

Aus dem Zentrum für Kardiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Lärmeffekte auf oxidativen Stress im Mausmodell

-Fokus auf oxidative DNA-Schäden in beschallten OGG1-Knockout-Mäusen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Konstantina Filippou
aus Thessaloniki

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1.Gutachter:

2.Gutachter:

Tag der Promotion:

12.07.2022

INHALTSVERZEICHNIS

1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
2. TABELLENVERZEICHNIS	3
3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
4. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	8
5. LITERATURDISKUSSION.....	9
5.1. Lärm.....	9
5.1.1. Definition von Lärm	9
5.1.2. Epidemiologische Daten bezüglich der Assoziation zwischen Lärm und kardiovaskulären Erkrankungen.....	10
5.1.2.1. Klinische Humanstudien bezüglich Lärmeffekte	16
5.1.2.2. Tierexperimentelle Studien bezüglich Lärmeffekte	17
5.1.3. Einfluss von Lärm auf die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen – mechanistische Konzepte	19
5.1.3.1. Lärmeffekte auf Stresshormone.....	19
5.1.3.2. Mechanistische Konzepte auf molekularer Ebene	24
5.1.4. Lärmeffekte auf Inflammation.....	27
5.2. Oxidativer Stress.....	30
5.2.1. Definition und historischer Überblick.....	30
5.2.2. Regulation des Gefäßtonus – ·NO-cGMP-Signalweg.....	31
5.2.3. Endotheliale Dysfunktion.....	34
5.2.3.1. Mechanismen der durch oxidativen Stress induzierten endothelialen Dysfunktion	35
5.2.4. Aktivierung und Funktion der NADPH-Oxidasen.....	41
5.2.5. Entstehung der Nitrattoleranz.....	43
5.2.5.1. Pseudotoleranz	44
5.2.5.2. Vaskuläre Toleranz (Kreuztoleranz).....	44

5.2.6. Funktion von ALDH-2.....	46
5.3. OGG1	50
5.3.1. Mit oxidativem Stress assoziierte Genotoxizität	50
5.3.2. DNA-Reparaturmechanismus als Reaktion auf die Genotoxizität	52
5.3.3. Die Rolle der OGG1 im BER-Mechanismus und ihre weiteren Funktionen..	53
5.3.4. Assoziation von OGG1 mit der Entstehung von Erkrankungen.....	58
6. MATERIAL UND METHODEN.....	62
6.1. Material.....	62
6.1.1. Chemikalien und Reagenzien	62
6.1.1.1. Häufig verwendete Puffer und Lösungen	64
6.1.2. Verbrauchsmaterial	66
6.1.3. Verwendete Antikörper.....	67
6.1.4. Geräte	69
6.1.4.1. Organbad.....	69
6.1.4.2. Immunhistochemie.....	69
6.1.4.3. Western-blotting.....	69
6.1.4.4. HLPC	70
6.1.4.5. Detektionskameras und Software	70
6.1.4.6. Allgemeine Laborausstattung	70
6.2. Methoden	72
6.2.1. Versuchstiere	72
6.2.1.1. Versuchsgruppen und Lärmexposition.....	72
6.2.1.2. Tötung der Tiere und Organentnahme.....	73
6.2.1.3. Aortenpräparation	74
6.2.2. Isometrische Spannungsmessung im Organbad.....	74
6.2.3. Immunhistochemie	77
6.2.3.1. Probenvorbereitung	77

6.2.3.2. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im OGG1/Lärm-Projekt.....	78
6.2.3.3. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im Projekt zu den Effekten der Lärmexposition während der Schlaf/Wachphase.....	79
6.2.3.4. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im Hypertonie/Lärm-Projekt	80
6.2.3.5. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im E-Zigaretten-Projekt.....	81
6.2.4. Detektion von oxidativem Stress durch Chemilumineszenz.....	81
6.2.5. Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE und Western-Blot	83
6.2.5.1. Probenvorbereitung	83
6.2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	83
6.2.5.3. SDS-PAGE und Western-Blot.....	84
6.2.5.4. Immunologischer Nachweis der Proteine.....	86
6.2.5.5. Densitometrische Auswertung der Western-Blots.....	87
6.2.5.6 Entfernen von Antikörpern von einer Membran – „Stripping“	87
6.2.6. Bestimmung der ALDH-2-Aktivität mittels HPLC.....	88
6.2.6.1. Mitochondrienisolation und Proteinbestimmung nach Lowry	88
6.2.6.2. HPLC-Aktivitätsmessung	89
6.2.7. Statistische Analyse	90
7. ERGEBNISSE.....	91
7.1. Vaskuläre Funktion	91
7.1.1. Endothelabhängige Relaxation	91
7.1.2. Endothelunabhängige Relaxation	92
7.2. Untersuchung der ALDH-2-Funktion	93
7.2.1. Expression von ALDH-2-Protein in Herz- und Aortengewebe.....	93
7.2.2. Bestimmung der ALDH-2-Aktivität im Lebergewebe mittels HPLC	94
7.3. Oxidativer Stress im vaskulären Gewebe	95

7.3.1. Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase.....	95
7.3.2. Nachweis von 3-Nitrotyrosin im vaskulären Gewebe	96
7.3.3. Nachweis von 4-Hydroxynonenal im vaskulären Gewebe	97
7.4. Inflammationsmarker im kardialen und vaskulären Gewebe	98
7.4.1. Nachweis des oxidativen und inflammatorischen Markers NOX-2 in Aortengewebe	98
7.4.2. Nachweis von IL-6 in Aortengewebe.....	99
7.4.3. COX-2-Protein-Expression.....	100
7.5. Detektion von DNA-Schäden in der Aorta mittels Immunhistochemie.....	101
7.6. Nachweis von ET-1, iNOS und GFAP mittels Immunhistochemie im Projekt zu den Effekten der Lärmexposition während der Schlaf-/Wachphase.....	101
7.7. Nachweis von ET-1 und 3-NT mittels Immunhistochemie im Lärm/Hypertonie-Projekt.....	104
7.8. Nachweis von 3-NT, ET-1, iNOS und NOX-2 mittels Immunhistochemie im E-Zigaretten-Projekt.....	106
8. DISKUSSION	110
8.1 Das Exposom-Konzept	111
8.2. Verschlechterung der Gefäßfunktion durch Lärm.....	112
8.2.1. Redox-Sensitivität der ALDH-2 führt zur Nitratoleranz.....	114
8.3. Lärm erhöht den oxidativen Stress und oxidative Schäden.....	116
8.4. Unterschiede der Lärmauswirkung in der Wach- und Schlafphase und die entscheidende Rolle der Nox-2.....	118
8.5. Lärmeffekte auf oxidativen Burst in Leukozyten	122
8.6. Auswirkungen von OGG1-Defizienz	124
8.7. Andere Noxen in Kombination mit Lärmexposition	128
8.7.1. Verstärkung der lärmbedingten kardiovaskulären Schäden in Kombination mit experimenteller arterieller Hypertonie	128
8.7.2. Kurzzeitige Zigarettdampf-Exposition (E-Zigarette).....	133

8.8. Ausblick bezüglich der DNA-Schäden.....	136
8.9. Limitationen und Stärken der Studie	136
9. ZUSAMMENFASSUNG	138
10. LITERATURVERZEICHNIS	140

1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 5.1	Beispiele für Umgebungslärmquellen mit den entsprechenden Schalldruckpegeln in dB(A).	9
Abbildung 5.2	Assoziation zwischen der Dosis der Verkehrslärmexposition (Flug-, Zug- und Straßenverkehrslärm) und dem Hazard-Ratio für das Risiko für ischämische Herzkrankheit (A), Hypertension (B) und Schlaganfall (C).	12
Abbildung 5.3	Beziehungen zwischen der Dosis der Flug- bzw. Straßenverkehrslärmexposition und das Risiko für Hypertonie und koronare Herzkrankheit.	14
Abbildung 5.4	Lärm-Stress-Antwort-Konzept von Babisch et al.	20
Abbildung 5.5	Schematische Darstellung der nachteiligen kardiovaskulären Auswirkungen von Lärmbelastung.	21
Abbildung 5.6	Lärmexposition und Stresshormone.	23
Abbildung 5.7	Molekulare Mechanismen, die vermutlich zur Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen führen.	26
Abbildung 5.8	Einfluss von Mediatoren auf die Regulation des Gefäßtonus.	31
Abbildung 5.9	Mechanismen der ·NO/Organischem Nitrat-induzierten Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur.	34
Abbildung 5.10	Biosynthese von ·NO durch die NOS.	36
Abbildung 5.11	Redoxsensitive Modifikationen der endothelialen NO-Synthase (eNOS).	37
Abbildung 5.12	Einfluss von Peroxynitrit auf den Prostaglandin-Pathway.	39
Abbildung 5.13	Funktionsweise der NADPH-Oxidasen (Nox).	42
Abbildung 5.14	I) Durch NADPH-Oxidase vermittelte Reaktion der Bildung von Superoxidanionen II) Bildung von Peroxynitrit aus Superoxidanion und Stickstoffmonoxid.	42
Abbildung 5.15	Mechanismus der Nitrattoleranz.	45
Abbildung 5.16	Mit oxidativem Stress assoziierte Genotoxizität.	50
Abbildung 5.17	Links intakte Guaninbase und rechts 8-oxo-G.	51
Abbildung 5.18	Produkte aus DNA-Desaminierung.	52
Abbildung 5.19	Kristallographische Röntgenstruktur vom OGG1-Enzym, während es mit der 8-Hydroxyguanin-Modifikation am DNA-Doppelstrang verbunden ist.	54
Abbildung 5.20	OGG1- und MUTYH- initiierte BER von C:8-Oxo-G-Fehlpaaren.	55
Abbildung 5.21	Ein Komplex aus OGG1 und der freien exzidierten Base 8-Oxoguanin fungiert als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (englisch kurz GEF) für die kleinen GTPasen wie zum Beispiel Ras, Rac und Rho und stimuliert so bestimmte Signaltransduktionswege.	58
Abbildung 6.1	Schematische Darstellung einer Organbad-Kammer.	76
Abbildung 7.1	Isometrische Spannungsmessung nach Acetylcholin-Zugabe zum Einfluss von Lärmexposition auf die endothelabhängige Relaxation bei Wild-Typ und OGG1-Defizienz.	91

Abbildung 7.2	Isometrische Spannungsmessung nach Nitroglyzerin-Zugabe zum Einfluss von Lärmexposition auf die endothelabhängige Relaxation bei Wild-Typ und OGG1-Defizienz.	92
Abbildung 7.3	Lärmeffekte auf die Proteinexpression von ALDH-2.	94
Abbildung 7.4	Lärmeffekte auf die ALDH-2-Aktivität.	95
Abbildung 7.5	Lärmeffekte auf die Expression der eNOS im Aortengewebe.	96
Abbildung 7.6	Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen Markers 3-NT in Aorta.	97
Abbildung 7.7	Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen Markers 4-HNE in Aorta.	98
Abbildung 7.8	Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen und inflammatorischen Markers NOX-2 in Aorta.	99
Abbildung 7.9	Immunhistochemischer Nachweis des inflammatorischen Markers IL-6 in Aorta.	99
Abbildung 7.10	Lärmeffekte auf die Expression der COX-2 in Aorta (A) und im Herzgewebe (B).	100
Abbildung 7.11	Immunhistochemischer Nachweis von 8-oxoGua in Aorta.	101
Abbildung 7.12	Immunhistochemischer Nachweis von Endothelin-1 (ET-1) im Aortengewebe.	102
Abbildung 7.13	Immunhistochemischer Nachweis der induzierbaren NO Synthase (iNOS) im Aortengewebe.	103
Abbildung 7.14	Immunhistochemischer Nachweis von GFAP-positiven Astrozyten im Hirngewebe.	104
Abbildung 7.15	Immunhistochemischer Nachweis von Endothelin-1 in der Aorta.	105
Abbildung 7.16	Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin in der Aorta.	105
Abbildung 7.17	Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin (3-NT) und Endothelin-1 (ET-1) im Aortengewebe.	106
Abbildung 7.18	Immunhistochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Nox-2 im Aortengewebe.	107
Abbildung 7.19	Immunhistochemischer Nachweis von 4-HNE im Aortengewebe.	108
Abbildung 7.20	Immunhistochemischer Nachweis der Nox-2 im Lungengewebe.	109
Abbildung 8.1	Das Exposom-Konzept.	112
Abbildung 8.2	Die ALDH-2-Aktivität korreliert sich mit dem kardialen Schutz vor ischämischer Schädigung und ist auch an der Kardioprotektion durch Prækonditionierung über die PKC-vermittelte Aktivierung der ALDH-2 beteiligt. Die kardioprotektiven Effekte basieren hauptsächlich auf der effizienten Entgiftung des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE.	115
Abbildung 8.3	Zusammenfassung der kardiovaskulären Lärmeffekte in unserem neuen Tiermodell.	117
Abbildung 8.4	Die Auswirkungen des Fluglärms während der Schlaf- und Wachphase auf das Gefäßsystem und das Gehirn der Mäuse.	119
Abbildung 8.5	Die Schlüsselrolle der Nox-2 für die lärmbedingten schädlichen zerebrovaskulären Effekte bei Mäusen.	121
Abbildung 8.6	Chemilumineszenz zum Einfluss von Lärm auf den oxidativen Stress im Vollblut.	123
Abbildung 8.7	Additive bzw. synergistische Effekte der Lärmexposition und der Angiotensin-II-Behandlung auf dem hypertensiven Phänotyp der Mäuse.	129

