

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

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

**Lebensalter und endotheliale Dysfunktion:
Veränderungen funktioneller, struktureller und biochemischer
Kenngrößen der Endothelfunktion**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jessica Rottler

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. M. Kelm

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke

Meinen lieben Eltern gewidmet

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADA	American Diabetes Association
AHA	American Heart Association
BMI	Body-mass-index
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz-Detektion
CRP	C-reaktives Protein
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
EDHF	endothelialer hyperpolarisierender Faktor
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMD	Flow Mediated Dilation (flussvermittelte Dilatation)
GTN	Glyzeroltrinitrat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
I ⁻	Iodid
IMT	Intima Media Thickness (Intima-Media-Dicke)
JNC	Joint National Committee
KHK	koronare Herzkrankheit
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
MACE	Major Adverse Cardiac Event
MAP	Mean arterial pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
Min.	Minute
MOD	Magneto Optical Disc
MW	Mittelwert
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NYHA	New York Heart Association
NO [·]	Stickstoffmonoxid (*)
NO ₂	Stickstoffdioxid
NO ⁺	Nitrosoniumion
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat

NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
O ₂ ⁻	Superoxidanion (*)
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1)
PBS	Saliner Phosphatpuffer
PW-Doppler	Pulsed Wave-Doppler
SE	Standard Error (Standardfehler)
Tab.	Tabelle
tPA	Tissue Plasminogen Aktivator
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
vWF	von-Willebrand-Faktor
VCL	Vanadiumchlorid
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheits- organisation)

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

1.	Einleitung	8
1.1.	Bedeutung der Arteriosklerose.....	8
1.2.	Marker einer endothelialen Dysfunktion	9
1.2.1.	Funktionelle Marker.....	9
1.2.2.	Strukturelle Marker.....	10
1.2.3.	Serologische Marker	10
1.2.4.	Plasmatisches Nitrit als Biomarker.....	11
1.2.5.	Definition der plasmatischen Nitrit-Reserve	13
1.3.	Lebensalter und endotheliale Dysfunktion	14
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Studienprotokoll	16
2.2.	Studienkollektiv	16
2.3.	Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der Endothel- abhängigen und Endothel-unabhängigen Dilatation der Arteria brachialis.....	18
2.3.1.	Untersuchungsprotokoll	19
2.3.2.	Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung des Durch- messers der Arteria brachialis.....	21
2.3.3.	Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der Intima- Media-Dicke (IMT).....	23
2.4.	Untersuchungsprotokoll der fahrradergometrischen Belastung ..	25
2.5.	Biochemische Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma.....	26
2.5.1.	Blutentnahme und Probenaufbereitung.....	26
2.5.2.	Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels Gasphasen-Chemilumineszenz	27
2.5.3.	Bestimmung der Nitratkonzentration mittels Vanadium(III)-Chlorid- FIA (VCL-FIA)	29
2.6.	Mathematisch-statistische Methoden	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Validierung zur automatischen Vermessung des Diameters der Arteria brachialis	32

3.2.	Charakterisierung der Studienpopulation	33
3.3.	Funktionelle und strukturelle Veränderungen peripherer Leitungs- arterien	34
3.3.1.	Endothel-abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien	34
3.3.2.	Strukturelle Eigenschaften der Gefäßwand	35
3.4.	Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite.....	36
3.5.	Korrelation zwischen dem Alter und der funktionellen, strukturellen und biochemischen Kenngröße der endothelialen Dysfunktion	38
3.6.	Korrelation zwischen der strukturellen und funktionellen Veränder- ung und der biochemischen Kenngrößen der endothelialen Dysfunktion	39
4.	Diskussion.....	40
4.1.	Methodenkritik.....	41
4.1.1.	Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der Fluss- vermittelten-Dilatation	41
4.1.2.	Messung der Intima-Media-Dicke.....	45
4.1.3.	Quantifizierung der zirkulierenden NO-Metabolite.....	47
4.1.4.	Ausbelastungskriterien der fahrradergometrischen Belastung....	49
4.2.	Einfluss des Alters auf funktionelle und strukturelle Kenngrößen peripherer Leitungsarterien	50
4.3.	Einfluss des Alters auf biochemische Kenngrößen	54
4.4.	Klinische Bedeutung und Ausblick	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Veröffentlichungen	70
8.	Danksagung.....	71
9.	Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Arteriosklerose

Die Hauptursache für kardiovaskuläre Erkrankungen ist die Arteriosklerose, welche sich auf dem Boden einer endothelialen Dysfunktion entwickelt^{1:2}. Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch progressive Erkrankung aller Arterien. Hierbei kommt es zu einer entzündlichen Erkrankung der arteriellen Blutgefäße mit Makrophagen- und Lymphozyteninfiltration in die Gefäßintima. Frühste arteriosklerotische Veränderungen ließen sich bereits im Kindesalter nachweisen³. Im weiteren Verlauf entstehen zusätzlich extrazelluläre Fettablagerungen, sowie regressive Veränderungen mit einem bindegewebigen Umbau und Verkalkungen, welche als fortgeschrittene Läsion oder Plaques bezeichnet werden⁴. Diese können entweder zu einer progressiven hämodynamisch relevanten Einengung führen oder durch ein appositionelles Thrombuswachstum auf dem Boden eines rupturierten Plaque akute ischämische Ereignisse, wie einen Myokardinfarkt und Schlaganfall, hervorrufen^{5:6}. Häufig kommen die betroffenen Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium in die Klinik, wenn bereits Beschwerden mit eingetretenen Organschädigungen (z.B. koronare Herzerkrankung, periphere arterielle und cerebrovaskuläre Verschlusskrankheiten, Nephrokalzinose) vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt eine Diagnostik und Therapie mit aufwendigen und kostenintensiven interventionellen und chirurgischen Revaskularisationsverfahren, sowie mit einer stetig wachsenden medikamentösen Therapie. Dies hat zur Folge, dass die Patienten in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sind und der Volkswirtschaft nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr zur Verfügung stehen.

Da die sozioökonomischen Auswirkungen sehr beträchtlich sind, ist es von entscheidender Bedeutung das Krankheitsgeschehen in seiner frühesten Entwicklung zu diagnostizieren und zu therapieren. Die Entwicklung der Arteriosklerose beginnt allerdings schon zu einem früheren Zeitpunkt. Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktion im Sinne einer endothelialen Dysfunktion spielen sowohl in der Entstehung als auch in der Progression einer Arteriosklerose eine zentrale Rolle und sind bereits viele Jahre vor einer manifesten Organschädigung nachweisbar. Eine verminderte

NO-Bioverfügbarkeit ist hierbei von besonderer Bedeutung. Daher wurden in den vergangenen Jahren enorme Anstrengungen zur Entwicklung und Etablierung von neuen Biomarkern einer endothelialen Dysfunktion unternommen.

1.2. Marker einer endothelialen Dysfunktion

1.2.1. Funktionelle Marker

Ein attraktiver, funktioneller Marker⁷ ist die Bestimmung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe invasiver und nicht-invasiver Untersuchungstechniken, welche auf der Bestimmung der Endothel-abhängigen Dilatation beruhen^{8;9} (Tab. 1).

Tabelle 1:

Klinische Anwendbarkeit funktioneller Marker einer kardiovaskulären Erkrankung

Funktionelle Marker	verfügbare Methode	standardisierte Methode	Sensitivität/ Spezifität	identifiziert Schwere der Krankheit	Veränderung bei Therapie der Erkrankung
Endotheliale Dysfunktion	+	+	++	++	+

Als Goldstandard wird die intraarterielle Gabe von Acetylcholin angesehen, welches zu einer Vasorelaxation führt¹⁰⁻¹². Allerdings ist dieses Verfahren nicht spezifisch für Stickstoffmonoxid (NO), da es zu einer Stimulation der endothelialen Synthese von Prostacyclin, dem endothelialen hyperpolarisierenden Faktor (EDHF) und NO kommt⁹. Ein anderes etabliertes, nicht-invasives Verfahren, welches ausschließlich durch endotheliales NO vermittelt wird, stellt die Fluss-medierte-Dilatation (FMD) dar. Dieses Verfahren beruht auf einer scherkraftinduzierten Stimulation der NO-Synthese, wodurch es zu einer Endothel-abhängigen Dilatation kommt. Hierbei wird die Arteria brachialis mittels eines hochauflösenden Ultraschalls gemessen. Zahlreiche Studien belegen die Bedeutung der Diagnostik einer endothelialen Dysfunktion in der Früherkennung der Arteriosklerose, Therapiekontrolle und Risikostratifizierung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Die Messung der FMD eignet sich prinzipiell sowohl für Verlaufsuntersuchungen zur Abschätzung prognostischer Indices als auch von Therapieinterventionen. Diese wird aber in der täglichen klinischen Routine noch nicht eingesetzt. Als mögliche Gründe hierfür kommt der große zeitliche

Aufwand, die hohen Kosten für die Geräte und die hohen Variabilitäten der Untersuchungen in Betracht.

1.2.2. Strukturelle Marker

Als ein attraktiver, struktureller Marker¹³ kardiovaskulärer Erkrankungen wird die Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMT) angesehen (Tab. 2), welche mittels Ultraschall an der Arteria brachialis oder Arteria carotis durchgeführt wird.

Tabelle 2:

Klinische Anwendbarkeit struktureller Marker einer kardiovaskulären Erkrankung.

Strukturelle Marker	verfügbare Methode	standardisierte Methode	Sensitivität/ Spezifität	identifiziert Schwere der Krankheit	Veränderung bei Therapie der Erkrankung
Intima-Media-Dicke	++	++	++	++	+

Auch bei der Bestimmung der IMT handelt es sich um ein nicht-invasives, reproduzierbares und zuverlässiges Verfahren, welches die arteriosklerotischen Wandveränderungen ermitteln kann, bevor ein Eingriff in das Lumen stattfindet. Um Gefäßwandveränderungen unter pathologischen Bedingungen beurteilen zu können, ist die Kenntnis einer physiologischen Arterienwanddicke erforderlich¹⁴. Hierzu wären altersabhängige und geschlechtsspezifische Unterschiede an großen Kollektiven erforderlich. Allerdings liegen solche standardisierten Untersuchungen mit den entsprechenden Werten noch nicht vor^{13;14}.

1.2.3. Serologische Marker

Die Bestimmung serologischer Biomarker¹⁵ ermöglicht eine Beurteilung biologischer Prozesse, welche in der Pathophysiologie der Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen. Zahlreiche mögliche Biomarker, die bei Entzündungsreaktionen, bei der Homöostase, der Fibrinolyse und beim oxidativen Stress eine wichtige Rolle spielen, zeigten bereits gute Ansätze in der Vorhersage zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse.

Zu den serologischen Markern zählen beispielsweise das hoch-sensitive C-reaktive Protein (hsCRP), Interleukin-6 und -8, Myeloperoxidase, tPA, Fibrinogen, Homocystein, Lipoprotein(a), die LDL Partikelgröße und oxidiertes

LDL¹⁵. Allerdings liefert keiner dieser Biomarker, mit Ausnahme von hsCRP, additive Informationen zu den bestehenden Risikoabschätzungen, wie dem Framingham Risk Score. Das CRP, als inflammatorischer Marker, kann daher als potentieller Marker für das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung dienen. Vorteilhaft ist, dass dieser Parameter mit verschiedenen standardisierten, validen und kostengünstigen Analysemethoden gemessen werden kann¹⁶. Ein neuer, attraktiver Ansatz wurde in Vorarbeiten dieser Untersuchung etabliert. Hierbei handelt es sich um die Nitrit-Reserve, welche bei einer endothelialen Dysfunktion vermindert ist¹⁷⁻¹⁹.

1.2.4. Plasmatisches Nitrit als Biomarker

Das vaskuläre Endothel ist ein außerordentlich aktives auto- und parakrines Organ²⁰, welches für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion von essentieller Bedeutung ist⁹. In diesem Zusammenhang kommt Stickstoffmonoxid (NO), welches aus dem Gefäßendothel in einer Redoxreaktion durch eine endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird^{21;22}, eine besondere Bedeutung zu, da es an allen Funktionen des Endothels beteiligt ist. Das Endothel reguliert die Modulation des Gefäßtonus²³, es hemmt die Thrombozytenaggregation²⁴, sowie die Einwanderung von Entzündungszellen²⁵ und beeinflusst die Architektur der Gefäßwand und der Gefäßpermeabilität⁸.

Störungen dieser Endothelfunktionen werden als endotheliale Dysfunktion bezeichnet⁸ und stellen ein Schlüsselereignis in der Entstehung der Arteriosklerose dar. NO gilt als potentieller Marker für die endotheliale Dysfunktion, allerdings kann es *in vivo* nicht bestimmt werden. NO ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron. Es kann über die Zellmembran aus der Endothelzelle heraus in das Gefäßlumen diffundieren. In biologischen Medien ist NO sehr labil und hat im Vollblut nur eine sehr kurze Halbwertszeit²⁶. Während NO in der glatten Muskelzelle der Gefäßwand über die Aktivierung der Guanylatzyklase und eine Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) vasodilatatorisch wirkt, wird es im Vollblut oxidativ zu Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) abgebaut²⁶. Der größte Teil des endothelial gebildeten NOs wird im Plasma in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff (O₂) unmittelbar zu Nitrit oxidiert^{27;28}.

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Nitrit die akuten und chronischen Veränderungen der eNOS-Aktivität widerspiegelt^{27;29;30}.

Untersuchungen von Lauer et al.²⁷ am Gefäßbett des Unterarms belegen die Spezifität von Nitrit als einen Indikator für die basale endotheliale NO-Synthese nach rezeptor- und substratvermittelter Stimulation. In anderen Untersuchungen an transgenen Mäusen (eNOS-knock-out) zeigte sich eine um 50% reduzierte Nitritkonzentration im Plasma im Vergleich zu wild-type Mäusen³⁰. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Nitritkonzentration im Plasma von 350 Blutspendern normal verteilt sind. Aufbauend auf diese Untersuchungen wurden Versuche an Patienten mit einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren durchgeführt³¹, welche zeigten, dass zwar tendentiell eine Abnahme der basalen Nitritkonzentration zu sehen ist, aber dass es aufgrund der hohen Streuung der Konzentrationen zu keinem signifikanten Ergebnis kam (Abb.1). Aus diesem Grund wurde nach einer Alternative gesucht, um einen Biomarker zu finden, welcher in der klinischen Routine einsetzbar ist. In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, welches nicht die basalen Nitritkonzentrationen im Plasma bestimmt, sondern die plasmatische Nitrit-Reserve^{17;32}.

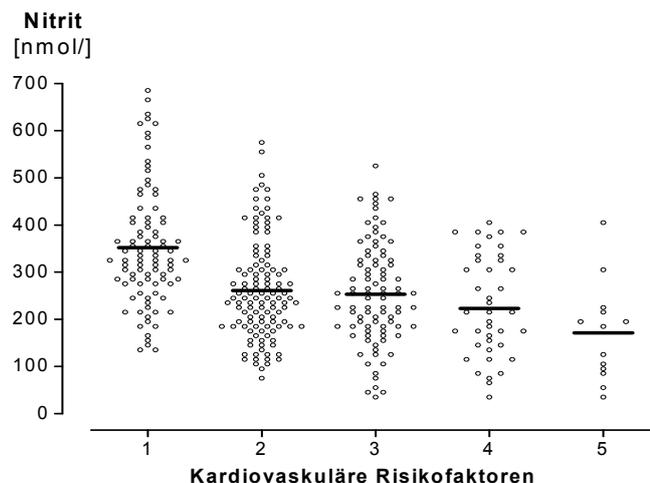


Abbildung 1:

Darstellung der Nitritkonzentration im Plasma in Abhängigkeit von der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Abnahme der Nitritkonzentration zeigt aufgrund einer zu großen Streuung keine signifikanten Unterschiede mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

1.2.5. Definition der plasmatischen Nitrit-Reserve

Der nicht-invasive Goldstandard der Bestimmung einer endothelialen Dysfunktion nutzt als Prinzip eine Einschränkung der scherkraftinduzierten Vasodilatation. Das Prinzip der Bestimmung der plasmatischen Nitrit-Reserve beruht, im Vergleich zur FMD-Messung, auf einer systemischen Scherkraftinduktion mittels der Fahrradergometrie. Hierbei kommt es zu einem noch stärkeren Stimulus für die scherkraftinduzierte eNOS-Aktivierung. Den Probanden wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Blut zur Bestimmung der Nitritkonzentration abgenommen. Die Nitrit-Reserve errechnet sich aus der Differenz der Nitritkonzentration nach Belastung ($\text{NO}_2^-_{\text{post}}$) und der basalen Nitritkonzentration ($\text{NO}_2^-_{\text{prä}}$) im Plasma.

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

In den Vorarbeiten wurde die fahrradergometrische Belastung an 31 gesunden, jungen Probanden durchgeführt. Den Probanden wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 2,5,8,10,15,20,25,30,45,60 Min.) nach Belastung Blut abgenommen. Der größte Nitritanstieg zeigte sich 10 Minuten nach der fahrradergometrischen Belastung (Abb.2).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es bei einem jungen Probandenkollektiv nach fahrradergometrischer Belastung zu einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration im Plasma von maximal $56 \pm 11\%$ kommt.

