandveränderungen ermitteln kann, noch bevor ein Eingriff ins Lumen stattfindet. Allerdings fehlen bislang noch standardisierte Messprotokolle und prospektive epidemiologische Studien zur Festlegung geeigneter Referenzwerte<sup>26</sup>.

**Tabelle 2:** Klinische Epidemiologie struktureller und funktioneller Marker kardiovaskulärer Erkrankungen mit Auftragung der jeweiligen Kriterien eines Biomarkers.

Surrogatparameter	überzeugende ubiquitär verfügbare Methodik	standardisierte Methodik	Sensitivität/ Spezifität	identifiziert Erkrankungs- schweregrad	Veränderung bei Therapie der Erkrankung
<b>Funktionelle Marker</b>					
Endotheliale Dysfunktion (FMD)	+	+	++	++	+
<b>Strukturelle Marker</b>					
IMT	++	++	++	++	+
LVH	++	++	++	++	++

FMD=Flow Mediated Dilation; IMT=Intima Media Thickness; LVH=Left Ventricular Hypertrophy

### 1.2.4. Genetische Biomarker

Große Hoffnung wird heutzutage in die Entwicklung und Etablierung genetischer Marker gesteckt. Die Möglichkeit einer Intervention auf genetischer Ebene eröffnet neue Perspektiven in der Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. So konnte unter anderem in Untersuchungen von Zotz et al.<sup>27</sup> gezeigt werden, dass Polymorphismen der Thrombozytenrezeptoren mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert sind. Das humane Thrombozytenantigen 1b (HPA-1b oder P1A2) ist ein hereditärer Risikofaktor einer erhöhten Plättchenthrombogenizität, die zu einem vorzeitig eintretenden Myokardinfarkt auf dem Boden einer KHK

führen kann<sup>27;28</sup>. Ebenso scheint der Genotyp alpha(2)807TT des Integrins alpha2beta1 mit dem verfrühten Auftreten eines Myokardinfarkts assoziiert zu sein<sup>29</sup>. Zur Verifizierung dieser Erkenntnisse sind allerdings noch weiterführende prospektive Studien erforderlich.

Die Identifizierung der genetischen Marker stellt sich bislang noch als schwierig heraus, da die Entstehung der kardiovaskulären Erkrankung multifaktoriell bedingt ist und auf einen polygenetischen Ursprung zurückzuführen ist<sup>30</sup>.

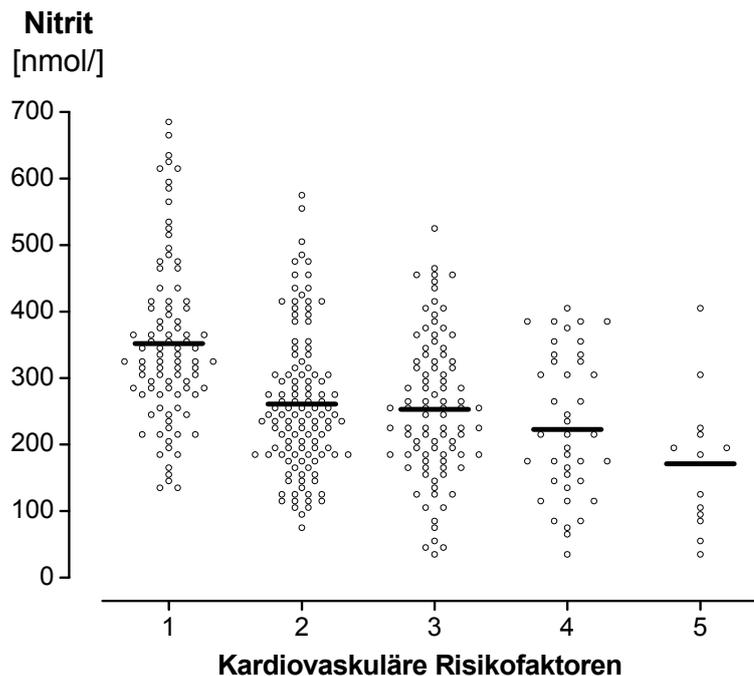
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zahlreiche attraktive serologische, funktionelle und strukturelle Parameter etabliert wurden, die in Ansätzen die Kriterien eines geeigneten Biomarkers zur Früherkennung, Therapiekontrolle und Prognose einer Arteriosklerose erfüllen. Gemeinsames Charakteristikum ist aber die bislang noch unzureichende Sensitivität und Spezifität, die eine Integration dieser Biomarker in die klinische Routinediagnostik zum momentanen Zeitpunkt nicht ermöglicht.

#### **1.2.5. Plasmatisches Nitrit als Biomarker**

Das Endothel als größtes Organ im Körper ist essentiell an der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase beteiligt. Seine physiologischen Funktionen umfassen die Modulation (I.) des aktuellen und bedarfsgerechten Gefäßtonus<sup>31</sup>, (II.) der antithrombotischen<sup>32</sup> und (III.) anti-adhäsiven Eigenschaften der Gefäßwand, (IV.) der Architektur der Gefäßwand und (V.) der Gefäßpermeabilität. Endothelial gebildetem NO kommt in diesem Zusammenhang eine besondere Bedeutung zu, da es an der Steuerung aller genannten Endothelfunktionen beteiligt ist<sup>10</sup>. Störungen dieser essentiellen Endothelfunktionen werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und stellen ein Schlüsselereignis in der Entstehung einer Arteriosklerose dar. Die sehr kurze Halbwertszeit, die NO *in vivo* aufweist, führt allerdings zu der Problematik, dass schon während einer Blutentnahme NO vollständig zu seinen primären Abbauprodukten, Nitrit und Nitrat, oxidiert wird. Daher wurde in verschiedenen Arbeiten die

Möglichkeit der indirekten Bestimmung der NO-Bioverfügbarkeit durch Bestimmung von Nitrit und Nitrat, untersucht. Der größte Teil des endothelial gebildeten NOs wird im Plasma unmittelbar zu Nitrit oxidiert<sup>33;34</sup>. Nitrat stellt das stabile vasoinactive Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges dar.

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass plasmatische Nitritspiegel akute und chronische Änderungen der endothelialen NO-Synthase(eNOS)-Aktivität widerspiegeln<sup>33;35;36</sup>. Untersuchungen von Lauer et al.<sup>36</sup> am Gefäßbett des Unterarms belegen die Spezifität von Nitrit als einen Indikator für die basale endotheliale NO-Synthese als auch nach rezeptor- und substratvermittelter Stimulation der NOS. Weiterhin zeigte sich bei Untersuchungen an transgenen Mäusen eine um 50% reduzierte Nitritkonzentration bei eNOS-Knock-Out(eNOS-/-) Mäusen, im Gegensatz zum NOS-inhibierten Wildtyp (eNOS+/+) nach Gabe von L-N<sup>ω</sup>-Nitroarginin Methylester (L-NAME)<sup>35</sup>. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Nitritkonzentrationen im Plasma von 350 Blutspendern normalverteilt sind<sup>37</sup>. Zudem zeigte sich, dass die plasmatische Nitritkonzentration mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren erniedrigt ist<sup>37</sup> (vgl. Abb. 2). Bei allerdings bestehender großer Streuung der Messwerte, konnte keine ausreichende Trennschärfe für die klinische Routine bestimmt werden, so dass nach einer Alternative zur Bestimmung der vaskulären Dysfunktion gesucht wurde. Im Gegensatz zur basalen Nitritbestimmung könnten die Unterschiede durch eine maximale Stimulation der scherkraftinduzierten NOS-Aktivität deutlicher hervorgebracht werden. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde daher erstmalig das Konzept der plasmatischen Nitrit-Reserve eingeführt.



**Abbildung 2:** Nitritkonzentration in Abhängigkeit von der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren. Die Abnahme der Nitritkonzentration zeigt aufgrund einer zu großen Streuung keine ausreichende Trennschärfe bei steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

### 1.2.6. Definition der plasmatischen Nitrit-Reserve

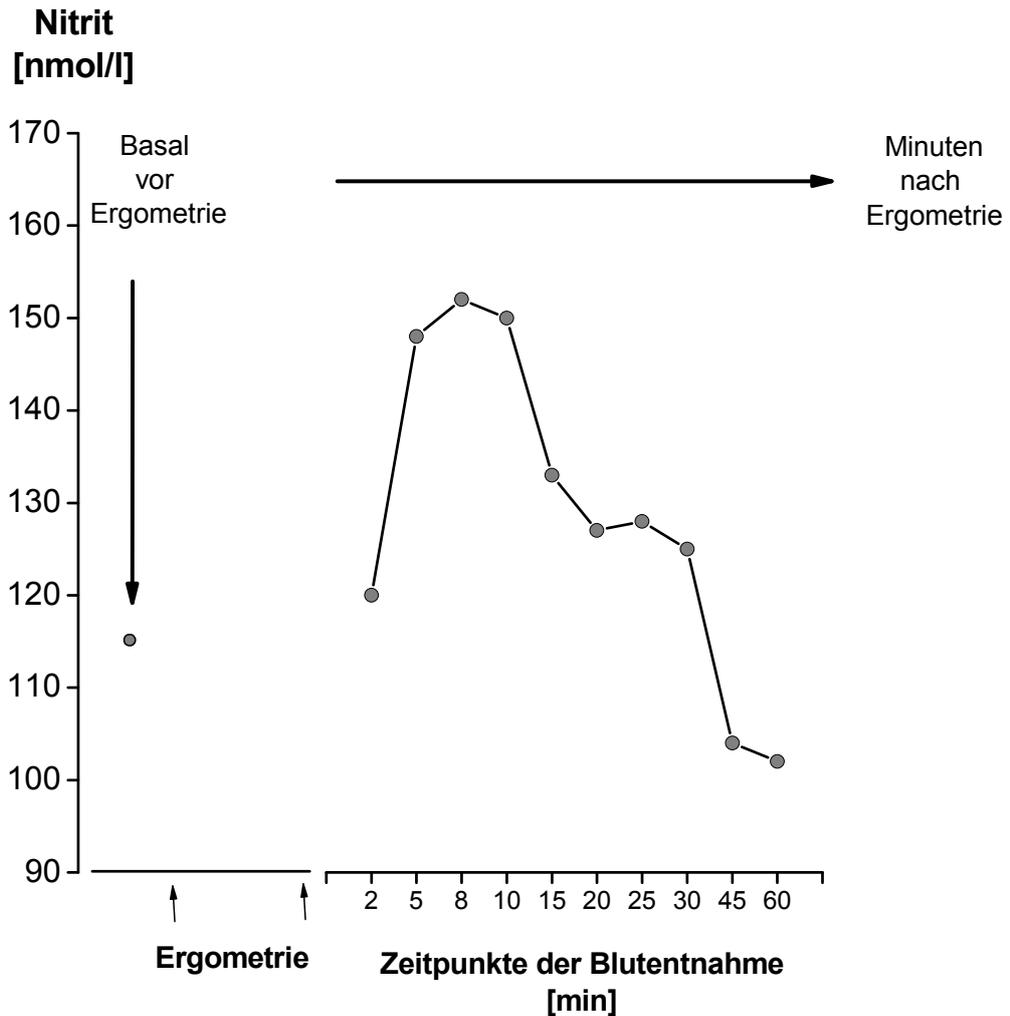
Der nicht-invasive Goldstandard zur Bestimmung einer endothelialen Dysfunktion nutzt als Prinzip eine Einschränkung der scherkraftinduzierten Vasodilatation. Im Gegensatz zur lokalen Induktion der eNOS bei der Messung der Fluss-vermittelten Dilatation (FMD), beruht das Prinzip der Nitrit-Reserve auf einer systemischen Induktion der eNOS mittels fahrradergometrischer Belastung. Die Nitritkonzentration im Plasma wird hierbei basal und nach fahrradergometrischer Ausbelastung bestimmt. Die Differenz der Nitritkonzentrationen entspricht der plasmatischen Nitrit-Reserve:

$$\text{Nitrit-Reserve} = \frac{\text{NO}_2^- \text{ post} - \text{NO}_2^- \text{ prä}}{\text{NO}_2^- \text{ prä}} \times 100$$

**Abbildung 3:** Formel zur Bestimmung der Nitrit-Reserve.  $\text{NO}_2^- \text{ prä}$  = basale Nitritkonzentration im Plasma;  $\text{NO}_2^- \text{ post}$  = Nitritkonzentration im Plasma nach fahrradergometrischer Belastung

Die Untersuchungen zur Etablierung der Nitrit-Reserve wurden an einem Kollektiv von 31 jungen gesunden Normalpersonen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren durchgeführt. Nach einer basalen Blutentnahme wurden die Probanden maximal durch fahrradergometrische Belastung ausbelastet. Die weiteren Blutentnahmen wurden daran anschließend in einem Zeitintervall von bis zu 60 min durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Nitritkonzentration im Plasma mit einem Maximum von  $56 \pm 11\%$  10 min nach Beendigung der Belastung. Im weiteren Zeitverlauf fiel die Nitritkonzentration wieder auf Ausgangsniveau zurück (vgl. Abb. 4).

Mit der Intention die Bestimmung der Nitrit-Reserve als diagnostische Routineuntersuchung in den klinischen Alltag zu integrieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich Versuche zur Lagerungsmöglichkeit nitrit- und nitrathaltiger Plasmaproben durchgeführt. Die Möglichkeit der Aufbewahrung von Plasmaproben könnte somit die Handhabung bei der Bestimmung nitrithaltiger Proben und die Anwendbarkeit der Nitrit-Reserve als serologischen Biomarker in der klinischen Routine vereinfachen.



**Abbildung 4:** Prinzip der plasmatischen Nitrit-Reserve. Untersuchungen an einem jungen Normalkollektiv zeigten signifikante Anstiege der Nitritkonzentration nach fahrradergometrischer Belastung mit einem Maximum bei 5 bis 10 Minuten.

### 1.3. Problemstellung

Seit langem weiß man, dass neben klassischen Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Dyslipidämie, Rauchen, Alter auch neuere Risikofaktoren wie körperliche Inaktivität, postprandialer Zustand, Homocystein, Übergewicht, Infekte gepaart mit intrinsischer Infektanfälligkeit, sowie genetische und Umwelteinflüsse auf unterschiedliche Art und Weise zu einer vaskulären Dysfunktion führen.

Der Begriff der vaskulären Dysfunktion wird in der Mehrzahl klinischer Studien synonym mit Störungen des endothelialen L-Arginin-NO-

Stoffwechsels gebraucht<sup>38</sup>. Dabei führt die proatherogene Wirkung kardiovaskulärer Risikofaktoren unter anderem durch Zunahme von oxidativem Stress zu einer chronischen Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit<sup>39</sup>. Unter der Annahme, dass eine verminderte NO-Synthese zu einer verminderten Nitrit-Reserve im Plasma führt, wurde versucht die Nitrit-Reserve als Marker einer vaskulären Dysfunktion zu etablieren.

Mit dem Hintergrund, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer Einschränkung der NO-Bioverfügbarkeit führen, wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Der Anstieg der Nitritkonzentration im Plasma ist nach fahradergometrischer Steigerung der endothelialen NOS-Aktivität bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und koronarer Herzkrankheit erniedrigt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde sowohl die Konzentration von Nitrit im Plasma, als auch der Grad der vaskulären Dysfunktion mit Hilfe eines etablierten nicht-invasiven Verfahrens (FMD) bei Personen mit bekannter koronarer Herzerkrankung (KHK) bestimmt. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit galten daher der Klärung folgender drei Fragen:

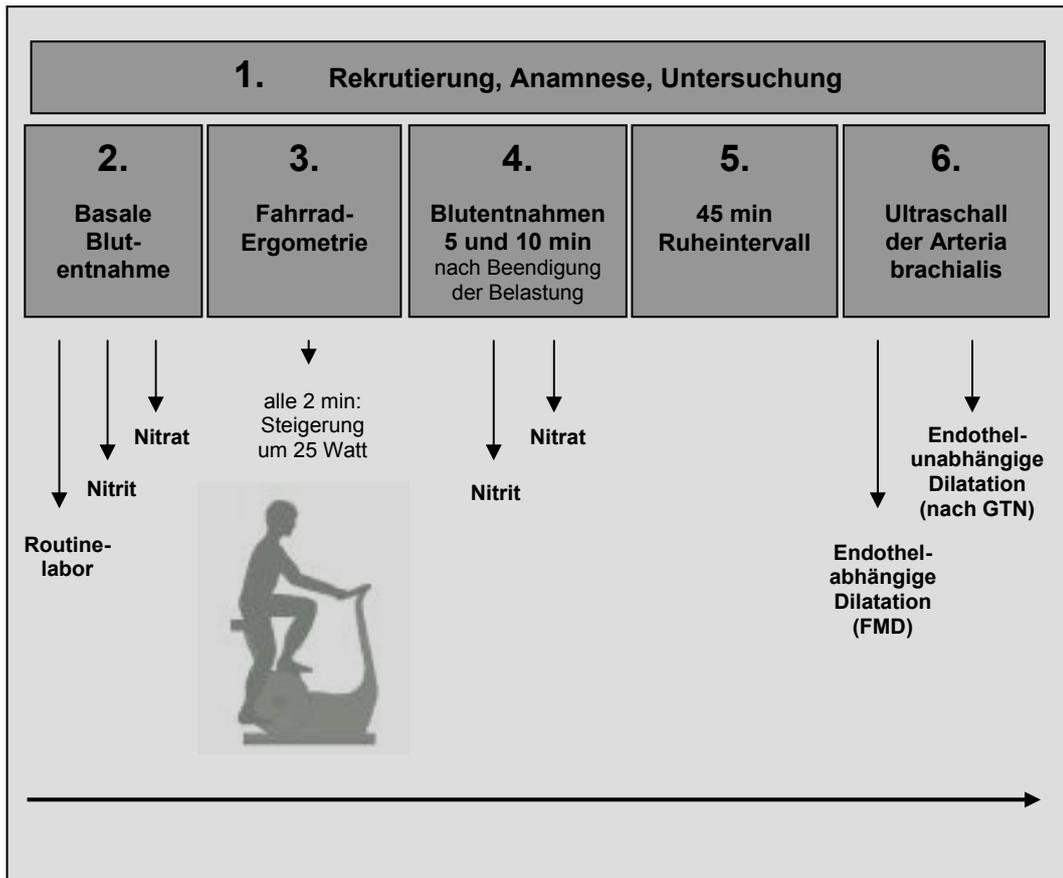
- (1.) Ist die Nitrit-Reserve im Plasma von Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter koronarer Herzerkrankung vermindert?
- (2.) Besteht eine Korrelation zwischen der Nitrit-Reserve im Plasma und dem Grad der vaskulären Dysfunktion?
- (3.) Wie sensitiv und spezifisch ist die Nitrit-Reserve im Plasma als Parameter einer vaskulären Dysfunktion?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Studienprotokoll**

Das Studienprotokoll der vorliegenden Untersuchungen setzt sich aus folgenden Teilen zusammen: der Probandenrekrutierung, einer fahrradergometrischen Belastung, Blutentnahmen vor und 5 und 10 min nach fahrradergometrischer Belastung und einer Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis (vgl. Abb. 5).