Abbildung 8.8	Mechanistische Daten zur lärminduzierten Neuroaktivierung des endokrinen Systems, zur Neuroinflammation und zum zerebralen oxidativen Stress, welche zur Dysregulation der zirkadianen und vaskulären Genexpression, zum Bluthochdruck, zur vaskulären Inflammation, zum oxidativen Stress und zur endothelialen Dysfunktion führen.	131
Abbildung 8.9	Effekte des kurzzeitigen E-Zigaretten-Vapings auf die Gefäßfunktion und den oxidativen Stress in Nox-2^{-/-}- gegenüber Wildtyp-Mäusen.	134

2. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 6.1	Primäre und sekundäre Antikörper, die für Immunhistochemie verwendet wurden.	67
Tabelle 6.2	Primäre und sekundäre Antikörper, die für die Immunassays Western-Blot verwendet wurden.	68
Tabelle 6.3	Einteilung der Versuchstiergruppen.	73

3. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

:NO ₂	Stickstoffdioxid
1,2-GDN	Glyzerol-1,2-Dinitrat
3-NT	3-Nitrotyrosin
4-HNE	4-Hydroxynonenal
8-oxo-G	7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanin oder 8-Oxoguanin
A	Adenin
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACTH	Adrenokortikotropisches Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ALDH-2	Aldehyddehydrogenase 2
AMPK	5'-AMP-aktivierte Proteinkinase
APE1	apurinische bzw. apyrimidinische Endonuklease 1
ApoE	Apolipoprotein E
AP-Stelle	apurinische bzw. apyrimidinische Stelle
aqua dest.	destilliertes Wasser
ARAS	aufsteigendes retikuläres Aktivierungssystem
ATII	Angiotensin II
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BER	Basenexzisionsreparatur
BH ₂	Dihydrobiopterin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BK _{Ca} -Kanäle	Calciumaktivierter Kaliumkanal mit hoher Leitfähigkeit
BRCA	Brustkrebsgen
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Ca ²⁺	Calciumionen
CCL20	chemokine CC-motif ligand 20
CGD	X-chromosomal-rezessive septische Granulomatose
cGK-I	cGMP-abhängige-Proteinkinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNG-Kanäle	zyklisch-Nukleotid-gesteuerte Kanäle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	chemokine (CXC-motif) ligand 1
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DALYs	disability-adjusted life years
dB(A)	Dezibel A
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Zigarette	Elektronische Zigarette
ECL	gesteigerte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

ERK1,2	extracellular signal-regulated kinase 1,2
ET	Endothelin
Fas	cell death signaling molecule (CD95)
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1
FOXO	forkhead box
G	Guanin
GAM-POX	Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG Sekundär-antikörper aus der Ziege
GAR-POX	Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG Sekundär-antikörper aus der Ziege
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GG-NER	global-genome nucleotide excision repair
gp91 ^{phox}	glykosilierte 91-kDa Untereinheit der phagozytären NADPH-oxidase
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1a	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
HO-1	Hämoxygenase 1
HPA	Hypophyse-Nebennierenrinde-Achse
HPLC	high performance liquid chromatography
HYENA	Hypertension and Exposure to Noise near Airports
I.E.	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP-Rezeptor	Prostazyklin-Rezeptor
IRAG	IP ₃ -Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat
ISDN	Isosorbiddinitrat
ISMN	Isosorbid-5-mononitrat
JAK	Januskinase
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene
L-012	8-Amino-5-chlor-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion-Natriumsalz
Lig1	Ligase 1
LPS	Lipopolysaccharide
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MLKK/MLKP	Myosin-Leichtkettenkinase/phosphatase
MMR	mismatch repair
MOM	mouse on mouse
MRX II-Plattenlesegerät	Mithras2-Chemilumineszenz-Plattenlesegerät
mt	mitochondrial
mtK _{ATP}	mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle
mTOR	mammalian target of rapamycin

mtPTP	mitochondrial Permeability-Transitionpore
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NADPH-Oxidase (Nox-2)	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NEIL	Nei-Endonuklease VIII-like Protein
NF-YA	nuclear transcription factor Y subunit alpha
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLRP3	Nucleotide-binding,leucin-rich-containing and pyrin domain-containing protein 3
·NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit-Anion
NO ₃ ⁻	Nitrat-Anion
NORAH	Noise-Related Annoyance, Cognition and Health
NRF2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NTG	Nitroglyzerin
NTHL1	Nth-Endonuklease III-like Protein 1
NUDT	Nudix-Typ
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Superoxid
OGG1	8-Oxoguanin-Glykosylase
Ogg1 ^{-/-}	OGG1-knockout
OH·	reaktives Hydroxylradikal
ONOO·	Peroxynitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDBu	Phorbolesterdibutyrat
PEDN	Pentaerythrityldinitrat
PEMN	Pentaerythritylmononitrat
PETN	Pentaerythrityltetranitrat
PETriN	Pentaerythrityltrinitrat
PGH ₂	Prostaglandinendoperoxid
PGI ₂	Prostazyklin
PGIS	Prostazyklinsynthase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
Pol	Polymerase
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rac 1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (21-kDa G-Protein)
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RNA	Ribonukleinsäure
rNMP	ribonukleosidische Monophosphate
RNS	reaktive Stickstoffspezies
RONS	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP-A	replication protein A
SAMP8-Mäuse	senescence-accelerated mouse prone 8

SAPALDIA	Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SERCA	sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
sGC	lösliche Guanylatzyklase
siRNA	small interfering RNA
SOD	Superoxiddismutase
STAT	signal transducers and activators of transcription
T	Thymin
TBS	Tris Buffered Saline
TC-NER	transcription-coupled nucleotide excision repair
TGFβ	transforming growth factor beta
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TP-Rezeptor	Thromboxan-Rezeptor
UVB	Ultraviolettstrahlung B
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation
WT	Wildtyp
XRCC1	X-ray repair cross complementing 1

4. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

In den letzten Dekaden wird zunehmend über die Rolle von Lärm als Umweltrisikofaktor und über seine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien geforscht. In großen epidemiologischen Studien wurde schon ein enger Zusammenhang zwischen der Lärmbelastung und der Inzidenz von arterieller Hypertonie, ischämischer Herzkrankheit, metabolischem Syndrom und ischämischem Schlaganfall gezeigt (1-4). Weitere Studien untermauern die Rolle der Lärmexposition als ein unabhängiger kardiovaskulärer Risikofaktor (5, 6). Die WHO schätzt zudem, dass in Ländern Westeuropas jährlich 1 Million gesunde Lebensjahre durch Umgebungslärm verloren gehen.

In initialen Studien haben Münzel et al. den Pathomechanismus identifiziert, wie Lärm im vaskulären und kardialen Gewebe sowie im Gehirngewebe oxidativen Stress bewirkt und folglich auch zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen führt (7). Ziel der vorliegenden Arbeit ist, die nicht-auditorischen Effekte von Lärm auf das Gefäßsystem, den oxidativen Stress und zusätzlich die DNA-Schäden unter genetischer OGG1-Defizienz in einem Tiermodell zu untersuchen. Die 8-Oxoguanine DNA Glycosylase (OGG1) fungiert als das primäre Enzym, das für die Exzision der am häufigsten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursachten Läsion, 8-Oxoguanin, aus der DNA verantwortlich ist.

Die genannten Aspekte sollen im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersucht werden. Dadurch wird der Mechanismus besser beleuchtet, wie Lärm zu vaskulären Funktionsstörungen auf molekularer Ebene führt. Diese Erkenntnis kann in Zukunft zu der Entwicklung von Strategien beitragen, welche die kardiovaskuläre Gesundheitsbelastung durch diesen Umweltstressor reduzieren.

5. LITERATURDISKUSSION

5.1. Lärm

5.1.1. Definition von Lärm

Lärm kann als Schall definiert werden, der als störend empfunden wird. Lärm hat auf der einen Seite eine objektive, physikalisch quantifizierbare Dimension in Form von Schallpegeln, gemessen in Dezibel (dB[A]), und eine subjektive bzw. psychologische Dimension, die durch die individuelle Beurteilung der Schallquelle durch den Zuhörer bestimmt wird (8). Die Abbildung 5.1 zeigt ein paar Beispiele für Umgebungslärmquellen mit den entsprechenden Schalldruckpegeln in dB(A).



Abbildung 5.1 Beispiele für Umgebungslärmquellen mit den entsprechenden Schalldruckpegeln in dB(A).

Die Dezibel-Skala ist eine logarithmische Skala, sodass eine Erhöhung oder eine Abnahme von 3 dB(A) eine Verdopplung bzw. eine Halbierung der Schallintensität respektive bedeutet. Schmerzschwelle bei 130 dB(A), WHO-Empfehlung bei <55 dB(A). Abbildung übersetzt aus (3).

Aufgrund der in den letzten Dekaden rasant zunehmenden Verwendung von unterschiedlichen Arten von Verkehrsmitteln wird den wissenschaftlichen Ergebnissen

über die gesundheitlichen Auswirkungen von Lärm immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Jedenfalls gehört die berufsbedingte Lärmschwerhörigkeit zu den führenden Berufskrankheiten. Dies lässt sich aus den statistischen Daten zum Berufskrankheitsgeschehen ableiten. Sie ist nicht nur eine der am häufigsten angezeigten und die am häufigsten anerkannte Berufskrankheit in Deutschland, sondern es kommt durch Deprivationseffekte in Beruf, persönlicher Umgebung und Familie auch zu gravierenden sozialen Folgen für die Betroffenen (9). Ein kurzer historischer Rückblick ergibt für die berufsbedingte Lärmschwerhörigkeit eine besondere Geschichte als Berufskrankheit: Bereits zu Beginn der Neuzeit und später im Gefolge der industriellen Revolution finden sich zunehmend Berichte, die einen Zusammenhang zwischen hoher Lärmexposition und nachlassendem Hörvermögen beschreiben. Bereits mit der zweiten Berufskrankheitenverordnung 1929 hat der deutsche Verordnungsgeber erstmals eine entsprechende Berufskrankheit in die Berufskrankheitenliste aufgenommen (10)(11). Die heutige Gestalt und Kommentierung der beruflichen Lärmschwerhörigkeit stammt aus der Berufskrankheitenverordnung von 1976, wo sie als BK 2301 aufgeführt ist. Nach der Verordnung zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen durch Lärm und Vibrationen haben die Beschäftigten beim Überschreiten eines Tages-Lärmexpositionspegels von 85 dB(A) oder eines Spitzenschalldruckpegels von 137 dB(A) Gehörschutz zu tragen. Wenn Tages-Lärmexpositionspegel von 80 dB(A) oder Spitzenschalldruckpegel von 135 dB(A) überschritten werden, hat der Arbeitgeber den Beschäftigten Gehörschutz zur Verfügung zu stellen (12). Aus präventiven Gesichtspunkten wurden Grenzwerte für Arbeitsschutzmaßnahmen festgesetzt, bei denen erfahrungsgemäß nur noch ein sehr geringes bzw. kein nennenswertes Risiko für eine Lärmschwerhörigkeit besteht.

5.1.2. Epidemiologische Daten bezüglich der Assoziation zwischen Lärm und kardiovaskulären Erkrankungen

Die Assoziation zwischen Lärm und kardiovaskulären Erkrankungen wird schon seit langem von unterschiedlichen Arbeitsgruppen untersucht. Bis vor kurzem waren die genauen Mechanismen, die den lärminduzierten kardiovaskulären Erkrankungen zugrunde liegen, weitgehend unbekannt, hauptsächlich wegen fehlender Modelle für Forschung an Menschen und Tieren. Die epidemiologische Forschung in dieser Richtung hat in den letzten Jahren sowohl quantitativ als auch qualitativ erheblich

zugenommen. Um ein paar Beispiele zu nennen, wurden die Methoden zur Standardisierung der Auswertung der Lärmbelastung verbessert, größere Bevölkerungsgruppen wurden untersucht, und es gab eine bessere Korrektur der sogenannten Confounders (Störvariablen). In Tierexperimenten wurden explizit die Mechanismen untersucht, mit denen Lärm zur Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beiträgt. Diese werden im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt (Kap. 5.1.3.).

Wenn man die Forschungsergebnisse der letzten 20 Jahre zusammenfassend betrachtet, stellt man fest, dass Lärm Herz-Kreislauf-, Stoffwechsel- und psychische Krankheiten verursachen kann: Hypertonie, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, Diabetes, Herzrhythmusstörungen, Schlaganfall, Depression und Angststörungen (3, 13). Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt sind, induzieren chronische Stressreaktionen den aktuellen Befunden zufolge gesteigerte Stresshormonspiegel und pathophysiologische Veränderungen, die entweder direkt oder indirekt zur Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheiten führen (14, 15). Schon 1910 hat der Nobelpreisträger Robert Koch die These aufgestellt, dass man irgendwann Lärm so unnachgiebig wie die Pest und Cholera bekämpfen müssen werde. Circa ein Jahrhundert später ist Koch's These laut Daten der WHO in Erfüllung gegangen. Die WHO hat sich unter Betrachtung der Ergebnisse von Forschungsstudien zwischen 2000 und 2014 mit der mit Lärm assoziierten Krankheitslast beschäftigt, indem die sogenannten DALYs bestimmt wurden. DALYs, von englisch „disability-adjusted life years“, sind ein Maß für die Quantifizierung der Krankheitsbelastung. DALYs drücken nicht nur die Anzahl verlorener Jahre aufgrund vorzeitigen Todes, sondern auch die mit Krankheit oder Behinderung gelebten Jahre bis zur Genesung oder zum Tod aus. Die WHO schätzt, dass in Ländern Westeuropas die Anzahl der durch Umgebungslärm bedingten DALYs 61.000 Jahre für Herzischämie beträgt, 45.000 Jahre für kognitive Beeinträchtigung bei Kindern, 903.000 Jahre für Schlafstörungen, 22.000 Jahre für Tinnitus und 587.000 Jahre für psychische Belästigung. Daraus ergibt sich, dass jedes Jahr mindestens eine Million gesunde Lebensjahre in Westeuropa aufgrund der Lärmbelastung verloren gehen (16), was wiederum den hochgradigen klinischen Einfluss von Lärm auf die Gesundheit widerspiegelt. Insbesondere scheint der Lärm am Arbeitsplatz für fast sechs Millionen verlorene behinderungsbereinigte DALYs verantwortlich zu sein (17).