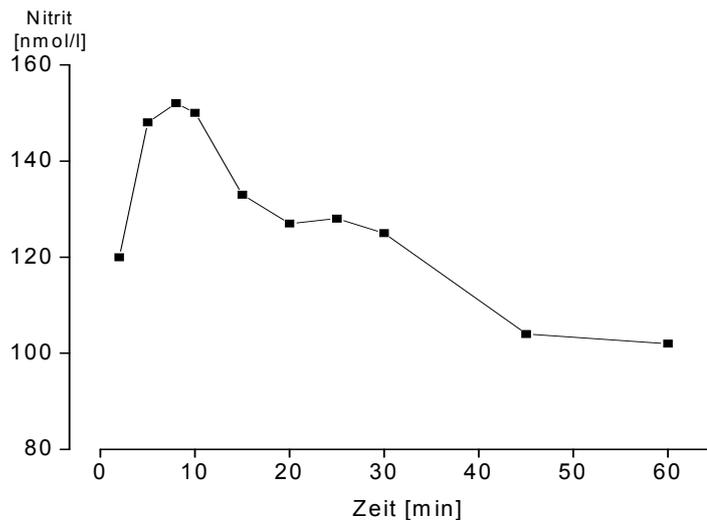


Abbildung 2:

Darstellung der plasmatischen Nitrit-Reserve bei einem gesunden jungen Normalkollektiv. Die Nitritkonzentrationen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der fahradergometrischen Belastung bestimmt. Der größte Anstieg zeigte sich 10 Minuten nach der Belastung.

1.3. Lebensalter und endotheliale Dysfunktion

Eine intakte Funktion des Endothels ist essentiell für die Prävention von vaskulären Schäden und dient somit dem Schutz vor der Entstehung der Arteriosklerose^{33;34}. Eine kontinuierliche Schädigung des Endothels durch Hyperlipidämie, Hypertonie und mechanischen Stress kann zu deutlichen Veränderungen der Morphologie der Endothelzellen führen. Diese Veränderungen können einen Verlust der Orientierung der Endothelzellen, eine verminderte Überschneidung zwischen angrenzenden Endothelzellen oder einen beschleunigten Umsatz der Endothelzellen sein³⁵. Es wurde gezeigt, dass solch eine Schädigung der vaskulären Homöostase zu einer vermehrten Vasokonstriktion, Leukozytenadhärenz, Thrombozytenaggregation, vaskulärer Entzündung und letztlich zu einer Bildung von arteriosklerotischen Plaques führt. Neben anderen Risikofaktoren für die Bildung von Arteriosklerose verursacht auch das Altern eine signifikante Erniedrigung der Endothel-abhängigen Dilatation^{36;37} und fördert die Entstehung der endothelialen Dysfunktion³⁸⁻⁴³. Experimentelle und klinische Untersuchungen zeigen bei älteren Patienten

sowohl ein erhöhtes Risiko für Arteriosklerose als auch schlechtere Resultate nach therapeutischen Interventionen.

Der Grund für diese altersabhängige Veränderung der Gefäßfunktion ist bis heute nicht geklärt^{39;44-46}. Eine Ursache für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion ist eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO²⁷. Im Alter kann es durch einen beschleunigten Abbau von NO, aufgrund des ansteigenden oxidativen Stresses, zu einer Verminderung der Bioverfügbarkeit kommen^{39;43;44;47;48}. Eine andere Möglichkeit besteht in der Hemmung der Bildung von NO, welche durch (1.) eine verminderte eNOS-Expression, (2.) durch einen Substrat- oder Cofaktorenmangel und (3.) durch eine verminderte Aktivität der eNOS entstehen kann.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die nicht-invasive Charakterisierung vaskulärer Veränderungen mit zunehmendem Lebensalter darzustellen.

Vor diesem Hintergrund wurde folgende Hypothese aufgestellt:

Funktionelle, strukturelle und biochemische Kenngrößen der Endothelfunktion sind im Alter verändert.

Hieraus leiteten sich folgende Fragen ab:

(1.) Ist die funktionelle Kenngröße der Endothelfunktion im Alter verändert? Hierzu wurde der altersabhängige Grad der endothelialen Dysfunktion mittels des etablierten nicht-invasiven Verfahrens (FMD-Messung) bei jungen und alten Probanden bestimmt.

(2.) Ist die strukturelle Kenngröße der Endothelfunktion im Alter verändert? Hierzu wurde die IMT mittels Ultraschallmessung bei jungen und alten Probanden bestimmt.

(3.) Ist die biochemische Kenngröße der Endothelfunktion im Alter verändert? Hierzu wurde die Nitrit-Reserve im Plasma während der fahrradergometrischen Belastung bei jungen und alten Probanden bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll der vorliegenden Untersuchung setzt sich aus 4 Teilen zusammen:

- (1.) der Probandenrekrutierung
- (2.) einer Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis zur Bestimmung der FMD und IMT
- (3.) der fahrradergometrischen Belastung
- (4.) den Blutabnahmen vor, sowie 5 und 10 Minuten nach Belastung zur Bestimmung der Nitrit-Reserve.

Alle Studienteilnehmer wurden zunächst in einem Aufklärungsgespräch über die Untersuchungen informiert und bekundeten ihr schriftliches Einverständnis. Nachfolgend wurde eine routinemäßig internistische Anamnese erhoben, insbesondere zur Erfassung von Erkrankungen, kardiovaskulären Risikofaktoren und einer aktuellen Medikation. Zusätzlich wurde ein internistisches Routine-labor bestimmt. Die Untersuchungen wurden jeweils morgens nüchtern durchgeführt. Es erfolgte zunächst eine basale Blutabnahme, aus der Nitrit und Nitrat im Plasma bestimmt wurden. Im Anschluss daran erfolgte eine fahrradergometrische Belastung. Nach Beendigung der Belastung folgten weitere Blutabnahmen nach 5 und 10 Minuten. Hieraus wurden wiederum Nitrit und Nitrat bestimmt. Als letzter Teil schloss sich nach einem 45-minütigen Ruheintervall die Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis an. Diese umfasste die Quantifizierung der Endothel-abhängigen (FMD) und Endothel-unabhängigen Dilatation nach oraler Gabe von 400 µg Glyceroltrinitrat (GTN), sowie die Bestimmung der IMT.

2.2. Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden Probanden (n=31) im Alter von 19 bis 28 Jahren und Probanden (n=29) im Alter von 35 bis 74 Jahren untersucht. Zu den jungen Probanden wurden all diejenigen gezählt, die unter dem 30. Lebensjahr waren, da die Veränderungen der Gefäßfunktion, welche

durch Surrogatparameter erfasst sind, in der Literatur vorwiegend ab der 3. Lebensdekade beschrieben sind (Abb. 3). Das Kollektiv der jungen Probanden setzte sich aus 16 Frauen und 15 Männern zusammen. Das mittlere Lebensalter betrug $24 \pm 0,4$ Jahre, die durchschnittliche Körpergröße 177 ± 2 cm und das mittlere Gewicht betrug 70 ± 2 kg. Das Kollektiv der alten Probanden setzte sich aus 19 Frauen und 10 Männern im Alter von 58 ± 2 Jahren (Größe 169 ± 2 cm; Gewicht 68 ± 3 kg) zusammen. Als Studienteilnehmer stellten sich Studenten der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, sowie Mitarbeiter und Angehörige des kardiologischen Forschungslabors zur Verfügung.

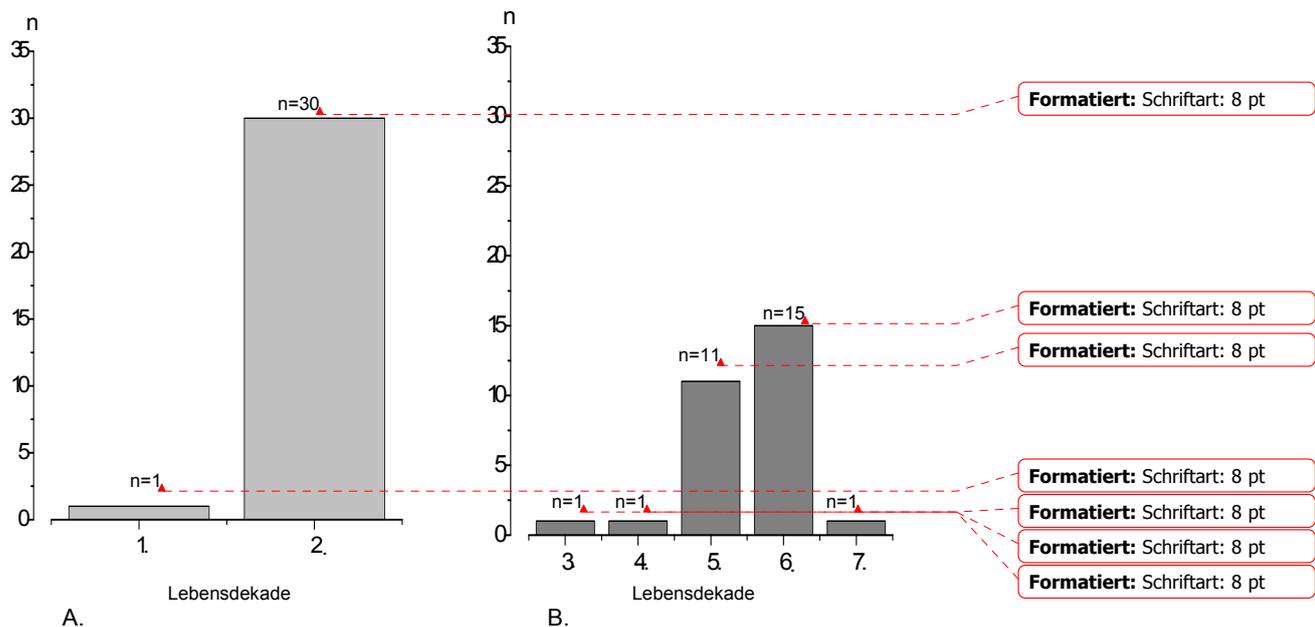


Abbildung 3:

Darstellung der Anzahl der A. jungen Probanden und B. alten Probanden eingeteilt in die jeweiligen Lebensdekaden. Zu den jungen Probanden zählen diejenigen, die sich in der 1. und 2. Lebensdekade befinden und zu den alten Probanden diejenigen, die sich in der 3. bis 7. Lebensdekade befinden.

Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte nach folgenden Ausschlusskriterien:

- akute Entzündungen (CRP > 0,5 mg/dl)
- Nierenfunktionsstörungen oder Hämodialyse
- Herzinsuffizienz gemäß NYHA III. oder IV. Grades

- relevante Herzrhythmusstörungen wie Arrhythmia absoluta
- Malignom-Erkrankungen
- die im weiteren aufgeführten kardiovaskulären Risikofaktoren

Als Risikofaktoren erster Ordnung wurden die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, ein Nikotinabusus und eine Hypercholesterinämie gewertet. Eine arterielle Hypertonie wurde anhand der JNC-Kriterien⁴⁹ bzw. der WHO-Richtlinie⁵⁰ diagnostiziert, wenn arterielle Blutdrücke >140/90 mmHg bei drei Messungen an drei separaten Tagen gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der WHO⁵¹ und ADA⁵² diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen die Plasmaglukosespiegel >126 mg/dl gemessen wurden, ein oraler Glukosetoleranztest mit 2 Stunden-Werten von >200 mg/dl oder zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten von >200 mg/dl bestanden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetikern 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 einer bestehenden cholesterinsenkenden Therapie. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die täglich mindestens 20 Zigaretten über >1 Jahr (1 Packungsjahr) geraucht hatten.

2.3. 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 eNOS⁵³. Dieses Verfahren wird als Flussvermittelte-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 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 Flusssteigerung führt zu einer Steigerung der an der Gefäßwand ansetzenden Scherkraft, welche als Stimulation der eNOS über eine vermehrte Freisetzung endothelialen NOs zu einer Vasodilatation der Arteria brachialis führt. Die Messung der FMD findet 60 und 90 s nach Beendigung der Ischämie statt.

Eine Einschränkung der FMD kann durch eine reduzierte NO-Synthase (NOS), 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 Glyceroltrinitrat (GTN; Nitrolingual; Pohl; Deutschland) bestimmt. Sowohl die Endothel-abhängige Dilatation als auch die Endothel-unabhängige Dilatation werden als prozentuale Zunahme des Diameters in Relation zum Ruhediameter gemessen.

Die FMD errechnet sich aus der Differenz des Diameters der Arteria brachialis nach dem Lösen der Ischämie (D_{post}) und dem basalen Diameter der Arterie ($D_{\text{prä}}$).

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

2.3.1. 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 Arterien durchmessers zu einem identischen Zeitpunkt im 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 an dem Arm des Probanden markiert und weder die Schallkopfposition noch die Geräteeinstellungen wurden während der gesamten Zeit der Untersuchung verändert. Anschließend erfolgten die Darstellung der IMT, sowie 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 des Probanden) 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 s die Bestimmung des Diameters der Arterie (FMD). Nach einer 10-minütigen Ruhephase wurde der Diameter 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 3 Herzzyklen aufgenommen. Abschließend wurde der arterielle Blutdruck des Probanden kontrolliert (Abb.4).

Ultraschalluntersuchungen

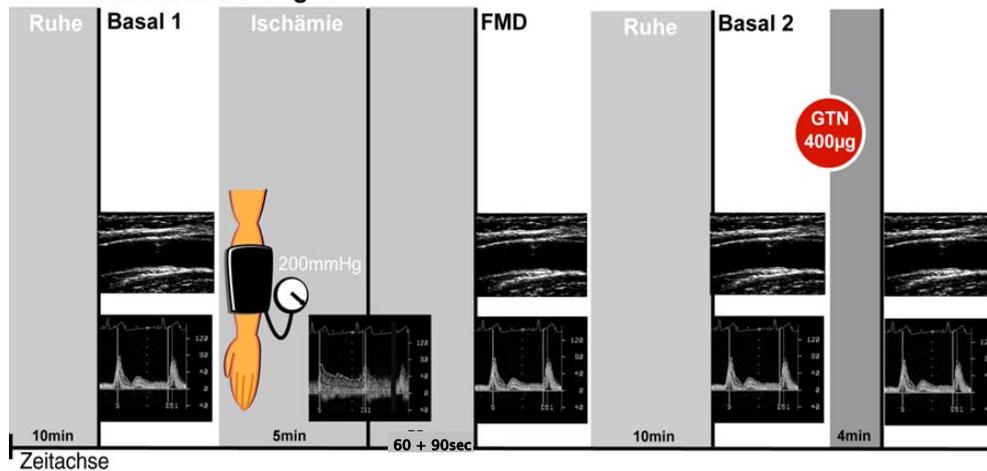


Abbildung 4:

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

2.3.2. Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung des Durchmessers der Arteria brachialis

Die Vermessungen des Arterienradius erfolgten EKG gesteuert am Ende der Diastole (R-Zacke). Als Eckpunkte der Durchmesserbestimmungen dient die M-Linie (Abb.5). 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 bestimmt⁵⁴.

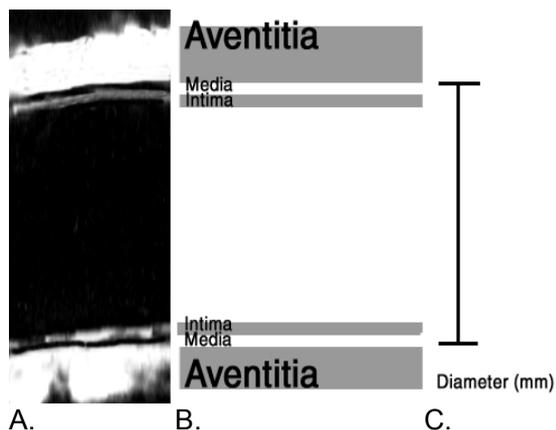


Abbildung 5:

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 echobildenden Strukturen
C: Den Durchmesserbestimmungen wurde die Strecke von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie zu Grunde gelegt.

Die Untersuchungen werden nach der Methode von Preik et al. computer-
gestützt ausgewertet⁵⁵. Bei dieser Methode wird jeweils eine Bildschleife aufge-
nommen und digital gespeichert. Jede Bildschleife setzt sich aus ca. 60 Einzel-
bildern zusammen und umfasst dadurch 3-4 Herzzyklen (Abb.6).

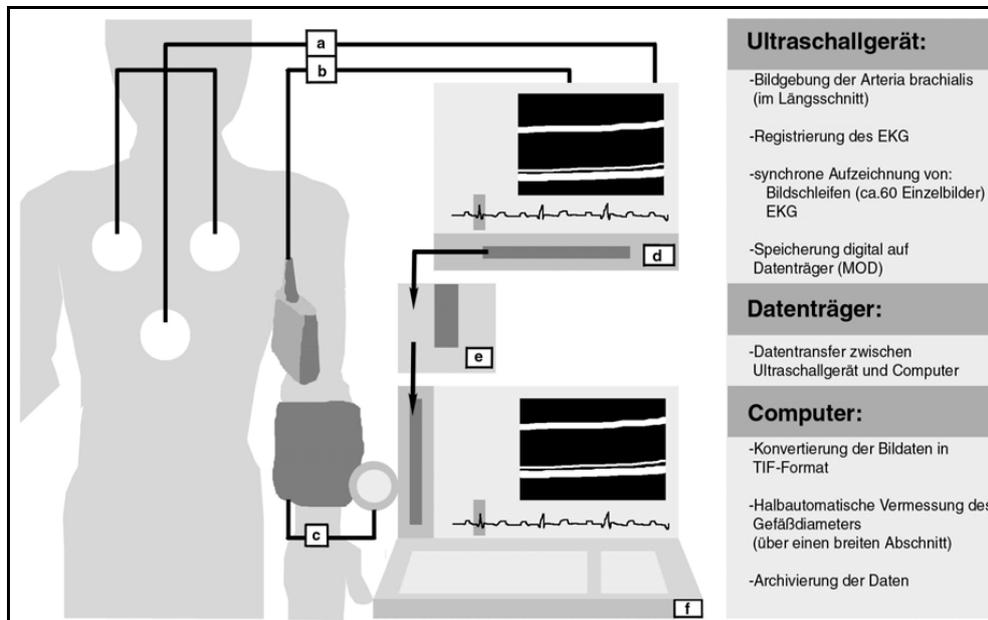


Abbildung 6: Schematische Anordnung des Messplatzes zur duplexsonographischen Quantifizierung der endothelialen Funktion. (a=EKG, b=Schallkopf, c=Blutdruckmanschette zur Stauung des Unterarms, d=Ultraschallgerät, e=Datenträger, f=Computer)

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 (Abb.7).