Alle Studienteilnehmer wurden zunächst im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs über die Untersuchungen informiert und bekundeten ihr schriftliches Einverständnis. Nachfolgend wurde eine routinemäßige internistische Anamnese zur Erfassung von Erkrankungen, kardiovaskulären Risikofaktoren und der aktuellen Medikation erhoben, sowie ein internistisches Routinelabor bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten jeweils morgens in nüchternem Zustand. Zunächst wurde die basale Blutentnahme durchgeführt. Hieraus wurden das Routinelabor, sowie das Nitrit und das Nitrat im Plasma bestimmt. Daraufhin erfolgte die fahrradergometrische Intervention, nach deren Beendigung die weiteren Blutentnahmen zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat im Plasma durchgeführt wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis. Diese umfasste die Quantifizierung der Endothel-abhängigen (FMD) und Endothel-unabhängigen Dilatation nach oraler Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN).



**Abbildung 5:** Zeitlicher Ablauf des Studienprotokolls.

## 2.2. Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden gesunde Normalpersonen (n=29) und Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK (n=28) untersucht. Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden sowohl anamnestische Angaben, als auch die klinische Untersuchung und laborchemische Parameter herangezogen. Bei den Probanden wurde daher nach der Anamneseerhebung eine internistische Untersuchung, ein Ruhe- und Belastungs-EKG, sowie eine Kontrolle des Routinelabors (Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL- Cholesterin, Triglyzeride, Glukose, HbA1c, CRP) durchgeführt.

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

gewertet. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien (JNCVI<sup>40</sup>) bzw. der WHO-Richtlinien<sup>41</sup> diagnostiziert, wenn arterielle Drücke an drei verschiedenen Tagen >140/90 mmHg gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der WHO<sup>42</sup> und der ADA<sup>43</sup> diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen Plasmaglukosespiegel nüchtern >126 mg/dl gemessen wurden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. In Anlehnung an die Richtlinien der AHA und des NHLBI wurde eine Hypercholesterinämie definiert als Vorliegen eines Gesamtcholesterins >240 mg/dl, eines LDL-Cholesterins >160 mg/dl, eines HDL-Cholesterins <35 mg/dl oder bestehender cholesterinsenkennder Therapie. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die jemals täglich mindestens 20 Zigaretten über ein Jahr, also ein Packungsjahr, geraucht hatten.

Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 29 gesunden Normalpersonen (19 Frauen, 10 Männer) zusammen, bei denen die oben definierten kardiovaskulären Risikofaktoren ausgeschlossen werden konnten. Hier betrug das mittlere Lebensalter  $58 \pm 2$  Jahre, bei einer durchschnittlichen Körpergröße von  $169 \pm 2$  cm und einem mittleren Körpergewicht von  $68 \pm 3$  kg. Für die Untersuchungen stellten sich Mitarbeiter des kardiologischen Labors und deren Angehörige zur Verfügung.

Die Gruppe der Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK (n=28) bestand aus 8 Frauen und 20 Männern mit einem mittleren Lebensalter von  $64 \pm 2$  Jahren, einer durchschnittlichen Körpergröße von  $171 \pm 2$  cm und einem mittleren Körpergewicht von  $79 \pm 3$  kg. Sämtliche Studienteilnehmer wurden aus dem Patientengut der Kardiologie der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert.

Alle Studienteilnehmer wurden unter Berücksichtigung folgender Ausschlusskriterien für die Untersuchungen ausgewählt:

- akute Entzündungen (CRP > 0,5 mg/dl)
- Nierenfunktionsstörungen oder Hämodialyse
- Herzinsuffizienz gemäß NYHA III. oder IV. Grades
- relevante Herzrhythmusstörungen wie Arrhythmia absoluta
- Malignom-Erkrankungen
- BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>

### **2.3. Untersuchungsprotokoll der fahrradergometrischen Belastung**

Die Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens in der Ergometrieabteilung der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Die Ausbelastung wurde unter ärztlicher Kontrolle durch eine 12-Kanal-EKG-Aufzeichnung überwacht. Nach Messung von Ruhe-Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte die basale Blutentnahme. Die ergometrische Ausbelastung der Probanden wurde gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) durchgeführt. Dieses Schema sieht eine Belastungssteigerung um jeweils 25 Watt alle 2 Minuten vor, beginnend bei 25 Watt. Zur Kontrolle der Kreislauffunktion wurden dabei alle 2 Minuten Blutdruck und Herzfrequenz registriert. Bei Erreichen der allgemeinen Abbruchkriterien gemäß DGK wurde die Belastung beendet und wiederum Blutdruck und Herzfrequenz bestimmt. Als absolute Indikation zum Belastungsabbruch ist dabei das Auftreten folgender Symptome beschrieben:

- ST-Strecken-Senkung  $\geq 3$  mm
- ST-Strecken-Hebung  $\geq 1$  mm
- Blutdruckabfall >10 mmHg mit Zeichen der myokardialen Ischämie
- Mäßig schwere Angina-pectoris-Symptomatik
- Schwere Dyspnoe
- Klinische Zeichen einer Minderperfusion (Zyanose)
- Anhaltende ventrikuläre Tachykardien (Dauer > 30 Sekunden)
- Erschöpfung des Patienten

Nach einer zweiminütigen Ruhepause erfolgten die weiteren Blutentnahmen nach 5 und 10 Minuten. Parallel zu diesen Zeitpunkten wurden wiederum Blutdruck und Herzfrequenz bestimmt.

Nach einer 45 minütigen Ruhepause erfolgte schließlich die Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis.

## **2.4. Biochemische Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma**

### **2.4.1. Blutentnahme**

Die Blutentnahmen erfolgten nach einer fünfzehnminütigen Ruhephase der Probanden aus der Kubitalvene. Die Punktion wurde mit Einwegkanülen (W.I.N. 21G, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) durchgeführt. Zunächst erfolgte die Entnahme von Blutproben in Vakuumröhrchen (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Großbritannien) zur Bestimmung des Routinelabors. Anschließend wurden 2 ml Blut zur Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat luftblasenfrei aufgezogen und entnommen. Die Blutproben wurden in 2 ml Einwegspritzen (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) entnommen und direkt in 15 ml Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Diese waren bereits mit 8 ml eisgekühltem PBS-Puffer (Serag Wiessner, Naila, Bayern, Deutschland) und 2 µl Heparin (Heparin: 10IE/ml; Liquemin N5000, Wirkstoff: Heparinnatrium, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach, Wyhlen, Deutschland) gefüllt.

### **2.4.2. Probenaufarbeitung**

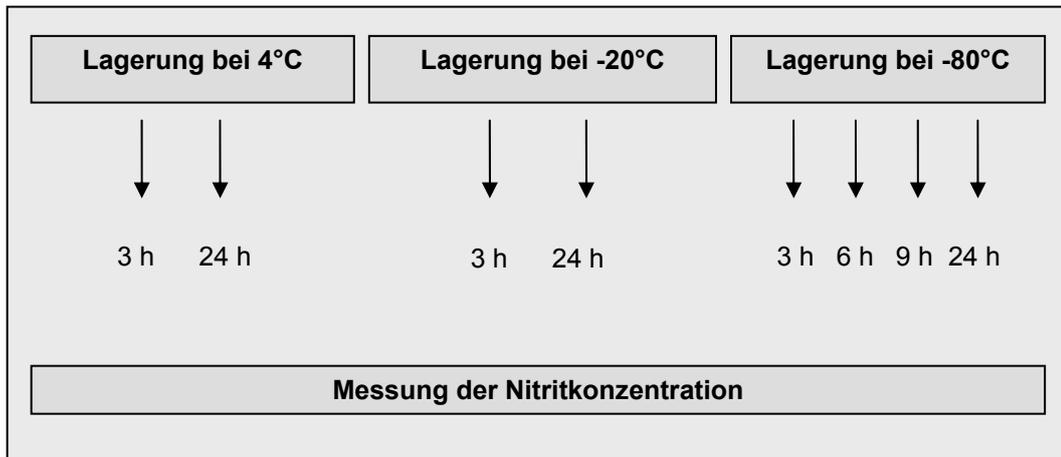
Alle vorbereiteten Lösungen, die Greiner-Röhrchen und die Zentrifugen wurden während der gesamten Aufarbeitung auf 4°C gekühlt. Die Aufbereitungszeit betrug 2 Stunden von der Blutentnahme bis zur Analyse. Zur Separation des Plasmas von zellulären Bestandteilen wurden die 1:5 in PBS-Puffer verdünnten und mit Heparin antikoagulierten

Blutproben zunächst 15 Minuten lang bei 800 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektion (CLD). Ein Aliquot des klaren Überstands wurde in Ultrafiltrationsröhrchen (Centrisart, cut-off 20.000 Dalton, Fa. Sartorius, Deutschland) zur Nitrat-Bestimmung überführt. Die Ultrafiltrationsröhrchen wurden bei 3.000 g über den Zeitraum von 60 Minuten zentrifugiert. Das Ultrafiltrat wurde für die spätere Nitrat-Bestimmung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Analyse der Nitratkonzentration erfolgte mit Hilfe der Fluss-Injektions-Analyse (VCI-FIA). Parallel zu jeder Messung wurden Leerwerte mitgeführt, um mögliche Kontaminationen während der Aufarbeitung zu erfassen.

Bisher mussten Proben zur Nitritbestimmung direkt am Abnahmetag bestimmt werden, da Nitrit in plasmatischen Medien durch seine geringe Halbwertszeit schnell abgebaut wird. Die Stabilität von Nitrat hingegen ist nach Lagerung höher. Um die Messung von Nitrit und Nitrat besser in den klinischen Alltag integrieren zu können, wurden bereits Untersuchungen im kardiologischen Forschungslabor zur Haltbarkeit durchgeführt. Hier wurde bislang gezeigt, dass Nitrit eine optimale Wiederfindungsrate von  $100,0 \pm 9,9\%$  bei einer Lagerung von 2 Tagen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in unbehandeltem Plasma aufweist. Bei der Lagerung von Nitratproben zeigte sich die höchste Stabilität bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in wässrigen Lösungen wie Phosphatpuffer und Ultrafiltrat.

Als weiterführende Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Bestimmung der Stabilität von nitrit- und nitrathaltigen Plasmaproben nach zwei unterschiedlichen Aufarbeitungsprotokollen durchgeführt:

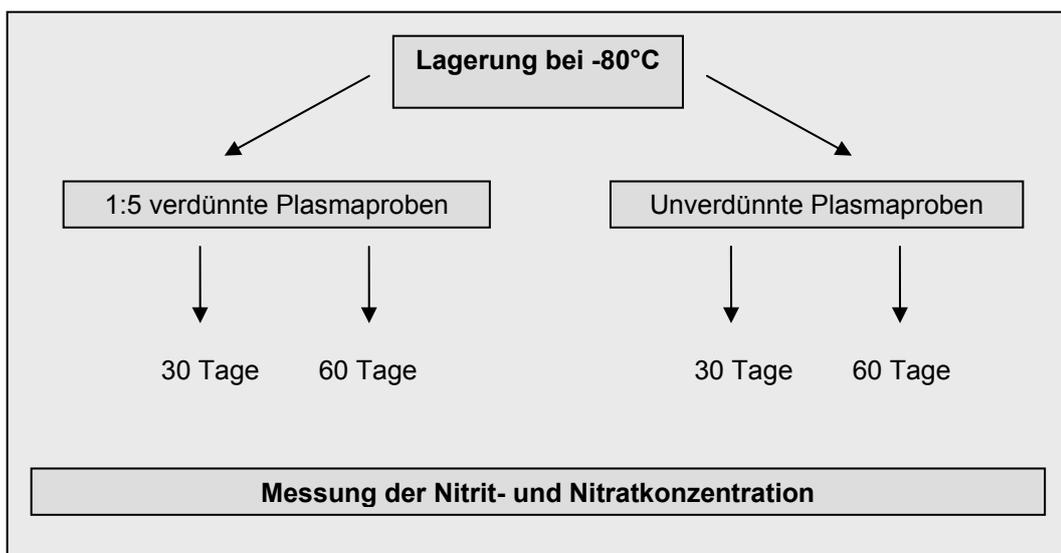
- 1.) Anhand der oben beschriebenen Ergebnisse wurde exemplarisch eine Lagerung von unverdünnten, mit Heparin antikoagulierten Plasmaproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von 3, 6, 9 und 24 Stunden durchgeführt. Da allerdings die Verfügbarkeit adäquater Kühlgeräte im klinischen Alltag zumeist eingeschränkt ist, wurde zusätzlich die Möglichkeit der Lagerung



**Abbildung 6:** Schematische Übersicht des Lagerungsprotokolls (1.)

2.) Unverdünnte, mit Heparin antikoagulierte Plasmaproben (n=7) und 1:5 in PBS-Puffer heparinisierte Proben (n=9) wurden bei einer Kühlungstemperatur von  $-80^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 Tagen aufbewahrt.

Die Probenaufarbeitung wurde wie bereits oben beschrieben durchgeführt. Die Lagerung sämtlicher Proben erfolgte unter lichtgeschützten Bedingungen in Plasma-Röhrchen der Firma Cryo (Nunc Cryo Tube Vials, Roskilde, Dänemark).

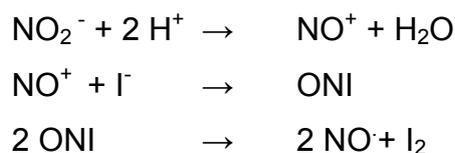


**Abbildung 7:** Schematische Übersicht des Lagerungsprotokolls (2.)

### 2.4.3. Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels Gasphasen-Chemilumineszenz

Die Gasphasen-Chemilumineszenz stellt eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zur Messung von NO in flüssigen oder gasförmigen Proben dar. Die Methode beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Reaktion von NO mit Ozon freigesetzt werden. Die Messungen wurden an einer Chemilumineszenzanlage der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO e, Eco Physics, Schweiz) durchgeführt.

Zur Bestimmung des Nitritgehalts flüssiger Proben werden je 100 µl dreifach mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kunststoffmembran in die Lösungskammer (Verhees, Deutschland) der Anlage injiziert. In dieser Injektionskammer befinden sich 20 ml einer iodhaltigen, reduktiven Reaktionslösung, die für die Freisetzung von NO aus Nitrit verantwortlich ist. Diese Lösung setzt sich zusammen aus 1,62 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,57 g Iod (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in 15 ml HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) und versetzt mit 202,5 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Reaktionslösung setzt zunächst aus in der Probe enthaltenem Nitrit Nitrosoniumionen (NO<sup>+</sup>) frei, die mit Iodid (I<sup>-</sup>) weiter zu NO reagieren:



Das auf diese Weise äquimolar aus Nitrit gebildete NO wird nun in einem NO-Analysator mittels Photoreaktion bestimmt.

Das Reaktionsgefäß wird von einem Wasserbad mit 60°C warmem Wasser ummantelt. Durch eine Glasfritte strömt während der gesamten Messung mit konstantem Fluss Helium (vgl. Abb.8). Aufgrund des hohen Löslichkeitskoeffizienten tritt das gebildete NO schnell von der Flüssigkeits- in die Gasphase über. Dabei erleichtert Helium den Übertritt

von NO in die Gasphase und transportiert das Gas in die Reaktionskammer der Anlage. Dabei strömt das Gas zunächst durch einen Kühlungsbereich und anschließend durch eine mit 1 M Natriumhydroxid (NaOH) gefüllte Waschflasche.

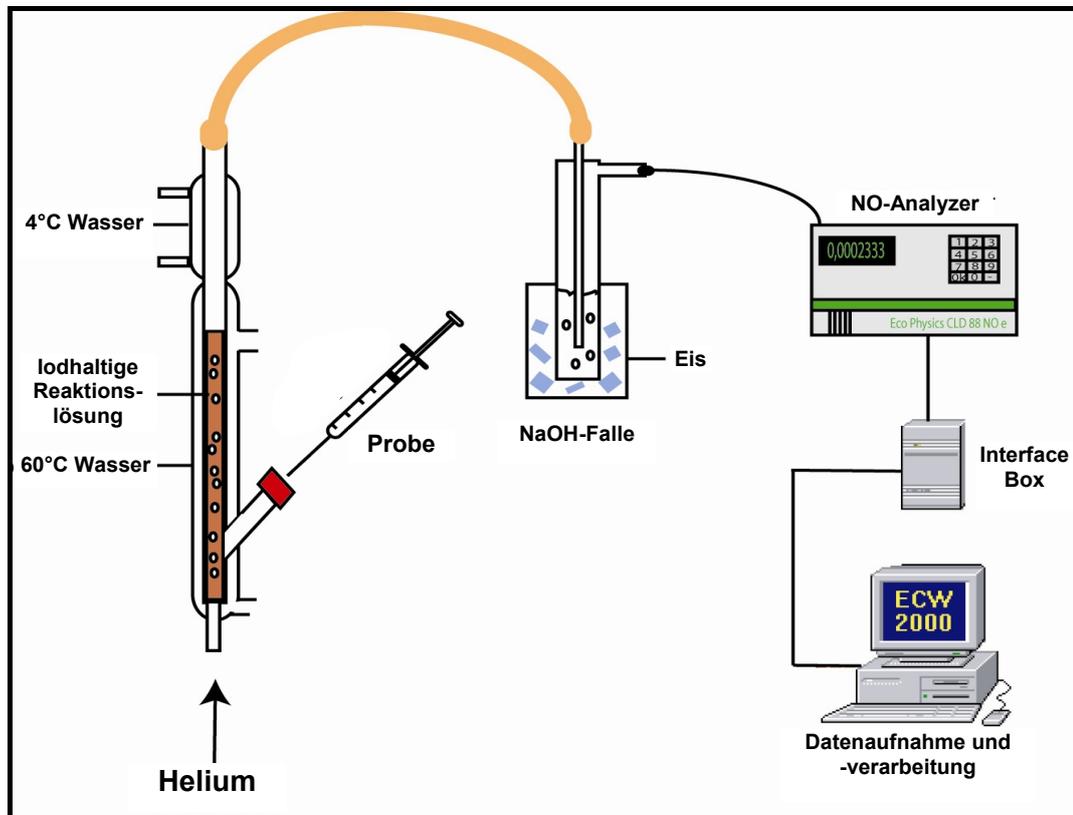
In der Reaktionskammer wird das zugeleitete NO mittels einer Photoreaktion gemessen. Hierfür wird der Kammer aus Sauerstoff generiertes Ozon mit konstantem Fluss zugeleitet. Ozon reagiert dabei spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>). Diese Reaktion läuft sehr schnell ab ( $10^{-7} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  bei Raumtemperatur), so dass selbst schnelle Änderungen der NO-Konzentrationen erfasst werden können. Ein Teil des gebildeten NO<sub>2</sub> befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>). Diese überschüssige Energie wird dann in Form von Lichtquanten ( $h\nu$ ) emittiert:



Das emittierte Licht befindet sich in einem Rot- und Infrarotbereich von ~640-3000 nm und ist für einen großen Konzentrationsbereich linear proportional zum NO-Gehalt der Probe. Die schwache Rotlichtemission wird durch einen Photoverstärker erfasst. Dieser ist durch einen Rotlichtfilter von der Reaktionskammer getrennt und verhindert die Verstärkung von Licht anderer Wellenlängen, z.B. von ultravioletten Emissionen durch Reaktion von Alkenen und schwefelhaltigen Verbindungen. Dabei muss die Temperatur des Photoverstärkers möglichst konstant gehalten werden, da die Lichtemission der Chemilumineszenzreaktion zwischen Ozon und NO temperaturabhängig ist. Durch konstante Kühlung des Analysators auf -15°C reduziert man ein durch Temperatur beeinflusstes Störrauschen.