In der aktuellen Leitlinie der WHO (2018) für Umgebungslärm in der europäischen Region werden die epidemiologischen Daten aus unterschiedlichen Metaanalysen gesammelt und zusammengefasst. Diese sind in der Abbildung 5.2 dargestellt. Hier wurde gezeigt, dass Verkehrslärm in Form von Flug-, Zug- oder Straßenverkehrslärm mit einem erhöhten Risiko für ischämische Herzkrankheit, Hypertension und Schlaganfall assoziiert ist.

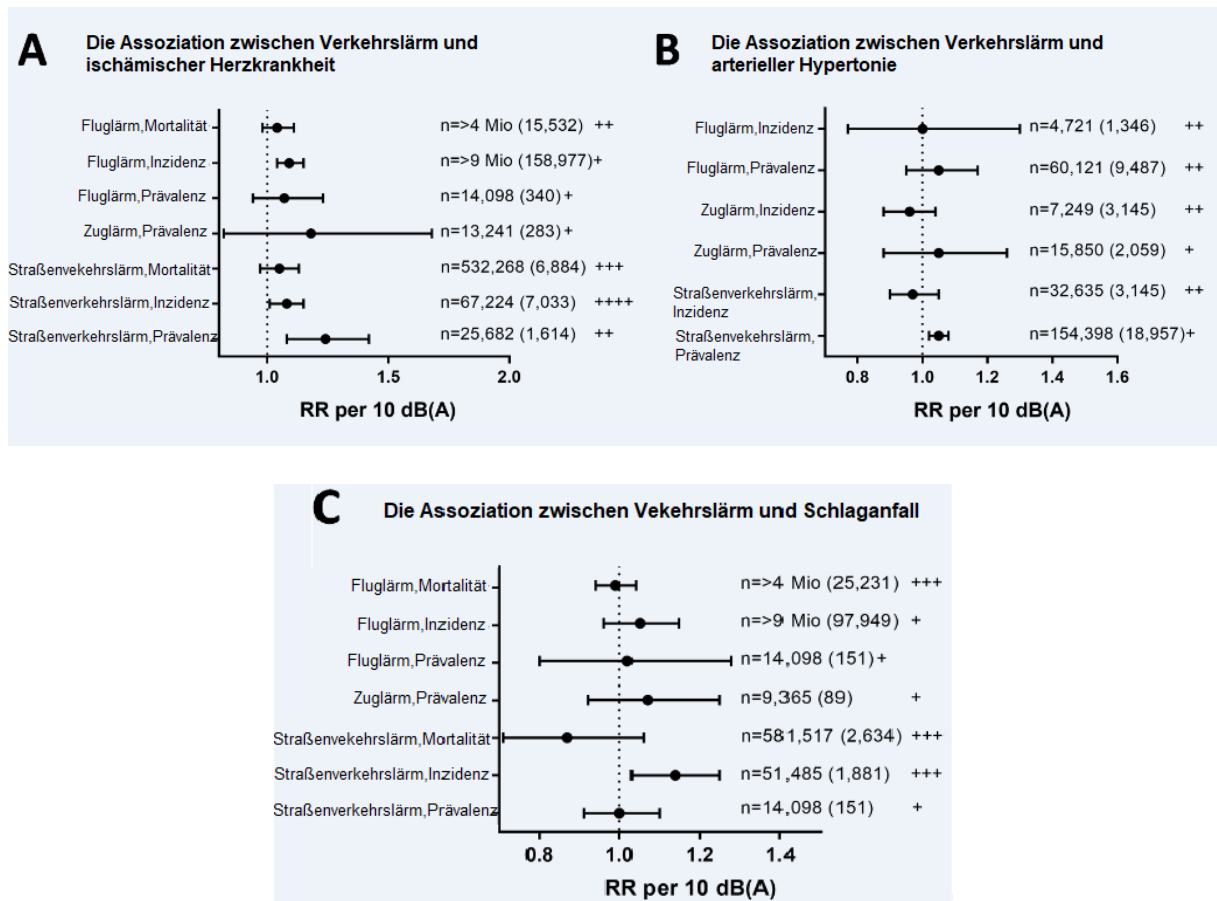


Abbildung 5.2 Assoziation zwischen der Dosis der Verkehrslärmexposition (Flug-, Zug- und Straßenverkehrslärm) und dem Hazard-Ratio für das Risiko für ischämische Herzkrankheit (A), Hypertension (B) und Schlaganfall (C).

Lärmpegel wurde tagsüber, abends und nachts appliziert. Qualitätsstufe der Evidenz: + sehr niedrig, ++ niedrig, +++ moderat, ++++ hoch. Mit Konfidenzintervallen von 95 %. RR= relatives Risiko. Die Graphen basieren auf den Daten aus (4) und aus unterschiedlichen Metaanalysen, die in den aktuellen Leitlinien (2018) der WHO für Umgebungslärm in der europäischen Region zusammengefasst sind (18). Teilweise publiziert in (19). Die Abbildung wurde übersetzt.

Seit der Veröffentlichung der ersten Studie Ende der 1980er wurde der Zusammenhang zwischen Verkehrslärm und Koronarer Herzkrankheit (KHK) umfassend untersucht. Neueren Metaanalysen zufolge ist Lärmbelastung mit einem erhöhten Risiko für KHK verbunden (2, 20). Interessanterweise zeigte eine

Metaanalyse von Vienneau et al. 2015 unter Betrachtung von Studien über Straßenverkehrs- und Fluglärm eine signifikante Risikoerhöhung für KHK um 6 % für jede Zunahme des Lärmpegels um 10 dB(A), wobei man mit 50 dB(A) startete (2). Auch Kohortenstudien, die den sozioökonomischen Status, den Lebensstil und die Luftverschmutzung berücksichtigten, stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen Lärm und KHK fest (21, 22). In einer dänischen (21) und einer schwedischen (22) Kohortenstudie wurde eine signifikante Assoziation zwischen Straßenverkehrslärm und Prävalenz der myokardialen Ischämie identifiziert. Zu ähnlichen Ergebnissen ist die Arbeitsgruppe von Sørensen 2012 gekommen. Straßenverkehrslärm erhöhte hier die Inzidenz von Myokardinfarkt um 12 % bei jeder Lärmerhöhung um 10 dB(A) mit einem Ursprungslärmpegel von 42 dB(A) (23). 2011 stellte sich außerdem in einer großen Kohortenstudie der gleichen Arbeitsgruppe von Sørensen ein 14-prozentiges signifikant erhöhtes Risiko auch für Schlaganfall für jede Zunahme des Straßenverkehrslärmpegels um 10 dB(A) heraus (24). Laut Beobachtungen in einer Studie von Hansell et al. 2013 konnten Fluglärmpegel über 55 dB(A) sowohl tagsüber als auch nachts das Risiko für einen Krankenhausaufenthalt aufgrund einer zerebralen Ischämie um 8 % und 29 % respektive im Vergleich zu Schallpegeln unter 50 dB(A) unter einer Population von 3,6 Millionen Einwohnern in der Nähe des Heathrow-Flughafens erhöhen (25). Daraus lässt sich der Rückschluss ziehen, dass der nächtliche Lärm besonders schädlich sein kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kam es in einer Studie in London mit Teilnahme von 8,6 Millionen Bewohnern. Es wurde festgestellt, dass das Risiko für Krankenhausaufenthalte wegen Schlaganfall unter Straßenverkehrslärm signifikant zunimmt (26). Um diese Befunde zu untermauern, kann man an dieser Stelle auf weitere große Bevölkerungsstudien hinweisen, die zeigten, dass Straßenverkehrs- und Fluglärm mit einer höheren Schlaganfall-Mortalität assoziiert sind (25-27).

Abgesehen von KHK und zerebraler Ischämie ist durch Studien belegt, dass Lärm zu Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern führen kann (27-29). Zwei große Populationsstudien zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko für Herzinsuffizienz sowohl unter Straßenverkehrs- als auch Fluglärmereignissen. Die Risikoerhöhung variierte zwischen 2 % und 7 % pro 10 dB(A)-Lärmpegelerhöhung je nach Studie und Art der Exposition (27, 29). Außerdem stellte eine Kohortenstudie von Monrad et al. 2016 fest, dass Straßenverkehrslärm das Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern um 6 %

für jede Lärmerhöhung von 10 dB(A) steigerte, obwohl diese Beobachtung nicht unabhängig von der Luftverschmutzung war (28). Letzteres hebt die Korrelation vom Straßenverkehrslärm mit der Luftverschmutzung hervor, was näher berücksichtigt werden muss.

Interessanterweise konnte auch belegt werden, dass die Belästigung durch Lärm sogar in direktem Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen wie Depression und Angststörungen steht (30), die bekannte negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System haben (31).

Epidemiologische Daten zeigen nicht nur einen Zusammenhang zwischen Lärm und Herzerkrankungen, sondern auch zwischen Lärm und kardiovaskulären Risikofaktoren. Im Jahr 2012 wurde in einer Metaanalyse von Babisch und van Kempen festgestellt, dass ein Anstieg von 5 dB(A) vom Straßenverkehrslärm mit einem signifikanten relativen Risiko von 1,034 für die Prävalenz von Hypertonie assoziiert ist (32). Diese Beobachtungen wurden auch durch ähnliche Ergebnisse von Studien über die Inzidenz von Bluthochdruck unterstützt (33-35). Die Abbildung 5.3 legt die oben beschriebenen Beziehungen zwischen Flug- bzw. Straßenverkehrslärm und arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit dar.

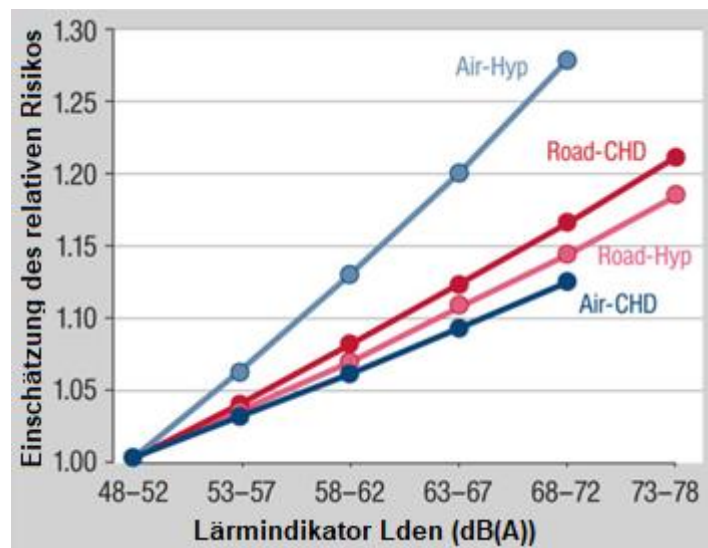


Abbildung 5.3 Beziehungen zwischen der Dosis der Flug- bzw. Straßenverkehrslärmexposition und dem Risiko für Hypertonie und koronare Herzkrankheit.

Lden= Lärm tagsüber, abends und nachts. Air= Fluglärm, Road= Straßenverkehrslärm, Hyp= Hypertonie, CHD= koronare Herzkrankheit. Abbildung übersetzt aus (5). Die Daten stammen aus (2), (32), (20) und (36).

Darüber hinaus zeigte die umfangreiche NORAH-Studie (Noise-Related Annoyance, Cognition and Health) im Rhein-Main-Gebiet (innerhalb und in der Nähe von Darmstadt, Mainz und Worms) in Deutschland, dass Straßenverkehrs-, Zug- und Fluglärm im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt stehen (29). In der HYENA-Bevölkerungsstudie (Hypertension and Exposure to Noise near Airports) wurde der Zusammenhang von Straßenverkehrs- und Fluglärm und arterieller Hypertension im Beobachtungszeitraum von 2004 bis 2006 unter 4712 Teilnehmern untersucht, die in der Nähe von Flughäfen in sechs europäischen Ländern (Vereinigtes Königreich, Deutschland, Niederlande, Schweden, Griechenland und Italien) lebten. Hier deuteten die Ergebnisse auf ein gesteigertes Risiko für Bluthochdruck in Verbindung mit langfristiger Lärmbelastung hin, vor allem beim nächtlichen Fluglärm und beim Straßenverkehrslärm während der Tagesstunden (37). Für die Entwicklung der Atherosklerose stellt die Verkalkung der Aorta einen bekannten Risikofaktor dar. In einer Studie 2014 war nächtlicher Straßenverkehrslärm verantwortlich für eine signifikant vermehrte Kalzifikation der thorakalen Aorta um 3,9 % für jede Lärmerhöhung um 5 dB(A) bei 4.800 Teilnehmern (38). In einer Kohortenstudie mit 88.000 Teilnehmern ergab sich auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen Straßenverkehrslärm und erhöhter Herzfrequenz (39). Die Gesamtzahl der Lärmereignisse während der Nacht, aber nicht während des Tages, wurden in der schweizerischen Kohortenstudie SAPALDIA (Study on Air Pollution and Lung and Heart Diseases in Adults) mit einer Steifigkeit der arteriellen Gefäße assoziiert (40). In neueren Querschnitts- und Längsschnittsstudien wurde ein Zusammenhang zwischen Straßenverkehrs- sowie Fluglärm und Adipositas beobachtet, was ein Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist (41-44). Gleichzeitig zeigten weitere Kohortenstudien, dass Verkehrslärm mit einem signifikant erhöhten Diabetesrisiko (45-47) und Straßenverkehrslärm mit erhöhten Spiegeln von Nüchternblutglukose (48) assoziiert sind. Da Lärmereignisse Stressreaktionen und Schlafstörungen verursachen können, kann Verkehrslärm auch zu gesundheitsschädlichen Lebensstilveränderungen führen, wie zum Beispiel zum Bewegungsmangel (49, 50) oder dem Tabak- und Alkoholkonsum (51).