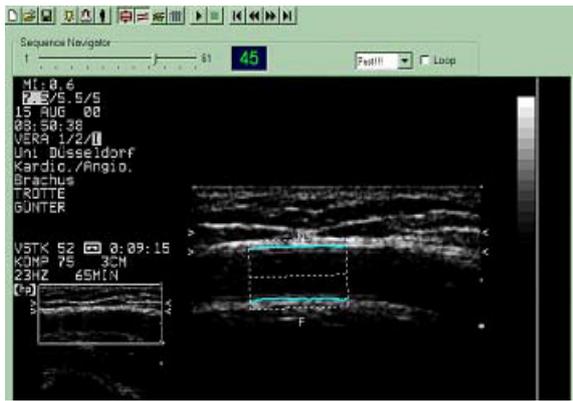


Abbildung 7: PC-gestützte Vermessung des Diameters der A. brachialis. Die Bestimmung des Diameters erfolgt durch Mittelung von ca. 150-300 einzelnen Messpunkten in einem zu definierenden Messabschnitt.

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 farbige angezeigt. Die farbige 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 Messabschnitt⁵⁵.

Zur Gewährleistung einer validen Untersuchungsqualität wurden weitere Untersuchungen zur Intra- und Inter-Observer-Variabilität durchgeführt.

Hierzu wurden 8 Probanden an zwei unterschiedlichen Tagen von zwei Untersuchern untersucht. Die Intra-Observer-Variabilität spiegelt die Abweichung von wiederholten Messungen eines einzelnen Untersuchers am gleichen Probanden wider. Die Inter-Observer-Variabilität stellt Abweichungen von Messungen verschiedener Untersucher am gleichen Probanden fest¹⁴.

2.3.3. Prinzip der duplexsonographischen Bestimmung der Intima-Media-Dicke (IMT)

Die Untersuchungen zur Bestimmung der IMT wurden neben der Bestimmung der FMD als weiterer Surrogatparameter einer Frühform der Arteriosklerose durchgeführt.

Im Ultraschallbild lassen sich bei der Wand der Arteria brachialis sowohl die sondennahe als auch die sondenferne Arterienwand als Doppelkontur

darstellen, wobei zwei parallel verlaufende hyperdense Schichten (Tunica intima und Adventitia) eine hypodense Schicht (Tunica media) umsäumen (Abb.8). Zur Bestimmung der IMT wird die sondenferne Arterienwand betrachtet.

Vorraussetzung für die automatische Bestimmung der IMT ist das Vorliegen eines geraden über 1 cm langen Gefäßabschnittes¹⁴.

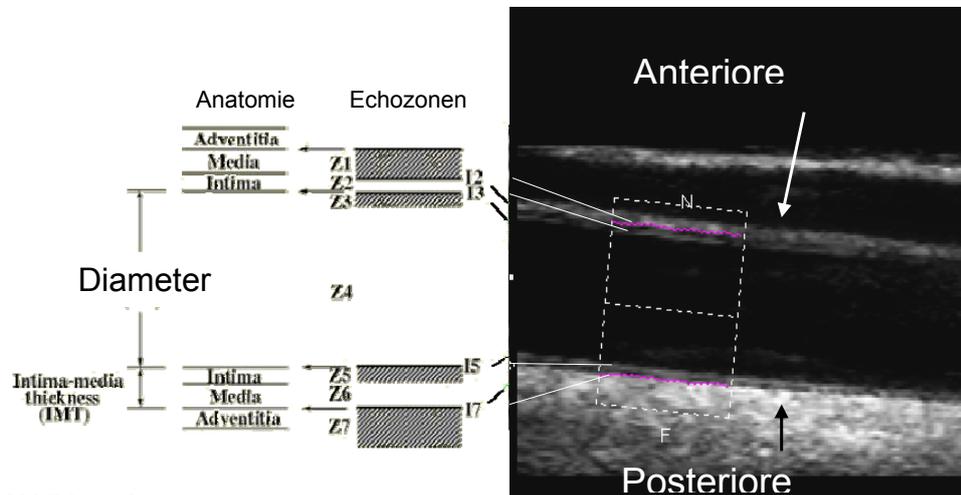


Abbildung 8:

Zuordnung der im duplexsonographischen B-Bild dargestellten Strukturen zum anatomischen Aufbau der anterioren und posterioren Gefäßwand. Die Vermessung der IMT erfolgt von Grenzlinie 15 zu Grenzlinie 17 an der posterioren Gefäßwand.

Zur Bestimmung des Intima-Media-Komplexes dient der Übergang vom Lumen zur Intima und der Übergang von der Media zur Adventitia. Nach der Einstellung eines Längsschnittes der Arteria brachialis erfolgt die Bestimmung der IMT EKG gesteuert am Ende einer Diastole (R-Zacke).

Nach der Übertragung dieser Aufzeichnung mittels MOD auf einen PC folgt die Konvertierung in ein Standard Bildformat (BMP-Format) und die Speicherung in einem speziellen Auswertungs- und Archivierungsprogramm (Artery Measurement System, AMS, Wallenberg Laboratory for Cardiovascular Research, Göteborg, Schweden). Anschließend erfolgen eine Kalibrierung und eine manuelle Markierung des auszuwertenden Gefäßabschnittes. Nun wird die IMT automatisch detektiert und farblich markiert⁵⁶ (Abb.9). Diese Markierung wird auf Übereinstimmungen geprüft und ein Mittelwert aus 100-200 Einzelpunkten bestimmt.

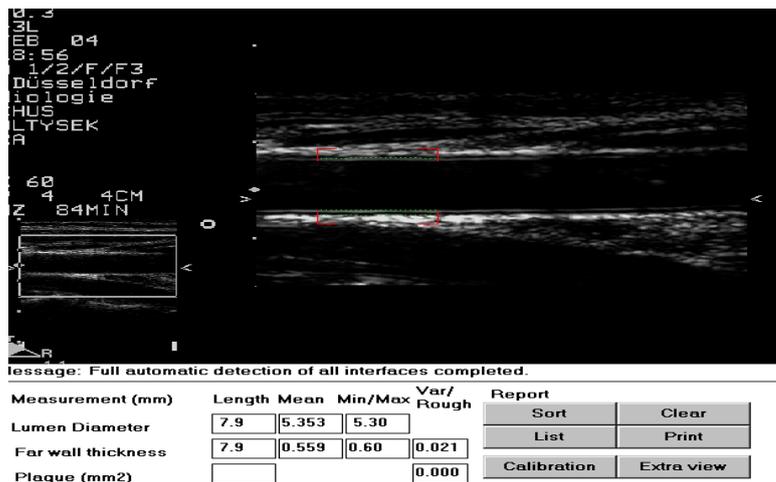


Abbildung 9:

Darstellung der PC-gestützten Auswertung des Intima-Media-Komplexes. Die beiden gepunkteten Linien stellen die Messpunkte an der Lumen-Intima-Grenze und der Media-Adventitia-Grenze dar.

2.4. Untersuchungsprotokoll der fahrradergometrischen Belastung

Die Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei 23 °C zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens durchgeführt. Nach einer 5-minütigen Ruhepause wurden der basale Blutdruck und die basale Herzfrequenz des Probanden in sitzender Position gemessen und notiert. Hierauf folgte eine basale Blutentnahme. Anschließend folgte die fahrradergometrische Belastung. Die ergometrische Belastung der Probanden wurde nach dem Schema der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) durchgeführt. Den Probanden wurde ein 12-Kanal-EKG angelegt, um die Ausbelastung zu überwachen. Die Belastung begann mit 25 Watt und wurde alle zwei Minuten um 25 Watt gesteigert. Gleichzeitig wurden während der Belastung alle zwei Minuten der Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen, um eine Kontrolle über die Kreislauffunktion zu haben. Als Abbruchkriterien galten:

- ST-Strecken-Senkung ≥ 3 mm
- ST-Strecken-Hebung ≥ 1 mm
- Blutdruckabfall > 10 mmHg mit Zeichen einer myokardialen Ischämie
- Mäßig-schwere Angina-Pectoris-Symptomatik
- Schwere Dyspnoe
- Klinische Zeichen einer Minderperfusion (Zyanose)

- Anhaltende ventrikuläre Tachykardien
- Erschöpfung der Probanden

Am Ende der Belastung wurden der Blutdruck und die Herzfrequenz abschließend gemessen. Nach einer 2-minütigen Ruhepause im Sitzen erfolgten die weiteren Blutentnahmen nach 5 und 10 Minuten nach Beendigung der Belastung. Gleichzeitig wurden zu diesen Zeiten der Blutdruck und die Herzfrequenz bestimmt. Im Anschluss an die fahrradergometrische Belastung folgte die Ultraschalluntersuchung der Arteria brachialis.

2.5. Biochemische Quantifizierung der Konzentrationen von Nitrit und Nitrat im Plasma

2.5.1. Blutentnahme und Probenaufbereitung

Die Blutentnahmen wurden bei den nüchternen Probanden zu den oben genannten Zeitpunkten durchgeführt. Die Punktion erfolgte mit Einwegkanülen (W.I.N. 21G, B.Braun Melsungen AG, Deutschland). Zur Bestimmung des Routinelabors (Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, HDL- und LDL-Cholesterin, Triglyceride, Glukose, HbA1c, Fibrinogen) erfolgte die Entnahme von Blutproben in Vakuumröhrchen (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Großbritannien). Im Anschluss daran wurden zur Quantifizierung der Konzentration von Nitrit und Nitrat 2 ml Blut entnommen. Die Entnahme erfolgte in 2 ml Einwegspritzen (B.Braun Melsungen AG, Deutschland) und die Blutproben wurden anschließend in 15 ml Greiner-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. In diesen Röhrchen befand sich bereits 8 ml eisgekühlter PBS-Puffer (Serag Wiessner, Naila, Bayern, Deutschland) und 2 µl Heparin (Heparin: 10IE/ml; Liquimin N5000, Wirkstoff: Heparinnatrium, Hoffmann La Roche AG, Grenzach, Wyhlen, Deutschland).

Während der gesamten Aufbereitungszeit wurden alle vorbereiteten Lösungen, die Greiner-Röhrchen und die Zentrifugen auf 4 °C gekühlt. Die Aufbereitungszeit betrug 2 Stunden von der Blutentnahme bis zur Analyse. Um zelluläre Bestandteile abzutrennen wurden die 1:5 in PBS-Puffer verdünnten und mit Heparin antikoagulierten Blutproben zunächst 15 min lang bei 800 g

zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand in 15 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und bis zur Analyse auf Eis gelagert. Um die Nitratbestimmung durchführen zu können, wurde ein Aliquot des klaren Überstands in Ultrafiltrationsröhrchen (Centrisart, cut-off 20.000 Dalton, Fa. Sartorius, Deutschland) überführt. Die Ultrafiltrationsröhrchen wurden bei 4.000 g über den Zeitraum von 1 Stunde zentrifugiert. Anschließend wurde das Ultrafiltrat für die spätere Nitratbestimmung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zu jeder Messung wurden parallel Leerwerte mitgeführt, um mögliche Kontaminationen während der Aufarbeitung zu erfassen.

2.5.2. Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels Gasphasen-Chemilumineszenz

Die Gasphasen-Chemilumineszenz (CLD) ist eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zur Messung von NO in flüssigen oder gasförmigen Proben. Die Methode beruht auf einer Messung von Lichtquanten, welche stöchiometrisch bei der Reaktion von NO mit Ozon (O_3) freigesetzt werden. Hier kam eine Chemilumineszenzanlage der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO e, Eco Physics, Schweiz) zum Einsatz.

Zuerst werden die Proben dreifach mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kunststoffmembran in die Lösungskammer (Verhees, Deutschland) der Anlage injiziert, um den Nitritgehalt zu bestimmen. Das Aufgabevolumen bei der Nitritmessung beträgt $100\text{ }\mu\text{g}$. In der Injektionskammer befinden sich 20 ml einer iodhaltigen, reduktiven Reaktionslösung (Braun'sche Lösung). Diese enthält 1,62 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,57 g Iod (Sigma, Steinheim, Deutschland), welches in 15 ml HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und mit 202,5 ml konzentrierter Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt ist. Diese Lösung setzt zunächst Nitrosoniumionen (NO^+) frei, welche aus Nitrit entstehen, dass sich in der Lösung befindet (Gleichung 1). Diese NO^+ -ionen reagieren mit Iodid (I^-) weiter zu NO (Gleichung 2 und 3).



Das gebildete NO, welches äquimolar aus Nitrit gebildet wurde, kann dann mittels einer Photoreaktion in einem NO-Analysator bestimmt werden.

Das Reaktionsgefäß wird von einem Wasserbad ummantelt und mit 60 °C warmen Wasser umspült. Während der gesamten Messung strömt Helium mit einem konstanten Fluss durch eine Glasfritte. Das gebildete NO tritt aufgrund des hohen Löslichkeitskoeffizienten schnell in die Gasphase über und gelangt so in die Reaktionskammer der Anlage. Dabei strömt das Gas zunächst durch einen Kühlungsbereich und anschließend durch eine mit 1 M NaOH gefüllte Waschflasche.

In der Reaktionskammer wird das zugeleitete NO mittels einer Photoreaktion gemessen. Hierzu wird der Kammer aus O₂ generiertes O₃ mit einem konstanten Fluss zugeleitet. O₃ reagiert dabei spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid (NO₂). Diese Reaktion läuft sehr schnell ab ($10^{-7} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei Raumtemperatur) und ermöglicht damit die Erfassung schneller Änderungen der NO-Konzentration. Ein Teil des gebildeten NO₂ befindet sich nach der Reaktion in einem angeregten Zustand (NO₂*). Diese überschüssige Energie wird dann in Form von Lichtquanten 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 O₃ und NO temperaturabhängig ist. Durch konstante Kühlung des Analysators auf -15°C reduziert man ein durch Temperatur beeinflusstes Störgeräuschen.

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, Dortmund, Deutschland) verwendet. Zur

Verbindung zwischen Rechner und Anlage diente eine Interfacebox der Firma Knauer (Dortmund, Deutschland) (Abb.10).

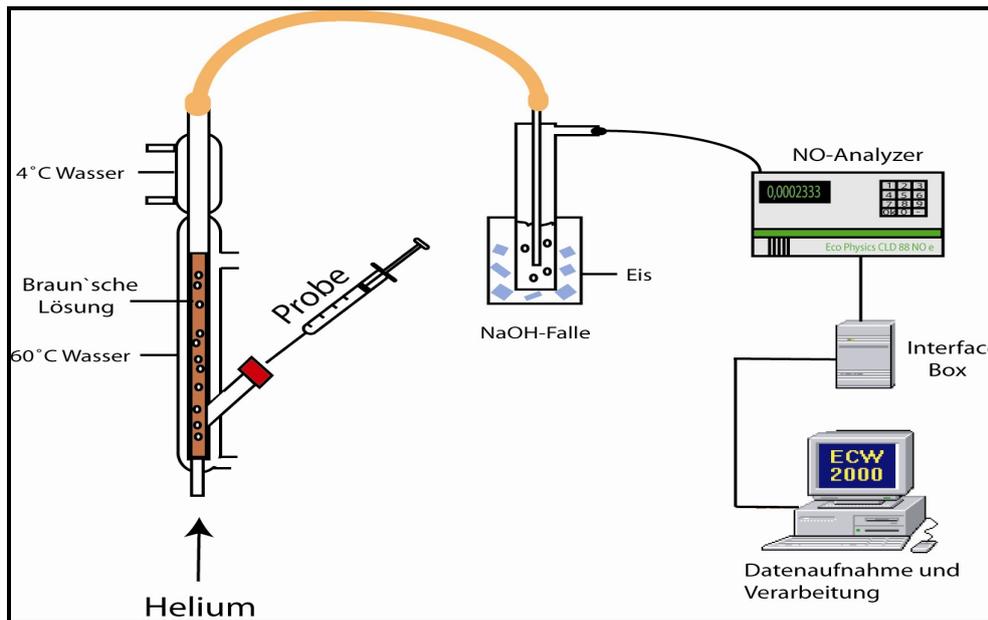


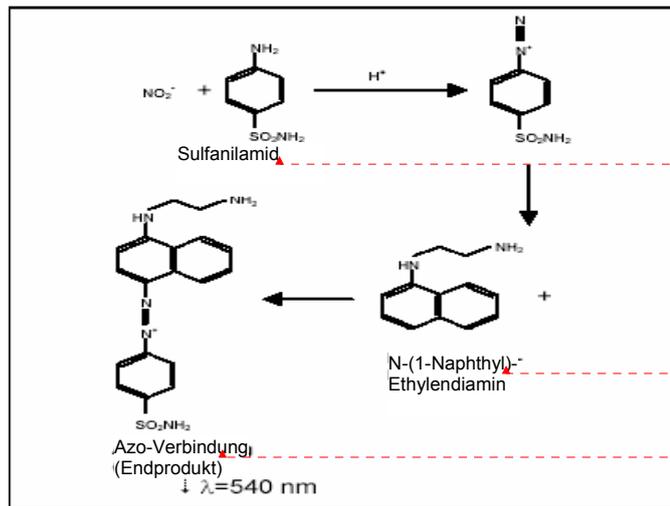
Abbildung 10:

Schematische Darstellung der Chemielumineszenz-Detektions-Anlage. 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 O_3 stattfindet.