Die Größe des Signals wird als Fläche unter der Kurve bestimmt. Vor jeder Analyse wird durch Aufgabe wässriger Nitritstandards eine Eichung der Anlage durchgeführt. Zur Datenaufnahme und Integration wurde ein handelsüblicher PC mit der Software Eurochrom (Knauer, Berlin,

Deutschland) verwendet. Zur Verbindung zwischen Rechner und Anlage diente eine Interfacebox der Firma Knauer (Berlin, Deutschland).



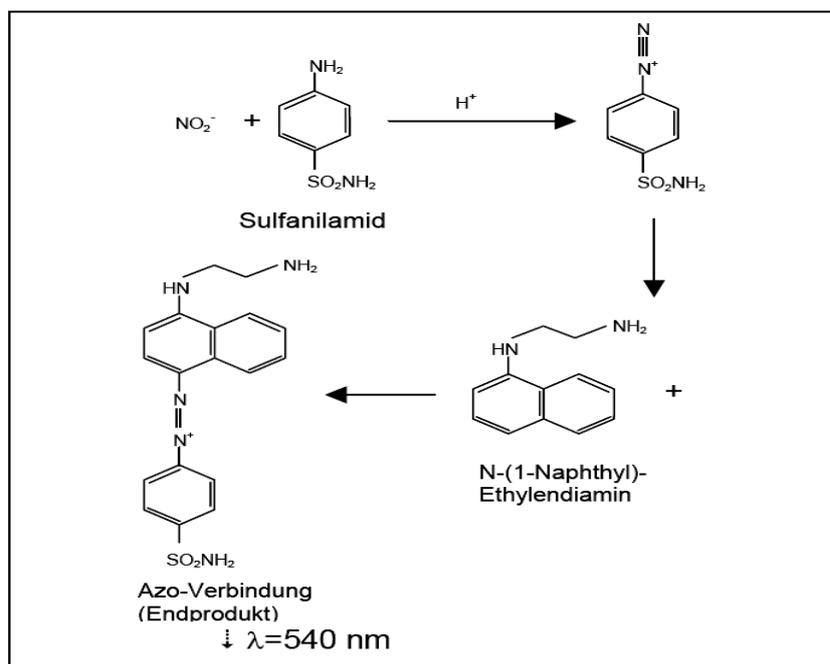
**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Chemilumineszenz-Detektions-Anlage (CLD). Die zu untersuchende Probe wird in ein Reaktionsgefäß injiziert. NO tritt in die Gasphase über und gelangt mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators, in der die Lichtreaktion mit Ozon stattfindet.

#### 2.4.4. Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma mittels Vanadium(III)-Chlorid-Fluss-Injektions-Analyse

Die Vanadium(III)-Chlorid-Fluss-Injektionsanalyse (VCI-FIA) ist eine valide und sensitive Methode zur Messung von Nitrat in flüssigen Proben. Das Prinzip der VCI-FIA beruht auf der spektrophotometrischen Bestimmung von Nitrit mittels der Griess-Reaktion (vgl. Abb.9) und der durchflussspektrometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion.

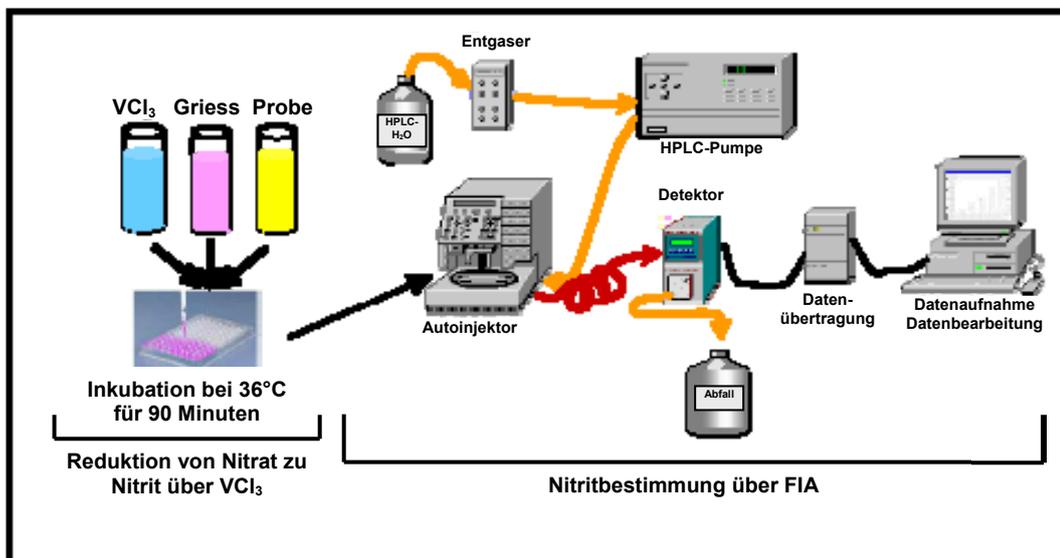
Die flüssigen Proben werden zunächst mit einer Reaktionslösung versetzt, die im Verhältnis von 5:1 aus  $VCl_3$ -Lösung und Griess-Reagenz besteht. Im ersten Schritt wird in der Probe enthaltenes Nitrat chemisch durch

Vanadium(III)-Chlorid ( $\text{VCl}_3$ ) zu Nitrit reduziert. Das Reduktionsreagenz besteht aus 0,4 g  $\text{VCl}_3$  (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 6,5 ml 25% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und versetzt mit 43,5 ml hochreinem HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland). Diese Lösung wird anschließend über einen Filter mit einer Porengröße von 0,45  $\mu\text{m}$  filtriert (RC 25, Sartorius, Göttingen, Deutschland). Im zweiten Schritt reagiert das entstandene Nitrit nach der Griess-Reaktion mit dem Griess-Reagenz. Dieses besteht zu gleichen Teilen aus 4 g Sulfanilamid (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 16 ml 25% HCl und 100 ml HPLC-Wasser, und 0,08 g N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 100 ml HPLC-Wasser. Die Proben werden mit den Reagenzien im Verhältnis 6:5:1 (Probe:  $\text{VCl}_3$ -Lösung: Griess-Reagenz) in eine Mikrotiterplatte (Cellstar<sup>®</sup>, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und abgedeckt für 90 min bei 36°C lichtgeschützt inkubiert.



**Abbildung 9:** Reaktionsmechanismus zur Bestimmung von Nitrit über die Griess-Reaktion. Nitrit reagiert in Anwesenheit von Säure mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, das durch die Reaktion mit N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin eine Azo-Verbindung bildet.

In der FIA Anlage wird mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 0,95 ml/min HPLC-Wasser über eine HPLC-Pumpe (Sunflow 100, Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland) durch einen Entgaser (2-Kanal Degaser Populair, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) gepumpt. Ein Autoinjektor (Triathlon Spark Holland, Niederlande) injiziert ein konstantes Volumen der aufgearbeiteten Proben von je 10 µl in das als Laufmittel dienende HPLC-Wasser. Dabei wird jede Probe als Dreifachbestimmung aufgegeben. Die während der Inkubation abgelaufene Farbreaktion wird in einem nachgeschalteten Photometer in einer Messzelle (6mm, 9µl, Kel-F, Linear Instrument, Reno, NE, USA) bei einer Wellenlänge von 540 nm detektiert. Die gemessene Absorptionsänderung wird durch einen Datenumwandler (Knauer, Dortmund, Deutschland) transformiert und an einen handelsüblichen Computer übermittelt. Die Größe des Signals wird als Peakhöhe bestimmt. Diese gibt exakter die Nitritkonzentration der Probe wider als die Fläche des Signals. Vor Analyse der Probe erfolgte durch Aufgabe wässriger Nitratstandards eine Eichung der Anlage. Die Datenakquisition und Integration erfolgte unter Anwendung der Chromatographie-Software ChromGate® (Chromgate 2.55, Knauer, Berlin, Deutschland).



**Abbildung 10:** Arbeitsschritte der VCI-FIA. Diese Methode besteht aus zwei Arbeitsschritten. Der erste Schritt ist die Reduktion von Nitrat zu Nitrit via Vanadium(III)-Chlorid ( $VCl_3$ ). Das Griess-Reagenz wird gleichzeitig den Proben zugegeben. Nach der lichtgeschützten Inkubation bei  $36^\circ C$  für 90 min erfolgt der zweite Schritt, die photometrische Absorptionsmessung über die FIA.

## **2.5. Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis**

Die Bestimmung der Endothel-abhängigen Vasodilatation beruht auf einer Diameterzunahme der Arteria brachialis nach vorheriger physiologischer scherkraftinduzierter Stimulation der eNOS<sup>44</sup>. Dieses Verfahren wird als Fluss-vermittelte Dilatation (FMD-Flow Mediated Dilatation) bezeichnet.

Hierzu wird der Durchmesser der Arteria brachialis im Bereich der Ellenbeuge unter Ruhebedingungen und im Anschluss an eine reaktive Hyperämie des distalen Versorgungsgebietes bestimmt. Die Diametermessung wird nicht-invasiv mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschalls durchgeführt. Die reaktive Hyperämie wird durch eine 5 minütige Insufflation einer am proximalen Unterarm platzierten Blutdruckmanschette induziert.

Die ischämische Vasodilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet führt zu einer Steigerung des Blutvolumenflusses im Bereich der dazugehörigen Leitungsarterie. Die Flussteigerung führt zu einer Steigerung der an der Gefäßwand ansetzenden Schubspannung, welche als Stimulus der eNOS über eine vermehrte Freisetzung endothelialen NOs zu einer Vasodilatation der Arteria brachialis führt. Die Messung der FMD findet 60 und 90 Sekunden nach Beendigung der Ischämie statt.

Eine Einschränkung der FMD kann durch eine reduzierte NO-Synthase, aber auch durch ein vermindertes Ansprechen der glatten Gefäßmuskulatur auf NO oder durch einen vermehrten NO-Abbau bedingt sein. Daher wird im Anschluss an die Endothel-abhängige Dilatation die Endothel-unabhängige Dilatation nach Gabe von 400 µg Glyzeroltrinitrat (GTN; Nitrolingual; Pohl; Deutschland) bestimmt. Sowohl die Endothel-abhängige Dilatation, als auch die Endothel-unabhängige Dilatation werden als prozentuale Zunahme des Diameters ( $D_{\text{post}}$ ) in Relation zum Ruhediameter ( $D_{\text{prä}}$ ) gemessen:

$$\text{FMD} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{prä}}}{D_{\text{prä}}} \times 100$$

**Abbildung 11:** Formel zur Bestimmung der Fluss-vermittelten Dilatation (FMD);  $D_{\text{prä}}$  = Ruhediameter;  $D_{\text{post}}$  = Diameter nach Dilatation

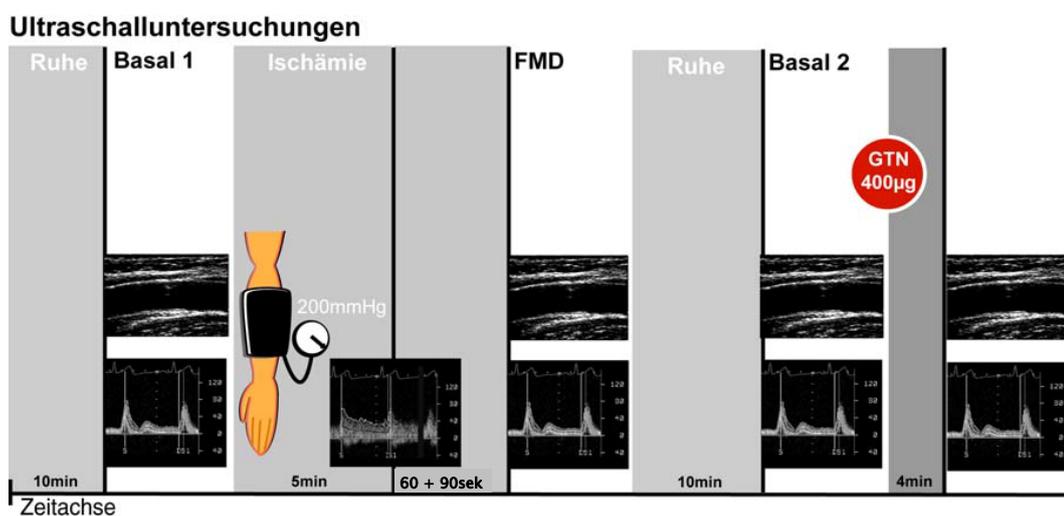
### 2.5.1. Untersuchungsprotokoll

Die Ultraschalluntersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23°C durchgeführt. Nach einer 10 minütigen Ruhephase in liegender Position erfolgte zunächst eine nicht-invasive Messung des arteriellen Blutdrucks nach Riva Rocci. Den Probanden wurde ein EKG angelegt, um die spätere Vermessung des Arterienmessers zu einem identischen Herzzyklus (enddiastolisch) zu gewährleisten. Im Anschluss daran wurde die Arteria brachialis duplexsonographisch unter Ruhebedingungen im Bereich der Ellenbeuge dargestellt und im B-Mode in einem langen und geraden Verlauf eingestellt. Die Aufzeichnungen erfolgten mit Hilfe eines hochauflösenden 15 MHz Linear Array Schallkopfes (Hewlett Packard, Sonos 2000, USA). Die Eindringtiefe des Ultraschalls betrug 3 cm. Der Diameter der Arteria brachialis wurde dadurch identifiziert, dass man sowohl die anteriore als auch die posteriore Arterienwand klar vom Lumen abgrenzen konnte. Anschließend wurde der Gefäßabschnitt mit der Zoomfunktion vergrößert. Zur optimalen Kontrasteinstellung wurden Veränderungen der Verstärkungs- und Kompressionseinstellungen vorgenommen. Die Schallkopfposition wurde am Arm des Probanden markiert und weder die Schallkopfposition noch die Geräteeinstellungen wurden während der gesamten Zeit der Untersuchung verändert. Daraufhin erfolgte die Messung des Ruhediameters der Arterie.

Um eine reaktive Hyperämie zu induzieren, wurde wie oben beschrieben eine Blutdruckmanschette am Unterarm des Probanden angelegt und auf suprasystolische Werte (mindestens 50 mmHg über dem systolischen

Druck) insuffliert. Der Druck wurde während der gesamten Zeit überwacht, um Druckverluste direkt ausgleichen zu können.

Nach dem Lösen der 5 minütigen Stauung folgte nach 60 und 90 Sekunden die Bestimmung des Diameters der Arterie (FMD). Nach einer 10 minütigen Ruhephase wurde der Durchmesser erneut bestimmt. Anschließend wurde dem Probanden 400 µg GTN verabreicht. Vier Minuten später erfolgte erneut die Messung des Diameters. Für die Messungen der Diameter wurden kontinuierlich drei Herzzyklen aufgenommen. Abschließend wurde der arterielle Blutdruck des Probanden kontrolliert.

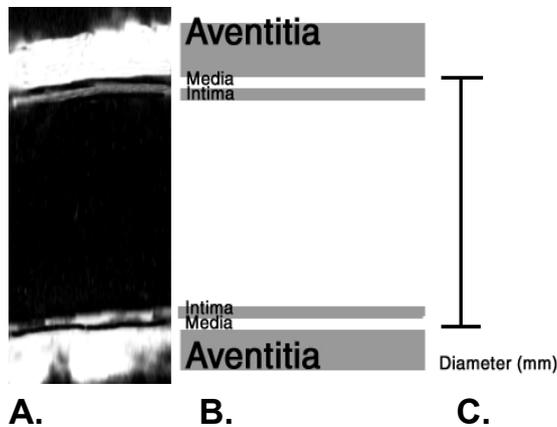


**Abbildung 12:** Zeitliche Abfolge des Untersuchungsablaufs. Nach der basalen Messung folgt eine 5 minütige Stauung des Unterarms. Anschließend wird die *Endothel-abhängige* Dilatation nach 60 und 90s gemessen. Nach einer weiteren basalen Messung folgt die Gabe von GTN. Abschließend wird nach vier Minuten eine letzte Aufnahme des Diameters gemacht, um die *Endothel-unabhängige* Dilatation zu bestimmen.

### 2.5.2. Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers

Die Vermessungen des Arterienradius erfolgten EKG-gesteuert am Ende der Diastole (R-Zacke). Als Eckpunkte der Durchmesserbestimmung dient die M-Linie (vgl. Abb.13). Diese echoarme M-Linie stellt den Übergang zwischen Adventitia und Media dar. Hierzu wird die Distanz

zwischen der schallkopfnahen M-Linie bis zur schallkopffernen M-Linie im rechten Winkel zur Gefäßachse bestimmt <sup>45</sup>.



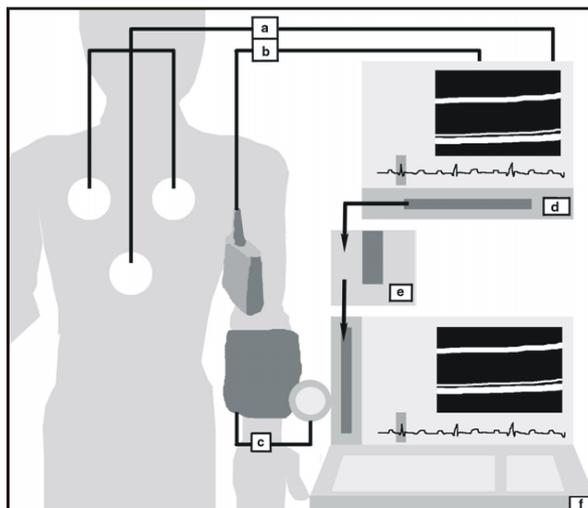
**Abbildung 13:** Schematische Gegenüberstellung des Ultraschallechos der A.brachialis und des anatomischen Korrelates der wandbildenden Strukturen.

**A:** Sonographische Darstellung der A.brachialis. Die M-Linie stellt sich echoarm dar.

**B:** Anatomisches Korrelat der echo-bildenden Strukturen.

**C:** Den Durchmessermessungen wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie zu Grunde gelegt.

Die Untersuchungen wurden nach der Methode von Preik et al.<sup>46</sup> computergestützt ausgewertet. Bei dieser Methode wird jeweils eine Bildschleife aufgenommen und digital gespeichert. Jede Bildschleife setzt sich aus ca. 60 Einzelbildern zusammen und umfasst dadurch 3-4 Herzzyklen.