Zusammenfassend lässt sich aus den epidemiologischen Daten sagen, dass Lärm sowohl mit der Manifestation von Koronarherzerkrankung, Schlaganfall,

Herzinsuffizienz und Vorhofflimmern, als auch mit kardiovaskulären Risikofaktoren, vor allem mit Bluthochdruck und mit Stoffwechselerkrankungen im Zusammenhang steht.

5.1.2.1. Klinische Humanstudien bezüglich Lärmeffekte

Es gibt nur wenige klinische Studien, welche die Verbindungen zwischen Lärm und endothelialer Funktion untersuchen. Die Arbeitsgruppe um Schmidt et al. 2013 konnte in zwei Studien zeigen, dass simulierter nächtlicher Fluglärm mit einer endothelialen Dysfunktion, gesteigerten Stresshormonspiegeln und mit verminderter Schlafqualität sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten mit bestehendem Koronarsyndrom assoziiert ist (52, 53). Es ist zu betonen, dass die endotheliale Dysfunktion nach akuter Verabreichung des Antioxidans Vitamin C deutlich verbessert wird. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass eher die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies bzw. der Mangel an Antioxidationsmitteln zum beobachteten Phänomen der endothelialen Dysfunktion führen. Die Zusammenhänge zwischen Lärm und endothelialer Funktion wurden wesentlich stärker unter der Bedingung beobachtet, dass die Untersuchten davor schon Lärm ausgesetzt wurden. Dies legt nahe, dass das Gefäßsystem als Reaktion auf eine wiederholte Lärmexposition eher für vaskuläre Schäden sensibilisiert als desensibilisiert wird. Parallel zur lärminduzierten gestörten Endothelfunktion wurden gesteigerte Spiegel von Adrenalin nachgewiesen. Zudem war der negative Zusammenhang zwischen Lärm und endothelialer Funktion ausgeprägter bei Patienten mit bekannter KHK (53). Interessanterweise wurde keine Korrelation mit Lärmempfindlichkeit oder Verärgerung beobachtet. Dies bedeutet indirekt, dass die Endothelfunktion sich als Antwort auf den nächtlichen Lärm verschlechtert, unabhängig davon, ob es eine Verärgerungsreaktion gibt oder nicht oder anders gesagt, auch wenn der Lärm unterbewusst wahrgenommen wird. Die gleiche Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen nächtlichem Fluglärm und erhöhten Blutdruckwerten, was in Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen der HYENA-Studie steht (53). Andere Forscher stellten eine verstärkte Korrelation zwischen Straßenverkehrslärm und kardiovaskulären Erkrankungen bei den Menschen fest, die mit offenen Fenstern schliefen, oder deren Schlafzimmer sich in Richtung der Straße befanden (54). Außerdem wurde eine gestörte Endothelfunktion auch bei Personen beobachtet, die in 24-Stunden-Nachtdienst arbeiten (55), oder die unter chronischem Schlafmangel litten (56). Diesen Beobachtungen zufolge könnten die nachts lärminduzierte Unterbrechung und

Fragmentierung der Schlafphase eine Schlüsselrolle für den mechanistischen Weg zwischen Lärm, endothelialer Dysfunktion und der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen spielen (57, 58).

Die endotheliale Dysfunktion scheint einen prognostischen Wert bei Patienten mit peripherer Arterienverschlusskrankheit, arterieller Hypertension, akutem oder chronischem Koronarsyndrom zu haben (59). Somit könnte die lärminduzierte endotheliale Dysfunktion den Zusammenhang zwischen Verkehrslärm und der in den epidemiologischen Studien beobachteten Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen erklären (1, 2).

5.1.2.2. Tierexperimentelle Studien bezüglich Lärmeffekte

Lärm in Tierhaltungseinrichtungen stellt ein großes Problem in Tierversuchen dar, denn er beeinträchtigt das Gehör, das Verhalten und die Physiologie der Mäuse (60). Die Herausforderung bei diesem bekannten Confounder in Tierversuchen wird noch komplexer aufgrund der Variabilität der Lärmanfälligkeit der verschiedenen Tierarten und ihrer Hörfrequenz. Mechanistische tierexperimentelle Studien, welche die Zusammenhänge zwischen Lärmexposition, endothelialer Funktion und kardiovaskulärem Risiko untersuchen, sind selten. In einer Studie wurden Affen neun Monate lang intermittierendem Lärm mit einem Schalldruckpegel von 85 dB(A) ausgesetzt und es wurde trotz fehlender Auswirkungen auf das auditorische System (kein signifikanter Hörverlust) eine signifikante Erhöhung der Blutdruckwerte um 30 mmHg beobachtet (61). Andere Studien bewiesen, dass die Lärmexposition von Ratten (mit 85 bis 100 dB(A)) über einen Zeitraum von zwei bis acht Wochen die endothelabhängige Vasodilatation beeinträchtigte, die Lumengröße der Mikrogefäße verringerte, den systolischen Blutdruck um 25 bis 37 mmHg erhöhte und die Parameter für oxidativen Stress stimulierte (62-65). Lärmbelastung im Bereich von 70 bis 100 dB(A) ist mit erhöhten Stresshormonspiegeln, Lipidperoxidation und morphologischen Veränderungen in Rattenherzen (66) sowie mit vaskulären Veränderungen verbunden, die nach Verabreichung von Antioxidans Vitamin E aufgehoben sind (67). Chronische Lärmexposition (100 dB(A)) induzierte auch eine intestinale inflammatorische Reaktion in Ratten mit einer anhaltenden Erhöhung von IgA, Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) (68).

In einer tierexperimentellen Studie mit männlichen Albino-Ratten wurde gezeigt, dass Lärmexposition in Höhe von 80-100 dB einen Anstieg von Kortikosteroiden,

Katecholaminen und Endothelin-1 im Plasma verursachte. Gleichzeitig wurde erhöhter oxidativer Stress induziert, was sich an der erhöhten Malondialdehyd-Konzentration und an der reduzierten Superoxiddismutase-Aktivität erkennen ließ. Im Plasma wurden auch erhöhte Nitrit- und Nitrat-Spiegel gemessen, vermutlich aufgrund einer vermehrten Expression der induzierbaren NO-Synthase, was zur endothelialen Dysfunktion und zu schweren nachteiligen kardiovaskulären Folgen führte (65). Diese Daten ergänzend haben andere Forscher festgestellt, dass eine Therapie mit dem Lipidsenker Rosuvastatin dank seiner potentiell antioxidativen Eigenschaften den lärminduzierten oxidativen Stress verhindern konnte (69).

Die inhaltliche Verbindung zwischen Fluglärm, oxidativem Stress und endothelialer Funktion lässt sich besonders durch eine hochrangige Publikation von Münzel und Daiber et al. aus dem Jahr 2017 herstellen (1). Die Arbeitsgruppe konnte ein Tiermodell mit Mäusen entwickeln, die Fluglärmereignissen mit einem maximalen Schalldruckpegel von 83 dB(A) und einem durchschnittlichen Schalldruckpegel von 72 dB(A) ausgesetzt wurden, um die nicht-auditiven Lärmauswirkungen auf das kardiovaskuläre System zu beleuchten. Die Effekte der kontinuierlichen 24-stündigen Fluglärmbelastung über 1, 2 und 4 Tage wurden mit den Effekten von weißem Rauschen mit gleichem Schalldruckpegel verglichen. Charakteristisch für weißes Rauschen ist ein konstantes Leistungsdichtespektrum mit einem sehr breiten Frequenzbereich. Diese Studie lieferte detailreiche Beobachtungen und zeigte auf, dass Fluglärm mit angestiegenen Blutdruckwerten, endothelialer Dysfunktion, reduzierter vaskulärer Stickstoffmonoxidproduktion, gesteigerten Markern für oxidativen Stress und erhöhter Gefäßempfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren verbunden ist (1). An dieser Stelle soll hervorgehoben werden, dass diese Veränderungen ausschließlich nach Fluglärmexposition beobachtet wurden, nicht jedoch als Reaktion auf weißes Rauschen. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Merkmale des Lärmstimulus wie zum Beispiel das Muster (vor allem das An- und Abschwellen des Schalldruckpegels), irreguläre Unterbrechungen, der Frequenzwechsel, die Expositionszeit und die Intensität, eine entscheidende Rolle spielen. Die Forscher konnten zwei ROS-produzierende Enzyme identifizieren, die eine wichtige Rolle für die Induktion der Gefäßdysfunktion spielen: die Isoform 2 der NADPH-Oxidase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) und die entkoppelte NOS (nitric oxide synthase). Die Phosphorylierung der endothelialen NOS

an der Aminosäure Serin 1177 war unter Lärmexposition erhöht, was als ein vergeblicher Mechanismus der Gegenregulation ohne Verbesserung der Endothelfunktion oder des Bluthochdrucks angesehen werden könnte. Auf der Ebene der Inflammation wurden erhöhte Interleukin-6-Spiegel und eine stärker ausgeprägte Infiltration von proinflammatorischen Makrophagen in die Aortenwand festgestellt. Die Daten der RNA-Sequenzierung („next generation sequencing“) zeigten, dass das Aortengewebe der mit Fluglärm behandelten Mäuse signifikante Veränderungen der Genexpression aufweist, die teilweise für die Regulierung der Gefäßfunktion, das vaskuläre Remodelling, das antioxidative Schutzsystem und den Zelltod verantwortlich sind (1). Während die proapoptotischen Faktoren wie zum Beispiel Kaspasen, Fas und p38 hochreguliert wurden, wurde eine Herunterregulation von Genen wie zum Beispiel der antioxidativen Schutzenzyme intrazelluläre Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase-1 und des bedeutenden Transkriptionsfaktors Forkhead-box-Protein O3 gemessen, der ebenfalls wichtige antioxidative Stoffwechselwege reguliert.

5.1.3. Einfluss von Lärm auf die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen – mechanistische Konzepte

5.1.3.1. Lärmeffekte auf Stresshormone

Chronische Stressreaktionen steigern die Stresshormonspiegel und führen zu pathophysiologischen Veränderungen, die direkt oder indirekt zur Initiierung sowie Progression von kardiovaskulären Erkrankungen beitragen (14, 15).

Hormone sind Bestandteile eines komplizierten Systems positiver und negativer Rückkopplungsmechanismen, welche die Herzaktivität, den Blutdruck, die Cholesterinämie, den Blutzucker und die Blutviskosität beeinflussen. Diese Parameter sind etablierte Risikofaktoren für Hypertension, Arteriosklerose und Myokardinfarkt (70). Verkehrslärm verursacht Stressreaktionen in der Arbeits- und Umweltumgebung (15). Unter der sympathischen und endokrinen Erregung steigen die Konzentrationen der Stresshormone, damit Energie und Sauerstoff mobilisiert werden, um den Organismus auf die „Kampf-oder-Flucht-Reaktion“ (fight-or-flight-reponse) zur Bewältigung des Stressors vorzubereiten (71). Während des Schlafens reichen bereits geringe Schalldruckpegel, um solche Reaktionen hervorzurufen. Üblicherweise hängt die Aktivierung des neuroendokrinen Systems davon ab, ob das Individuum einen Stressor als Bedrohung wahrnimmt (72). Das auditorische System aktiviert jedoch automatisch das retikuläre Aktivierungssystem. Eine wichtige Erkenntnis in Bezug auf

die Entstehung von lärmbedingten Organschäden konnte durch Babisch et al. 2002 im Rahmen des „Lärm-Stress-Antwort-Konzepts“ hergestellt werden (siehe Abbildung 5.4).