2.5.3. Bestimmung der Nitratkonzentration mittels Vanadium(III)-Chlorid-FIA (VCL-FIA)

Die Vanadium(III)-Chlorid-Fluss-Injektionsanalytik (VCL-FIA) ist eine valide und sensitive Methode zur Messung von Nitrat in flüssigen Proben. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spektrophotometrischen Bestimmung von Nitrit mittels der Griess-Reaktion und der durchflussspektrometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion. Die flüssigen Proben werden zunächst mit einer Reaktionslösung versetzt, welche im Verhältnis von 5:1 aus VCL_3 -Lösung und Griess-Reagenz besteht. Bei dieser Methode wird im ersten Schritt enthaltenes Nitrat chemisch durch VCl_3 zu Nitrit reduziert. Das Reduktionsreagenz besteht aus 0,4 g VCl_3 (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland), welches in 6,5 ml 25%iger Salzsäure (HCL) (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und mit 43,5 ml hochreinem HPLC-Wasser versetzt ist. Diese Lösung wird über einen Filter mit 0,45 μm Porengröße (RC 25, Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Das entstandene Nitrit reagiert im zweiten Schritt nach der Griess-Reaktion (Abb.11)

mit dem Griessreagenz. Dieses besteht zu gleichen Teilen aus 4 g Sulfanilamid (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 16 ml 25%iger HCl und 100 ml HPLC-Wasser, und 0,08 g N-(1-Naphtyl)-Ethyldiamin (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), gelöst in 100 ml HPLC-Wasser. Die Probe wird nun mit den Reagenzien im Verhältnis 6:5:1 (Probe: VCl₃-Lösung: Griess-Reagenz) in eine Mikrotiterplatte (Cellstar[®], Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert. Anschließend wird die Probe für 90 min bei 36 °C lichtgeschützt und abgedeckt inkubiert.



Formatiert: Schriftart: 8 pt

Formatiert: Schriftart: 8 pt

Formatiert: Schriftart: 8 pt

Abbildung 11:

Reaktionsmechanismus zur Bestimmung von Nitrit über die Griess-Reaktion. Nitrit reagiert in Anwesenheit von Säure mit Sulfanilamid zu einem Diazoniumsalz, der durch die Reaktion mit N-(1-Naphtyl)-Ethyldiamin 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 (6 mm, 9 μl , 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 Nitratkonzentration der Probe wieder als die Fläche des Signals. Vor der 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) (Abb.12).

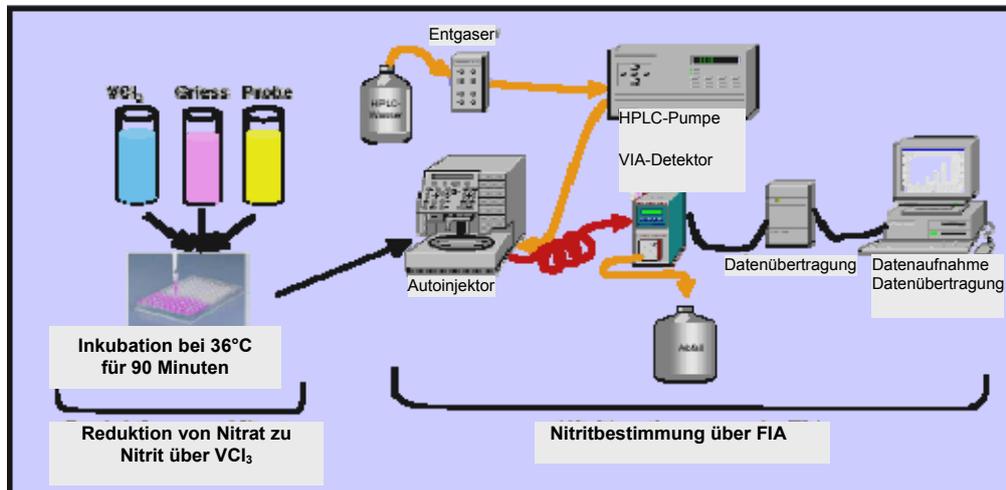


Abbildung 12:

Arbeitsritte 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 ebenfalls 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 .

2.6. Mathematisch-statistische Methoden

Alle deskriptiven statistischen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler ($MW \pm SE$) angegeben. Mit Hilfe des Kolmogorovv-Smirnov-Tests wurde auf Normalverteilung geprüft. Änderungen der Gruppenmittelwerte wurden mittels Students t-Test für gepaarte Daten überprüft. Die Korrelationen wurden zweiseitig nach Spearman berechnet. Zur Varianzaufklärung wurde die schrittweise lineare Regression 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. Validierung zur automatischen Vermessung des Diameters der Arteria brachialis

Um eine valide Bestimmung der FMD und IMT zu gewährleisten wurden die Variabilitäten der jeweiligen Messungen an der Arteria brachialis in Voruntersuchungen ermittelt (Tab.3; Abb.13). Bei der Bestimmung der FMD betrug die Intra-Observer-Differenz 0,8%, die Inter-Observer-Differenz 0,8%, die Tag-zu-Tag-Differenz 1,3%. Der Variationskoeffizient betrug 0,78%. Bei der IMT-Bestimmung betrug die Intra-Observer-Differenz 1,1%, die Inter-Observer-Differenz 1,9%, die Tag-zu-Tag-Differenz 1,1% und der Variationskoeffizient 1,8%.

Tabelle 3:

Gegenüberstellung der ermittelten untersucherseitigen Differenzen, der Tag-zu-Tag Differenz, sowie des Variationskoeffizienten für die FMD-, und IMT-Bestimmung (n=8; MW±SE).

Parameter	Einheit	FMD	IMT
Intra-Observer-Differenz	[%]	0,8±0,2	1,1±0,1
Inter-Observer-Differenz	[%]	0,8±0,1	1,9±0,9
Tag-zu-Tag-Differenz	[%]	1,3±0,3	1,1±0,2
Variationskoeffizient	[%]	0,78	1,8

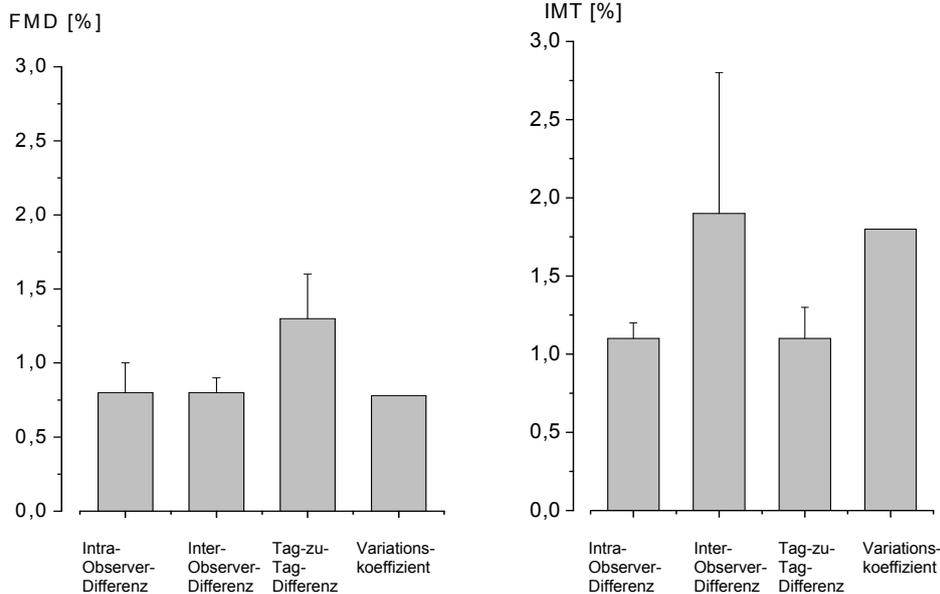


Abbildung 13:

Graphische Darstellung der untersucherseitigen und Tag-zu-Tag-Variabilität, sowie des Variationskoeffizienten der PC-gestützten Analyse des Gefäßdiameter der FMD-Messung und der IMT-Messung (n=8; Fehlerbalken=SE).

3.2. Charakterisierung der Studienpopulation

Es bestanden signifikante Altersunterschiede zwischen dem Kollektiv der jungen Probanden und dem der alten Probanden ($p < 0,01$). In Hinsicht auf die Körpergröße waren beide Studienkollektive vergleichbar. Auch die Blutwerte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Hingegen zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Größe ($p < 0,05$), dem BMI ($p < 0,05$), dem MAP ($p < 0,05$) und der erbrachten Leistung während der fahrradergometrischen Belastung ($p < 0,01$) zwischen den beiden Kollektiven. Die jungen Probanden waren im Durchschnitt größer und hatten einen niedrigeren BMI als die alten Probanden. Bei der Belastung zeigte sich, dass das Kollektiv der jüngeren Probanden durchschnittlich eine höhere Leistung erbrachte (Tab.4).

Tabelle 4:

Charakterisierung der Kollektive der jungen Probanden und der älteren Probanden (MW \pm SE).

Parameter	Einheit	Junges Kollektiv	Altes Kollektiv	Signifikanz
N		31	29	
Geschlecht	[w/m]	16/15	19/10	
Alter	[Jahre]	24 \pm 0,4	58 \pm 2	$p < 0,01$
Größe	[cm]	177 \pm 2	169 \pm 2	$p < 0,05$
Gewicht	[kg]	70 \pm 2	68 \pm 3	n.s.
BMI	[kg/m ²]	22,1 \pm 0,4	24,8 \pm 0,7	$p < 0,05$
MAP	[mmHG]	120,5 \pm 1,9	98,0 \pm 1,7	$p < 0,05$
Druck-Frequenz-Produkt basal	[mmHg/s]	6506,7 \pm 234,8	6590,9 \pm 229,8	n.s.
Druck-Frequenz-Produkt maximal	[mmHg/s]	18633,9 \pm 672,4	16892,4 \pm 655,9	n.s.
Leistung	[W]	196,0 \pm 7,6	164,8 \pm 8,9	$p < 0,01$
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	191 \pm 61	213,2 \pm 12	n.s.
LDL/HDL		1,7 \pm 0,2	2,2 \pm 0,2	n.s.
Triglyceride	[mg/dl]	84 \pm 8,5	122 \pm 12,8	n.s.
Glucose	[mg/dl]	81 \pm 1,3	91,5 \pm 2,5	n.s.
HbA1c	[%]	4,9 \pm 0,2	5,3 \pm 0,1	n.s.
Harnsäure	[mg/dl]	4,7 \pm 0,3	5,13 \pm 0,2	n.s.
Gesamteiweiß	[g/dl]	6,8 \pm 0,1	7,62 \pm 0,1	n.s.
Leukozyten	[*1000/ μ l]	5645 \pm 164	5200 \pm 187,6	n.s.

Als Maß für die ergometrisch induzierte Steigerung der Scherkräfte wurde das Druck-Frequenz-Produkt bestimmt (Tab.4). Der Anstieg der Kollektive unterschied sich nicht signifikant voneinander. Das Kollektiv der jungen Probanden hatte ein mittleres basales Druck-Frequenz-Produkt von 6506,7 \pm 234,8 mmHg/s. Zum maximalen Endpunkt der Belastung stieg dies auf 18633,9 \pm 672,4 mmHg/s an. Bei den alten Probanden zeigte sich ein ähnliches basales Druck-Frequenz-Produkt von 6590,9 \pm 229,8 mmHg/s, welches auf 16892,4 \pm 655,9 mmHg anstieg.

3.3. Funktionelle und strukturelle Veränderungen peripherer Leitungsarterien

Tabelle 5:

Zusammenfassung der sonographischen Untersuchungsergebnisse des jungen Kollektivs und des alten Kollektivs gemessen an der Arteria brachialis.

Parameter	Einheit	"jung"	"alt"	Signifikanz
Ruhediameter	[mm]	3,9±0,1	4,27±0,1	p<0,05
FMD	[%]	7,9±0,4	5,1±0,3	p<0,05
GTN	[%]	14,7±0,5	12,0±0,6	p<0,05
FMD/GTN	[%]	53,9±2,3	44,7±4,4	p<0,05
IMT	[mm]	0,34±0	0,38±0	p<0,05

3.3.1. Endothel-abhängige Dilatation peripherer Leitungsarterien

Der basale Diameter der Arteria brachialis wurde bei dem Kollektiv der jungen Probanden durchschnittlich mit 3,9±0,1 mm bestimmt. In dem Kollektiv der alten Probanden betrug der Diameter 4,3±0,1 mm (p<0,05).

Die FMD war in dem alten Kollektiv gegenüber dem jungen Kollektiv beeinträchtigt (7,9±0,4% vs. 5,1±0,3%; p<0,05). Die Endothel-unabhängige Dilatation zeigte bei den alten Probanden eine Einschränkung gegenüber der Endothel-unabhängigen Dilatation der jungen Probanden (14,7±0,5% vs. 12,0±0,6%; p<0,05). Um das quantitative Ausmaß der jeweiligen Komponenten zu bestimmen, wurden für beide Kollektive die Ratio aus Endothel-abhängiger Dilatation und Endothel-unabhängiger Dilatation (FMD/GTN) gebildet, welche in Prozent ausgedrückt wurde. Im Kollektiv der alten Probanden betrug diese 44,7±4,4%, im Kollektiv der jungen Probanden war die FMD/GTN-Ratio 53,9±2,3% (p<0,05) (Tab.5; Abb.14). Dies bedeutet, dass die Reduktion der FMD vorwiegend durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit und zu einem geringeren Anteil durch eine eingeschränkte NO-Sensitivität des glattmuskulären Kompartiments erklärt werden kann.

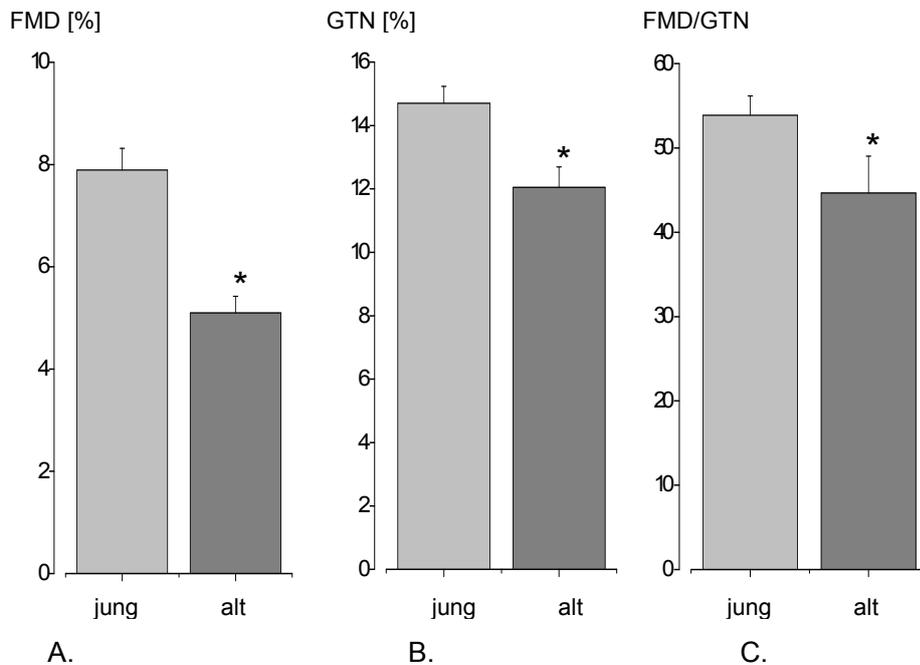


Abbildung 14:

Gegenüberstellung der Messung der A. Endothel-abhängigen Dilatation (FMD), B. der Endothel-unabhängigen Dilatation (GTN) und C. der Ratio von FMD und GTN, des jungen und des alten Kollektivs. Es zeigt sich, dass die FMD und GTN-Antwort im Alter signifikant eingeschränkt sind. Auch die FMD/GTN-Ratio ist im Alter vermindert, d.h., dass die FMD stabiler reduziert, als die GTN (*= $p < 0,05$; Fehlerbalken=SE).

3.3.2. Strukturelle Eigenschaften der Gefäßwand

Der Intima-Media-Komplex der Arteria brachialis war bei den alten Probanden dicker als bei den jungen Probanden (Tab.5; Abb.15).

Sie betrug bei dem alten Kollektiv $0,38 \pm 0,01$ mm und bei dem jungen Kollektiv $0,34 \pm 0$ mm ($p < 0,05$).

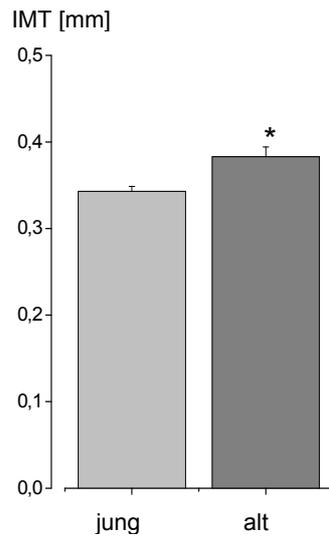


Abbildung 15:

Gegenüberstellung der Dicke des Intima-Media Komplexes der Arteria brachialis der jungen und der alten Probanden. Es zeigt sich eine signifikante Zunahme der IMT bei dem Risikofaktor Alter (*= $p < 0,05$; Fehlerbalken=SE).

3.4. Biochemische Quantifizierung der NO-Metabolite

Nach der fahrradergometrischen Belastung zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich des Nitritanstiegs zwischen dem jungen und dem alten Kollektiv (Abb.16). Die Nitritkonzentration der jungen Probanden stieg um maximal $58 \pm 11,2\%$ zum Zeitpunkt 5 Minuten nach Beendigung der Belastung an ($107,9 \pm 8,3$ nmol/l basal vs. $157 \pm 8,6$ nmol/l nach 5 min und $154,5 \pm 11,6$ nmol/l nach 10 min). Dagegen stieg die Nitritkonzentration der alten Probanden um maximal $15,1 \pm 5,6\%$ 5 min nach der Beendigung der Belastung ($96,3 \pm 5,5$ nmol/l basal vs. $108 \pm 7,3$ nmol/l nach 5 min und $105 \pm 7,5$ nmol/l nach 10 min).