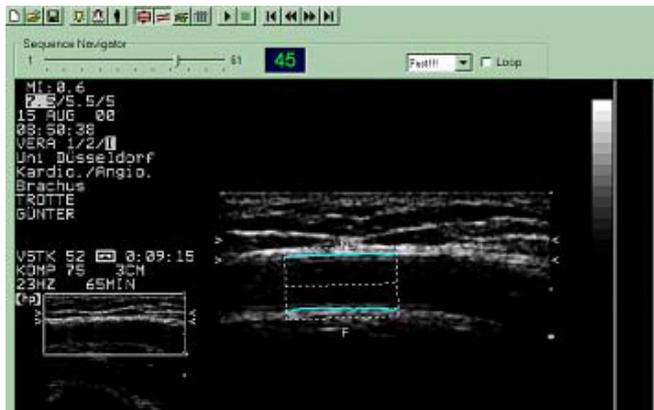
**Abbildung 14:** Schematische Anordnung des Messplatzes zur duplexsonographischen Quantifizierung der endothelialen Funktion. Registrierung des EKG (a). Bildgebung der A.brachialis (im Längsschnitt) mit Schallkopf (b). Blutdruckmanschette (c).

Ultraschallgerät (d).

Synchrone Aufzeichnung von Bildschleifen (ca 150 Einzelbilder) und EKG (a und d). Speicherung digital auf Datenträger (MOD) (e), Transfer zum Computer (f) und digitale Auswertung der aufgenommenen Bildschleifen.

Der Transfer des Bildmaterials vom Ultraschallgerät auf den Computer erfolgt mit Hilfe eines Wechseldatenträgers (MOD). Am PC werden die Bilder mit einer speziell entwickelten Software in ein Standard-Bildformat

(TIF-Format) konvertiert (Brachial Converter, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA). Diese können nachfolgend mit einer hochsensitiv entwickelten Software (Brachial Analyse, Medical Imaging Applications, Iowa City, Iowa, USA) analysiert werden (vgl. Abb. 14).



**Abbildung 15:** PC-gestützte Vermessung des Diameters der A.brachialis. Die Bestimmung des Diameters erfolgte durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten in einem zu definierenden Messabschnitt.

Nachdem das Bildmaterial in die zur Diametermessung verwendete Software importiert ist, wird der zu vermessende Gefäßabschnitt manuell markiert. Anschließend wird das Programm anhand von mitgespeicherten Eichmarken kalibriert. Nun werden die Gefäßwände automatisch detektiert und farbig angezeigt. Die farbig markierten Begrenzungen der Gefäßwand werden auf Übereinstimmung mit dem Ultraschallbild überprüft. Die Bestimmung des Diameters erfolgt R-Zacken-synchron durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten im definierten Messabschnitt<sup>46</sup> (vgl. Abb.15).

## 2.6. Mathematisch-statistische Methoden

Deskriptive statistische Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (MW  $\pm$  SE) angegeben. Änderungen der Gruppenmittelwerte der Nitrit-, und Nitratkonzentration zwischen den Kollektiven nach ergometrischer Belastung wurden durch den Student's t-Test für ungepaarte Daten auf signifikante Unterschiede überprüft. Beim Vergleich der Konzentrationsveränderungen von Nitrit und Nitrat innerhalb eines Gruppenkollektives

wurde der Student's t-Test von ungepaarten Daten durchgeführt. Lineare Korrelationen wurden zweiseitig nach Pearson berechnet. Als statistisch relevant galt ein p-Wert  $\leq 0,05$ . Zur Analyse diente das Computerprogramm SPSS® 11.0 für Windows (Chicago Ill., USA).

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

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

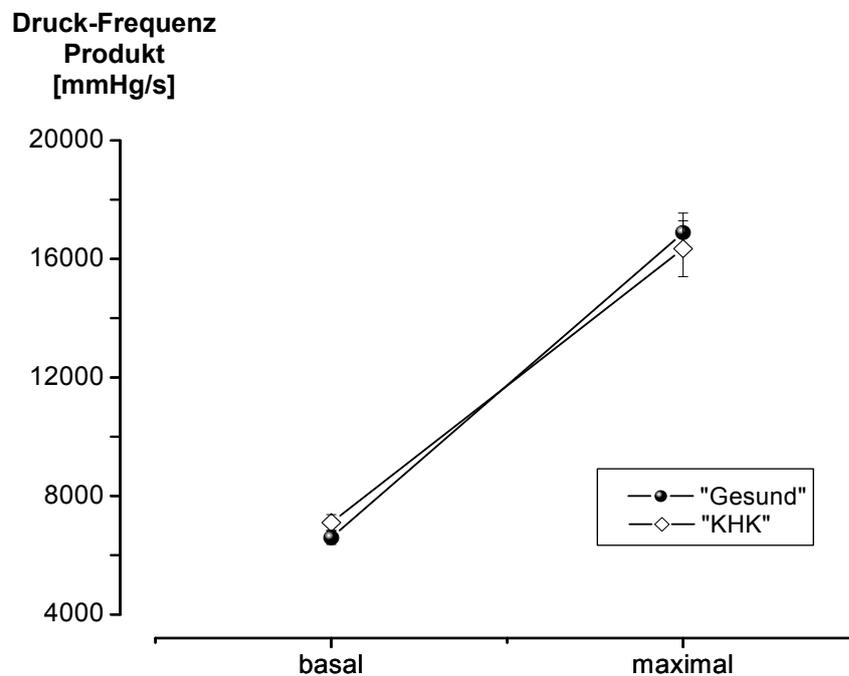
Zwischen dem gesunden Kontrollkollektiv und der Gruppe mit bekannter KHK bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich Alter, Körpergröße, Körpergewicht und BMI. Ebenfalls konnten bei der Bestimmung der Natrium-, und Kaliumkonzentration, des Hämatokrit, der LDL- und HDL-Werte, der Ratio aus LDL/HDL, der Triglyzeride, des HbA1c, der Harnsäurekonzentration, des CRP, des Fibrinogens sowie des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Hingegen zeigten sich im untersuchten KHK-Kollektiv ein signifikant höheres Gesamtcholesterin ( $p < 0,05$ ), höhere Glukosespiegel ( $p < 0,05$ ) und höhere Leukozytenzahlen ( $p < 0,05$ ), sowie eine geringere Belastungsintensität und -dauer ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 3:** Charakterisierung der Normalpersonen und der Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK (MW+SE). Signifikante Unterschiede sind mit  $p < 0,05$  gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede durch n.s.

Parameter	Einheit	Kontroll-Kollektiv	KHK-Kollektiv	Signifikanz
n		29	28	
Geschlecht	[ w/m ]	19/10	8/20	
Alter	[ Jahre ]	58 ± 2	64 ± 2	n.s.
Körpergröße	[ cm ]	169 ± 2	171 ± 2	n.s.
Gewicht	[ kg ]	68 ± 3	79 ± 3	n.s.
BMI	[ kg/m <sup>2</sup> ]	24,8 ± 0,7	27,1 ± 0,9	n.s.
Natrium	[ mmol/l ]	143 ± 0,5	141 ± 0,6	n.s.
Kalium	[ mmol/l ]	4,0 ± 0,1	4,5 ± 0,1	n.s.
Hämatokrit	[ % ]	42,8 ± 0,6	42,3 ± 0,9	n.s.
Gesamtcholesterin	[ mg/dl ]	207 ± 13	168 ± 6	P<0,05
LDL	[ mg/dl ]	144 ± 8	128 ± 9	n.s.
HDL	[ mg/dl ]	72 ± 3	63 ± 5	n.s.
LDL/HDL-Ratio		2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	n.s.
Triglyzeride	[ mg/dl ]	122 ± 12,8	141 ± 13,5	n.s.
Glukose	[ mg/dl ]	92 ± 2,5	113 ± 9,1	p<0,05
HbA1c	[ % ]	5,3 ± 0,1	5,6 ± 0,2	n.s.
Harnsäure	[ mg/dl ]	5,1 ± 0,2	6,1 ± 0,3	n.s.
CRP	[ mg/dl ]	0,36 ± 0,03	0,44 ± 0,06	n.s.
Fibrinogen	[ mg/dl ]	294 ± 17	318 ± 19	n.s.
Leukozyten	[ *1000/µl ]	5168 ± 193	6196 ± 387	P<0,05
MAP	[ mmHg ]	98 ± 2	99 ± 3	n.s.
Belastungsintensität	[ Watt ]	161 ± 7	129 ± 8	P<0,05
Belastungsdauer	[ min ]	7,7 ± 0,4	3,9 ± 0,3	P<0,05

Die bei der Fahrradergometrie erreichte Belastungsintensität war in dem KHK-Kollektiv niedriger im Vergleich zum Kontrollkollektiv ( $129 \pm 8$  vs.  $161 \pm 7$  Watt). Als Maß für die ergometrisch induzierte Steigerung der Scherkräfte wurde die Änderung des Druck-Frequenz-Produktes bestimmt. Dabei zeigte sich ein vergleichbarer Anstieg innerhalb beider Kollektive. In dem Normalkollektiv stieg das Druck-Frequenz-Produkt von basal durchschnittlich  $6414 \pm 235$  auf maximal  $16621 \pm 710$  mmHg/s, in dem Kollektiv mit kardiovaskulären Risikofaktoren von basal  $7125 \pm 260$  auf maximal  $16315 \pm 940$  mmHg/s.

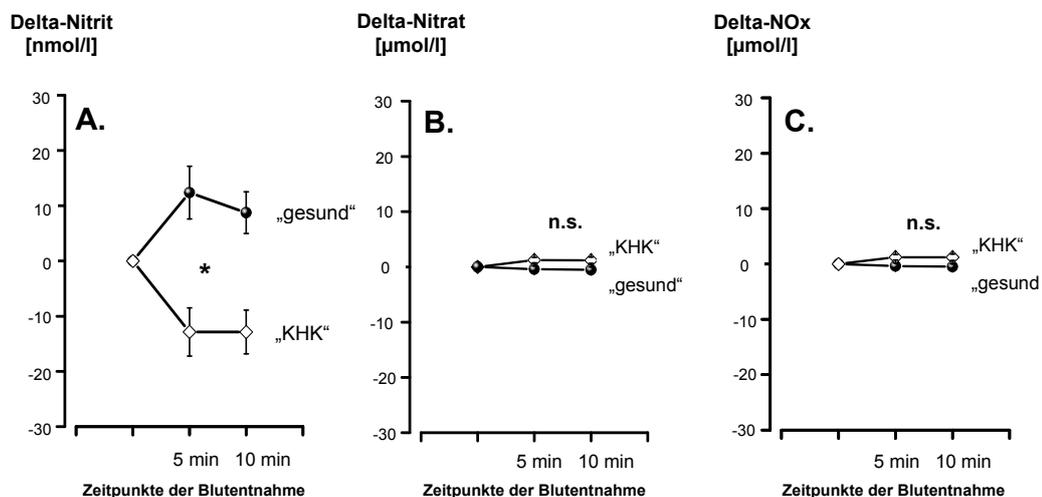


**Abbildung 16:** Änderung des Druck-Frequenz-Produktes als Maß für die ergometrisch induzierte Steigerung der Scherkräfte. Der Anstieg des Druck-Frequenz-Produktes ist nach ergometrischer Belastung im Kontrollkollektiv und KHK-Kollektiv annähernd gleich ( $p=n.s.$ ).

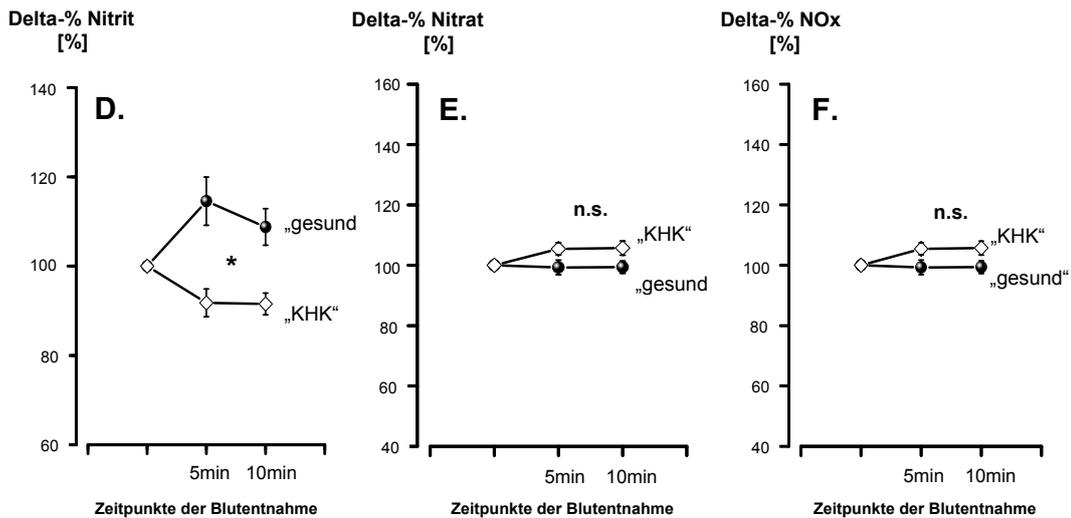
### 3.2. Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite

Unter basalen Bedingungen betragen die Nitritkonzentrationen im Mittel  $96 \pm 6$  nmol/l im Kontrollkollektiv, bzw.  $128 \pm 10$  nmol/l im KHK-Kollektiv ( $p < 0,05$ ). Die basalen Nitratkonzentrationen betragen  $23,4 \pm 1,7$   $\mu$ mol/l im Kontrollkollektiv und  $23,2 \pm 1,3$   $\mu$ mol/l im KHK-Kollektiv ( $p = n.s.$ ).

Nach der fahrradergometrischen Ausbelastung zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Nitritanstiegs zwischen dem gesunden Kollektiv und dem KHK-Kollektiv ( $p < 0,05$ ). Während die Nitritkonzentration in dem gesunden Normalkollektiv um  $14,6 \pm 5,4\%$  zum Zeitpunkt nach 5 min und  $8,8 \pm 4,1\%$  nach 10 min anstieg ( $96 \pm 6$  basal vs.  $108 \pm 7$  nach 5 min und  $104 \pm 8$  nmol/l nach 10 min), fiel in dem Kollektiv mit bekannter KHK der Nitritspiegel um  $8,2 \pm 3,1\%$  nach 5 min und  $8,5 \pm 3,1\%$  10 min nach Beendigung der Belastung unter den Basalwert ab (basal  $128 \pm 10$  vs.  $116 \pm 9$  nmol/l nach 5 min und  $116 \pm 8$  nmol/l nach 10 min).



**Abbildung 17:**  $\Delta$ -Nitrit-(A.),  $\Delta$ -Nitrat-(B.) und  $\Delta$ -NOx-Konzentration (C.) zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen nach fahrradergometrischer Belastung. Die  $\Delta$ -Nitritkonzentration ist signifikant unterschiedlich zwischen dem Normalkollektiv und dem KHK-Kollektiv, nicht hingegen die  $\Delta$ -Nitrat- und  $\Delta$ -NOx-Konzentration (\*= $p < 0,01$ ; n.s.=nicht signifikant; Fehlerbalken=SE).



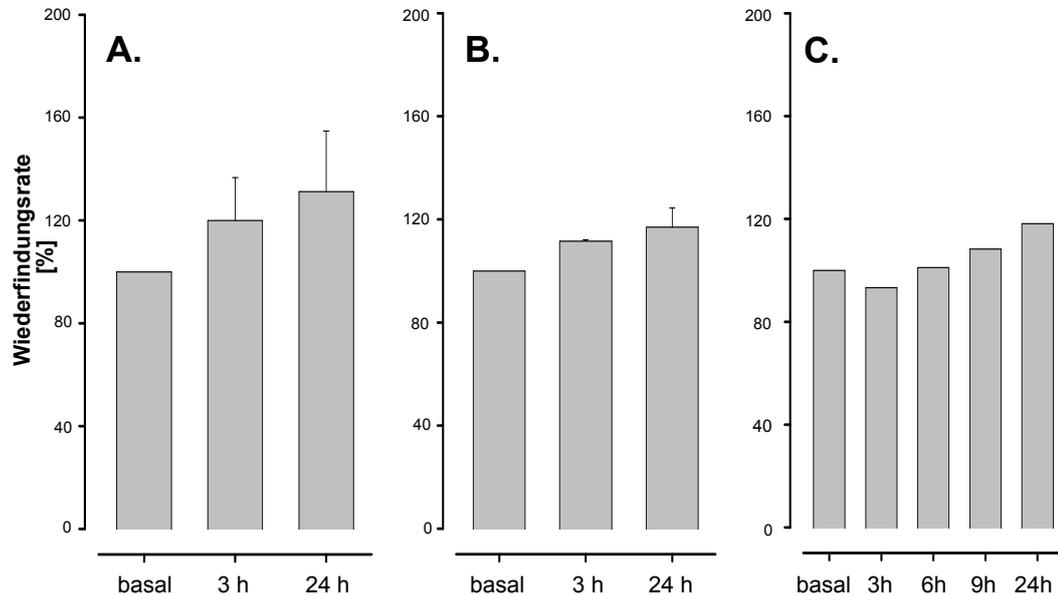
**Abbildung 18:**  $\Delta\%$ -Nitrit-(D.),  $\Delta\%$ -Nitrat-(E.) und  $\Delta\%$ -NOx-Konzentration (F.) zu den Zeitpunkten der Blutentnahmen nach fahrradergometrischer Belastung. Die  $\Delta\%$ -Nitritkonzentration ist signifikant unterschiedlich zwischen dem Normalkollektiv und dem KHK-Kollektiv, nicht hingegen die  $\Delta\%$ -Nitrat- und  $\Delta\%$ -NOx-Konzentration (\*= $p < 0,01$ ; n.s.=nicht signifikant; Fehlerbalken=SE).

Im Gegensatz dazu blieb bei beiden Untersuchungsgruppen die Nitrat- und NOx-Konzentration nach fahrradergometrischer Belastung annähernd konstant ( $p = \text{n.s.}$ ): im gesunden Kontrollkollektiv zeigten sich Werte von basal  $23,4 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$ , 5 min nach Beendigung der Belastung von  $23,0 \pm 1,6 \mu\text{mol/l}$  und nach 10 min  $22,8 \pm 1,7 \mu\text{mol/l}$ . Im KHK-Kollektiv lagen die Werte basal bei  $23,2 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$ , zum Zeitpunkt nach 5 min bei  $24,4 \pm 1,4 \mu\text{mol/l}$  und nach 10 min bei  $24,5 \pm 1,4 \text{ mmol/l}$ .