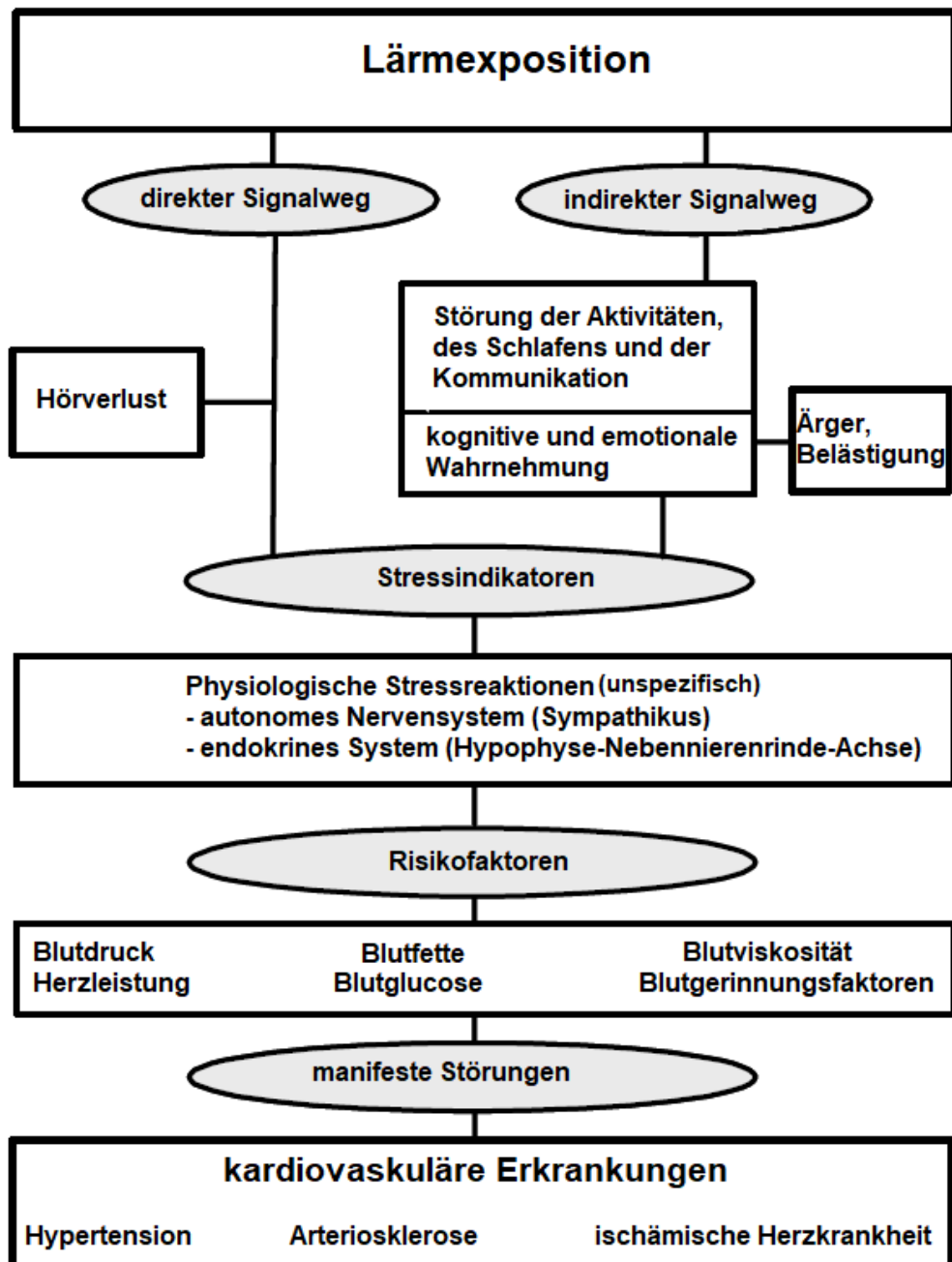


Abbildung 5.4 Lärm-Stress-Antwort-Konzept von Babisch et al.

Abbildung übersetzt aus (73).

Es ist wichtig zu betonen, dass die nicht-auditorischen Lärmauswirkungen nicht dem toxikologischen Prinzip der Dosierung folgen. Im Gegensatz zu chemischen Umweltfaktoren wie Blei oder Kadmium ist Schallenergie kein exogener Stressfaktor, der sich im Organismus akkumuliert, sondern man sollte eher die Belästigung des

Individuums und ihre Auswirkungen berücksichtigen. 80 Dezibel bei der Arbeit können weniger Auswirkungen haben als 65 Dezibel bei der Ausführung geistiger Aufgaben zu Hause oder 50 Dezibel im Schlaf. In dieser Hinsicht kann die Nachtzeit, in der sich der Organismus physisch von der Tagesbelastung erholt und die Wiederherstellung des Gehirns stattfindet, im Hinblick auf lärmbedingte Gesundheitseffekte besonders wichtig sein. Lärmgestörter Schlaf kann zur Entwicklung von kardiovaskulären Störungen führen (14).

Der Mechanismus funktioniert entweder direkt über die neuronalen Synapsen im retikulären Aktivierungssystem und in Teilen des Diencephaons einschließlich des Hypothalamus oder indirekt über die emotionale und kognitive Wahrnehmung des Geräusches über die kortikalen und subkortikalen Strukturen einschließlich der limbischen Region (74). Lärm stimuliert die Hypophyse-Nebennierenrinde-Achse (HPA-Achse) und die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (siehe Abbildung 5.5).

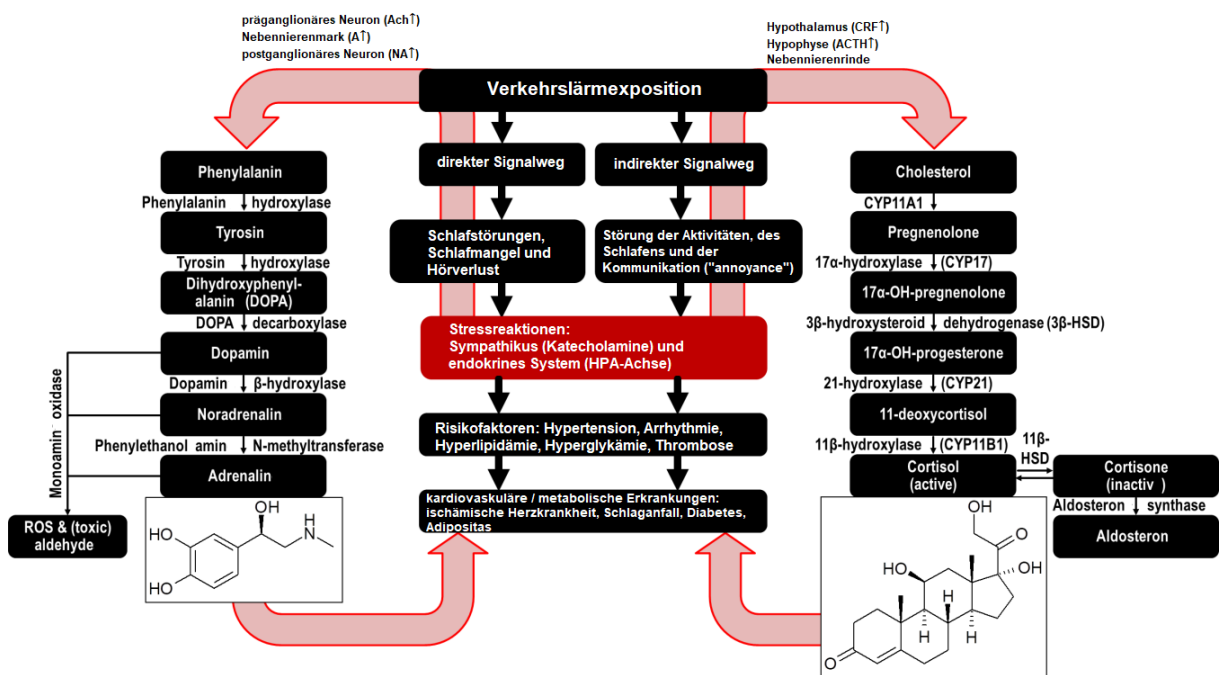


Abbildung 5.5 Schematische Darstellung der nachteiligen kardiovaskulären Auswirkungen von Lärmbelastung.

Der direkte Weg ist hauptsächlich mit physischen Schäden des Innenohrs verbunden, die zum Hörverlust und anderen Erregungszuständen (z. B. Schlaffragmentierung) aufgrund direkter Lärmeinwirkungen führen. Im Gegensatz dazu hängt der indirekte Weg von kognitiven und emotionalen Reaktionen sowie einer Störung der zirkadianen Uhr ab. Beide Wege führen jedoch über das sympathische (z. B. Katecholamine) und endokrine (z. B. Cortisol) System zu Stressreaktionen, die Vasokonstriktion und Veränderungen der Herzfrequenzvariabilität, der Gerinnung und des Stoffwechsels auslösen, die mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert

sind. Links und rechts sind die Synthesewege von Katecholaminen und Glucocorticoiden dargestellt. Diese Signalwege werden durch den Sympathikus und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) als Folge der Stressreaktion auf Lärmbelastung oder psychischen Stress aktiviert. Die Stresshormone können über verschiedene Mechanismen direkt zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen beitragen. Abbildung übersetzt aus (75). Teile wurden aus dem "Lärmreaktionsschema" aus (73, 76) neu gezeichnet und modifiziert.

Zuerst werden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet. Auf der einen Seite sind die Noradrenalin Spiegel bei habituierem Lärm erhöht. Auf der anderen Seite sind Unbehagen, emotionaler Stress und nicht-habituierter Lärm mit einer erhöhten Ausschüttung von Adrenalin verbunden (71). Beide Hormone sind Bestandteil der sogenannten „Abwehrreaktion“ (defence-reaction) bei Gefahr vor Kontrollverlust. Hilflosigkeit und Depression sind mit einem Anstieg von ACTH und Kortikosteroiden assoziiert (77). Dieser Mechanismus bezieht sich auf die sogenannte „Niederlagenreaktion“ (defeat-reaction) beim Kontrollverlust (78). Allerdings sollte man darauf hinweisen, dass diese theoretische Unterscheidung zwischen Abwehr- und Niederlagenreaktion eher fließend ist und alle drei Hormone bei Bedrohung signalisierenden Stimuli ausgeschüttet werden.

Es folgt die Aktivierung der HPA-Achse mit einer verzögerten Erhöhung der zirkulierenden Zytokine einschließlich der Interleukine IL-6 und IL-1 β . Unter chronischem Stress wurde eine Dysfunktion der HPA-Achse dokumentiert (79). Die Funktion der Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse im Hinblick auf das Feedback zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere basiert auf drei Hormonen: Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH), Adrenokortikotropisches Hormon (ACTH) und Glucocorticoide. Cortisol übt seine biologische Wirkung durch seine Bindung in Niere, Kolon, Herz und Gehirn an die Mineralkortikoid-Rezeptoren und an die ubiquitär vorhandenen Glucocorticoid-Rezeptoren aus. Die HPA-Achse und der Cortisolspiegel werden stark vom zirkadianen Rhythmus beeinflusst und sind für die Entstehung von Hyperglykämie, Dysproteinämie, Elektrolytstörungen, hypertotonischer Entgleisung, immunmodulatorischen Effekten, Stimmungsschwankungen und Schlaf-Fragmentierung verantwortlich (79). Nach dem allgemeinen Stressmodell beeinflusst die neuroendokrine Erregung den humoralen und metabolischen Zustand des Organismus und wirkt als Vermittler auf dem Weg vom wahrgenommenen Schall zur stressbedingten Erkrankung (73). Xia und Li et al. konnten belegen, dass chronischer psychischer Stress eine Glucocorticoid-Resistenz verursachen kann, was zu einer

fehlenden Glucocorticoid-abhängigen Suppression von Entzündungswegen mit nachfolgender übermäßiger Inflammationsreaktion und oxidativem Stress führt (80). Dabei spielen die Nox-2-Enzyme eine zentrale Rolle (81, 82). Gleichzeitig sind erhöhte Glucocorticoidspiegel mit eingeschränkter eNOS-Funktion und reduzierter ·NO-Bioverfügbarkeit (83, 84) verbunden und können eventuell das sympathische (85) und das vagale (80) System beeinflussen. Zusätzlich kann die Sympathikusaktivierung über die Hochregulation der Knochenmarkproduktion von unreifen und proinflammatorischen Monozyten zu einem entzündeten Phenotyp beitragen (86). In der Abbildung 5.6 werden die oben genannten Signalwege zusammengefasst.

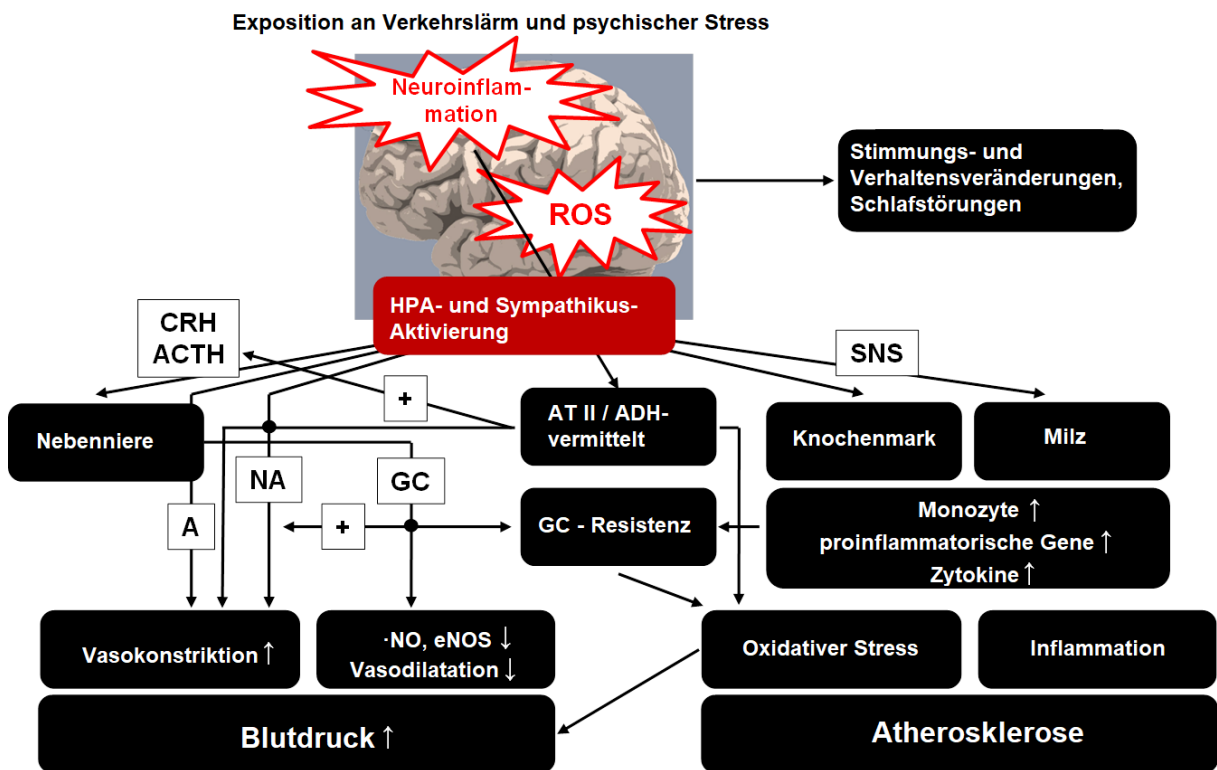


Abbildung 5.6 Lärmexposition und Stresshormone.