Im Gegensatz zu der Nitritkonzentration blieb die Nitratkonzentration nach der fahrradergometrischen Belastung annähernd konstant. Bei den jungen Probanden stieg die Nitratkonzentration um maximal $3,88 \pm 2,5\%$ 5 Minuten nach der Belastung an ($24,81 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/l}$ basal vs. $25,71 \pm 1,6$ $\mu\text{mol/l}$ nach 5 min und $24,77 \pm 1,5$ $\mu\text{mol/l}$ nach 10 min). Bei dem alten Kollektiv zeigte sich ein leichter Abfall nach 5 Minuten nach der Belastung um maximal $-0,71 \pm 2,4\%$ ($23,42 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/l}$ basal, $23,02 \pm 1,6$ $\mu\text{mol/l}$ nach 5 min und $22,8 \pm 1,7$ $\mu\text{mol/l}$ nach 10 min).

Kommentar:

Kommentar:

Kommentar:

Kommentar:

Kommentar:

Kommentar:

Kommentar:

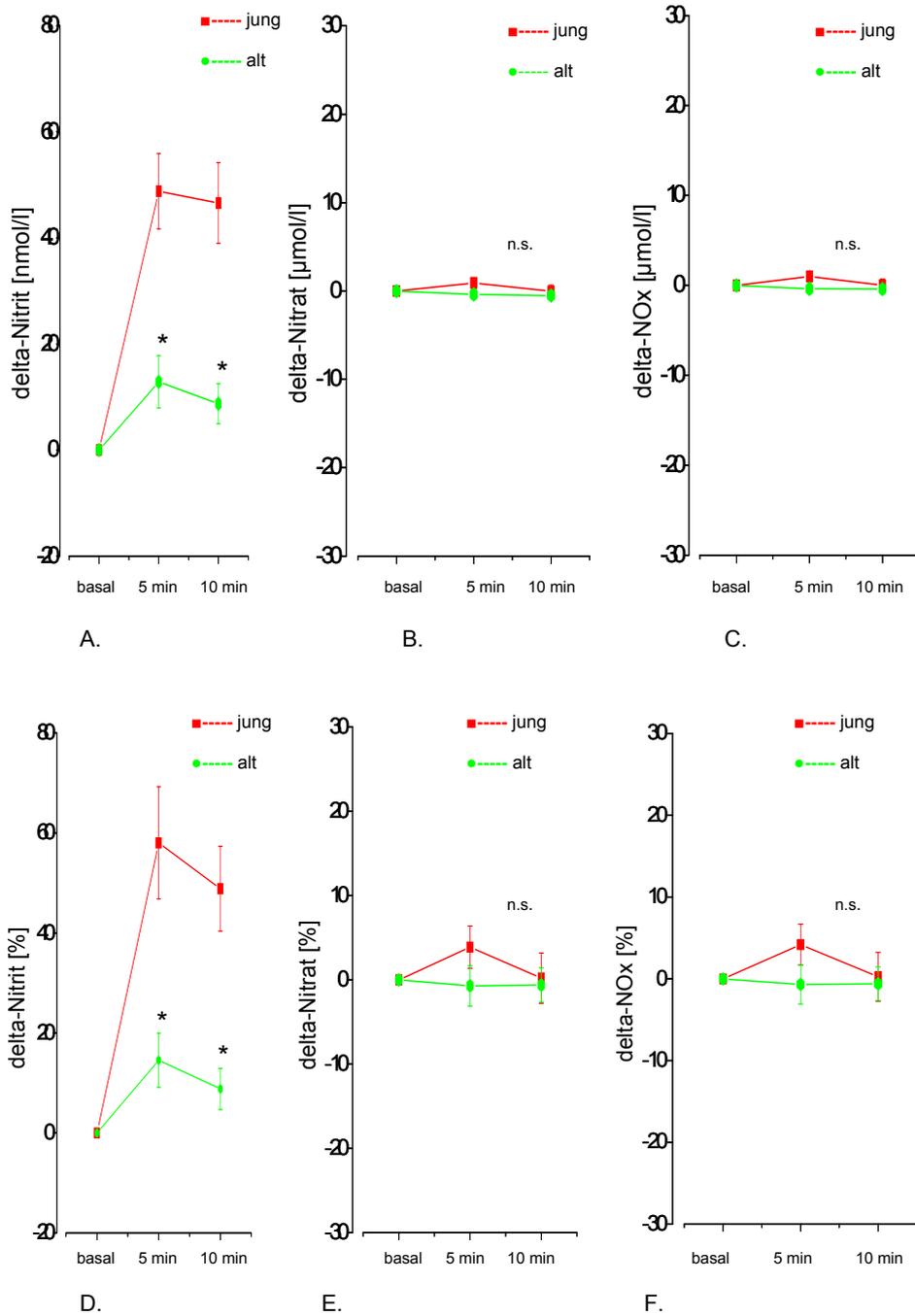


Abbildung 16:

Darstellung der absoluten Nitrit-, Nitrat- und NOx-Konzentration (A-C) sowie des prozentualen Anstiegs der Nitrit-, Nitrat- und NOx-Konzentrationen (D-F) des jungen und des alten Kollektivs. Die jeweiligen Konzentrationen sind den verschiedenen Zeitpunkten der Bestimmung gegenübergestellt. Es zeigten sich signifikante Unterschiede bei dem Anstieg der Nitritkonzentration, wohingegen die Anstiege der Nitrat- und NOx-Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied in den beiden Kollektiven aufwiesen (*= $p < 0,05$; Fehlerbalken=SE; n.s.=nicht signifikant)

3.5. Korrelation zwischen dem Alter und der funktionellen, strukturellen und biochemischen Kenngröße der endothelialen Dysfunktion

Da die funktionellen, strukturellen und biochemischen Kenngrößen im Alter verändert waren, wurden diese auf Korrelation geprüft.

Als funktionelle Kenngröße korrelierte die FMD invers mit dem Lebensalter ($n=48; r=-0,54; p<0,0001$). Ebenfalls korrelierte die IMT, als strukturelle Kenngröße mit dem Lebensalter ($n=53; r=0,48; p<0,0001$). Als biochemische Kenngröße korrelierte der absolute Nitritanstieg 10 Minuten nach der Belastung invers mit dem Lebensalter ($n=53; r=-0,52; p<0,0001$). Zusammenfassend zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter, eingeschränkter FMD, zunehmender IMT und Abnahme der Nitrit-Reserve (Abb. 17). Das bedeutet, dass funktionelle, strukturelle und biochemische Veränderungen der endothelialen Dysfunktion im Lebensalter nicht-invasiv abgebildet werden können.

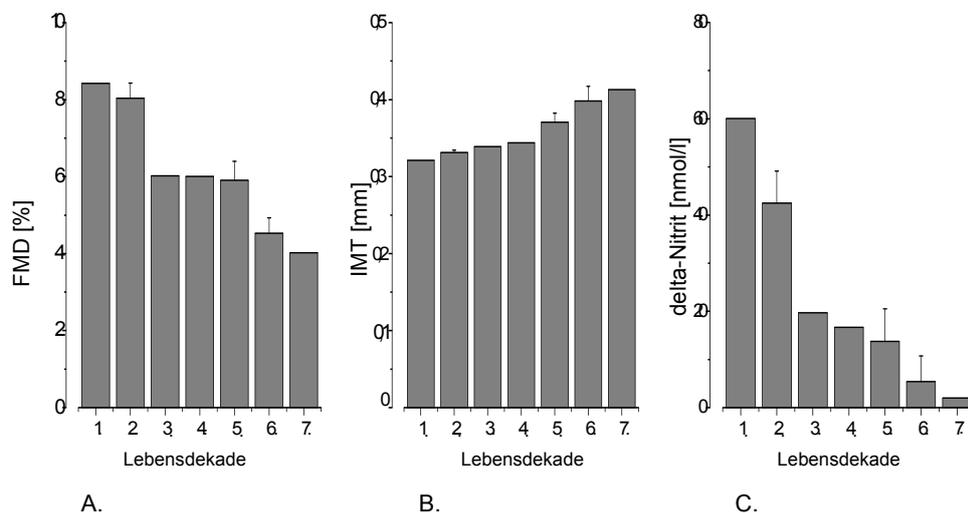


Abbildung 17: Darstellung der funktionellen, strukturellen und biochemischen Veränderungen im Alter nach Einteilung der Probanden in die jeweiligen Lebensdekaden. Mit zunehmendem Lebensalter zeigt sich eine A. Verminderung der FMD, B. Zunahme der IMT, sowie C. eine Abnahme der Nitrit Konzentration, welche 10 Minuten nach der fahrradergometrischen Belastung bestimmt wurde (MW±SE; Fehlerbalken=SE).

3.6. Korrelation zwischen der strukturellen und funktionellen Veränderung und biochemischen Kenngrößen der endothelialen Dysfunktion

Da sich mit zunehmendem Lebensalter sowohl die funktionelle als auch die strukturelle Kenngröße der endothelialen Dysfunktion verändert, wurden diese auf Korrelation geprüft. Hierbei zeigte sich eine signifikant inverse Korrelation zwischen der FMD und der IMT ($n=43$; $r=-0,55$; $p<0,001$) (Abb. 18).

Weiterhin wurde als biochemische Kenngröße die absolute Nitritkonzentration zehn Minuten nach der Belastung mit der funktionellen und strukturellen Kenngröße korreliert. Hierbei zeigte sich eine geringere Korrelation der Nitritkonzentration und der FMD ($n=44$; $r=0,25$; $p<0,05$).

Zwischen der IMT und der absoluten Nitritkonzentration 10 Minuten nach der Belastung zeigte sich eine inverse Korrelation mit zunehmendem Alter ($n=45$; $r=-0,17$; $p<0,05$).

Das bedeutet, dass funktionelle und strukturelle Veränderungen der Endothelfunktion altersabhängig einen engen Zusammenhang zeigen, während der Zusammenhang der biochemischen Veränderung geringer ausgeprägt ist.

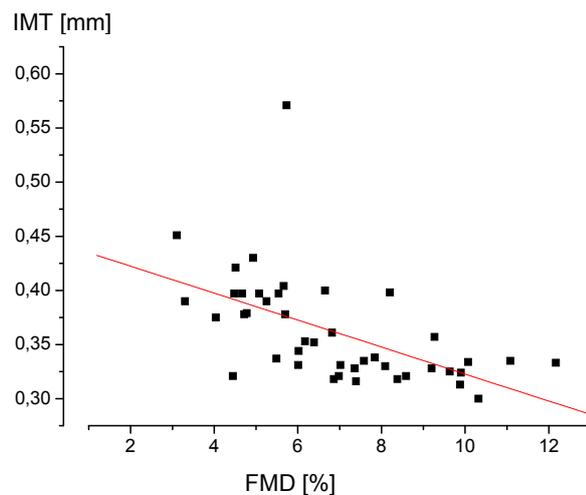


Abbildung 18: Korrelation zwischen der Endothel-abhängigen Dilatation und der IMT der Arteria brachialis ($n=43$; $r=-0,55$; $p<0,001$).

4. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- (1.) Die Endothel-abhängige Dilatation (FMD), als funktionelle Kenngröße der Endothelfunktion, ist mit zunehmendem Alter vermindert.
- (2.) Die Intima-Media-Dicke, als strukturelle Kenngröße der Endothelfunktion, ist mit zunehmendem Alter vergrößert.
- (3.) Die Nitrit-Reserve im Plasma, als biochemische Kenngröße der Endothelfunktion, ist mit zunehmendem Alter vermindert.
- (4.) Die funktionellen (gemessen mittels FMD) und strukturellen (gemessen mittels IMT) Veränderungen der Endothelfunktion im Alter zeigen eine enge Korrelation zueinander. Die Nitrit-Reserve, als biochemische Kenngröße, zeigt dabei nur eine geringe Korrelation zu den funktionellen und strukturellen Kenngrößen der Endothelfunktion.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Darstellung der Veränderungen der funktionellen, strukturellen und biochemischen Kenngrößen der Endothelfunktion mit zunehmendem Lebensalter. Hierzu wurde der Grad einer endothelialen Dysfunktion mit Hilfe des etablierten Verfahrens der FMD-Messung bestimmt. Zusätzlich wurde mittels Intima-Media-Messung die Wanddicke der Arteria brachialis erfasst, welche bei Verdickung auf einen arteriosklerotischen Prozess hindeutet. Des Weiteren wurde die Nitrit-Reserve im Plasma ermittelt. Diese Verfahren wurden auf Korrelation geprüft.

(1.) Bei Personen mit dem alleinigen kardiovaskulären Risikofaktor Alter zeigte sich eine Reduktion sowohl der FMD als auch der Nitrit-Reserve im Plasma, nicht jedoch der Nitratkonzentration im Plasma. Gleichzeitig zeigte sich bei diesen Personen eine Verdickung des Intima-Media-Komplexes. (2.) Die FMD zeigte eine reziproke Korrelation mit der IMT, wohingegen diese beiden Kenngrößen eine geringe Korrelation mit der Nitrit-Reserve im Plasma aufwiesen. Das bedeutet, dass die Nitrit-Reserve als biochemische Kenngröße die funktionellen und strukturellen Kenngrößen nur bedingt widerspiegelt.

4.1. Methodenkritik

4.1.1. Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der Flussvermittelten-Dilatation

Es gibt verschiedene Untersuchungsverfahren, um die Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion zu erfassen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Endothel-abhängige Dilatation mit Hilfe der nicht-invasiven Messung der FMD der Arteria brachialis ermittelt. Die Dilatation wurde durch einen physikalischen Stimulus induziert. Als mechanischer Stimulus führt Scherstress über Konformationsänderungen des endothelialen Zytoskeletts zu einer Phosphorylierung der eNOS, welche eine Steigerung der Kalziumsensitivität bewirkt⁵⁷. Die daraus resultierende gesteigerte NO-Produktion kann über eine Vasodilatation der Leitungsarterien sonographisch gemessen werden²³.

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 konnte⁵⁸.

Es gibt verschiedene Einflussmöglichkeiten, welche die Endothel-abhängige Dilatation bzw. die Genauigkeit der Quantifizierung beeinflussen können:

1. biologische Faktoren
2. methodische Variabilitäten
3. untersucherseitige Variabilitäten

Es sind verschiedene biologische Einflussfaktoren bekannt, welche die Höhe der FMD beeinflussen können. So wurde in Untersuchungen festgestellt, dass eine negative Korrelation zwischen Ruhediameter der Arteria brachialis und der Höhe der FMD vorliegt^{59,60}. Arterien, die einen kleineren Diameter als 2,5 mm haben, sind schwieriger zu messen⁶¹ und dilatieren im Verhältnis zu großen Arterien stärker⁵⁹. Als weiteres konnte eine zirkadiane Rhythmik mit einem Maximum der FMD am späten Nachmittag festgestellt werden⁶². Einen weiteren Einfluss stellt die Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron während des Menstruationszyklus dar⁶³. Außerdem kann die FMD durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst werden, so führt eine akute Hyperglykämie⁶⁴ und fettreiche Nahrung⁶⁵ zu einer Reduktion der FMD. Einen weiteren Einfluss auf eine veränderte FMD hat der Kaffeeconsum und die

Einnahme von Vitamin C²⁰. Akuter psychischer Stress⁶⁶ und Zigarettenrauchen führen ebenfalls zu einer Verminderung der FMD⁶⁷.

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 an nüchternen Probanden 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 ein²⁰. 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 Einschränkungen der Untersuchung sind eine inhomogene Geschlechterverteilung bei dem Kollektiv der alten Probanden und die fehlende Zyklusanamnese zu nennen. Bei dem mittleren Alter von 58 Jahren der weiblichen Probanden des alten Kollektivs kann jedoch zumeist ein postmenopausaler Hormonstatus angenommen werden.

Neben den biologischen Einflussfaktoren auf die FMD kommen folgende Faktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht:

(1.) die Größe des ischämischen Gebietes, (2.) die Ischämiezeit, (3.) die der Diametermessung zugrunde gelegenen Eckpunkte, (4.) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie und (5.) innerhalb des Herzzyklus.

In der Literatur herrscht kein Konsens darüber, welche Positionierung der Blutdruckmanschette zu bevorzugen ist⁵³. So zeigte sich in manchen Untersuchungen eine größere FMD, wenn die Blutdruckmanschette proximal der Ellenbeuge am Oberarm angelegt wurde⁵³, während in anderen Untersuchungen eine größere FMD bei dem Anlegen der Manschette am Unterarm erzielt wurde⁵³. Bei der proximalen Okklusion kann die induzierte Dilatation fälschlicherweise zu hoch gemessen werden, da es zum Anfall einer Vielzahl von Metaboliten²⁰, 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^{53;68-70}. Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen die tolerierbare Dauer von 5 Minuten bevorzugt.

Wie auch bei den meisten anderen Arbeitsgruppen⁵³ wurde die Diametermessung von der schallkopfnahen zur schallkopffernen M-Linie durchgeführt, welche dem anatomischen Adventitia-Media-Übergang entspricht⁷¹.

Die maximale Dilatation der Arteria brachialis wurde 60 s nach der Beendigung der Ischämie bestimmt. Da neue Untersuchungen darauf hinweisen, dass die maximale Dilatation sowohl bei Kindern⁷², als auch bei Erwachsenen⁷⁰ sehr voneinander abweichen kann, wurde die Dilatation bei den vorliegenden Untersuchungen erneut nach 90 s 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 Durchmesser der Arteria brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatile Veränderungen unterworfen ist.

Das verwendete Untersuchungsprotokoll entsprach zusammenfassend den in den Leitlinien empfohlenen Standards⁵³.