### 3.3. Lagerung nitrit- und nitrathaltiger Proben

Die Untersuchungen zur Stabilität der Nitritkonzentration in plasmatischen Proben zeigten 1.) Wiederfindungsraten von  $119,9 \pm 16,7\%$  nach 3 Stunden und  $131,2 \pm 23,6\%$  nach 24 Stunden Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$  ( $65 \pm 17$  vs.  $75 \pm 10$  nach 3 h und  $81 \pm 8 \text{ nmol/l}$  nach 24 h). Nach Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  lagen diese bei  $111,6 \pm 0,6\%$  nach 3 Stunden und  $116,9 \pm 7,4\%$  nach 24 Stunden bei (basal  $48 \pm 2$  vs.  $54 \pm 1$  nach 3 h und  $56 \pm 2 \text{ nmol/l}$  nach 24 h). Bei  $-80^\circ\text{C}$ -Lagerung zeigten sich Werte von  $93,3\%$  nach 3

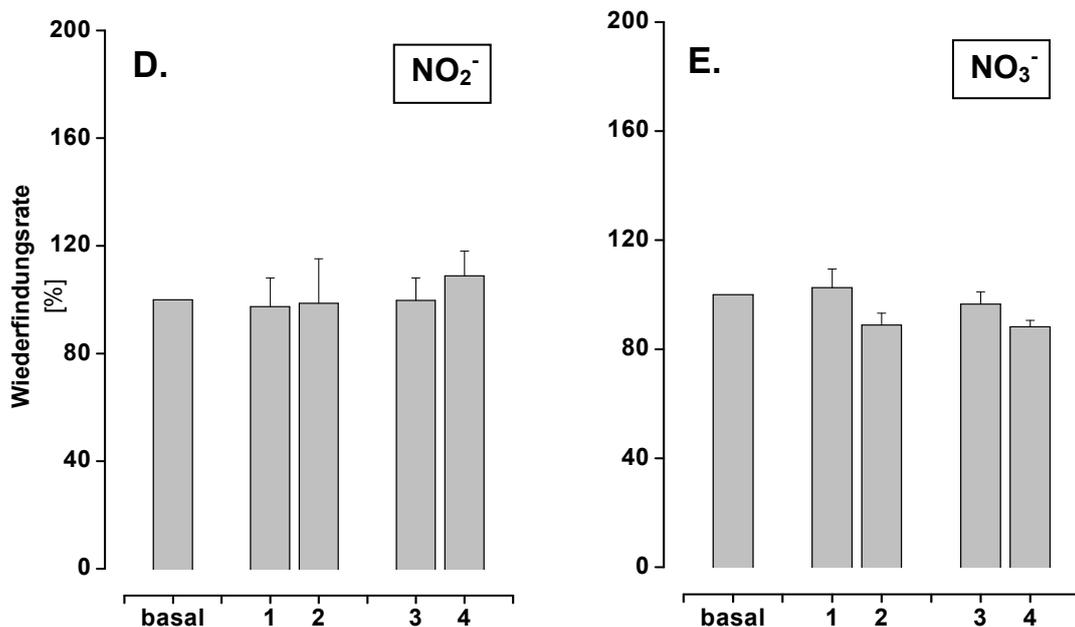
Stunden, 101,1% nach 6 Stunden, 108,2% nach 9 Stunden und 118,15% nach 24 Stunden (basal 83 nmol/l vs. 77 nach 3h, 84 nach 6 h und 98 nmol/l nach 24 h).



**Abbildung 19:** Prozentuale Wiederfindungsrate von Nitrit nach Lagerung. Unverdünnte Plasmaproben wurden bei (A) 4°C, (B) -20°C und (C) -80°C lichtgeschützt gelagert. Die Ergebnisse sind als %-Wiederfindungsrate der Nitritkonzentration nach Lagerung in Bezug auf die basale Nitritkonzentration vor Lagerung (100%) dargestellt (Fehlerbalken=SE).

2.) Die Wiederfindungsraten von Nitrit lagen bei den unverdünnten Plasmaproben bei  $97,4 \pm 10,7\%$  nach 30 Tagen und  $98,7 \pm 8,3\%$  nach 60 Tagen Lagerung (basal  $80 \pm 11$  vs.  $72 \pm 8$  nach 30 d und  $75 \pm 12$  nmol/l nach 60 d). Bei den verdünnten Plasmaproben fanden sich Wiederfindungsraten von  $99,8 \pm 16,5\%$  nach 30 Tagen und  $108,9 \pm 9,2\%$  nach 60 Tagen Lagerung (basal  $80 \pm 11$  vs.  $79 \pm 6$  nach 30 d und  $84 \pm 10$  nmol/l nach 60 d).

Für Nitrat fanden sich hingegen Wiederfindungsraten von  $102,6 \pm 6,8\%$  nach 30 Tagen und  $88,8 \pm 4,4\%$  nach 60 Tagen in unverdünntem Plasma (basal  $23,6 \pm 2,9$  vs.  $24,6 \pm 3,6$  nach 30 d und  $20,4 \pm 3,6$   $\mu\text{mol/l}$  nach 60 d). Bei verdünnten Plasmaproben betrug diese  $96,5 \pm 4,6\%$  und  $88,17 \pm 2,4\%$  nach 30 bzw. 60 Tagen Lagerung (basal  $23,6 \pm 2,9$  vs.  $22,4 \pm 2,3$  nach 30 d und  $20,9 \pm 2,9$   $\mu\text{mol/l}$  nach 60 d).



**Abbildung 20:** Prozentuale Wiederfindungsraten von Nitrit (D) und Nitrat (E) nach Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . (1) und (2) zeigen die Wiederfindungsraten von unverdünnten Plasmaproben nach 30 und 60 Tagen. (3) und (4) geben die Wiederfindungsraten der verdünnten Proben nach 30 bzw. 60 Tagen wieder.

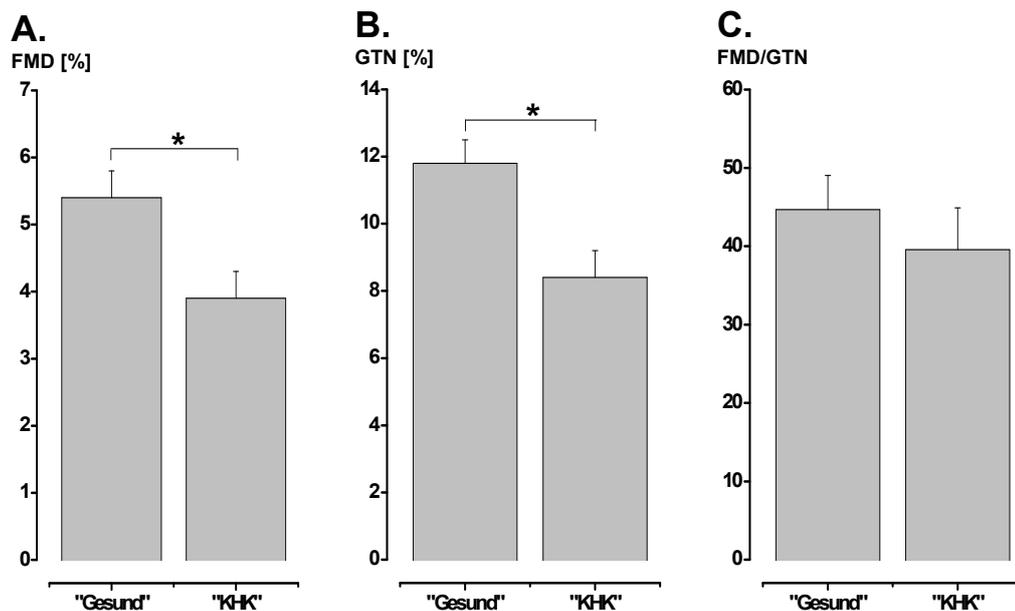
### 3.3. Duplexsonographische Bestimmung der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Der basale Diameter der Arteria brachialis zeigte signifikante Unterschiede zwischen beiden Kollektiven ( $p < 0,01$ ). Im Kontrollkollektiv wurde dieser mit durchschnittlich  $4,2 \pm 0,1$  mm bestimmt. In der Gruppe mit bekannter KHK lag der Durchmesser bei  $4,9 \pm 0,1$  mm.

Es zeigte sich eine verminderte FMD im Kollektiv mit bekannter KHK im Gegensatz zum Kontrollkollektiv ( $p < 0,05$ ):  $5,4 \pm 0,4\%$  (Kontrollkollektiv) vs.  $3,9 \pm 0,4\%$  (KHK-Kollektiv).

Auch die Endothel-unabhängige Dilatation der Arteria brachialis war bei den KHK-Patienten signifikant eingeschränkt ( $p < 0,05$ ). Im Kontrollkollektiv betrug sie  $11,8 \pm 0,7\%$ , im KHK-Kollektiv wurde sie mit  $8,4 \pm 0,8\%$  bestimmt.

Zur Bestimmung des quantitativen Ausmaßes der jeweiligen Komponente, wurde in jedem Kollektiv die Ratio aus Endothel-abhängiger und Endothel-unabhängiger Dilatation (FMD/GTN) bestimmt. In der Kontrollgruppe betrug diese  $44,7 \pm 4,4$ . Im KHK-Kollektiv hingegen lag das Verhältnis bei  $39,6 \pm 5,3$ . Somit war bei den Personen mit KHK die FMD nicht nur absolut, sondern ebenfalls in Relation zur Endothel-unabhängigen Dilatation eingeschränkt.

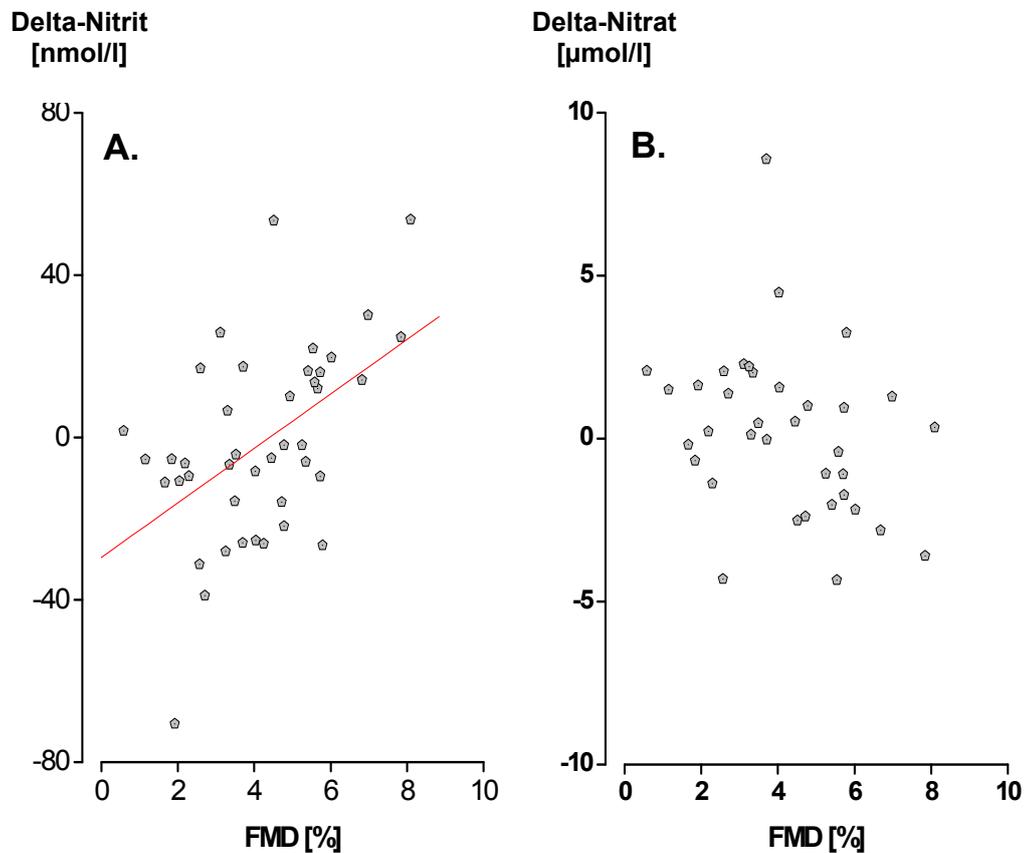


**Abbildung 21:** Bei den Personen mit bekannter koronarer Herzkrankheit zeigt sich eine signifikante Reduktion der FMD im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (A.). Auch die Endothel-unabhängige Dilatation nach Gabe von GTN ist beim KHK-Kollektiv vermindert (\*= $p < 0,05$ ; Fehlerbalken=SE).

### 3.4. Korrelation zwischen NO-Metaboliten, Endothel-abhängiger und Endothel-unabhängiger Vasodilatation

Da sowohl der Nitritanstieg nach fahrradergometrischer Belastung als auch die Endothel-abhängige Dilatation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung vermindert waren, wurden beide Parameter auf Korrelation überprüft. Dabei korrelierte der absolute Nitritanstieg nach 10 min sowohl mit der FMD ( $n=57$ ;  $r=0,542$ ;  $p < 0,01$ ), als auch mit der Ratio

aus FMD/GTN (n=57; r=0,439; p<0,01). Im Gegensatz hierzu bestand keine Korrelation zur Nitratkonzentration (p=n.s.).



**Abbildung 22:** A. Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation (FMD) der Arteria brachialis und der Nitritkonzentration 10 min nach Beendigung der Belastung ( $\Delta$ -Nitrit). ( $r = 0,542$ ;  $p < 0,01$ ) B. Es besteht keine Korrelation zwischen der FMD und der Nitratkonzentration 10 min nach Belastungsende ( $\Delta$ -Nitrat). ( $p = n.s.$ )

### 3.5. Plasmatische Nitrit-Reserve als biochemischer Marker einer vaskulären Dysfunktion

Zur Quantifizierung der diagnostischen Wertigkeit der Nitrit-Reserve als biochemischen Marker der vaskulären Dysfunktion wurden die Sensitivität und die Spezifität im Vier-Felder-Test ermittelt. Die Sensitivität ist definiert als relativer Anteil aller als „krank“ erkannten Personen, bezogen auf alle „Kranken“. Die Spezifität gibt den relativen Anteil aller als „gesund“ erkannten Personen wider, bezogen auf alle „Gesunden“.

Für die Nitrit-Reserve wurde ein Trennwert von 14,5% festgelegt. Diesen Trennwert ermittelten wir durch eine Quartiltrennung des maximalen relativen Nitritanstieg ( $\Delta$ -% Nitrit max), d.h.  $\frac{1}{4}$  des gesamten Kollektivs wies eine Nitrit-Reserve im Plasma unter 14,5% auf,  $\frac{3}{4}$  des gesamten Kollektivs verfügten über eine Nitrit-Reserve im Plasma über 14,5%. Somit wurden die Werte im untersten Quartil als pathologisch definiert. Daraus ergab sich im untersuchten Kollektiv eine diagnostische Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 66%. Der positiv prädiktive Wert zur Diagnose einer vaskulären Dysfunktion konnte mit 72% bestimmt werden.

**Tabelle 4:** 4-Felder-Test zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der Nitrit-Reserve in der Diagnostik der vaskulären Dysfunktion.

		KHK	
		ja	nein
<b>Nitrit-Reserve</b>	<b>[n]</b>		
< 14,5 %		26	10
> 14,5 %		2	19
<b>Gesamt</b>		28	29
		Sensitivität: 93 %	Spezifität: 66 %

## **4. Diskussion**

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- (1.) Die Nitrit-Reserve ist im Plasma von Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK vermindert.
- (2.) Die Nitrit-Reserve im Plasma korreliert mit der Fluss-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis als nicht-invasiver Goldstandard der endothelialen Dysfunktion.
- (3.) Bei einer Nitrit-Reserve im Plasma von 14,5% ergab sich im Vier-Felder-Test eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 66%.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines biochemischen Markers für die Diagnostik einer vaskulären Dysfunktion. Hierzu wurde der Grad einer vaskulären Dysfunktion mit Hilfe eines etablierten Verfahrens (FMD) bestimmt und mit der Konzentration der oxidativen Abbauprodukte des NO im Plasma, Nitrit und Nitrat, korreliert. Als Voraussetzung für die Einführung in die klinische Routinediagnostik, wurde die Lagerungsmöglichkeit nitrit- und nitrathaltiger Plasmaproben nachgewiesen.

(1.) Bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK zeigte sich eine Reduktion sowohl der FMD, als auch der Nitrit-Reserve im Plasma, nicht jedoch der Nitratkonzentration im Plasma. (2.) Die Höhe der Nitrit-Reserve im Plasma korrelierte mit der Höhe der FMD. Es zeigte sich dagegen keine Korrelation zwischen der FMD und der Höhe der Nitratkonzentration im Plasma. (3.) Bei einer Nitrit-Reserve im Plasma von 14,5% ergab sich im Vier-Felder-Test eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 66%.

### **4.1. Methodenkritik**

#### **4.1.1. Quantifizierung der zirkulierenden NO-Metabolite**

Die meisten Ansätze klinischer Studien legen nahe, dass Störungen des endothelialen Stoffwechsels eine wesentliche Rolle der vaskulären Dysfunktion darstellen<sup>21</sup>. Die in den letzten Jahren etablierten Biomarker

zeigen in ihrem Vorhersagewert zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse bereits gute Ansätze. Allerdings konnte bislang noch keiner dieser Biomarker in ausreichendem Maße die eingangs erwähnten Kriterien eines idealen Markers (vgl. 1.2.) erfüllen, wie additiven Informationsgewinn zu bereits bestehenden Markern, Darstellung des klinischen Schweregrads der Erkrankung, zuverlässige und genaue Bestimmbarkeit, hohe Sensitivität und Spezifität, ubiquitäre Verfügbarkeit und einfache Bestimmbarkeit. Daher war eine Einführung einer dieser Marker in die klinische Routine bislang nicht möglich.

So stellte sich das CRP als potentieller Marker für das Auftreten zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse heraus<sup>19</sup>. Daneben zeigten auch andere Entzündungsparameter wie das Fibrinogen, das Serum Amyloid A (SAA), die inflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6), IL-18 und TNF- $\alpha$ , der lösliche CD40-Ligand, die Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A2 und die Leukozyten-aktivierende Myeloperoxidase bereits gute klinische Ansätze. Gleiches gilt für die Bestimmung von E-Selektin, VCAM-1 und Fibronectin als mögliche Marker der antiadhäsiven Eigenschaften des Endothels. Mit Ausnahme von CRP und Fibrinogen, ist die Effektivität dieser alternativen inflammatorischen Biomarker für populationsbasierte Screening-Untersuchungen allerdings eher als gering einzuschätzen, da ihre diagnostische Wertigkeit aufgrund einer zu geringen Sensitivität und Spezifität bislang nicht gesichert werden konnte. Untersuchungen zum Homocystein zeigten, dass erhöhte Plasmaspiegel zu frühzeitigen arteriellen Thrombosierungen führen können. Über verschiedene Mechanismen wie die endotheliale Dysfunktion, Thrombozytenaktivierung, proinflammatorische Prozesse und vermehrte Oxidation von LDL-Cholesterin führt die Hyperhomocysteinämie zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko<sup>47</sup>. Trotz einer Reihe prospektiver Studien, die eine Assoziation zwischen Hyperhomocysteinämie und erhöhtem Risiko nachweisen, und einer relativ leichten Analysemethodik, wird ein Screening auf Homocystein in neueren Richtlinien bislang nicht empfohlen. Es fehlen noch definitive Versuchsdaten, die zeigen, dass eine

Homocysteinsenkung auch zu einer Verminderung des kardiovaskulären Risikos führen. Die Homocysteinbestimmung stellte sich bisher nur bei den Patienten als relevant heraus, bei denen die klassischen Risikofaktoren nicht diagnostiziert werden konnten.