Verkehrslärm und psychischer Stress bewirken eine Aktivierung des Sympathikus (SNS) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) mit nachfolgender Ausschüttung von Katecholaminen (A, Adrenalin; NA, Noradrenalin) sowie Glucocorticoid (GC) über das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und das adrenocorticotrope Hormon (ACTH, auch als Corticotropin bezeichnet). Dieser Prozess wird von einer neuronalen Aktivierung über Entzündungsprozesse und von oxidativem Stress (ROS) begleitet. Letzterer trägt zu einer nachteiligen Signalgebung über Angiotensin-II (AT-II) und antidiuretisches Hormon (ADH, auch Vasopressin genannt) bei. Chronische Verkehrslärmbelastung und psychischer Stress verursachen eine schädliche Stresshormonsignalisierung (hauptsächlich durch Glucocorticoid (GR)-Resistenz), die zu einem entzündlichen Phänotyp, einem gestörten Redox-Gleichgewicht und Vasokonstriktion führt. Alle diese Effekte tragen zu erhöhtem Blutdruck,

Die Lärmeffekte auf die Stresshormone wurden in mehreren Studien beleuchtet. Eine Forschungsgruppe beobachtete eine am Abend gestörte zirkadiane endokrine Regulation mit erhöhten Cortisolspiegeln bei Probanden, die Fluglärm in der Nähe von Flughäfen ausgesetzt wurden (87). Die multizentrische HYENA-Studie zeigte auch, dass die Fluglärmexposition zu erhöhten Cortisolwerten im Speichel von weiblichen Probanden in den frühen Morgenstunden führte (88). In einer experimentellen Studie wurden 20 gesunde Probanden 20 Minuten lang einer Wiedergabe von aufgezeichnetem Verkehrslärm mit einem Schalldruckpegel von 75 dB(A) ausgesetzt. Hier wurde ein signifikanter Anstieg an Stressparametern wie zum Beispiel alpha-Amylase und Cortisol im Speichel gemessen (89). Außerdem wurden gesteigerte Cortisolspiegel im Urin von Kindern beobachtet, die in lauterer Nachbarschaften wohnten, was gut mit erhöhten Blutdruckwerten in Ruhe und Herzfrequenzreaktivität korrelierte (90). In Übereinstimmung mit den vorhergehenden Daten offenbarte eine große Kohortenstudie mit 1.751 erwachsenen Teilnehmern, dass die Cortisolkonzentration im Speichel bei hochgradig verärgerten Probanden unter Straßenverkehrslärmexposition besonders hoch waren, was die Theorie untermauert, dass die Wahrnehmung von Lärm durch jedes Individuum den Grad der Stressreaktion bestimmt (91).

Darüber hinaus ist es nicht nur die chronische Lärmexposition, die mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziiert ist, sondern auch eine kurzfristige nächtliche Lärmbelastung kann eine sogenannte Stresskardiomyopathie verursachen. Dieses Phänomen, auch bekannt als Takotsubo-Syndrom, ist mit erhöhten Blutspiegeln von Stresshormonen, insbesondere den körpereigenen Katecholaminen, meist unmittelbar nach einer außerordentlichen emotionalen oder körperlichen Belastung assoziiert (92).

5.1.3.2. Mechanistische Konzepte auf molekularer Ebene

Es scheint zwischen der Lärmbelastung und der steigenden kardiovaskulären Morbidität und Mortalität einen Zusammenhang zu geben, der in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung gelangt ist (14, 76).

In früheren Studien wurden bereits die mechanistischen Konzepte für die gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Umgebungslärm untersucht. 1970 schlug

Karl Kryter vor, dass Lärmexposition drei nicht-auditorische neuronale Systeme stimulieren kann (93). Das erste davon ist das autonome Nervensystem, das für die Kontrolle des Erregungszustandes des Körpers unter Einbeziehung von Drüsen, viszeralen Organen, Herz und Blutgefäßen verantwortlich ist. Als zweites wird das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem (ARAS) stimuliert, das die Aktivierung von höheren Hirnzentren des Zentralnervensystems und den sensorischen Input bezüglich Schmerz und Vergnügen kontrolliert. Zuletzt sind die kortikalen und subkortikalen Hirnzentren, die an der Kognition, am Bewusstsein, an der Aufgabenerfüllung und am Denken beteiligt sind. 2003 konnten Babisch et al. in ihrer Publikation ein moderneres Modell belegen (73). Dieses besagt, dass abgesehen von den direkten auditorischen Effekten von hohen Schalldruckpegeln auf das Gehörorgan ein indirekter Weg bei der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen von entscheidender Rolle ist (siehe auch Abbildung 5.4). Der vorgeschlagene indirekte Signalweg beinhaltet die kognitive Wahrnehmung von Lärm, die zur kortikalen Aktivierung und zur emotionalen Reaktion auf die Lärmbelastung führt. Lärmbedingt werden das Schlafen, die Kommunikation und die Tätigkeiten gestört (73). Das Gefühl der Verärgerung könnte dann eine chronische Stressreaktion und folglich erhöhte Stresshormonspiegel verursachen. Bei chronischer Exposition und daraus resultierenden erhöhten Stresshormonen können sich kardiovaskuläre Erkrankungen einschließlich akutem myokardialen Infarkt, Herzinsuffizienz, Arrhythmien, Hypertension und Apoplex manifestieren (73). Allerdings ist noch kein präziser molekularer Mechanismus identifiziert worden, wie Lärm genau Herzkreislauf-Erkrankungen induziert. Mögliche Mechanismen umfassen eine Aktivierung des Sympathikus (14, 15, 73, 94), die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren, Modifikation von Lipiden oder Phospholipiden, Aktivierung von Leukozytenpopulationen, die durch oxidativen Stress induzierte endotheliale Dysfunktion (52, 53) und Aktivierung des prothrombotischen Signalwegs. Abbildung 5.7 bildet die in diesem Kapitel beschriebenen Zusammenhänge anschaulich ab.

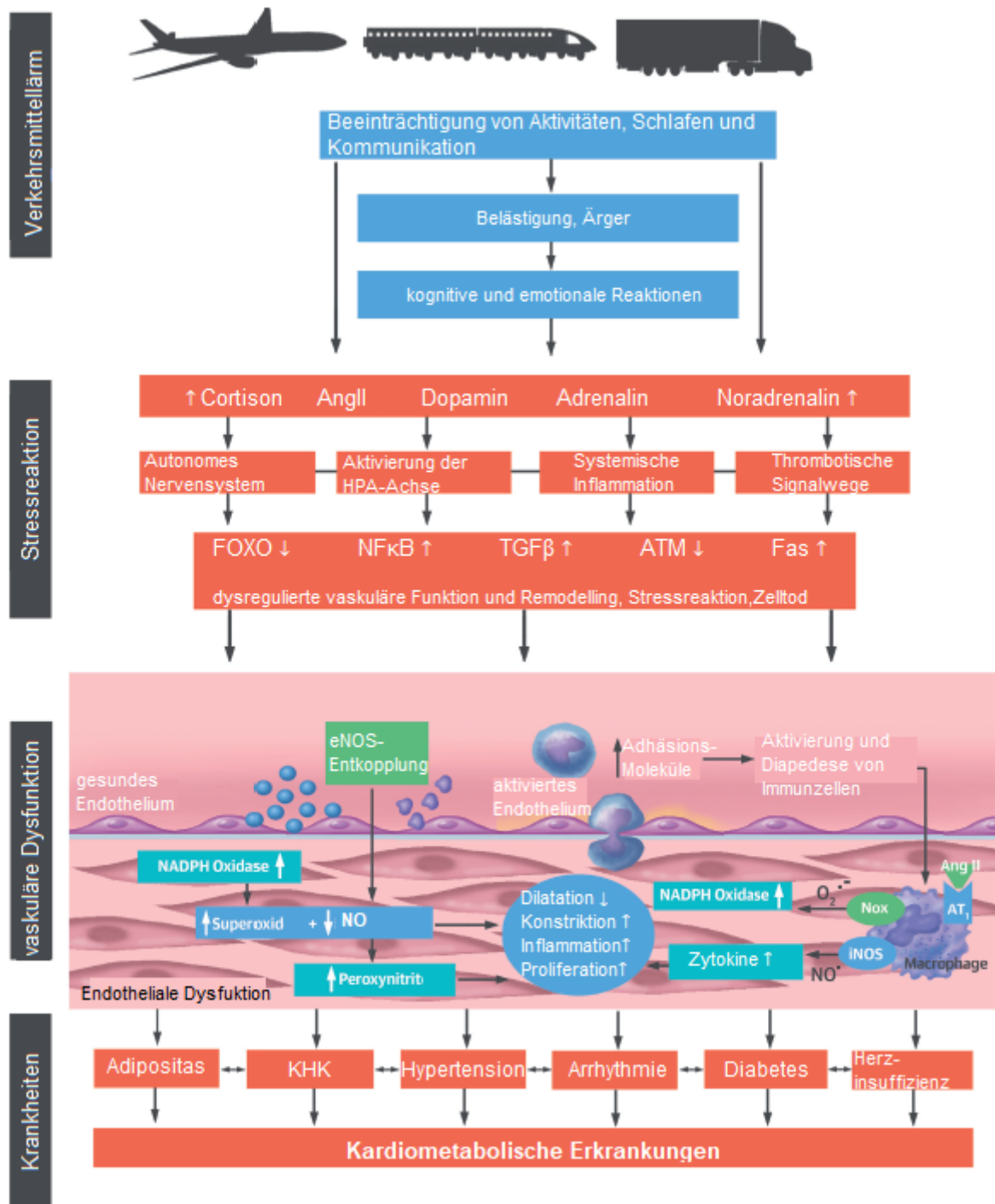


Abbildung 5.7 Molekulare Mechanismen, die vermutlich zur Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen führen.

Lärm verursacht Belästigung und Stressreaktionen, die durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse, Entzündung, Thrombose und veränderte Genexpression charakterisiert sind. Nähere Einzelheiten im Abschnitt 5.2. AngII= Angiotensin II, FOXO= forkhead box O, NFκB= nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, TGF= transforming growth factor, ATM= ataxia telangiectasia mutated, Fas= cell death signaling molecule (CD95), KHK= koronare Herzkrankheit, HPA= hypothalamic-pituitary-adrenal. Abbildung übersetzt aus (3).

Lärm induziert eine Stressreaktion mit resultierender Aktivierung des Sympathikus und Erhöhung der Konzentrationen von Katecholaminen, Cortison und Angiotensin II (siehe auch Schemata in 5.1.3.1.). Dies führt anschließend zu vaskulären Schäden, da es sich bei Angiotensin II um einen potenten Aktivator der vaskulären und phagozytischen NADPH-Oxidase handelt, deren aktivierte Form erhöhten oxidativen Stress im Gefäß verursacht. Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) fangen ·NO ab (oxidative Depletierung) und durch die Oxidation des Cofaktors Tetrahydrobiopterin und durch S-Glutathionylierung wird die endotheliale NO-Synthase (eNOS) entkoppelt, was wiederum zu weiter erhöhtem oxidativen Stress führt (95). Auf der Ebene der Genexpression beeinträchtigen die ROS die Signalwege mit Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), FOXO-Transkriptionsfaktoren, TGFβ und NFκB, die alle zur Aktivierung von Endothelin-1, zu höheren Konzentrationen von zirkulierendem Interleukin-6 und zur vermehrten Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen führen. Oxidativer Stress steht in engem Zusammenhang mit gesteigerter Inflammation (96). Die Immunzellen wie die Neutrophilen, die natürlichen Killerzellen und die Makrophagen generieren Superoxid und Stickstoffmonoxid bei der Diapedese in das Gefäß, was oxidative Proteinmodifikationen von 3-Nitrotyrosin, Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal hervorruft. Gleichzeitig tragen die erhöhten Glucocorticoidspiegel zu einer weiteren Reduzierung der endothelialen ·NO-Produktion, zur gestörten Vasodilatation und folglich zur Hypertension bei. Die vasokonstriktorisches Effekte werden von den erhöhten Katecholamin- und Endothelin-1-Spiegeln verursacht. Die schädlichen Auswirkungen auf das Gefäß sind für die Entstehung von arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, Herzinsuffizienz sowie Stoffwechselerkrankungen verantwortlich. Die Abbildung 5.7 stellt anschaulich die potentiellen mechanistischen Konzepte dar, die zur Entstehung von Lärm-induzierten kardiovaskulären Erkrankungen führen. Die Mechanismen der durch oxidativen Stress induzierten endothelialen Dysfunktion sind ausführlicher im Abschnitt 5.2.3. erläutert.