Folgende drei Variablen repräsentieren die Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität von Ultraschalluntersuchungen: (1.) die technische Ausrüstung, (2.) der Untersucher und (3.) die Auswertung.

Als technische Voraussetzung wurde für die nicht-invasive Vermessung des Durchmessers der Arteria brachialis ein linearer Schallkopf mit einer Ultraschallfrequenz von 15 MHz mit einer axialen Auflösung von 0,1 mm eingesetzt. Dies entsprach dem gegenwärtigen Standard für diese Ultraschalluntersuchungen⁵⁴, welche mindestens einen Schallkopf mit Frequenzen von 7,5 MHz voraussetzen. Nur einem gut geschulten Untersucher⁷³ ist es möglich, Durchmesser von 0,1 mm zu erkennen und somit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Da die technische Auflösung sehr nahe an dem zu

bestimmenden biologischen Bereich liegt, hängt die duplexsonographische Untersuchung der Gefäßfunktion umso stärker von der Erfahrung des Untersuchers ab. Der Untersucher sollte in einer ruhigen und bequemen Position sitzen und mindestens 100 Probeuntersuchungen unter Aufsicht vollbracht haben, bevor unabhängige Messungen durchgeführt werden können⁵³. 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%)⁵⁵.

Auch die Variabilität der Bestimmung von peripheren Gefäßdiametern hängt, neben der Genauigkeit des Ultraschallgeräts und der Untersuchung selbst, von der Art der Bilddatenanalyse ab. Diese umfassen die Unterschiede, welche vom Untersucher ausgehen (Intra-Observer-Differenz), die bei der Auswertung durch zwei verschiedene Personen (Inter-Observer-Differenz) und die durch die Untersuchung an unterschiedlichen Tagen entstehen (Tag-zu-Tag-Differenz). Letztere hängt wiederum von der biologischen Variation der Gefäßfunktion und der untersucherseitigen Variabilität ab. In den meisten publizierten Studien ist der Variationskoeffizient für die Messung der FMD zwischen 1% bis 3% für die Intra- und Inter-Observer-Variabilität angegeben⁷⁴⁻⁷⁶. Neuere Untersuchungen von Enderle et al.⁷⁷ zeigen Intra-Observer-Variabilitäten von 1,9-2,6%. Die Untersucher dieser Studie berichten, dass die Diameter, welche von zwei verschiedenen Untersuchern gemessen wurden, in 95% der Fälle nicht größer als 0,2 mm waren. In eigenen Voruntersuchungen konnte eine Intra-Observer-Differenz von $0,8 \pm 0,2\%$, eine Inter-Observer-Differenz von $0,8 \pm 0,1\%$ und eine Tag-zu-Tag-Differenz von $1,3 \pm 0,3\%$ erzielt werden.

Die meisten Untersuchungen der FMD wurden bislang an großen Kollektiven durchgeführt, um signifikante Unterschiede feststellen zu können. Bei gesunden Personen findet sich in der Literatur ein Mittelwert der Endothel-abhängigen Dilatation von $6,5 \pm 0,4\%$ ⁷⁸⁻⁸⁰. In der vorliegenden Untersuchung betrug die FMD des jungen gesunden Kollektivs $7,9 \pm 0,4\%$. Um Fehlerquellen bei der Auswertung zu vermeiden, wurde ein von Preik et al.⁵⁵ entwickeltes PC- assistiertes Analyseverfahren zur Diametermessung verwendet. Mittels dieses Analyseverfahrens war es möglich die Intra- und Inter-Observer-Differenz gering zu halten und die Untersuchungen mit einem geringen Zeitaufwand durchführen zu können.

4.1.2. Messung der Intima-Media-Dicke

Die Vermessung der IMT setzt eine genaue Kenntnis über die ultraschallphysikalische Entstehung des Ultraschallechos und über die anatomischen Strukturen, welche diese Echos erzeugen, voraus. Im Folgenden soll zunächst auf den Einfluss des Auflösungsvermögens der Ultraschallsonden, auf die Grundlagen der Entstehung eines Grenzechos und anschließend auf die Strukturen, welche an der sondennahen und sondenfernen Gefäßwand diese Echos erzeugen, eingegangen werden.

Damit eine hohe Bildqualität und die Möglichkeit der Differenzierung arterieller Wandstrukturen erreicht werden kann, wird eine hohe bildliche Auflösung der Ultraschallsonde vorausgesetzt. Außerdem muss ein senkrechter Einfall der von der Sonde ausgesandten Ultraschallwellen zur Gefäßlängsachse gewährleistet sein. Hochfrequente Schallgeber ermöglichen so eine optimale Darstellung des Ultraschallbildes¹⁴.

Ein Grenzflächenecho entsteht im Ultraschallbild am Übergang zweier Gewebe verschiedener Dichte. Die obere Begrenzung dieses Echos wird als „leading edge“ und die untere Begrenzung als „far edge“ bezeichnet¹⁴. Die genaue anatomische Lage kann nur am oberen Grenzflächenübergang einer echoreichen Struktur („leading edge“) quantifiziert werden. Der Grund hierfür liegt darin, dass beim distalen Übergang eines echoreichen in ein echoarmes Ultraschallecho automatisch echoreiche Reflexechos auftreten können. Diese können zusätzlich durch die vom Untersucher verstellbare Ultraschallverstärkung und von anderer Geräteeinstellung (z.B. Komprimierung oder Fokuseinstellung) beeinflusst werden. Zur Ausmessung der IMT wird die „leading edge“ Methode angewandt, bei der die Distanz zwischen zwei leading edges bestimmt wird. Die IMT ist durch die Distanz zum nächsten leading edge definiert und nicht durch die Breite des Echos⁸¹.

Um die Bestimmung der IMT zu verstehen, ist die Kenntnis des Zusammenhangs zwischen dem sonographischen Erscheinungsbild der Arterienwand und den anatomischen Gewebsstrukturen von besonderer Bedeutung. Bei der Wand einer gesunden Arterie imponiert sowohl eine sondenferne als auch sondennahe Doppelkontur, wobei zwei parallel verlaufende echoreiche Linien eine dunkle, echoarme Linie umsäumen. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die erste innere echoreiche Linie

der sondenfernen Arterienwand durch eine Reflexion von Ultraschallwellen an der Grenzfläche Gefäßlumen zu Intimaschicht erreicht wird^{82;83}. Die zweite äußere echoreiche Linie hingegen hat ihren Ursprung von der Grenzfläche der Gewebeschichten Media und Adventitia. Die Gesamtdicke von innerer echo-reicher und mittlerer echoarmer Linie der sondenfernen Arterienwand entspricht der histologischen IMT^{82;83}. Im Jahre 1990 wies P.Pignoli⁸³ darauf hin, dass die sondenferne Arterienwanddicke nicht mit der der sondennahen übereinstimmt. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die Ultraschallechos an der sondennahen Gefäßwand durch andere anatomische Strukturen hervorgerufen werden als an der sondenfernen Gefäßwand, wo die Schallsignale durch die Übergänge Lumen zu Media und Media zu Adventitia entstehen. Die Bestimmung der IMT ist somit nur an der sondenfernen und nicht an der sondennahen Arterienwand möglich, da hier genau definierte sonographische Grenzen zwischen Media zu Adventitia sowie Intima zu Gefäßlumen fehlen. Die Voraussetzung für die Vermessung ist die oben beschriebene „leading edge“ Methode. Dagegen publizierten R.W. Barnes und M.G. Bond⁸⁴ 1990, dass die arteriellen IMT Messungen im Bereich der sondennahen Arterienwand durchzuführen seien, diese Messungen reflektieren aber nicht die IMT, sondern die Dicken von Adventitiaanteilen, Media- und Intimaschichten.

Da die Unterscheidung der Intima- von der Mediaschicht sonographisch nicht möglich ist kann die Zunahme der IMT der Arterienwand nicht nur Folge einer Arteriosklerose sein, sondern auch in einer hypertoniebedingten Mediamuskelzellhyperplasie oder -hypertrophie begründet sein¹⁴.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten an welchem Gefäßabschnitt die IMT gemessen werden kann. Die meisten Untersuchungen finden an der Arteria carotis communis⁸⁵⁻⁸⁸ statt. Die Messungen können aber auch an der Arteria radialis⁸⁹ oder an der Arteria brachialis⁹⁰ durchgeführt werden. Die Auswertung dieser Untersuchungen findet an einem PC-gestützten-Analysesystem statt, welches von Prof. Gustavson (Universität, Göteborg, Schweden) entwickelt wurde. Die Voraussetzung für die automatische Auswertung ist das Vorliegen eines 1cm langen, geraden Gefäßabschnittes mit parallelen Wandkonturen¹⁴. Mit Hilfe dieses Analyseverfahrens ist, im Gegensatz zu der manuellen Auswertung, der zeitliche Aufwand wesentlich reduziert. Schmidt-Truckäss et al.⁹¹ verglichen ein automatisches Messprogramm mit manuellen IMT Messungen an

den sondenfernen Arterienwänden der Arteria carotis communis bei gesunden Probanden. Dabei ließen sich die Untersuchungszeiten im Mittel von $74,5 \pm 18,2$ s auf $25,4 \pm 3,3$ s verringern. Nachteilig ist die Anwendung der automatischen Auswertung bei lokalisierten Intima-Media-Verdickungen von mehr als 1,0 mm, wie sie zum Beispiel bei der Plaquebildung in der Arteria carotis communis vorkommen können¹⁴. Hier kommt es sonographisch zu einem Verlust der scharf abgrenzbaren Doppelkontur. Die Messungen der vorliegenden Untersuchungen wurden an der Arteria brachialis durchgeführt, an der Plaquebildungen nicht bekannt sind. So fallen diese Beschränkungen, wie sie bei der IMT Bestimmung der Arteria carotis communis bestehen, weg. Die Variabilitäten der Messung der IMT ist abhängig von dem Ort der Messung¹⁴. Die Intra-Observer-Differenz betrug in eigenen Voruntersuchungen $1,1 \pm 0,1\%$, die Inter-Observer-Differenz $1,9 \pm 0,9\%$ und die Tag-zu-Tag-Differenz $1,1 \pm 0,2\%$. Somit liegen diese Variabilitäten noch unterhalb von denen in der Literatur. Nachteilig für die Messung der IMT und die Anwendung in der klinischen Routine ist noch, dass kein standardisiertes Protokoll für die Messung vorliegt¹³. Um pathologische Veränderungen der Gefäßwand beurteilen zu können, ist die Kenntnis einer physiologischen Arterienwanddicke erforderlich¹⁴. Solche standardisierten Untersuchungen an großen Kollektiven liegen allerdings noch nicht vor^{13;14}. Hierzu wären altersabhängige, da eine Zunahme der Wanddicke im Alter normal ist, und geschlechtsspezifische Unterschiede erforderlich.

4.1.3. Quantifizierung der zirkulierenden NO-Metabolite

Die meisten Ansätze klinischer Studien legen nahe, dass Störungen des endothelialen Stoffwechsels eine wesentliche Rolle der endothelialen Dysfunktion darstellen⁹. Die in den letzten Jahren etablierten Biomarker wurden zu Beginn dieser Arbeit diskutiert. Das CRP ist der bevorzugte potentielle Marker für das kardiovaskuläre Risiko¹⁵.

Eine besondere Bedeutung hat dabei NO. Seine Bestimmung im Plasma kann die Konzentration an oder in der Endothelzelle reflektieren²⁶. 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 der Arteriosklerose begünstigen kann, wurden Metabolite des NO-Stoffwechselweges

quantifiziert. So wurden die direkten Abbauprodukte des NOs, (1.) das Nitrit und (2.) das Nitrat im Plasma bestimmt.

(1.) Das primäre Abbauprodukt von NO im humanem Plasma ist Nitrit, welches als instabiles Abbauprodukt weiter zu dem stabileren Nitrat reagiert^{26;92}. Durch eine spezielle Probenaufarbeitung wurde versucht, diesen Abbauprozess zu verlangsamen. Mittels dieser Aufarbeitung zeigten sich in experimentellen Untersuchungen von Kleinbongard et al.⁹³ und Lauer et al.²⁷ gute Ergebnisse für die diagnostische Genauigkeit der Nitritbestimmung zur NOS-Aktivität *in vivo*. Nach Acetylcholin-induzierter eNOS-Stimulation und nach L-NMMA-induzierter Inhibition wurden die Nitritkonzentrationen mit einer Placebo-Gruppe, welche physiologische Kochsalzlösung infundiert bekamen, verglichen. Dabei zeigte sich nach eNOS-Stimulation ein Anstieg und nach eNOS-Inhibition ein Abfall der plasmatischen Nitritkonzentration. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen, zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der Nitrit-Spiegel im Plasma. Damit konnte die Spezifität von plasmatischem Nitrit als Marker der regionalen NO-Freisetzung nachgewiesen werden, welcher mit einer hohen Sensitivität akute Änderungen der regionalen eNOS-Aktivität widerspiegelt. Die Bestimmung der Nitritkonzentration erfolgte mittels CLD, hierbei handelt es sich um ein Verfahren mit hoher Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit. In der vorliegenden Arbeit lagen die plasmatischen Nitritkonzentrationen durchschnittlich im Einklang mit dem in der Literatur angegebenen Bereich von 100-600 nmol/l^{26;27;94;95}. 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.) Die Nitratbestimmung erfolgte mittels Vanadium-(III)-Chlorid-FIA in Kombination mit der Griess-Reaktion, welches ein etabliertes Verfahren darstellt. Nach der chemischen Reduktion des Nitrats, wird die Nitritkonzentration spektrometrisch quantifiziert. Die Sensitivität dieses Verfahrens von 200 nmol/l war aufgrund von Voruntersuchungen und Literaturangaben für die durchgeführten Untersuchungen ausreichend. Die bestimmten Nitratkonzentrationen entsprachen auch hier den Werten der Literatur, welche bei 19-60 µmol/l liegen^{26;27;95}.

4.1.4. Ausbelastungskriterien der fahrradergometrischen Belastung

Um die Scherkraftinduktion bei der fahrradergometrischen Belastung der beiden Probandenkollektive quantifizieren zu können, wurde in den vorliegenden Untersuchungen eine Messung der Druck-Frequenz-Produkte vor der Belastung und zum maximalen Endpunkt der Belastung bestimmt. Dieses Druck-Frequenz-Produkt stellt einen Parameter für die Herzkreislauffunktion und letztlich des Blutflusses im Gefäßsystem dar. Je höher das Druck-Frequenz-Produkt und damit der Blutfluss ansteigt, desto stärker steigt auch die Scherkraft im Gefäßsystem an. Es zeigte sich ein vergleichbarer, nicht signifikant unterschiedlicher Anstieg des Druck-Frequenz-Produktes. Somit konnte gezeigt werden, dass trotz der unterschiedlichen Kollektive, welche sicherlich aufgrund des Alters eine unterschiedliche körperliche Verfassung aufwiesen, eine gleiche Scherkraftinduktion erzielt werden konnte.

Kritisch anzumerken ist die unterschiedliche Dauer und Intensität der Belastung. Das Kollektiv der jungen Probanden belastete sich durchschnittlich $11,5 \pm 0,5$ min bei einer Leistung von $196 \pm 7,6$ Watt, wohingegen sich die Probanden des alten Kollektivs im Durchschnitt $7,9 \pm 0,5$ min bei $164,8 \pm 8,9$ Watt belasteten. Demzufolge könnte angenommen werden, dass der höhere Nitritanstieg des jungen Probandenkollektivs bei der fahrradergometrischen Belastung im Vergleich zu den alten Probanden aufgrund der höheren Leistung und der längeren Zeit der Belastung vorliegt. So würde sich ein besserer Vergleich erzielen lassen, wenn beide Kollektive mit gleicher Belastungsdauer und Intensität belastet würden. Allerdings zeigte eine weitere Unterteilung der Probanden in Subkollektive mit einer vergleichbaren Belastung keine signifikanten Unterschiede der Höhe der Nitritkonzentration im Plasma nach der fahrradergometrischen Belastung.

Da in den vorliegenden Untersuchungen ein biochemischer Marker gesucht wurde, welcher in der klinischen Routine einsetzbar ist, wurde die Belastung nach den Leitlinien der DGK durchgeführt. Diese Leitlinien sehen bei der fahrradergometrischen Belastung einen stufenweisen Anstieg der Belastungsintensität vor und eine Beendigung der Belastung bei der körperlichen Erschöpfung oder den oben beschriebenen Abbruchkriterien. Demzufolge könnte die Bestimmung der Nitrit-Reserve parallel der Fahrradergometrie, welche in der klinischen Routine durchgeführt wird, eingesetzt werden.

4.2. Einfluss des Alters auf funktionelle und strukturelle Kenngrößen peripherer Leitungsarterien

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine chronisch progressive Erkrankung der Arterien. Da die arteriosklerotischen Veränderungen der Armgefäße nicht die gleiche Bedeutung bezüglich der Mortalität und Morbidität haben wie arteriosklerotische Veränderungen der koronar- bzw. hirnversorgenden Gefäße, ist die entscheidende Frage, welcher **Zusammenhang** zwischen brachialer Endothelfunktion und den vital relevanten Gefäßabschnitten besteht. Sorensen et al.⁹⁰ beschäftigten sich mit dieser Frage und konnten eine gute Korrelation zwischen dem histologischen Schweregrad einer Arteriosklerose in den Koronararterien bzw. der Arteria carotis und der Arteria brachialis feststellen. Auch in Untersuchungen von Anderson et al.⁹⁶ wurde die periphere und koronare Endothelfunktion untersucht. Sie fanden heraus, dass Patienten mit einer koronaren Endotheldysfunktion eine signifikant reduzierte FMD aufwiesen. Auch in anderen Untersuchungen konnte eine enge Beziehung zwischen der Endothelfunktion der Koronararterien und der Arteria brachialis nachgewiesen werden^{97;98}. Somit handelt es sich bei der Messung der FMD der Arteria brachialis um eine einfache und nicht-invasive Untersuchung, welche seit Jahren als Surrogatparameter einer endothelialen Dysfunktion, welche als ein Frühstadium der Arteriosklerose angesehen wird, verwendet wird.