Die Identifizierung genetischer Polymorphismen von thrombozytären Rezeptoren zeigte in der Vorhersage kardiovaskulärer Ereignisse bereits gute Erfolge. So scheint das Auftreten des HPA-1b- und alpha(2)807TT-Polymorphismus mit dem vorzeitigen Eintritt eines Myokardinfarkts assoziiert zu sein<sup>27-29</sup>. Auch hier stehen noch Verlaufsstudien offen, um diese Assoziation verifizieren zu können. Die Analysemethodik zur Identifizierung genetischer Aberrationen ist allerdings aufwendig und kostenintensiv in der Handhabung.

Die Bestimmung der zirkulierenden Plasmaspiegel der endothelialen Signalstoffe von vWF, sThrombomodulin, t-PA, Plasminogen-Aktivator PAI-1 bzw. Stoffwechselprodukten als Surrogatparameter einer Funktionsstörung der Endothelfunktion konnten ebenfalls in ihrer diagnostischen Wertigkeit nicht gesichert werden<sup>21</sup>. Zwar kommen t-PA und sein Inhibitor PAI-1 potentiell als relativ sensitive Marker der vaskulären Dysfunktion in Betracht, die die Diagnose mittels FMD-Messung komplementieren. Allerdings fehlen noch prospektive Studien, die den Zusammenhang zwischen der vaskulären Dysfunktion und der akuten t-PA-Freisetzung genauer definieren. Ebenso erlaubt die Messung von Metaboliten des vasokonstringierenden Endothelin und des vasodilatierenden Prostacyclins im Plasma keinen spezifischen Rückschluss auf die Funktion des Endothels<sup>48</sup>.

Eine Ausnahme stellt hier das NO dar. Seine Bestimmung im Plasma kann die Konzentration an oder in der Endothelzelle reflektieren<sup>49</sup>. Mit dem Hintergrund, dass eine Beeinträchtigung wesentlicher homöostatischer Endothelfunktionen mit einer Einschränkung der endothelialen NO-Synthese und somit der Bioverfügbarkeit von NO einhergeht und die Entwicklung einer Arteriosklerose begünstigen kann, wurden Metabolite des NO-Stoffwechselweges quantifiziert. So wurden die direkten

Abbauprodukte des NO, (1.) das Nitrit und (2.) das Nitrat, im Plasma bestimmt.

(1.) In humanem Plasma wird NO primär nahezu vollständig zu Nitrit umgesetzt. Nitrit als instabiles Abbauprodukt des NO reagiert unter normogenen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 110 s in Gegenwart von Erythrozyten zum stabileren Nitrat<sup>49;50</sup>. Durch eine spezielle Probenaufarbeitung wurde versucht diesen Abbauprozess zu verlangsamen. So wurden die venösen Blutproben direkt in 4°C kalten PBS-Puffer gegeben und dadurch 1:5 verdünnt. Durch die Verdünnung wird die Nitritkonzentration im Blut stabilisiert. Durch Zentrifugation unmittelbar nach Entnahme der Blutproben wurden die Proben von zellulären Bestandteilen, insbesondere Erythrozyten, befreit. Dieses Aufbereitungsverfahren zeigte in experimentellen Untersuchungen von Kleinbongard et al.<sup>51</sup> und Lauer et al.<sup>33</sup> gute Ergebnisse für die diagnostische Genauigkeit der Nitritbestimmung zur Beurteilung der eNOS-Aktivität *in vivo*. Die Nitritkonzentrationen wurden nach Acetylcholin-induzierter eNOS-Stimulation und nach L-NMMA-induzierter Inhibition mit einer Placebo-Gruppe, die lediglich physiologische Kochsalzlösung infundiert bekam, verglichen. Dabei zeigte sich nach eNOS-Stimulation ein Anstieg und nach eNOS-Inhibition ein Abfall der plasmatischen Nitritkonzentration. Der Vergleich zwischen den Gruppen mit und ohne Intervention, zeigte statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Nitrit-Spiegel im Plasma. Damit konnte die Spezifität von plasmatischem Nitrit als Marker der regionalen NO-Formation nachgewiesen werden, der mit einer hohen Sensitivität akute Änderungen der regionalen eNOS-Aktivität widerspiegeln kann.

Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektions-Anlage (CLD). Dieses Verfahren stützt sich auf Untersuchungen von Feelisch et al.<sup>52</sup>. Die verwendeten Konzentrationen der Reaktionslösungen sowie die Messtemperatur entsprachen den in der Arbeit vorgegebenen Angaben. Das Verfahren beruht auf einer reduktiven Denitrosierung von Nitrit. Eine Iod/Iodid-haltige Redoxlösung führt zur Freisetzung von NO aus Nitrit, welches dann mittels einer

Photoreaktion mit Ozon detektiert wird<sup>53</sup>. Die Sensitivität dieser Methode beträgt bei einem Probenvolumen von 100 µl 5nmol/l und ist geeignet für die Messung von Nitritkonzentrationen in einem Bereich von 10-100.000 nmol/l. Die Tag-zu-Tag Variabilität identischer Proben hat einen Variationskoeffizienten von 4,7%<sup>54</sup>. Die Chemilumineszenzdetektion erweist sich somit als ein Verfahren mit hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit zur Bestimmung von Nitrit in plasmatischen Proben. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmten plasmatischen Nitritkonzentrationen sind mit durchschnittlich 112 nmol/l in Einklang mit dem in der Literatur angegebenen Bereich (100-600 nmol/l)<sup>33;49;55;56</sup>. Derzeit existieren keine allgemein akzeptierten Referenzwerte der Nitrit-Reserve bei gesunden Personen. Daher wurde in den eigenen Untersuchungen ein Trennwert der Nitrit-Reserve im Plasma von 14,5% festgelegt. In weiterführenden prospektiven Studien stehen noch Untersuchungen zur Ermittlung eines Referenzwertes aus. Die Bestimmung von Nitrit ermöglicht es auch kleinere Veränderungen der NO-Bioverfügbarkeit zu erfassen. Somit eignet sich Nitrit als Marker akuter Änderungen der endothelialen NOS-Aktivität.

(2.) Nitrat stellt das stabile Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechsels dar. Die Nitratbestimmung erfolgte mit Hilfe der Vanadium-(III)-Chlorid-FIA in Kombination mit der Griess-Reaktion. Nach chemischer Reduktion des Nitrats wird die Nitritkonzentration spektrophotometrisch quantifiziert. Die Methode stellt ein etabliertes Verfahren zur validen Messung nitrathaltiger Proben in einem Bereich von 0-25 µmol/l dar. Die Sensitivität dieses Verfahrens von 200 nmol/l war aufgrund von Voruntersuchungen und Literaturangaben für die durchgeführten Untersuchungen ausreichend. Die bestimmten Nitratkonzentrationen sind im Einklang mit den erwarteten Werten aus der Literatur von 19-60 µmol/l<sup>33;49;56</sup>.

Um den Eingang der Nitrit-Reserve als serologischen Biomarker in die klinische Routine zu vereinfachen, wurde die Haltbarkeit nitrithaltiger Plasmaproben nach Lagerung untersucht. In Voruntersuchungen konnte

gezeigt werden, dass Nitrit im Ultrafiltrat aus dem Plasma während der Lagerung abgebaut wird<sup>57</sup>. Durch den Einfrierprozess wird das Nitrit in wässrigen Lösungen zu Nitrat oxidiert<sup>58;59</sup>. Diese Autoxidations-Reaktion ist während des Einfrierprozesses schneller als die analoge Reaktion bei Raumtemperatur. Dies ist dadurch zu erklären, dass der pH-Wert während des Einfrierens sinkt und Nitrit im sauren Milieu zu Salpetriger Säure umgewandelt wird. Salpetrige Säure wird in Anwesenheit von gelöstem Sauerstoff zu Nitrat oxidiert. Plasma enthält zahlreiche Proteine, Phosphat, Bikarbonat und Elektrolyte, die zur Stabilisierung des pH-Wertes führen und damit auch zur Stabilisierung des Nitrits während der Lagerung. Einmal eingefroren, können unbehandelte Plasmaproben bis zu 60 Tagen bei -80°C gelagert werden. Die Nitritkonzentrationen zeigten nach dieser Lagerungszeit noch Wiederfindungsraten von  $99,8 \pm 16,5\%$ . Dieser Befund stellt eine Erleichterung für die Bestimmung der Nitrit-Reserve als möglichen Biomarker in der klinischen Routinediagnostik dar. So besteht z.B. die Möglichkeit, dass die zu untersuchenden Blutproben zur weiteren Analytik von der Klinik in geeignete Labore verschickt werden können. Die Möglichkeit der Lagerung nitrithaltiger Plasmaproben ohne signifikante Veränderung der Konzentration trägt somit zur Erfüllung des an einen idealen Marker gestellten Kriteriums einer einfachen und praktischen Bestimmbarkeit bei.

#### **4.1.2. Quantifizierung der Endothel-abhängigen Dilatation mittels Fluss-vermittelter Dilatation**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluss-vermittelte Dilatation der Arteria brachialis als nicht-invasiver Goldstandard der endothelialen Dysfunktion verwendet. Der Nachweis, dass die Messung der FMD peripherer Leitungsarterien als funktioneller Surrogatparameter für die NO-Synthese und Freisetzung dienen kann, wurde durch Untersuchungen erbracht, in denen die FMD durch intraarterielle Gabe von L-NMMA, einem kompetitivem Inhibitor der NOS, vollkommen unterdrückt werden konnte<sup>60</sup>.

Es gibt verschiedene Einflussmöglichkeiten, welche die Endothel-abhängige Dilatation bzw. die Genauigkeit der Quantifizierung beeinflussen können. Dazu zählen (1.) biologische Einflussfaktoren, (2.) methodische Variabilitäten und (3.) untersucherseitige Variabilitäten.

(1.) In verschiedenen Untersuchungen konnten zahlreiche biologische Einflussfaktoren nachgewiesen werden. So wurde festgestellt, dass eine negative Korrelation zwischen Ruhediameter der Arteria brachialis und der Höhe der FMD vorliegt<sup>24;61</sup>. Arterien mit einem Diameter kleiner 2,5 mm sind schwieriger zu messen und dilatieren im Verhältnis zu großen Arterien in einem stärkeren Ausmaß<sup>24</sup>. Als weiteres konnte eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum der FMD am späten Nachmittag festgestellt werden<sup>62</sup>. Zudem spielt die Konzentrationsänderung weiblicher Geschlechtshormone während des Menstruationszyklus eine Rolle in der Beeinflussung der FMD<sup>63</sup>. Außerdem kann die FMD durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden. So führt eine akute Hyperglykämie<sup>64</sup> und fettreiche Nahrung<sup>65</sup> zu einer Reduktion. Auch Kaffeekonsum und die Einnahme von Vitamin C sind mit Veränderung der FMD beschrieben worden<sup>66</sup>. Akuter psychischer Stress<sup>67</sup> und Zigarettenrauchen führen ebenfalls zu einer Verminderung<sup>68</sup>.

Um den Einfluss dieser Faktoren möglichst gering zu halten, wurden die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit immer zu der gleichen Tageszeit zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens durchgeführt. Die Probanden wurden darüber aufgeklärt, dass sie eine Nüchternphase von 8-12 Stunden vor der Untersuchung einhalten sollten. Dies schloss auch den Verzicht von Kaffee-, Tee- und Vitamin C-Konsum mindestens 4-6 Stunden vor der Untersuchung ein<sup>66</sup>. Die Untersuchungen wurden in einem vollklimatisierten, ruhigen Raum in entspannter Körperhaltung nach einer mindestens 10 minütigen Ruhephase durchgeführt. Die Herzfrequenz und der Blutdruck, als Parameter der sympathoadrenergen Stimulation, unterschieden sich nicht signifikant vor und nach der Untersuchung.

Als Einschränkung der Untersuchung ist eine inhomogene Geschlechterverteilung innerhalb beider Kollektive zu nennen. Aufgrund des postmenopausalen Hormonstatus der weiblichen Studienteilnehmer konnte die zyklusbedingte Beeinflussung der FMD weitgehend ausgeschlossen werden.

(2.) Die methodische Variabilität wird verursacht durch Einflussfaktoren wie die Größe des ischämischen Gebietes, die Ischämiezeit, die der Diametermessung zugrunde gelegenen Eckpunkte, der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie sowie innerhalb des Herzzyklus. In der Literatur herrscht kein Konsens darüber, welche Positionierung der Blutdruckmanschette zu bevorzugen ist<sup>44</sup>. Bei der proximalen Okklusion kann die induzierte Dilatation fälschlicherweise zu hoch gemessen werden, da es zum Anfall einer Vielzahl von Metaboliten<sup>66</sup>, insbesondere Adenosin kommen kann. Bei der distalen Okklusion können diese Fehlerquellen ausgeschaltet werden, da sich die Substanzen nicht auf den untersuchten Gefäßabschnitt auswirken können. Aus diesem Grund und um darüber hinaus potentielle Einflüsse einer direkten Kompression auf den untersuchten Bereich der Arteria brachialis zu vermeiden, wurde die Blutdruckmanschette in den vorliegenden Untersuchungen distal der Ellenbeuge am Unterarm angelegt. Weiterhin hängt die Höhe der FMD von der Ischämiezeit ab. Eine maximale Dilatation wird erst nach einer 4,5 minütigen Ischämie erreicht, welche auch durch eine längere Ischämiezeit nicht signifikant gesteigert werden kann<sup>44;69</sup>. Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen die tolerierbare Dauer von 5 Minuten bevorzugt. Wie auch bei den meisten anderen Arbeitsgruppen<sup>44;70-72</sup> wurde die Diametermessung von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie durchgeführt, welche dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang entspricht<sup>73</sup>. Die maximale Dilatation der Arteria brachialis wurde 60 Sekunden nach Beendigung der Ischämie bestimmt. Da Untersuchungen darauf hinweisen, dass die maximale Dilatation sowohl bei Kindern<sup>74</sup> als auch bei Erwachsenen<sup>70</sup> sehr voneinander abweichen kann, wurde die Dilatation bei den vorliegenden Untersuchungen erneut

nach 90 Sekunden bestimmt, um eine exaktere Bestimmung der maximalen Dilatation zu erreichen. Dennoch ist es nicht auszuschließen, dass der wahre maximale Wert der FMD in einigen Fällen unterschätzt wird. Alle Messungen wurden EKG-getriggert enddiastolisch durchgeführt, da der Diameter der Arteria brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatilen Veränderungen unterworfen ist. Das verwendete Untersuchungsprotokoll entsprach zusammenfassend den in den Leitlinien empfohlenen Standards<sup>44</sup>.

(3.) Folgende drei Variablen repräsentieren die Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität von Ultraschalluntersuchungen: die technische Ausrüstung, der Untersucher und die Auswertung.

Als technische Voraussetzungen wurde für die nicht-invasive Vermessung des Diameters der Arteria brachialis entsprechend dem gegenwärtigen Standard ein linearer Schallkopf mit einer Ultraschallfrequenz von 15 MHz mit einer axialen Auflösung von 0,1 mm eingesetzt<sup>45</sup>. Nur einem gut geschulten Untersucher<sup>75</sup> ist es möglich Diametermessungen von 0,1 mm zu erkennen und somit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Da die technische Auflösung sehr nahe an dem zu bestimmenden biologischen Bereich ist, hängt die duplexsonographische Untersuchung der Gefäßfunktion umso stärker von der Erfahrung des Untersuchers ab. So sollte der Untersucher mindestens 100 Probeuntersuchungen unter Aufsicht vollbracht haben, bevor unabhängige Messungen durchgeführt werden können. Die Diameteränderung der Endothel-abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation mit einem Ruhediameter von 3,8 mm liegen im Bereich von 0,1-0,6 mm (2,7%-16,7%)<sup>76</sup>.

Im kardiologischen Forschungslabor wurde ein Normwert für die FMD für junge Erwachsene ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren (Hypertonie, Nikotin, Hypercholesterinämie, Diabetes) von  $6,5 \pm 0,4\%$  (95% Konfidenzintervall des Mittelwerts: 5,8% - 7,3%) bestimmt. Daher gebrauchten wir den unteren Wert von 5,8% als Trennwert zur Diagnose einer endothelialen Dysfunktion<sup>77-79</sup>. In den eigenen Untersuchungen betrug die FMD des gesunden Kollektivs  $5,4 \pm 0,4\%$  und liegt damit geringgradig

unterhalb des Normwertes. In Untersuchungen zur Beeinflussung des Alters auf die Endothel-abhängige Dilatation wurde gezeigt, dass der Faktor Alter auch ohne Auftreten weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren zu einer eingeschränkten Vasorelaxation führt<sup>80</sup>.

Durch die Verwendung eines von Preik et al.<sup>76</sup> entwickelten PC-assistierten Analyseverfahrens zur Diametermessung konnten Fehlerquellen bei der Auswertung weitgehend vermieden und mit einem geringen Zeitaufwand durchgeführt werden.

#### **4.1.3. Ausbelastungskriterien der fahrradergometrischen Intervention**

Als Maß für die ergometrisch induzierte Steigerung der Scherkräfte wurde die Änderung des Druck-Frequenz-Produktes bestimmt. Dabei zeigte sich in beiden Kollektiven ein vergleichbarer Anstieg. Somit konnten wir zeigen, dass trotz der unterschiedlichen Konstitution der Personen mit bekannter KHK im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv eine gleichwertige Ausbelastung erzielt werden konnte. Allerdings ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass sich die beiden Kollektive hinsichtlich der Belastungsdauer und damit auch der Belastungsintensität voneinander unterschieden. So wurden die KHK-Patienten im Durchschnitt  $3,9 \pm 0,3$  min bei einer Belastungsintensität von durchschnittlich  $129 \pm 8$  Watt belastet, die gesunden Normalpersonen hingegen  $7,7 \pm 0,4$  min bei  $161 \pm 7$  Watt. Ein besserer Vergleich der äquivalenten scherkraftinduzierten Steigerung der eNOS-Aktivität könnte durch eine fest definierte Belastungsdauer und -intensität erzielt werden. Allerdings soll die Bestimmung der Nitrit-Reserve als biochemischer Marker einer vaskulären Dysfunktion auf einfache Weise in die klinische Routinediagnostik integrierbar sein. So war die Intention die Bestimmung der Nitrit-Reserve mit der Ergometrie-Untersuchung, welche im Bereich der kardiologischen Diagnostik eine Routineuntersuchung darstellt, zu kombinieren. Gemäß den Leitlinien der DGK erfolgt die fahrrad-

ergometrische Belastung durch eine intervallgesteigerte Belastungsintensität bis zum Erreichen der individuellen Ausbelastung (vgl. 2.3.). Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen die fahrradergometrische Belastung entsprechend der Leitlinien der DGK durchgeführt.