5.1.4. Lärmeffekte auf Inflammation

Chronischer psychischer Stress führt zu einem entzündlichen Phänotyp, der in engem Zusammenhang mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko steht (97). Laut einer Metaanalyse von 2007 steigert eine akute psychische Belastung die Konzentrationen der zirkulierenden Zytokine IL-6 und IL-1β (98). Die Synthese von IL-6 findet in einer

Vielzahl von verschiedenen Zelltypen des Organismus statt, unter anderem auch in Endothelzellen. IL-6 bindet an spezielle membrangebundene IL-6-Rezeptoren auf Hepatozyten und Leukozyten sowie an lösliche IL-6-Rezeptoren. Diese Rezeptoren induzieren über das membranständige Glykoprotein 130 (gp130) eine intrazelluläre Signalkaskade. Die Aktivierung von gp130 bewirkt die Phosphorylierung einer Janus-aktivierten Kinase, was über den JAK-STAT-Signalweg intrazellulär zur Transkription bestimmter für die Immunantwort relevanten Zielgene führt (99). Obwohl es nicht so viele Studien über die Mechanismen der lärminduzierten Inflammation gibt, wurde eine bedeutende Anzahl relevanter Studien zumindest im Bereich des lärminduzierten Hörverlustes veröffentlicht (13). Weitere Studien offenbarten eine erhöhte oxidative Stressreaktion und eine damit verbundene vaskuläre Dysfunktion in der Cochlea als Schlüsselemente beim lärminduzierten Hörverlust (100, 101). Diese negativen Auswirkungen konnten durch Verabreichung von Antioxidantien verhindert werden (102). In einem Chinchilla-Modell für lärminduzierten Hörverlust wurde gesteigerte Aktivität von NADPH-Oxidase und NF- κ B von aktivierten B-Zellen nach Lärmaussetzung beobachtet (103). Um die wichtige Rolle der Inflammation beim lärminduzierten Hörverlust zu unterstreichen, wurde gezeigt, dass hohe Lärmpegel von 105 dB(A) die Cochlea bei Mäusen mit einem proinflammatorischen Phänotyp (Diabetes) aufgrund der Beeinträchtigung des Blutflusses in der Cochlea und der ineffizienten Erholung bei diesen Tieren mehr Schaden verursachten (104).

Im Hinblick auf die indirekten nicht-auditiven Lärmefekte induzierte weißes Rauschen mit einem Schalldruckpegel von 100 dB mit Frequenzen zwischen 0,4-6,3 kHz (vier Stunden pro Tag über 30 Tage) einen transienten Anstieg von Blutglukose, Entzündungsmarkern und Triglyzeriden und Veränderungen im Mikrobiom. Innerhalb von 14 Tagen nach Beendigung der Lärmbelastung kam es zur Normalisierung dieser Parameter (68). Bemerkenswerterweise konnte chronische Lärmexposition nicht nur das Darmmikrobiom verändern, sondern auch eine altersbedingte neurochemische und inflammatorische Dysregulation und Alzheimer-ähnliche Veränderungen im Gehirn von SAMP8-Mäusen verursachen (105). SAMP8 (von englisch „senescence-accelerated mouse prone 8“) ist ein spontanes Mausmodell der beschleunigten Alterung. Konkret veränderte die chronische Lärmaussetzung den prozentualen Anteil von Proteobakterien, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori* und *Yersinia*, und von Aktinobakterien im Darm. Somit nimmt der Roseburia-

Anteil zu und der Faecalibakterium-Anteil in Caecum ab. Alle diese Veränderungen könnten möglicherweise die beobachtete lärminduzierte gestörte Regulation des Blutzuckers mit einer Verschiebung zum Prädiabetes bzw. zum metabolischen Syndrom sowie zur intestinalen Entzündung erklären (105). Zudem verschlimmerten sich die neuroinflammatorischen Zustände und die Pathologie der Alzheimer-Krankheit in einem Ratten-Modell nach Lärmexposition (106).

Diese Studienergebnisse stimmen auch mit dem Befund der Arbeitsgruppe von Münzel und Daiber et al. überein, dass bereits eine niedrige Lärmbelastung die zirkulierenden Zytokine erhöhte und die Infiltration von Immunzellen in die Vaskulatur (1, 75) und einen neuroinflammatorischen Phänotyp förderte (7). Die Forscher beobachteten auch in einer kleinen Kohortenstudie, dass selbst Straßenverkehrslärm mit geringen Schalldruckpegeln durch die Erhöhung von IL-12 und die Reduktion der Anzahl und der Aktivität von natürlichen Killerzellen die Gesundheit beeinflussen kann (107). Schließlich wurde in der norwegischen HUNT- (Helseundersøkelsen i Nord-Trøndelag) und in der niederländischen Lifelines-Studie bei einer Gesamtanzahl von 144.082 Probanden festgestellt, dass Straßenverkehrslärm in Höhe von 5,1 dB(A) während der Tagesstunden mit einem Anstieg von 1,1 % im hochempfindlichen C-reaktiven Protein (CRP) verbunden war (48). CRP ist ein Plasmaprotein, das in der Leber gebildet wird und zu den sogenannten Akute-Phase-Proteinen und den Entzündungsparametern zählt. Das C-reaktive Protein ist ein unspezifischer Laborparameter für akute entzündliche Erkrankungen mit infektiösen und nicht-infektiösen Ursachen und kann als Hinweis auf den Schweregrad einer Entzündung gewertet werden. Der deutlichste Anstieg zeigt sich bei bakteriellen Infektionen. Darüber hinaus wird CRP zusammen mit IL-6 als Risikoindikator für Arteriosklerose, Insulinresistenz und das metabolische Syndrom eingestuft (108-110). Hierfür wurden abgewandelte Testprotokolle entwickelt, die als hochsensitives CRP (hsCRP) bezeichnet werden. Im Allgemeinen wurde eine Korrelation zwischen akuten psychologischen Stressbedingungen und Stresshormonspiegeln, Aktivierung der Immunzellen und kardiovaskulären Parametern belegt, wobei die Personen mit den schwersten kardiovaskulären Auswirkungen gleichzeitig auch die stärker ausgeprägten immunologischen Veränderungen aufwiesen (111, 112).

5.2. Oxidativer Stress

5.2.1. Definition und historischer Überblick

Helmut Sies definierte 1985 oxidativen Stress als ein Ungleichgewicht zwischen Prooxidantien und Antioxidantien, genauer ROS Generierung / induzierte oxidative Schäden und deren Abbau bzw. Reparatur (113). Bis vor etwa 40 Jahren war die allgemein anerkannte Lehrmeinung, dass Radikale im Organismus wenn überhaupt eine rein schädliche Rolle spielen. Nach langjähriger Suche nach dem „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) konnte dieser von den Nobelpreisträgern Murad, Ignarro und Furchgott in den 70er und 80er Jahren als Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) identifiziert werden. Diese Entdeckung revidierte die überwiegend negative Lehrmeinung über Radikale und zeigte, dass diese durchaus physiologische Funktionen ausüben können; im Fall von $\cdot\text{NO}$ die Regulation des Gefäßtonus.

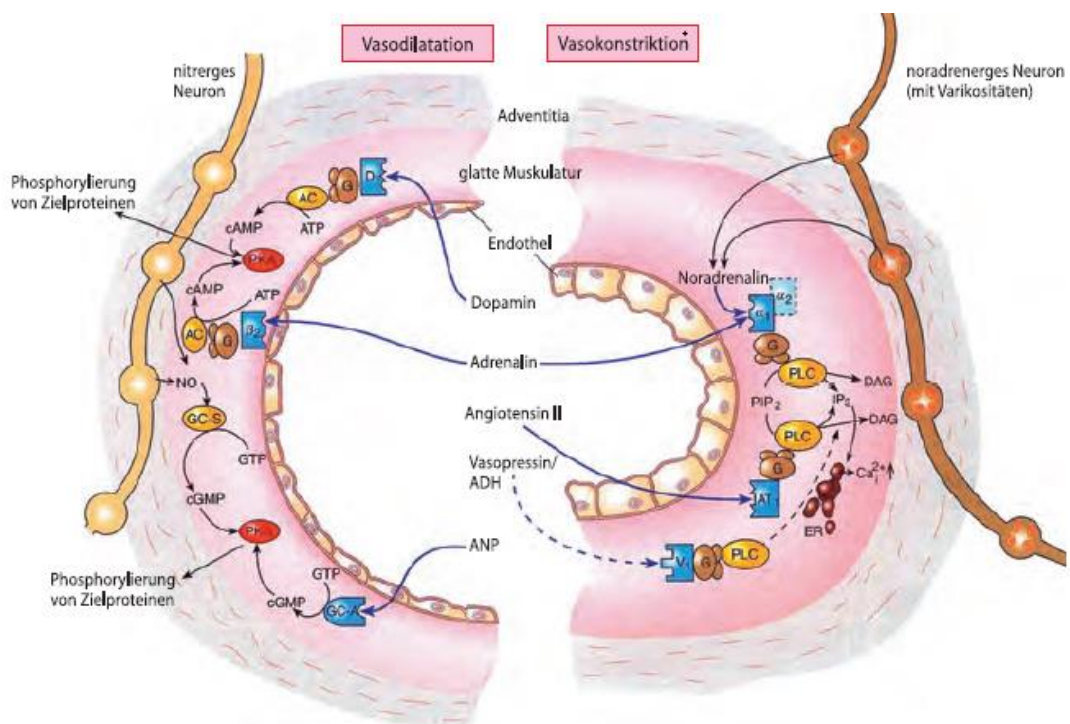
Unter freien Radikalen sind sowohl Sauerstoffradikale (ROS), wie das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und das sehr reaktive Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), als auch Stickstoffradikale (RNS), wie Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) oder das Stickstoffdioxidradikal ($\cdot\text{NO}_2$), bekannt. Für die Entstehung von freien Radikalen ist insbesondere die mitochondriale Atmungskette verantwortlich. Andere Quellen sind die plasmamembrangebundene NADPH-Oxidase, die zytosolische Xanthinoxidase sowie die entkoppelte Stickstoffmonoxidsynthase. Damit der Organismus vor den schädlichen Wirkungen bei hohen Konzentrationen von freien Radikalen geschützt wird, gibt es antioxidative Abwehrmechanismen. In diesem Kontext sind insbesondere die Superoxiddismutasen (SOD) bedeutsam (114). Als Beispiele hierfür sind die mitochondriale Mangan-SOD und die zytosolische bzw. extrazelluläre Kupfer/Zink-SOD zu nennen. Aber auch weitere Enzyme wie zum Beispiel Katalase, Thioredoxin und zugehörige Reduktasen, Peroxiredoxine, Glutaredoxine und die Glutathionperoxidase dienen dem Schutz des Organismus vor oxidativem Stress. Neben diesen enzymatischen Abwehrmechanismen spielen auch andere niedermolekulare Moleküle wie Ascorbat und Tocopherole in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle (115).

Nimmt die Bildung von oxidierenden Spezies wie Superoxid und Peroxynitrit überhand, so entsteht im Organismus ein Ungleichgewicht im Redoxstatus, d. h. Gleichgewichte wie das Thiol-Disulfid-System werden zu den oxidierten Zuständen hin verschoben und das antioxidative Abwehrsystem (z. B. Superoxiddismutasen und Katalase) wird überfordert. Dieser Zustand der gestörten Homöostase zwischen der Entstehung von

RONs und dem Schutz vor RONS wird als oxidativer Stress bezeichnet und kann langfristig zum Zelltod (Apoptose oder Nekrose) und in schweren Fällen zum Tod des gesamten Organismus führen (115). Ein dramatisches Beispiel für eine überschießende Generierung von oxidativem Stress durch den Organismus selbst stellt der septische Schock dar. Hier kann es zu lebensbedrohlichen, wegen der Katecholaminrefraktärität nicht beherrschbaren Zuständen führen (115)(116).

5.2.2. Regulation des Gefäßtonus – NO-cGMP-Signalweg

Zwischen der Muskelschicht des Gefäßes (Tunica media) und dem intravasalen Blut befindet sich eine monozellige, kontinuierliche Schicht an der Innenwand der Gefäße: das Endothel (Tunica interna). Schon aufgrund seiner Zellzahl (5×10^{13}), Masse (1,5 kg) und Oberfläche (1000 m^2) sowie seiner strategischen anatomischen Position spielt das Endothel eine Schlüsselrolle in der Regulation von Gefäßspannung, Blutgerinnung, Zellmigration bzw. -adhäsion und Angiogenese (117, 118). Die Regulation des Gefäßtonus unterliegt einem komplexen Netzwerk von vasokonstriktorisch und -dilatatorisch wirkenden Mediatoren. Die wichtigsten davon werden unten in der Abbildung 5.8 mit ihren Wirkungsweisen kurz vorgestellt; zwecks Übersichtlichkeit wurde hier bewusst darauf verzichtet, alle an der Modulation des Gefäßtonus beteiligten Signalwege im Detail zu diskutieren.