Das Alter gilt als Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose^{38;41-43}. In zahlreichen Versuchen wurde der Einfluss dieses Risikofaktors auf die Gefäßfunktion untersucht. In verschiedenen Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter die Dilatation der Gefäße eingeschränkt ist. Konga et al.⁹⁹ untersuchten 1988 die Aorta von Ratten, welche nach der Gabe von Acetylcholin, einem Endothel-abhängigen-Vasodilatator, mit zunehmendem Alter vermindert dilatierte. Dieses Phänomen bestätigten auch andere Studien¹⁰⁰, welche die Gefäßfunktion nach der gleichen Methode untersuchten. Ähnliche Versuche wurden von Blackwall et al.¹⁰¹ an Mäusen durchgeführt, welche zu dem Selben Ergebnis kamen. Taddei et al.¹⁰² stellten eine verminderte Acetylcholin-induzierte Dilatation der Arteria brachialis mit zunehmendem Alter fest. Aus anderen Untersuchungen geht hervor, dass bei Männern die altersabhängige Abnahme der Dilatation früher beginnt als bei Frauen. Diese Unter-

suchung führte Celermajer et al.¹⁰³ durch, indem er die FMD der Arteria brachialis bestimmte. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der FMD, insbesondere bei Männern ab dem 40. Lebensjahr (Abnahme um 0,21%) und bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr (Abnahme um 0,49%). In anderen Untersuchungen hingegen wurde gezeigt, dass eine Abnahme der Dilatation in dem vierten Lebensjahrzehnt vorliegt³⁹.

Im Einklang mit der Literatur konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen eine altersabhängige Gefäßveränderung festgestellt werden. In dem Kollektiv der alten Probanden zeigte sich eine geringere FMD als bei dem jungen Kollektiv. Der genaue Pathomechanismus für das Abfallen der Endothel-abhängigen Dilatation bei dem Risikofaktor Alter ist noch ungeklärt^{39;44-46}.

Es kommen mehrere Mechanismen in Betracht, aus welchem Grund das Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor zu einer verminderten Endothel-abhängigen Dilatation führen kann. Viele Studien belegen, dass eine Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit vorliegt^{39;43;44;48;104}, welche durch (1.) einen beschleunigten Abbau von NO oder (2.) durch eine Hemmung der Bildung von NO hervorgerufen werden kann. Verschiedene Studien sprechen dafür, dass das Alter über eine gesteigerte Radikalbildung zu einem beschleunigten Abbau von NO führen kann⁴⁷. Als wesentlicher Mechanismus hierzu wird eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Gefäßwand diskutiert¹⁰⁵. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den Superoxidanionen (O_2^-) zu, welche die Bioverfügbarkeit von NO unter Peroxynitritbildung ($ONOO^-$) verringern können. Diese Reaktion läuft dreimal schneller ab als der Abbau von O_2^- durch die Superoxiddismutase⁴⁷. $ONOO^-$ kann wiederum die NOS inhibieren und somit zu einer Einschränkung der NO-Bildung führen¹⁰⁶. Taddei et al. haben Untersuchungen durchgeführt, welche besagen, dass der ansteigende oxidative Stress erst ab einem Alter von über 60 Jahren bedeutend ist. Zuvor scheint ein Umbau des L-Arginin-Stoffwechsels zu einer endothelialen Dysfunktion zu führen⁴². In anderen Untersuchungen wurde in einem Tierversuch gezeigt, dass das Protein p66shc eine Bedeutung bei dem oxidativen Stress hat. Eine Inaktivierung dieses Gens würde somit vor einer altersabhängigen endothelialen Dysfunktion schützen¹⁰⁷.

Es wird auch diskutiert, ob es im Alter neben der vermehrten Bildung der freien Radikale zu einer veränderten Aktivität der Superoxiddismutase kommt, allerdings ist dies nicht gut untersucht⁴⁴.

Eine Möglichkeit, welche im Alter zu einer Hemmung der Bildung von NO führt, ist die verminderte eNOS-Expression¹⁰⁸. Die eNOS-Expression wird durch Beeinflussung des eNOS Promotors oder der eNOS mRNA reguliert. Eine gegenteilige Ansicht vertreten hingegen Cernadas et al.¹⁰⁹ und Chou et al.¹¹⁰, welche in Tierversuchen keine Änderung oder sogar einen Anstieg der eNOS-Expression beobachtet haben.

Eine Reduzierung der eNOS-Aktivität führt ebenfalls zu einer Hemmung der Bildung von NO¹¹¹. Hierbei ist die Phosphorylierung des interkonvertierbaren Enzyms von entscheidender Bedeutung. Durch einwirkenden Scherstress wird eine Akt-abhängige Kaskade aktiviert, welche zu einer Phosphorylierung der eNOS führt. Smith und Hagen³⁸ haben in Tierversuchen herausgefunden, dass diese eNOS Phosphorylierung, welche einem Mangel der Akt-Kinase Aktivität zuzuschreiben ist, in der Aorta von älteren Ratten um bis zu 50% geringer ist, als in der Aorta von jüngeren Ratten.

Neben der Verringerung der Bioverfügbarkeit von NO wird der Anstieg von Vasokonstriktoren wie Thromboxan A2 und Endothelin (ET-1) diskutiert, welche im Alter zu einer verminderten Endothel-abhängigen Dilatation der Gefäße führen können. Gleichzeitig kommt es zu einer Verminderung der Vasodilatoren, wobei nicht nur NO betroffen zu sein scheint, sondern auch EDHF und Prostazylin^{39;44}. Es ist nicht genau geklärt, welcher Mediator letztendlich dazu führt, dass im Alter die Dilatation eingeschränkt ist⁴⁸.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass es im Alter zu einer verminderten Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen kommt, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führt^{46;78}.

Als Ursache einer eingeschränkten FMD kommt bei den klassischen Risikofaktoren (Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und Rauchen) eine verminderte Wirkung von NO an den glatten Muskelzellen in Betracht⁶⁰. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung neben der FMD auch die Endothel-unabhängige Dilatation bestimmt. In Einklang mit anderen Untersuchungen^{39;59;103} zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Endothel-unabhängigen Dilatation des alten Kollektivs gegenüber dem

Kollektiv der jungen Probanden. Das Verhältnis der Endothel-abhängigen und der Endothel-unabhängigen Dilatation war bei dem alten Probandenkollektiv signifikant geringer als bei den jungen Probanden. Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der FMD vorwiegend durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit und nur zu einem geringeren Anteil durch eine eingeschränkte NO-Sensitivität des glattmuskulären Kompartiments erklärt werden kann.

Abschließend ist festzuhalten, dass das Alter als kardiovaskulärer Risikofaktor mit einer Einschränkung der Endothelfunktion einhergeht. Diese endotheliale Dysfunktion lässt sich nicht nur durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit erklären. Als Ursache kommen eine Vielzahl von Pathomechanismen in Betracht, wobei eine Differenzierung dieser Pathomechanismen nicht das Ziel dieser Studie und mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich war, da die hier gemessene eingeschränkte FMD einen Summationseffekt aller dieser Einflussfaktoren darstellt.

Nicht nur die funktionelle Kenngröße weist Veränderungen im Alter auf, sondern auch die strukturelle Kenngröße ist im Alter verändert. Unter physiologischen Veränderungen konnten verschiedene Studien altersabhängige Unterschiede der Intima-Media-Dicke zeigen¹¹²⁻¹¹⁴. Allerdings wurde die IMT an der Arteria carotis bestimmt, wohingegen die IMT der vorliegenden Arbeit an der Arteria brachialis bestimmt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stimmen mit denen der Literatur überein, welche besagen, dass die IMT verdickt ist, wenn das Alter als Risikofaktor vorliegt. Die mittlere Zunahme der IMT wird mit 0,005-0,01 mm/Jahr^{112;113} angegeben. Nicht nur das Alter, sondern auch das männliche Geschlecht¹¹², sowie die oben beschriebenen Risikofaktoren führen zu einer Zunahme der IMT. In der vorliegenden Untersuchung wurden Probanden rekrutiert, welche den alleinigen Risikofaktor Alter aufwiesen. Kritisch anzumerken ist hier, dass die geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht berücksichtigt wurden. Allerdings war das Ziel der Arbeit festzustellen, ob im Alter die strukturelle Kenngröße verändert ist und ob ein enger Zusammenhang zwischen der funktionellen und der strukturellen Kenngröße besteht.

4.3. Einfluss des Alters auf biochemische Kenngrößen

Mit dem Ziel Veränderungen der biochemischen Kenngröße zu untersuchen, wurde in den eigenen Untersuchungen Nitrit und Nitrat bei Personen mit dem Risikofaktor Alter im Plasma bestimmt. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO im menschlichen Blut gestaltet es sich als sehr schwierig NO selbst zu untersuchen²⁷. In wässriger Lösung ist eine konzentrationsabhängige Halbwertszeit von NO von 9-900 s beschrieben²⁶, im Vollblut hingegen wird die Halbwertszeit auf 0,05-1,8 ms geschätzt²³. Andere Untersuchungen gehen sogar von einer Halbwertszeit von 1 μ s aus¹¹⁵. Die viel kürzere Halbwertszeit erklärt sich aus der hohen Reaktivität des NO mit oxygeniertem Hämoglobin, welches durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe bestätigt wurde¹¹⁶. Bei der Zugabe von 5 μ mol/l NO zu Plasma wurde eine Halbwertszeit von 68 s bestimmt. Im Vollblut folgte der Abbau allerdings so schnell, dass mit der verwendeten NO-Elektrode kein NO messbar war. Aus diesem Grund schied NO als biochemischer Marker für die endotheliale Dysfunktion aus, da es noch während der Blutentnahme vollständig abgebaut wird.

Kommentar:

NO wird in humanem Plasma primär nahezu vollständig zu Nitrit umgesetzt, welches als instabiles Abbauprodukt mit einer Halbwertszeit von 110 s in Gegenwart von Erythrozyten zu dem stabileren Nitrat reagiert^{26;92}.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Nitratkonzentration im Plasma des alten Kollektivs im Vergleich zu dem Kollektiv der jungen Probanden. 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 sie wird durch eine Reihe von eNOS-unabhängigen Faktoren, wie zum Beispiel die Speichelbildung, der Nitratbildung der Darmbakterien, der Aufnahme der Stickoxide aus der Umgebungsluft und der Nahrungsaufnahme beeinflusst²⁶. Die Aussagekraft wird zusätzlich dadurch eingeschränkt, dass Nitrat in sehr hohen Hintergrundkonzentrationen (mikromolarer Bereich) vorliegt und ein Verteilungsvolumen einnimmt, welches ca. fünfmal größer als das Plasmavolumen ist und damit dem Extrazellulärvolumen entspricht¹¹⁷. Daher ist die exakte Bestimmung von Änderungen, welche auf die endogene NO-Bildung (nanomolarer Bereich) zurückzuführen sind, nur eingeschränkt möglich.

Zusammenfassend ergibt sich hieraus die Schlussfolgerung, dass auch Nitrat als biochemischer Marker einer endothelialen Dysfunktion nicht geeignet ist.

In verschiedenen Untersuchungen konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass Nitrit die eNOS-Aktivität repräsentiert^{27;29;118;119}. Durch die pharmakologische Stimulation der eNOS mittels Acetylcholin, stieg der Nitritspiegel im Plasma signifikant an, wohingegen die Nitritspiegel nach Gabe von Papaverin, einem Endothel-unabhängigen Vasodilatator, unverändert blieben. Dieser Aspekt wurde ebenfalls von anderen Untersuchungen bestätigt, welche belegen, dass annähernd 70-90% des im Plasma zirkulierenden Nitrit der eNOS-Aktivität sowohl im menschlichen als auch im Plasma verschiedener Säugetiere entstammt^{30;95}. Aufbauend auf diese Untersuchungen wurde in Vorarbeiten dieser Arbeit festgestellt, dass die Nitrit-Reserve die scherkraftinduzierte Steigerung der eNOS-Aktivität widerspiegelt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Nitrit-Reserve im Plasma nach fahrradergometrischer Belastung bestimmt. Hier zeigte sich eine Abnahme der Nitrit-Reserve in dem alten Kollektiv im Vergleich zu dem jungen Kollektiv.

Ähnliche Versuche wie in der vorliegenden Arbeit wurden von Allen et al.¹²⁰ durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde die Belastung mittels eines Laufbands durchgeführt und auch hier wurde die Intensität der Belastung stufenweise gesteigert. Anders als bei den vorliegenden Untersuchungen wurde hier die NO_x Konzentration, die Gesamtheit des im Plasma zirkulierenden Nitrit und Nitrat, von gesunden Probanden und solchen mit kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmt, da sie davon ausgehen, dass die Nitritkonzentration in der klinischen Routine schwierig zu bestimmen ist, da es schon während der Lagerung zu einer Oxidation von Nitrit zu Nitrat kommt. Im Vergleich zu dem gesunden Kontrollkollektiv waren die NO_x Anstiege bei Personen mit kardiovaskulären Erkrankungen signifikant geringer. Kritisch anzumerken sind hier die oben aufgeführten Gründe warum die Nitratkonzentration nicht die endogene NO-Synthese widerspiegelt. Daraus folgend ist durch die Bestimmung der zirkulierenden Nitrat- und NO_x-Konzentrationen im Vergleich zu Nitrit eine sensitive Bestimmung der eNOS-Aktivität nicht möglich.

4.4. Klinische Bedeutung und Ausblick

Erst in den letzten Jahren konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass ein Zusammenhang der endothelialen Dysfunktion und der Entstehung einer manifesten Arteriosklerose besteht, welche zu kardiovaskulären Ereignissen führen kann^{9;11;12}. Heitzer et al.¹²¹ zeigten, dass Personen, die eine eingeschränkte Endothel-abhängige Dilatation der Widerstandsgefäße des Unterarms aufweisen, ein erhöhtes Risiko haben, ein kardiales Ereignis zu erleiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Lebensalter als Risikofaktor betrachtet, welches als einer der bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung der Arteriosklerose angesehen wird⁴⁶. Daher muss der individuellen Risikostratifizierung der endothelialen Dysfunktion große Bedeutung geschenkt werden, zumal einige Untersuchungen davon ausgehen, dass diese zumindest in Teilen rückführbar sein kann^{122;123}. So konnte gezeigt werden, dass körperliches Training zu einer Steigerung der FMD führt^{43;45;123}. Auch die therapeutische Gabe von Vitamin C zielt darauf ab, die Bioverfügbarkeit von NO zu erhöhen¹²⁴. Diese Befunde sprechen dafür, dass die endotheliale Dysfunktion ein kausales Bindeglied und somit eine Zielgröße in der Prophylaxe und Therapie der Arteriosklerose darstellt^{9;125}.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit drei unterschiedliche Kenngrößen betrachtet, welche sich mit zunehmendem Alter verändern und eine umfassende Charakterisierung der endothelialen Dysfunktion bieten. Kritisch anzumerken ist die unterschiedliche Anzahl der Probanden in den einzelnen Lebensdekaden. Allerdings war es Ziel der Arbeit festzustellen, ob eine Veränderung der Endothelfunktion im Alter vorliegt. Weiterführend müssten Untersuchungen durchgeführt werden, welche die Veränderungen der Endothelfunktion im Alter an einem größeren Kollektiv mit gleicher Anzahl der Probanden in den jeweiligen Lebensdekaden aufzeigen. Diese drei beschriebenen Kenngrößen bieten möglicherweise einen Ansatz, welcher es möglich macht ältere Patienten prophylaktisch zu untersuchen und eine eventuell diagnostizierte endotheliale Dysfunktion frühzeitig zu therapieren und Folgen zu vermeiden.

Sowohl die Messung der FMD, als funktionelle Kenngröße, als auch die Messung der IMT, als strukturelle Kenngröße, sind nicht-invasive

Untersuchungsmethoden, welche bereits etabliert sind und somit in der Klinik eingesetzt werden könnten.

Ebenso könnte die Bestimmung der Nitrit-Reserve, als biochemische Kenngröße gut in der klinischen Routine- oder Vorsorgeuntersuchung eingesetzt werden. Da die Fahrradergometrie in den Kliniken verfügbar ist, wäre neben einem Belastungs-EKG eine zusätzliche Blutentnahme erforderlich, um die Nitritkonzentrationen bestimmen zu können.

Vor dem Einsatz in die klinische Routine müssten diese Untersuchungsmethoden noch weiter modifiziert werden, damit es sich um eine kostengünstige Methode mit einer leichten Handhabung handelt.

Des Weiteren müssten vor dem Einsatz in die klinische Routine physiologische und weitere methodische Einflussfaktoren und Normalwerte in einem größeren Kollektiv identifiziert werden. Auch die prognostische Wertigkeit müsste noch in Längsschnittuntersuchungen nachgewiesen werden.

5. Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion, mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit, spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose. Das Lebensalter wird hierbei als einer der bedeutendsten Risikofaktoren angesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Hypothese untersucht, dass funktionelle, strukturelle und biochemische Kenngrößen der Endothelfunktion im Alter verändert sind.

Hierzu wurden 31 junge, gesunde Probanden im Alter von 19 bis 28 Jahren und 29 alte, gesunde Probanden im Alter von 35 bis 74 Jahren untersucht. Als funktionelle Kenngröße der Endothelfunktion wurde die Fluss-vermittelte Dilatation der Arteria brachialis mittels des etablierten, nicht-invasiven Verfahrens (FMD-Messung) bestimmt. Als strukturelle Kenngröße wurde die Intima-Media-Dicke (IMT-Messung) der Arteria brachialis ebenfalls mittels Ultraschall bestimmt. Die Nitrit-Reserve im Plasma während der fahrrad-ergometrischen Belastung wurde als biochemische Kenngröße ermittelt.