#### **4.2. Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Konzentration zirkulierender NO-Metabolite**

Mit dem Ziel einen biochemischen Marker zur individuellen Diagnostik der vaskulären Dysfunktion zu entwickeln, wurden in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Nitrit- und Nitratkonzentrationen bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK untersucht. Aus folgenden Gründen wurde NO nicht direkt bestimmt:

NO wird mit einer nur sehr geringen Halbwertszeit aus dem menschlichen Blut eliminiert. In wässrigen Medien wird NO konzentrationsabhängig mit einer Halbwertszeit von 9-900 s abgebaut<sup>49</sup>. Im Vollblut hingegen wurden Halbwertszeiten von 0,05-1,8 ms<sup>31</sup> gemessen, es finden sich allerdings auch Angaben, die die Halbwertszeit mit 1 µs bemessen haben<sup>81</sup>. Die viel kürzere Halbwertszeit lässt sich durch die hohe Reaktivität von NO mit oxygeniertem Hämoglobin erklären. Dies konnte in Untersuchungen von Rassaf et al. bestätigt werden<sup>82</sup>. Nach Zugabe von 5 µmol/l NO wurde im Plasma eine Halbwertszeit von 68 s gemessen. Nach Zugabe der gleichen Menge NO in Vollblut, erfolgte der Abbau so schnell, dass mit der NO-Elektrode kein NO messbar war. Somit schied NO selbst als biochemischer Marker der vaskulären Dysfunktion aus, da es aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit schon während einer Blutentnahme vollständig abgebaut wird.

Bislang wurden Nitrat oder NO<sub>x</sub> als stabile Abbauprodukte des NO zur Abschätzung der endothelialen NO-Synthese *in vivo* verwendet. Der NO<sub>x</sub>-Gehalt entspricht der Gesamtheit des im Plasma zirkulierenden Nitrit und Nitrat. Den Hintergrund dafür bilden Untersuchungen, die zeigen, dass NO

nach Inhalation oder Infusion zu Nitrit und Nitrat umgewandelt und Nitrit letztendlich in den Erythrozyten weiter zu Nitrat oxidiert wird. Weiterhin zeigte sich, dass das im Lumen von Blutgefäßen bestimmte NO<sub>x</sub> einen konstanten Anteil der endothelialen NO-Synthese darstellt<sup>31</sup>. Bei Untersuchungen an transgenen eNOS-Knock-Out-Mäusen war eine um 50% reduzierte Konzentration des zirkulierenden NO<sub>x</sub> im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Im Überstand von Endothelzellkulturen aus Aorten derselben Tiere waren nur Hintergrundkonzentrationen nachzuweisen<sup>83</sup>. In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Nitratkonzentration nach scherkraftinduzierter Steigerung der eNOS-Aktivität, weder bei Personen mit bekannter KHK noch im gesunden Kontrollkollektiv. Außerdem bestand auch keine Korrelation zur FMD. Im Wesentlichen schränken zwei Gründe die Aussagekraft der Nitratkonzentration im Plasma bezüglich der endogenen NO-Synthese ein. Im Gegensatz zu Nitrit ist die Nitratkonzentration nicht überwiegend von der endogenen NO-Synthese abhängig, sondern wird von zahlreichen NOS-unabhängigen Faktoren beeinflusst, wie z.B. der Nahrungsaufnahme, der Speichelbildung, der bakteriellen Nitrat-Synthese im Darm, enzymatischen Prozessen in der Leber, der Inhalation von atmosphärischen Nitrogen-Oxiden und der Nierenfunktion<sup>84</sup>. Der Einfluss der Nahrungsaufnahme wurde in Untersuchungen verdeutlicht, bei denen sich nach einer 12 stündigen Fastenperiode eine Reduktion der Nitratkonzentration von 54% zeigte<sup>56</sup>. Hinzu kommt, dass das Nitrat im Plasma sehr hohe Hintergrundkonzentrationen aufweist (mikromolarer Bereich), ein Verteilungsvolumen einnimmt, welches ca. fünfmal größer als das Plasmavolumen ist und somit dem Extrazellulärvolumen entspricht und nur langsam aus dem Körper eliminiert wird. Die exakte Bestimmung von Änderungen, die auf die endogene NO-Bildung (nanomolarer Bereich) zurückzuführen sind, ist deshalb nur sehr eingeschränkt möglich. Aus diesen Gründen erlaubt die Bestimmung der Nitratkonzentration nur eine grobe Abschätzung der endogenen NO-Synthese.

Zusammenfassend ergibt sich daraus die Schlussfolgerung, dass Nitrat nicht als biochemischer Marker einer scherkraftinduzierten Steigerung der eNOS-Aktivität und damit einer vaskulären Dysfunktion geeignet ist.

Im Gegensatz zur Nitratkonzentration im Plasma, zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen eine Änderung der Nitritkonzentration nach scherkraftinduzierter Steigerung der eNOS-Aktivität. Es waren signifikante Unterschiede der Nitrit-Reserve bei Personen mit KHK im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nachweisbar. Weiterhin korrelierte die Nitrit-Reserve mit dem funktionellen Grad einer vaskulären Dysfunktion (FMD). Mit dem Hintergrund, dass die Nitrit-Reserve die vaskuläre Funktion widerspiegelt, stehen diese Befunde im Einklang mit der Hypothese, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer eingeschränkten Bioverfügbarkeit von NO führen.

In mehreren Studien wurde bereits bestätigt, dass Nitrit als Parameter der basalen, als auch als Parameter akuter Änderungen der eNOS-Aktivität geeignet ist. Experimentelle Untersuchungen, bei denen nüchterne Probanden <sup>15</sup>N markiertes L-Arginin infundiert bekamen, wiesen nach, dass 90% des im Blut zirkulierenden Nitrits aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel stammt<sup>56</sup>. Aufgrund des stöchiometrischen Abbaus von NO zu Nitrit spiegeln sich akute Änderungen der eNOS direkt in der Nitritkonzentration wider. Untersuchungen von Kelm et al.<sup>55</sup> und Lauer et al.<sup>33</sup> am Gefäßbett des Unterarms belegen die Spezifität von Nitrit als einen Indikator sowohl für die basale endotheliale NO-Synthese als auch nach Stimulation. Durch pharmakologische Stimulation der eNOS mittels Acetylcholin, stieg der Nitritspiegel im Plasma signifikant an. Nach Gabe von Papaverin, einem Endothel-unabhängigen Vasodilatator, blieb die Konzentration von Nitrit dagegen unverändert. Ebenso führte eine Inhibition der eNOS durch Gabe von L-NMMA zu keiner signifikanten Veränderung der Nitritspiegel im Plasma<sup>33</sup>. Nitrit besitzt im menschlichen Blut eine kurze Halbwertszeit von 110 s und kann damit kurzfristige und lokale Änderungen der Aktivität der eNOS widerspiegeln<sup>49</sup>.

Nur wenige Studien haben bisher den Einfluss der scherkraftinduzierten Steigerung der NO-Synthase auf die Konzentration zirkulierender NO-Metabolite nach akuter körperlicher Belastung untersucht. Aufgrund mangelnder sensitiver analytischer Methoden zur Nitritbestimmung im Plasma wurde nur die Summe aus Nitrit und Nitrat (NO<sub>x</sub>) bestimmt. Brown et al.<sup>85</sup> führten Untersuchungen zur belastungsinduzierten Steigerung der eNOS-Aktivität am Unterarm gesunder Personen durch. Die körperliche Belastung bestand hier in einer rhythmischen Kontraktion des Unterarms mit konstant ansteigendem Belastungsgrad. Die gemessenen NO<sub>x</sub>- und L-Citrullin-Konzentrationen im Plasma, als Marker der NO-Produktion, zeigten nach Belastung einen signifikanten Anstieg im belasteten Arm. Bei Untersuchungen von Allen et al.<sup>86</sup> wurde ebenfalls die Bedeutung von NO<sub>x</sub> als Marker der endothelialen NO-Produktion überprüft. Die Steigerung des Blutflusses, die durch maximale körperliche Belastung mit Hilfe eines Laufbandes mit intervallgesteigerte Zunahme der Geschwindigkeit und des Anstiegs erzielt wurde, führte zu erhöhten NO<sub>x</sub>-Konzentrationen im Plasma. Im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv waren die NO<sub>x</sub>-Anstiege bei Personen mit kardiovaskulären Erkrankungen signifikant geringer. Die Messung von Nitrit im Plasma zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen. Ein Erklärungsansatz für die zu den eigenen Untersuchungen bestehenden kontroversen Ergebnisse bietet die in den Untersuchungen angewandte Aufarbeitungs- und Analysemethodik, die zu einer weniger sensitiven Vermessung der NO-Metabolite im Plasma führte. Der Nachweis, dass die Bestimmung der Nitritkonzentration, aber nicht die der Nitratkonzentration, einen spezifischen Indikator der scherkraftinduzierten Steigerung der NOS-Aktivität darstellt, konnte in mehreren Studien erbracht werden. So spiegeln sich nachweislich akute Änderungen der endothelialen NOS-Aktivität in äquivalenten Veränderungen der Nitritkonzentration im Plasma wider<sup>35;51;87</sup>.

Eine verminderte Nitrit-Reserve bei Personen mit bekannter KHK lässt sich auf den Erklärungsansatz zurückführen, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einem Anstieg von oxidativem Stress führen. Zahlreiche

Untersuchungen sprechen dafür, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über eine gesteigerte Radikalbildung zu einem beschleunigten Abbau von NO führen<sup>38</sup>. Weiterhin belegen neuere Befunde, dass die NO-Deaktivierung durch Radikale wie den Superoxidanionen ebenfalls zu einer verringerten NO-Synthese führen kann. Das durch die Interaktion von Superoxidanionen und NO entstehende Peroxynitrit kann über die Interaktion mit Tetrahydrobiopterin zu einer Entkopplung der eNOS führen<sup>88</sup>. Diese synthetisiert anstelle von NO vermehrt Superoxidanionen. So zeigte sich bei Untersuchungen an HUVECs nach Inkubation mit Serum von Rauchern eine gesteigerte Expression bei verminderter NO-Produktion<sup>89</sup>.

Bei Untersuchungen von Personen mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit wurde unter maximaler Belastung ebenfalls ein Anstieg des oxidativen Stresses nachgewiesen, im Gegensatz zum gesunden Kontrollkollektiv, bei dem sich keine Veränderung zeigte. Nach Gabe von Vitamin C als Antioxidanz konnte diese gesteigerte Radikalbildung nicht mehr nachgewiesen werden<sup>90</sup>. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass neben dem bereits erhöhten oxidativen Stress bei Personen mit kardiovaskulärem Risikoprofil, der oxidative Stress nach maximaler körperlicher Belastung noch zusätzlich gesteigert wird. Somit ließe sich der Erklärungsansatz dafür finden, dass in den eigenen Untersuchungen die Nitritkonzentrationen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK nach maximaler körperlicher Belastung sogar unter die basalen Ausgangswerte gesunken sind. Bei gesunden Personen kann dieser akute oxidative Stress durch die Wirkung körpereigener Antioxidanzen kompensiert werden. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen am eigenen Kontrollkollektiv, bei dem die scherkraftinduzierte Steigerung der eNOS-Aktivität durch maximale körperliche Belastung zu einer vermehrten NO-Konzentration im Plasma führte.

### **4.3. Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die Endothel-abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien**

Die Arteriosklerose ist eine chronisch progressive Erkrankung der Arterien. Von größtem klinischem Interesse ist die Arteriosklerose der Koronararterien und der Karotiden. Doch sind strukturelle und funktionelle Veränderungen in fast allen Arterien des Organismus nachzuweisen<sup>91</sup>. Bei Sorensen et al.<sup>92</sup> zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem histologischen Schweregrad einer Arteriosklerose in den Koronararterien bzw. der Arteria carotis und der Arteria brachialis. In anderen Untersuchungen konnte eine enge Beziehung zwischen der Endothelfunktion der Koronararterien und der Arteria brachialis nachgewiesen werden<sup>93;94</sup>. So wird die Messung der FMD der Arteria brachialis aufgrund seiner einfachen und nicht-invasiven Durchführbarkeit seit Jahren als Surrogatparameter einer endothelialen Dysfunktion verwendet. Im Einklang damit zeigte sich die FMD auch im eigenen Studienkollektiv mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK eingeschränkt. Zudem bestanden inverse Korrelationen zu Parametern durch die kardiovaskuläre Risikofaktoren definiert sind, wie dem Alter, dem Gesamtcholesterin, dem LDL-Cholesterin, der HDL/LDL-Ratio, und den Triglyzeriden. Unter der Prämisse, dass die FMD zum größten Teil NO vermittelt ist<sup>95</sup>, folgt aus diesen Befunden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren entweder zu einer Einschränkung der Freisetzung von bioaktivem NO führen oder freigesetztes NO seine Wirkung nicht entfalten kann.

Wie bereits beschrieben, sprechen zahlreiche Untersuchungen dafür, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über eine gesteigerte Radikalbildung zu einem beschleunigten Abbau von NO führen<sup>38</sup>. Noch bevor NO als EDRF identifiziert wurde, war bekannt, dass die Halbwertszeit von EDRF durch Zugabe der Superoxiddismutase verlängert werden konnte. Am Rattenmodell des Streptozotocin-induzierten Diabetes ist die Endothel-abhängige Dilatation ebenfalls eingeschränkt<sup>96</sup>. In Gefäßen dieser Tiere wurde eine Überexpression einer dysfunktionalen NO-Synthase

nachgewiesen, welche eine reduzierte NO-Produktion und eine auf das 3-fache gesteigerte Superoxidanionenproduktion aufwies. Weiterhin war die Aktivität der NADPH-Oxidase signifikant gesteigert, was ebenfalls eine gesteigerte Superoxidanionenproduktion zur Folge hat. In einer Untersuchung von Arcaro et al.<sup>97</sup> wurde gesunden Probanden Insulin und Glukose parallel infundiert. Dies führte zu einer signifikanten Verringerung der FMD im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Wurde hingegen Vitamin C als Antioxidanz parallel infundiert, kam es zu keiner Einschränkung. Bei Personen mit Hypercholesterinämie zeigt sich nach Infusion von Vitamin C ebenfalls eine Verbesserung der verminderten Endothel-abhängigen Dilatation<sup>98</sup>. Bei experimentellen Untersuchungen an menschlichen Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVECs) führt die Inkubation mit oxLDL zu einer Steigerung der NADPH-Oxidase Expression mit gesteigerter Superoxidanionen-Produktion<sup>99</sup>. Am Rattenmodell der Angiotensin-II-induzierten arteriellen Hypertonie konnte ebenfalls eine gesteigerte Superoxidanionen-Produktion nachgewiesen werden.

Durch die Infusion von Superoxiddismutase konnte die verminderte Endothel-abhängige Dilatation und der erhöhte arterielle Blutdruck normalisiert werden<sup>100</sup>. Die für eine essentielle Hypertonie charakteristische verstärkte kontraktile Wirkung von Noradrenalin auf die Gefäßwand konnte durch Antioxidanzien verhindert werden<sup>101</sup>. Nach Applikation von Vitamin C zeigten Hypertoniker eine mit Normotonikern vergleichbare Kontraktion der Widerstandsgefäße durch Noradrenalin. Bei Rauchern kann durch eine Vitamin E Gabe die FMD akut gesteigert werden<sup>102</sup>. Neben der Deaktivierung von NO scheint oxidativer Stress über eine Hemmung der NO-Synthese zu einer verminderten Vasodilatation beizutragen. Für alle klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wurde der Nachweis erbracht, dass sie zu einer Verminderung von bioaktivem NO führen.

Als Ursache für die beobachtete Einschränkung der FMD bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK kommt neben einer verminderten NO-Synthese bzw. Menge an bioaktivem NO, eine

verminderte NO-Wirkung in Betracht<sup>61</sup>. Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Untersuchung neben der FMD, auch die Endothel-unabhängige Dilatation nach oraler Gabe von GTN quantifiziert. In Einklang mit anderen Untersuchungen zeigte sich in dem Kollektiv mit bekannter KHK eine verminderte Endothel-unabhängige Dilatation als Hinweis auf einen zunehmenden Umbauprozess innerhalb der Gefäßwand<sup>24;61</sup>. Der relative Anteil der FMD, bezogen auf die durch GTN-induzierte Dilatation, war bei Personen mit bekannter KHK kleiner als im Kontrollkollektiv.

Daraus wurde abgeleitet, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren zu einer eigenständigen Störung der Endothel-abhängigen Komponente der Vasorelaxation führen und die gefundene Reduktion der FMD bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK nicht allein durch eine eingeschränkte NO-Sensitivität erklärt werden kann.

#### **4.4. Klinische Bedeutung und Ausblick**

Erst in den letzten Jahren konnte der Nachweis erbracht werden, dass ein Zusammenhang zwischen der vaskulären Dysfunktion und der Prognose einer koronaren Herzkrankheit besteht. Durch die Etablierung neuer Biomarker ist es möglich das kardiovaskuläre Risiko schon frühzeitig abschätzen zu können und noch vor einer irreversiblen Manifestation zu intervenieren.

Bevor ein neu etablierter Biomarker allerdings Einzug in die klinische Routinediagnostik erhält, muss dieser erst den Anforderungen eines geeigneten Biomarkers ausreichend gerecht werden.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, dass Patienten mit einer bekannten KHK über eine verminderte Nitrit-Reserve verfügen im Vergleich zu Personen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren. Die Messung der Nitrit-Reserve stellt ein sensitives Verfahren dar, allerdings muss die Analysemethodik noch so weiterentwickelt werden, dass diese ubiquitär durch eine kostengünstige und

leichte Handhabung in der klinischen Routine eingesetzt werden kann. Die Möglichkeit der Lagerung nitrithaltiger Proben über einen gewissen Zeitraum, die in den eigenen Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, stellt hier bereits einen guten Ansatz dar. Darüber hinaus konnte in Untersuchungen von Kleinbongard et al. gezeigt werden, dass die Nitritkonzentration normalverteilt ist<sup>37</sup>.

Durch die Etablierung der Nitrit-Reserve als einen sensitiven und spezifischen Biomarker könnte somit die Früherkennung eines bestehenden kardiovaskulären Risikos ermöglicht werden. Dieser Früherkennung kommt eine entscheidende Rolle zu, da die zugrunde liegende vaskuläre Funktionsstörung zu diesem Zeitpunkt zumindest in Teilen rückführbar sein kann<sup>3;103</sup>. So beruht die Therapie der Arteriosklerose zu großen Teilen auf einer Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren. Bei einigen Therapiensätzen hat sich gezeigt, dass ACE- und CSE-Hemmer neben ihren ursprünglich bekannten Wirkungen<sup>104</sup> auch die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen können und dadurch einen direkten Einfluss auf die vaskuläre Dysfunktion haben<sup>105;106</sup>. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass körperliches Training mit einer Verminderung der vaskulären Dysfunktion einhergeht<sup>103</sup>. Somit stellt die vaskuläre Dysfunktion ein kausales Bindeglied und dadurch eine therapeutische Zielgröße in der Prophylaxe und Therapie einer Arteriosklerose dar<sup>21</sup>. Durch die Etablierung der Nitrit-Reserve als serologischen Marker könnte es nun möglich sein, die endotheliale Dysfunktion in die individual-spezifische Risikostratifizierung mit einzubeziehen. Zudem könnten Behandlungserfolge nun durch einen einfachen Bluttest objektiviert werden. Vor dem Einsatz in die klinische Routine müssen allerdings physiologische und pharmakologische Einflüsse genauer identifiziert und Normalwerte in epidemiologischen, prospektiven Studien an großen Fallzahlen etabliert werden. Auch die prognostische Wertigkeit muss noch in Längsschnitt-Untersuchungen nachgewiesen werden.

## 5. Zusammenfassung

Die morphologischen und funktionellen Veränderungen des Gefäßendothels scheinen eine entscheidende Rolle in der Entstehung einer Arteriosklerose, als auch in deren Progress zu spielen. In diesem Zusammenhang wurde in zahlreichen Arbeiten die Bedeutung des L-Arginin-Stickstoffmonoxid(NO)-Stoffwechselweges für die Endothelfunktion nahe gelegt. NO beeinflusst direkt Schlüsselprozesse, die für die Entwicklung einer Arteriosklerose bedeutend sind. Die klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren sind mit einer vaskulären Dysfunktion assoziiert und scheinen hierüber ihre proatherogene Wirkung zu vermitteln. Neuere klinische Ansätze deuten darauf hin, dass eine vaskuläre Dysfunktion therapeutisch rückführbar sein kann. Trotz der enormen sozioökonomischen Bedeutung, die der Früherkennung zukommt, konnte bisher noch kein einfaches Verfahren zur Früherkennung einer Arteriosklerose etabliert werden, welches in der klinischen Routine eingesetzt werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher einen serologischen Biomarker zur Diagnose der vaskulären Dysfunktion zu identifizieren. Untersuchungen der letzten Jahre wiesen nach, dass Nitrit akute Änderungen der NOS-Aktivität widerspiegelt. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die plasmatische Nitrit-Reserve als direkter serologischer Marker der vaskulären Dysfunktion dienen kann. Daher wurde sowohl die plasmatische Nitrit-Reserve, als auch die Fluss-abhängige Dilatation der Arteria brachialis als etablierter nicht-invasiver Parameter einer vaskulären Dysfunktion bei Normalpersonen und bei Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren und bekannter KHK bestimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- (1.) Die plasmatische Nitrit-Reserve ist bei Personen mit koronarer Herzkrankheit nach fahrradergometrischer Belastung vermindert.
- (2.) Die plasmatische Nitrit-Reserve korreliert mit der Höhe der Fluss-abhängigen Dilatation der Arteria brachialis.
- (3.) Bei einer Nitrit-Reserve im Plasma von 14,5% ergab sich im Vier-Felder-Test eine Sensitivität von 93% und eine Spezifität von 66%.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass die Bestimmung der plasmatischen Nitrit-Reserve nach fahrradergometrischer Belastung zur Identifikation von Patienten mit KHK geeignet sein könnte. Untersuchungen an größeren Kollektiven und eine Weiterentwicklung der Analytik sollten hierzu zukünftig durchgeführt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Engl J Med.* 1997;337:1360-1369.
2. Breslow JR. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med.* 1997;3:600-601.
3. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: Does it matter ? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:325-333.
4. Stary HC, Bleakley Chandler A, 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. *Circ Res.* 1994;89:2462-2478.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Scharf RE, Harker LA. Thrombosis and atherosclerosis: regulatory role of interactions among blood components and endothelium. *Blut.* 1987;55:131-144.
9. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.
10. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol.* 1999;94:295-314.
11. Stampfer MJ, Ridker PM, Dzau VJ. Risk factor criteria. *Circ Res.* 2004;109:IV-3-IV-5.
12. Ridker PM. Clinical application of c-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation.* 2003;107:363-369.

13. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive Protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*. 2003;108:1930-1932.
14. Smitzko PE, Wang CH, Weisel RD. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circ Res*. 2003;108:1917-1923.
15. Torres JL, Ridker PM. Clinical use of high-sensitivity C-reactive protein for the prediction of adverse cardiovascular events. *Curr Opin Cardiol*. 2003;18:471-478.
16. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circ Res*. 1998;98:2241-2247.
17. Ridker PM, Vaughan DE, Stampfer MJ. Endogenous tissue-type plasminogen activator and risk of myocardial infarction. *Lancet*. 1993;341:1165-1168.
18. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer MJ. Prospective study of endogenous tissue plasminogen activator and risk of stroke. *Lancet*. 1994;343:940-943.
19. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Jawahar LM. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circ Res*. 2004;109:IV-6-IV-19.
20. Danesh J, Whincup P, Walker M, et al. Fibrin D-dimer and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. *Circ Res*. 2001;103:2323-2327.
21. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion: therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist*. 1999;40:1300-1307.
22. 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.
23. 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.
24. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler 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.

25. 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.
26. Ludwig M, von Petzinger-Kruthoff A, von Buquoy M, Stumpe KO. Intima-Media-Dicke der Karotisarterien: Früher Indikator für Arteriosklerose und therapeutischer Endpunkt. *Ultraschall in Med*. 2003;24:162-174.
27. Zotz RB, Klein M, Dauben HP, Moser C, Gams E, Scharf RE. Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: platelet GP IIIa polymorphism (HPA-1b/PIA2) is a risk factor for bypass occlusion, myocardial infarction, and death. *Thromb Haemost*. 2000;83:404-407.
28. Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/PIA2) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 1998;79:731-735.
29. Zotz RB, Winkelmann BR, Muller C, Boehm BO, Marz W, Scharf RE. Association of polymorphisms of platelet membrane integrins alpha IIb(beta)3 (HPA-1b/PI) and alpha2(beta)1 (alpha807TT) with premature myocardial infarction. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1522-1529.
30. Gibbons GH, Choong CL, Goodarzi MO, Rotter JI, Hsueh WA, Siragy HM, Pratt R, Dzau VJ. Genetic markers: progress and potential for cardiovascular disease. *Circ Res*. 2004;109:IV-47-IV-58.
31. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66:1561-1575.
32. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80:3-6.
33. 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 USA*. 2001;98:12814-12819.
34. 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.
35. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects

- constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:790-796.
36. Lauer T, Kleinbongard P, Preik M, Rauch BH, Deussen A, Feelisch M, Strauer BE, Kelm M. Direct biochemical evidence for eNOS stimulation by bradykinin in the human forearm vasculature. *Basic Res Cardiol.* 2003;98:84-89.
  37. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax TW, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz R, Scharf R, Willers R, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrit reflects endothelial dysfunction and cardiovascular risk load in humans. ? 2005;:-.
  38. Cai H, Harrison DG. Endotheliale Dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
  39. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney jr JF. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med.* 1997;337:408-416.
  40. Joint National Committee on Detection EaToHBP. Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, and Treatment of High Blood Pressure (JNC VI). *Arch Intern Med.* 1997;157:2413-2446.
  41. Chalmers J. WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 World Health Organization- International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens.* 1999;17:151-185.
  42. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications -Report of a WHO Consultation -Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *WHO Offset Publication.* 1999.
  43. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183-1197.
  44. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
  45. Celermajer DS. Testing Endothelial Function Using Ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
  46. Preik M, Lauer T, Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated Ultrasonic Measurement of Human Arteries for the

Determination of Endothelial Function. *Ultraschall Med.* 2000;21:195-198.

47. Poddar R, Sivasubramanian N, Di Bello PM, et al. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 und interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circ Res.* 2001;103:2717-2723.
48. Stehouwer CDA. Is measurement of endothelial dysfunction clinically useful? *Eur J Clin Invest.* 1999;29:459-461.
49. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.
50. Kelm M, Feelisch M, Grube R, Motz W, Strauer BE. Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood. In: The biology of nitric oxide. 1 Physiological and clinical aspects. Moncada S, Marletta MA, Hibbs jr JB, Higgs EA, eds. 1992. Portland Press, London, Colchester.
51. Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein containing sample. *Methods Enzymol.* 2002;359:158-168.
52. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdeheuil 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.
53. 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.
54. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Kerber S, Gharini P, Zotz R, Scharf R, Feelisch M, Kelm M. Nitrite in human plasma: An index for NO-availability in individuals with cardiovascular risk factors. (in press).
55. Preik-Steinhoff H, Kelm M. Determination of nitrite in human blood by combination of a specific sample preparation with highperformance anion-exchange chromatography and electrochemical determination. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;685:348-352.
56. Rhodes PM, Leone AM, Francis PL, Struthers AD, Moncada S. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;209:590-596.

57. Kelm M, Schulz K, Kerber S, Ladda S. Pitfalls in biochemical analysis of plasma nitrite: a marker of endothelial derived nitric oxide. *Circulation*. 1999;100:1-49.
58. Takenaka N, Daimon T, Ueda A, Sato K, Kitano M, Bandow H, Maeda Y. Fast oxidation reaction of nitrite by dissolved oxygen in the freezing process in the tropospheric aqueous phase. *J Atmospher Chem*. 1998;29:135-150.
59. Betterton EA, Anderson DJ. Autoxidation of N(III), S(IV), and other species in frozen solution - A possible pathway for enhanced chemical transformation in freezing systems. *J Atmospher Chem*. 2001;40:171-189.
60. Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries in Vivo. *Circulation*. 1995;91(5):1314-1319.
61. Adams MR, Robinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:123-127.
62. Etsuda H, Takase B, Uehata A, Kusano H, Hamabe A, Kuhara R, Akima T, Matsushima Y, Arakawa K, Satomura K, Kurita A, Ohsuzu F. Morning Attenuation of Endothelium-Dependent, Flow-Mediated Dilatation in Healthy Young Men: Possible Connection to Morning Peak of Cardiac Events? *Clin Cardiol*. 1999;22:417-421.
63. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation*. 1995;92:3431-3435.
64. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:146-154.
65. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol*. 1997;79:350-354.
66. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Häring H-U. Indikatoren einer beginnenden Atherosklerose: Erfassung der endothelialen Dysfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall in Med*. 2003;24:153-161.
67. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Taylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental

stress induces transient endothelial dysfunction in humans. *Circulation*. 2000;102:2473-2478.

68. Lekakis JP, Papamichael CM, Vemmos CN, Nanas J, Kontoyannis D, Stamatelopoulos S, Mouloupoulos S. Effect of Acute Cigarette Smoking on Endothelium-Dependent Brachial Artery Dilatation in Healthy Individuals. *Am J Cardiol*. 1997;79:529-531.
69. Leeson P, Thorne S, Donald A, Mullen M, Clarkson P, Deanfield J. Non-invasive measurement of endothelial function: effect on brachial artery dilatation of graded endothelial dependent and independent stimuli. *Heart*. 1997;78:22-27.
70. Bressler B, Chan S, Mancini GB. Temporal response of brachial artery dilation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol*. 2000;85:396-400.
71. Celermajer DS. Endothelial function using ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
72. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelthaler DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-253.
73. Wendelhag I, Gustavsson T, Suurkula M, Berglund G, Wikstrand J. Ultrasound measurement of wallthickness in the carotid artery: fundamental principles and description of a computerized analysing system. *Clin Physiol*. 1991;11:565-577.
74. Jarvisalo MJ, Ronnema T, Volanen I, Kaitosaari T, Kallio K, Hartiala JJ, Irjala K, Viikari JS, Simell O, Raitakari OT. Brachial artery dilatation responses in healthy children and adolescents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H87-H92.
75. Balletshofer BM, Goebbel S, Rittig K, Lehn-Stefan A, Renn W, Enderle M, Dietz K, Haring HU. [Influence of experience on intra- and interindividual variability in assessing peripheral endothelial dysfunction with high resolution ultrasound]. *Ultraschall Med*. 2001;22:231-235.
76. Preik M, Lauer T, Heiß C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated ultrasonic measurement of human arteries for the determination of endothelial function. *Ultraschall in Medizin*. 2000;21:195-198.
77. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1276-1283.

78. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1441-1448.
79. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA*. 2003;290:1030-1031.
80. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. The effects of age and gender on brachial artery endothelium-dependent vasoactivity are stimulus-dependent. *Clin Cardiol*. 1995;18:471-476.
81. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang K-T, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:8757-8761.
82. 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.
83. 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.
84. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide, biology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142.
85. Brown MD, Srinivasan M, Hogikyan RV, Dengel DR, Glickmann SG, Galecki A, Supiano.M.A. Nitric oxide biomarkers increase during exercise-induced vasodilation in the forearm. *Int J Sports Med*. 2000;21:83-89.
86. Allen JD, Cobb FR, Gow AJ. Regional and whole-body markers of nitric oxide production following hyperemic stimuli. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:1164-1169.
87. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO-bioavailability in human blood. *News Physiol Sci*. 2002;17:251-255.
88. 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 of interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circ Res*. 2001;103:1282-1288.
89. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds L-J, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in

healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation*. 2001;104:1905-1910.

90. Silvestro A, Scopacasa F, Oliva G, de Cristofaro T, Iuliano L, Brevetti G. Vitamin C prevents endothelial dysfunction induced by acute exercise in patients with intermittend claudication. *Atherosclerosis*. 2002;165:277-283.
91. Hollenbeck M, Voiculescu A, Hetzel GR, Sandmann W, Modder U, Grabensee B. Arteriosclerotic renal artery stenosis. Significance, diagnosis and therapy options. *Med Klin (Munich)*. 2002;97:335-343.
92. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:318-322.
93. Neunteufl T, Katzenschlager R, Hassan A, Klaar U, Schwarzacher S, Glogar D, Bauer P, Weidinger F. Systemic endothelial dysfunction is related to the extent and severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 1997;129:111-118.
94. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1235-1241.
95. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Lüscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319.
96. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circ Res*. 2001;88:e14-e22.
97. 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.
98. 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.
99. Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski H-R, Morawietz H. Induction of NAD(P)H Oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation*. 2001;104:1767-1772.

100. 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.
101. Lembo G, Vecchione C, Izzo R, Fratta L, Fontana D, Marino G, Pilato G, Trimarco B. Noradrenergic vascular hyper-responsiveness in human hypertension is dependent on oxygen free radical impairment of nitric oxide activity. *Circulation*. 2000;102:552-557.
102. 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.
103. 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.
104. Hetzel GR, Hollenbeck M, Voiculescu A, Malms J, Cohnen M, Willers R, Mödder U, Grabensee B. Effect of acute intravenous ace-inhibition on the intrarenal doppler flow characteristics in hypertensive patients with and without unilateral renal artery stenosis. *Clin Exp Hypertens*. 2000;22:571-581.
105. 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.
106. 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.

## 7. Veröffentlichungen

### A. Originalarbeiten:

Rassaf, T., Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., **Mangold, S.**, Leyendecker, T., Rottler, J., Drexhage, C., Meyer, C., Kelm, M.: Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity; Br J Sports Med. 2007 Oct; 41 (10):669-73

Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Kehmeier, E., **Mangold, S.**, Leyendecker, T., Rottler, J., Meyer, C., Merx, MW, Kelm, M., Rassaf, T.: Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. Basic Res Cardiol. 2008 May:103(3):291-7. Epub 2008 Mar 17

### B. Abstracts:

Rassaf, T., Balzer, J., Jax, T., Kleinbongard, P., **Mangold, S.**, Leyendecker, T., Rottler, J., Kelm, M., Lauer, T.: Plasma Nitrite-Reserve as a Marker for Endothelial Dysfunction; Posterpräsentation auf dem International World Congress on Nitrite (National Institute of Health, MD, USA) (Sept. 2005)

Lauer, T., Rassaf, T., **Mangold, S.**, Leyendecker, T., Rottler, J., Kleinbongard, P., Kelm, M.: Plasma Nitrit-Reserve als Marker einer Endothelialen Dysfunktion; Z. Kardiol 94 (Suppl.): 1 (2005)

## **8. Danksagung**

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

Herrn Dr. med. Thomas Lauer und Herrn Dr. med. Tienush Rassaf danke ich für ihre hervorragende Betreuung. Herrn Dr. med. Thomas Lauer danke ich dabei besonders für sein kritisches Korrekturlesen und seine Hilfe während des Zusammenschreibens dieser Arbeit. Ihre niemals ermüdbare Motivation „auch das Positive zu sehen“ und ihr stets kompetenter Einsatz waren mir eine sehr wertvolle Unterstützung. Ihre Begeisterung und ihr Engagement am wissenschaftlichen Arbeiten werden mir in eindrucksvoller Erinnerung bleiben.

Fr. Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard danke ich für ihre Hilfe, sowohl für ihre konstruktiven Vorschläge, ihre Betreuung im Labor als auch für die Hilfe bei der Rekrutierung vieler unserer Probanden.

Herrn Dr. med. Jan Balzer danke ich sehr für seine Bereitschaft uns jederzeit tatkräftig bei den Versuchen zu unterstützen.

Herrn Dr. med. Mirko Robenek und Herrn Dr. med. Nadjib Shahab danke ich für die Hilfe bei der Rekrutierung unserer Patienten.

Frau MTA Simone Matern danke ich ebenfalls für ihre stets zuverlässige Hilfsbereitschaft.

Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des kardiologischen Labors danke ich für eine äußerst lehr- und erfahrungsreiche Zeit, für ihre Unterstützung und Hilfestellung während der Durchführung dieser Arbeit.

Am meisten möchte ich meiner lieben Familie danken, die mir durch ihren Rückhalt, ihre lieben Worte und ihren Glauben an mich stets eine unschätzbare wertvolle Unterstützung sind. In Liebe und Dankbarkeit widme ich meinen Eltern diese Arbeit.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Sarah Jasmin Laureen Mangold  
Geburtsdatum: 12.04.1982  
Geburtsort: Meerbusch  
Konfession: römisch-katholisch  
Eltern: Guido Derek Sidney Meyer-Mangold  
Sigrid Mangold  
Geschwister: Guido-Alexander Mangold

### Schulbildung:

1988 - 1992 Grundschole Bellenweg in Krefeld-Forstwald  
1992 - 2001 Arndt-Gymnasium in Krefeld mit Erlangung der  
Allgemeinen Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

10/2001 Beginn des humanmedizinischen Studiums an  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
09/2003 Ärztliche Vorprüfung  
08/2008 Immatrikulation und Beginn des Praktischen  
Jahres am Universitätsklinikum der RWTH  
Aachen  
11/2007 Zweite Ärztliche Prüfung

### Beruflicher Werdegang:

Seit 03/2008 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und  
Jugendmedizin, Universitätsklinikum der RWTH  
Aachen