Es zeigte sich im Alter eine Abnahme der FMD ($7,9 \pm 0,4\%$ vs. $5,1 \pm 0,3\%$; $p < 0,05$), eine Zunahme der IMT ($0,34 \pm 0\text{mm}$ vs. $0,38 \pm 0,01\text{mm}$; $p < 0,05$) und eine Abnahme der Nitrit-Reserve während der fahrradergometrischen Belastung ($58 \pm 11,2\%$ vs. $15,1 \pm 5,6\%$ fünf Minuten nach Beendigung der Belastung; $p < 0,05$). Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lebensalter und einer eingeschränkten FMD ($n=48$; $r=-0,54$; $p < 0,0001$), einer zunehmenden IMT ($n=53$; $r=0,48$; $p < 0,0001$) und einer Abnahme der Nitrit-Reserve ($n=53$; $r=-0,52$; $p < 0,001$). Weiterhin zeigten die funktionellen und strukturellen Veränderungen der Endothelfunktion eine enge Korrelation zueinander ($n=43$; $r=-0,55$; $p < 0,001$). Dagegen spiegelte die biochemische Kenngröße die funktionelle ($n=44$; $r=0,25$; $p < 0,05$) und strukturelle ($n=45$; $r=-0,17$; $p < 0,05$) Veränderung nur bedingt wider.

Zusammenfassend ist es möglich altersabhängig funktionelle, strukturelle und biochemische Veränderungen der Endothelfunktion mit Hilfe nicht-invasiver Untersuchungen sensitiv nachzuweisen. Dies erlaubt eine frühzeitige Erfassung von komplexen Veränderungen der Gefäßfunktion. Eine mögliche Bedeutung in der Diagnostik und Therapiekontrolle einer endothelialen Dysfunktion im klinischen Alltag muss zukünftig in umfangreichen Studien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
2. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol*. 1999;94:295-314.
3. Stary HC, Bleakley Chandler A, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, and Wissler RW. Definition of Initial, Fatty Streak and intermediate Lesions of Atherosclerosis. 2462-2478. 1994. Ref Type: Generic
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Cohn J.N., Quyyummi AA., Hollenberg NK., Jamerson KA. Surrogate Markers for cardiovascular disease: Functional Markers. *Circulation*. 2004;109:31-46.
8. Kelm M, Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-Arginin-NO-Pathway. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:107-127.
9. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion: therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist*. 1999;40:1300-1307.
10. 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.
11. Schachinger V, Britten MB, Zeiher A. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of heart disease. *Circulation*. 2000;101:1899-1906.
12. 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.

13. Mancini GB, Dahlöf B, Diez J. Surrogate markers for cardiovascular disease: Structural markers. *Circulation*. 2004;109:22-30.
14. 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.
15. Ridker PM, Brown J.S., Vaughan E.D., Harrison DG, Metha J.L. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*. 2004;109:19.
16. Ledue TB, Rifai N. Preanalytic and analytic sources of variation in C-reaktive protein measurement : implications for cardiovascular disease risk assesment. *clin chem*. 2003;1258-1271.
17. Leyendecker T. Analytik von Nitrit im Plasma: Darstellung der Änderung der eNOS-Aktivität durch physiologische Stimuli bei gesunden Normalpersonen. 2006. Ref Type: Thesis/Dissertation
18. Rassaf, T., Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Mangold S., Leyendecker T., Rottler J., and Kelm, M. Impaired Nitrite-Reserve in Age-Related Endothelial Dysfunction. 2005. Ref Type: In Press
19. Lauer, T., Rassaf, T., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Mangold S., Leyendecker T., Rottler J., and Kelm, M. Nitrite-Reserve as a Marker for Endothelial Dysfunction. 2005. Ref Type: In Press
20. 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.
21. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333:664-666.
22. Schmidt HHHW, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K-E, Klein MM, Niroomand F, Böhme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1988;154:213-216.
23. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res*. 1990;66:1561-1575.
24. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80 (Suppl. 5):3-6.
25. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 1995;96:60-68.
26. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411:273-289.

27. 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.
28. 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.
29. Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M. Indexes of NO-bioavailability in human blood. *News Physiol Sci*. 2002;17:251-255.
30. 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.
31. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz R, Scharf R, Willers R, Feelisch M, and Kelm M. Plasma nitrite endothelial dysfunction and cardiovascular risk load in humans. 2005. Ref Type: In Press
32. Lauer T, Rassaf T, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Kleinbongard P, and Kelm M. Plasma Nitrit-Reserve als Marker einer endothelialen Dysfunktion. *Zeitschrift für Kardiologie* 93 (3), -. 2004. Ref Type: Abstract
33. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:791-804.
34. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241.
35. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:23-37.
36. Castelli WP. Koronare Risikofaktoren bei älteren Menschen - Erfahrungen der Framingham-Studie. *Kardio*. 1989;8:11-12.
37. Weinsaft JW, Edelberg JM. Aging-associated changes in vascular activity: a potential link to geriatric cardiovascular disease. *Am J Geriatr Cardiol*. 2001;10:348-354.
38. Smith A.R., Hagen T.M. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by lipoic acid. *Biochemical Society*. 2003;31:1447-1449.
39. Gerhard M, Roddy M-A, Creager SJ, Creager MA. Aging progressively impairs endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans. *Hypertension*. 1996;27:849-853.

40. Zeiher AM, Drexler H, Saurbier B, Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. *J Clin Invest.* 1993;92:652-662.
41. Widlansky ME, Gokce N, Keaney jr JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:1149-1160.
42. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A. Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension.* 2001;38:274-279.
43. Taddei S, Galetta F, Virdis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Franzoni F, Giusti C, Salvetti A. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. *Circulation.* 2000;101:2896-2901.
44. Matz R.L., Schott C., Stoclet J.C., Andriantsitohaina R. Age-related Endothelial Dysfunction with respect to nitric oxide, Endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products. *Physiol Res.* 2000;49:11-18.
45. Eskurza I., Monahan KD, Robinson JA., Seals DR. Effect of acute chronic ascorbic acid on flow-mediated dilatation with sedentary and physically active human aging. *J Physiol.* 2004;556:315-324.
46. Rauscher F.M., Goldschmidt-Clermont P.J., Davis B.H., Tao Wang, Gregg D., Ramaswami P., Phippen A.M., Annex B.H., Dong C., Taylor D.A.: Aging, Progenitor cell exhaustion, and Artherosclerosis. *Circulation.* 2003;108:457-463.
47. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.
48. Singh N., Prasad S., Singer D.R.J., MacAllister R.J. Aging is associated with impairment of nitric oxide and prostanoid dilator pathways in human forearm. *Biochem Soc Symp.* 2002;102:595-600.
49. 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.
50. 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.
51. 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 Publ.* 1999.
52. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997;20:1183-1197.

53. Coretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager M, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:257-265.
54. Celermajer DS. Testing Endothelial Function Using Ultrasound. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32 (Suppl. 3):29-32.
55. 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.
56. Wendelhag, I., Liang, Q., Gustavsson, T., and Wikstrand, J. A New Automated Computerized Analyzing System Simplifies Readings and Reduces The Variability in Ultrasound Measurement of human Intima-Media-Thickness. 2195-2200. 1997. Ref Type: Generic
57. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996;79:984-991.
58. Joannides R, Haefeli WE, Lindner L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, Lüscher TF. Nitric Oxide Is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries in Vivo. *Circulation.* 1995;91(5):1314-1319.
59. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet.* 1992;340:1111-1115.
60. 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.
61. 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.
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. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Sorenson KE, Celermajer D, Spiegelthaler DJ, Georgakopoulos D, Robinson JA., Thomas O, Deanfield J. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*. 1995;74:247-253.
70. Bressler B, Chan S, Mancini GB. Temporal response of brachial artery dilatation after occlusion and nitroglycerin. *Am J Cardiol*. 2000;85:396-400.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1468-1474.

75. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation*. 1993;88:2149-2155.
76. Corretti MC, Plotnick GD, Vogel RA. Technical aspects of evaluating brachial artery vasodilatation using high-frequency ultrasound. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1995;268:H1397-H1404.
77. Enderle MD, Balletshofer BM, Schmülling RM, Häring HU, Pfohl M. Early detection of atherosclerosis in type 2 diabetic patients using high resolution ultrasound. *Ultraschall Med*. 1998;19:16-21.
78. Heiss C, Keymel S, Niesler U, Ziemann J, Kelm M, Kalka C. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *JACC*. 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. Heiss C, Lauer T, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1276-1283.
81. Kanters SD, Algra A, van Leeuwen MS, Banga JD. Reproducibility of in vivo carotid intima-media thickness measurements. *Stroke*. 1997;28:665-671.
82. Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation*. 1986;74:1399-1406.
83. Pignoli P, Glagov S, Newmann W, Schaffer S. Ultrasonic evaluation of arterial intima and media thickness: Development and validation of methodology. In: Pathobiology of the human atherosclerotic plaque. *New*. 1990.
84. Barnes RW, Bond MG, Riley WA, Wilmoth SK. Atherosclerosis risk in communities-Ultrasound reading center:quantitative B-mode scanning protocol in pathobiology of the human atherosclerotic plaque. *Springer Verlag*. 1990.
85. Ravikumar R, Deepa R, Shanthirani C, Mohan V. Comparison of carotid intima-media-thickness, arterial stiffness, and brachial artery flow mediated dilatation in diabetic and nondiabetic subjects. *Am J Cardiol*. 2002;702-707.
86. Tanaka H, Dinunno FA, Monahan KD, DeSouza CA, Seals DR. Carotid artery wall hypertrophy with age is related to local systolic blood pressure in healthy men. *Arterioscler Thromb*. 2001;21:82-87.
87. Brevetti G, Marzullo P, Silvestro A, Pivonello R, Oliva G, di Somma C, Lombardi G, Colao A. Early vascular alterations in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3174-3179.

88. Furumoto T, Fujii S, Saito N, Mikami T, Kitabatake A. Relationship between brachial artery flow-mediated dilatation and carotid artery intima-media-thickness in patients with suspected coronary artery disease. *Jpn Heart*. 2003;43:117-125.
89. Boutouyrie P, Bussy C, Lacolley P, Girerd X, Laloux B, Laurent S. Association between local pulse pressure, mean blood pressure, and large-artery remodeling. *Circulation*. 1999;100:1387-1393.
90. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the human brachial artery. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:318-322.
91. Schmidt-Trucksass A., Cheng D.C., Sandbrock M., Schulte-Monting J., Rauramaa R., Huonker M., Burkhardt H. Computerized analysing system using the active contour in ultrasound measurements of carotid artery intima-media thickness. *Clin Physiol*. 2001;21:561-569.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. 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.
96. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre 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.
97. Schröder S, Enderle M D, Meisner C, Baumbach A, Herdeg C, Oberhoff M, Ossen R, Pfohl M, Karsch KR. Ultraschallmessung der Endothelfunktion der Arteria brachialis bei Verdacht auf eine koronare Herzkrankheit. *Dtsch Med Wochenschr*. 1999;124:886-890.
98. 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.

99. Konga T., Takata Y., Kobayashi K., Takishita S., Yamashita Y., Fujishima M. Aging suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptor in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 1988;6:243-245.
100. Küng CF, Lüscher TF. Different mechanisms of endothelial dysfunction with aging and hypertension in rat aorta. *Hypertension.* 1995;25:194-200.
101. Blackwell KA., Sorenson JP., Richardson DM., Smith LA., Suda O., Nath K., Katusic ZS. Mechanisms of aging-induced impairment of endothelium-dependent relaxation: role of tetrahydrobiopterin. *Am J Physiol.* 2004.
102. Taddei S, Virdis A, Mattei P, Ghiadoni L, Gennari A, Fasolo CB, Sudano I, Salvetti A. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation.* 1995;91:1981-1987.
103. Celermajer D, Sorensen K, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson JA., Deanfield J. Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:471-476.
104. van de Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Lüscher TF. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med.* 2000;192:1731-1743.
105. Landmesser U., Harrison D. Oxidant stress as a marker for cardiovascular events. Oxidative stress in the spot. *Circulation.* 2001;104:2638-2640.
106. 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.
107. Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., Martin-Padura I., Savoia C., Migliaccio E., Pelicci PG., Schiavoni M., Lüscher TF., Volpe M., Cosentino F. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation.* 2004;110:2889-2895.
108. Barton M, Cosentino F., Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Lüscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. *Hypertension.* 1997;30:817-824.
109. Cernadas MR., Sanchez de miguel L., Garcia-Duran M., Gonzalez-Fernandez F., Millas I, Monton M., Rodrigo J., Rico L., Fernandez P., de Frutos T, Rodriguez-Feo JA., Guerra J., Caramelo C, Casado S, Lopez-Farre A. Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in vascular wall of young and aging rats. *Circ Res.* 1998;83:279-286.
110. Chou TC., Yen MH., Li Cy, Ding Y-A. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension.* 1998;31:643-648.

111. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2003;284:R1-R12.
112. Howard G, Sharett AR., Heiss G, et al. Carotid artery intimal medial thickness distribution in general populations as evaluated by B-mode ultrasound. *Stroke.* 1993;24:1297-1304.
113. Homma S, Hirose N, Ishida H, et al. Carotid plaque and intima-media-thickness assessed by B-mode ultrasonography in subjects ranging for young adults to centenarians. *Stroke.* 2001;32:830-835.
114. O'Leary DH, Polak JF, Kromal RA, et al. Distribution and correlates of sonographically detected carotid artery disease in cardiovascular health study. *Stroke.* 1992;23:1752-1760.
115. 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.
116. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Experimental and clinical studies on decomposition and transport of authentic NO in Plasma: Evidence for systemic effects on conduit and resistance arteries in the human circulation. *Circulation.* 2002;91:470-477.
117. Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, Forfia PR, Seyedi N, Shen W, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH. Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation.* 1995;91:2982-2988.
118. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res.* 1999;41:765-772.
119. 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.
120. Allen J.D., Cobb F.R., Gow AJ. Regional and whole-body markers of nitric oxide production following hyperemic stimuli. *Free Radic Biol Med.* 2005;38:1164-1169.
121. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2001;104:2673-2678.
122. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:325-333.

123. Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubbs M, World M, Deanfield JE. Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1379-1385.
124. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*. 1996;94:6-9.
125. Stehouwer CDA. Is measurement of endothelial dysfunction clinically useful? *Eur J Clin Invest*. 1999;29:459-461.

7. Veröffentlichungen

A. Paper:

1. Rassaf, T, Lauer, T, Heiss, C, Balzer, J, 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
2. 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. Posterpräsentationen/Abstracts:

3. 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 Institutes of Health, MD, USA) (Sept. 2005)
4. 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 und für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe das wissenschaftliche Arbeiten zu erlernen.

Herrn Dr. med. Thomas Lauer danke ich sehr für die hervorragende Betreuung. Durch seine unermüdbare Motivation, seine konstruktiven Ideen und seinem stets kompetenten Einsatz war er mir eine sehr große Unterstützung.

Herrn Dr. med. Tienush Rassaf danke ich ebenfalls für den kompetenten Einsatz und die konstruktiven Hilfestellungen.

Herrn Dr. med. Jan Balzer danke ich für die Einführung in die Ultraschalluntersuchungen. Dank seiner Motivation und ständigen Hilfsbereitschaft war er mir eine große Hilfe.

Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard danke ich für ihre Hilfe, sowohl für ihre konstruktiven Vorschläge als auch für die Rekrutierung vieler unserer Probanden.

Frau MTA Simone Matern danke ich sehr für ihre zuverlässige Hilfsbereitschaft. Auch bei der Arbeit im Sonographieraum war sie stets bereit mir zu helfen und die Probleme zu lösen.

Auch den Mitarbeitern des kardiologischen Labors möchte ich danken, da sie immer sehr hilfsbereit waren.

Meinen lieben Eltern und meinen Brüdern möchte ich besonders danken. Durch den starken Rückhalt, den sie mir geben, die ständige Motivation und den Glauben an mich, haben sie mir in verschiedenen Lebenslagen sehr geholfen. Meinen Eltern ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE INFORMATION

Name: Jessica Rottler

Geburtsdatum: 15.11.1981

Geburtsort: Wickede-Wimbern

Anschrift: Weidenhang 5, 59755 Arnsberg

Telefon: 0171/2154337

Email: J.Rottler@gmx.de

Eltern: Peter Rottler, selbstständiger Augenoptikermeister

Andrea Rottler, Augenoptikermeisterin,

Hörgeräteakustikerin

Geschwister: Paul Rottler, Augenoptikermeister

Philipp Rottler, Medizinstudent

Familienstand: ledig

Konfession: römisch-katholisch

BILDUNGSWEG

01/2008	Beginn der Facharztausbildung in der Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
12/2007	Abschluss des Humanmedizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
10/2001-12/2007	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10/2003	Beginn der Promotionsarbeit <i>„Lebensalter und endotheliale Dysfunktion: Veränderungen funktioneller, struktureller und biochemischer Kenngrößen der Endothelfunktion“</i>
09/2003	Ärztliche Vorprüfung an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf
07/2001	Abitur am St. Ursula Gymnasium in Arnsberg
1992-2001	Besuch des St. Ursula Gymnasiums in Arnsberg
1988-1992	Besuch des St. Elisabeth Grundschule in Arnsberg

PRAKTISCHES JAHR

04/2007-07/2007	Augenheilkunde an dem Universitätsklinikum Düsseldorf
12/2006-04/2007	Innere Medizin am Sanitätsbetrieb Brixen (Lehrkrankenhaus der Universität Bologna)
08/2006-12/2006	Chirurgie an dem Universitätsklinikum Düsseldorf