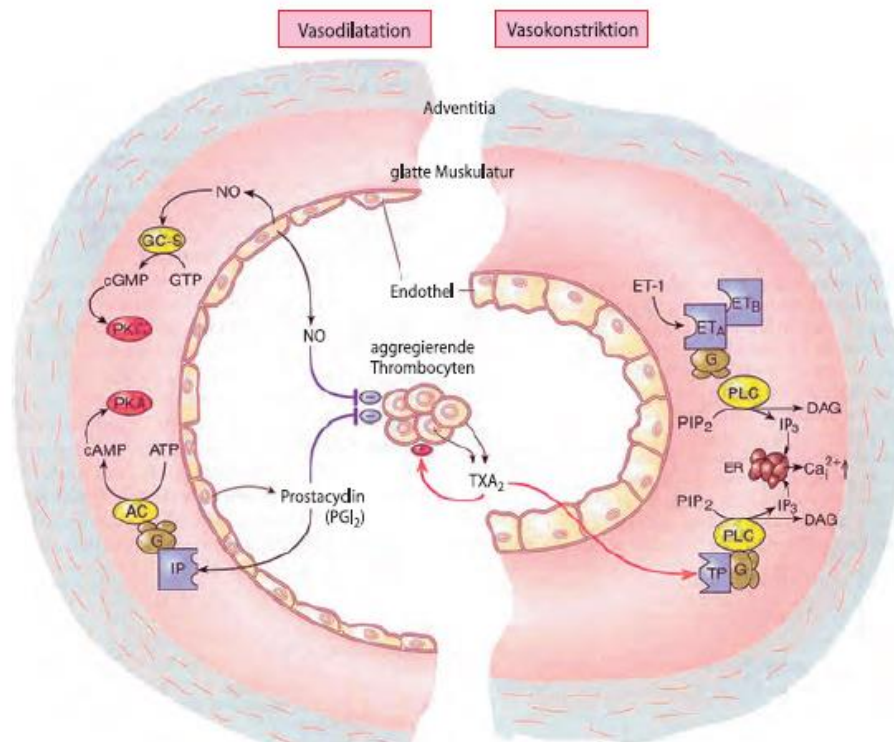


Abbildung 5.8 Einfluss von Mediatoren auf die Regulation des Gefäßtonus.

oben: NO vermittelt über die lösliche Guanylatzyklase und natriuretische Peptide über eine membranständige Guanylatzyklase mit Stimulation der Proteinkinase G eine Vasodilatation. Adrenalin und Dopamin aktivieren über G-Protein-gekoppelte β_2 - und D_1 -Rezeptoren entsprechend die Adenylatzyklase und bewirken über die Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase A eine Vasodilatation. Adrenalin und Noradrenalin aktivieren über α_1 -Rezeptoren, Angiotensin II über AT_1 -Rezeptoren und Vasopressin über V_1 -Rezeptoren die Phospholipase C. Diese setzt aus PIP_2 IP_3 frei, das einen IP_3 -Rezeptor-gekoppelten Calciumkanal öffnet. Es kommt zum Ausstrom von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und damit zur Konstriktion.

unten: Prostazyklin aktiviert den IP-Rezeptor, der über die G-Protein-gekoppelte Adenylatzyklase eine Vasodilatation vermittelt. Sowohl NO als auch Prostazyklin hemmen die Plättchenaggregation. Aktivierte Plättchen setzen Thromboxan A_2 frei, das zum einen die Plättchen weiter aktiviert und zum anderen über den TP-Rezeptor zur Aktivierung der PLC führt. Endothelin-1 aktiviert über die ET_A - und ET_B -Rezeptoren die PLC und bewirkt eine Vasokonstriktion. Abbildung aus (115).

Diese Mediatoren beeinflussen hauptsächlich die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivität der Myosin-Leichtkettenkinase/-phosphatase (MLKK/MLKP) in den Glattmuskelzellen. Strömt Ca^{2+} in das Zytosol der Zelle ein, bildet es mit Calmodulin einen Komplex. Über diesen Komplex wird die MLKK aktiviert. Nur wenn dieses Enzym im aktivierten Zustand vorliegt, sind die Myosinköpfechen in der Lage, an das Aktinfilament zu binden und eine Kontraktion der glatten Muskulatur auszulösen (119)(120). Katecholamine, Vasopressin, Thromboxan A_2 , Angiotensin II und

Endothelin-1 sind vasokonstriktorisch wirksame Mediatoren, die über G-Proteine die Phospholipase C aktivieren und so aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und 1,2-Diacylglycerol (einer der potentesten PKC und damit NOX2 Aktivatoren) generieren. IP₃ aktiviert rezeptorabhängig einen Calciumkanal im sarkoplasmatischen Retikulum, das in der glatten Muskulatur Ca²⁺-Ionen speichert. So kommt es zum Ausstrom von Ca²⁺ ins Zytosol und letztendlich zur Vasokonstriktion. Gegenspieler hiervon sind unter anderem Prostaglandine wie Prostazyklin, Dopamin, natriuretische Peptide und ·NO. Wichtig ist auch zu bedenken, dass eine Erhöhung des Ca²⁺ im Zytosol zu einer Aktivierung der eNOS und damit zu einer Vasodilatation führt. Die Vasodilatation durch ·NO wird über zwei wesentliche Mechanismen bewerkstelligt:

- 1) durch die Reduktion der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration in den Glattmuskelzellen und
- 2) durch die Desensitivierung der Myosin-Aktin-Filamente.

Grundlegend hierfür ist der sogenannte ·NO-cGMP-Signalweg (siehe auch Abbildung 5.9). Hier hat die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) durch ·NO eine gesteigerte Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus GTP zur Folge. Essentiell für die Wirkung von ·NO auf die glattmuskuläre Kontraktion ist die Senkung des zytosolischen Ca²⁺-Spiegels. In diesem Hinblick sind die cGMP-abhängige-Proteinkinase (cGK-I; glattmuskuläre Form) und die zyklisch-Nukleotid-gesteuerten Kanäle (CNG-Kanäle) involviert. Das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGMP-Kinase-Substrat (IRAG) ist ein weiteres Schlüsselprotein in der ·NO-cGMP-Signalkaskade. IRAG bildet zusammen mit der cGK-I und dem IP₃-Rezeptor Typ I einen trimeren Komplex und hemmt nach Aktivierung der cGK-I die Calciumausschüttung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Weiterhin kommt es durch die Phosphorylierung von BK_{Ca}-Kanälen zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle. Die daraus resultierende Hyperpolarisation inhibiert spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und verhindert auch den Einstrom von Ca²⁺ aus dem Extrazellularraum (121-123). Schließlich beschleunigt ·NO über die S-Nitrosylierung der Cystein-Thiole der SR-Ca²⁺-ATPase (SERCA) die Wiederaufnahme von Ca²⁺ ins sarkoplasmatische Retikulum (124). Dies führt auch zu einer Verringerung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration.

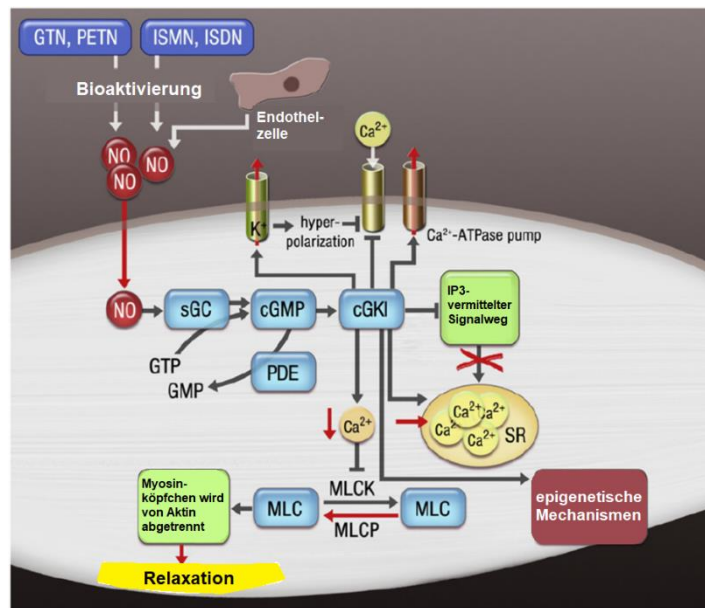


Abbildung 5.9 Mechanismen der NO/Organischem Nitrat-induzierten Vasodilatation der glatten Gefäßmuskulatur.

Nach der Bioaktivierung des organischen Nitrats stimuliert NO die lösliche Guanylatzyklase und erhöht das zyklische 3',5'-Guanosinmonophosphat (cGMP), das die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI) aktiviert. Anschließend wird der intrazelluläre Calciumspiegel über die Hemmung des IP₃-regulierten Ca-Kanals, die Aktivierung von Kaliumkanälen mit nachfolgender Hemmung von Calciumkanälen und die Aktivierung der Calciumpumpe im sarkoplasmatischen Retikulum gesenkt. Verminderte Calciumspiegel reduzieren die Kontraktilität der Myosin-/Aktinfilamente über die Hemmung der Phosphorylierung der leichten Myosinkette und bewirken somit eine Vasorelaxation. Abbildung übersetzt aus (125).

Neben der Beeinflussung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentrationen vermittelt NO über den NO-cGMP-Signalweg eine Aktivierung der Myosin-Leichtkettenphosphatase (MLCP) (126). Dieses Enzym ist ein Gegenspieler der MLCK und setzt durch Dephosphorylierung die Ca²⁺-Sensitivität des kontraktilelements herab.

5.2.3. Endotheliale Dysfunktion

Im intakten Endothel stehen all diese vasokonstriktorisch und vasodilatatorisch wirksamen Mediatoren im Gleichgewicht. Ein funktionierendes Endothel ist einer der wichtigsten Faktoren für die Vermeidung von kardiovaskulären Erkrankungen (115) (127)(128). Am intakten Endothel führen NO und Lokalhormone wie z. B. Prostaglandine zur Erniedrigung des Gefäßtonus, Hemmung der übermäßigen Thrombozytenaggregation und der Leukozytenadhäsion, sowie zur Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen (Intimaproliferation). So wirken diese Faktoren antiatherosklerotisch (129-131). Durch Verletzung, Entzündung oder kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Hypertonie und Diabetes mellitus

verliert das Endothel nicht nur diese protektiven Eigenschaften, sondern es entwickelt sogar proatherosklerotisches Potential. Diese Situation wird klinisch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet (115). Hier verliert das Gefäß die Fähigkeit auf endogen und exogen induzierte Veränderungen des Gefäßtonus angemessen zu reagieren. Hämodynamisch äußert sich die endotheliale Dysfunktion durch eine Abschwächung der sogenannten endothelabhängigen Relaxation. Die Stimulation der muskarinergen Rezeptoren im Endothel führt zu einer Aktivierung der endothelialen NO-Synthase, während die direkte Stimulation der muskarinergen Rezeptoren auf der glatten Muskulatur eine Vasokonstriktion auslöst. Somit hängt die Reaktion des Gefäßes auf Acetylcholin in erster Linie von der funktionellen Integrität des Endothels ab. Bei endothelialer Dysfunktion überwiegen die glattnuskulären Effekte und somit wird durch Acetylcholin eine paradoxe Vasokonstriktion ausgelöst (132, 133).

5.2.3.1. Mechanismen der durch oxidativen Stress induzierten endothelialen Dysfunktion

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies können die endotheliale Dysfunktion über mehrere Mechanismen verstärken. Eine wesentliche Komponente der endothelialen Dysfunktion stellen die vermehrte Inaktivierung von endothelalem $\cdot\text{NO}$ durch Superoxidanionradikale und die oxidierende Wirkung von Peroxynitrit dar.

Das für das Endothel wohl wichtigste pathophysiologische Ereignis ist die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase. $\cdot\text{NO}$ wird im Organismus durch drei Isoformen der NO-Synthase aus Arginin und Sauerstoff unter Verwendung des Cofaktors NADPH gebildet (siehe auch Abbildung 5.10): die neuronale-konstitutive NOS-1, die induzierbare NOS-2 und die endotheliale NOS-3 (eNOS) (134). Dadurch spielt $\cdot\text{NO}$ eine vielfältige Rolle für die Signaltransduktion im Gefäß (Endothelfunktion, Modulation der Plättchenaggregation sowie der Leukozytenadhäsion) und im neuronalen System (z. B. Nervenleitung und Prozess des Lernens). In den letzten Jahren wurde das Verständnis zur Regulation der eNOS-Aktivität weitaus komplexer und umfasst heute viele Formen der posttranslationalen Regulation. Hier soll nur ein kleiner, für diese Arbeit relevanter Teil dieser Mechanismen besprochen werden.

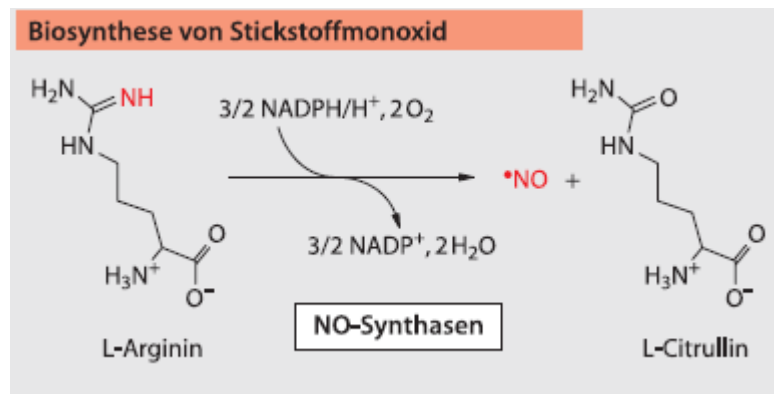


Abbildung 5.10 Biosynthese von $\cdot\text{NO}$ durch die NOS. (Abbildung aus (135)).

Die eNOS besteht aus einem Homodimer mit jeweils zwei Domänen, einer Oxygenase und einer Reduktase, die durch die Ca^{2+} /Calmodulin-Domäne verbunden sind. In einer intakten NO-Synthase fließen die Elektronen vom Cofaktor NADPH über das Flavinadenindinukleotid zum Flavimononukleotid, das die Elektronen jeweils an die Oxygenase-Domäne des anderen Monomers überträgt. Die Elektronen dienen zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff, was letztendlich zur Umsetzung von L-Arginin zu $\cdot\text{NO}$ und L-Citrullin führt. In den letzten Jahren wurde das Verständnis zur Regulation der eNOS-Aktivität weitaus komplexer und umfasst viele Formen der posttranslationalen Regulation, Proteininteraktionen und Phosphorylierungen an Aminosäureresten, insbesondere an Threonin⁴⁹⁵ und Tyrosin⁶⁵⁷ durch die PKC bzw. PYK-2 (136-138). Selbstverständlich kann auch ein Mangel an L-Arginin limitierend für die Syntheseleistung der eNOS sein, obwohl dies aufgrund der Affinität von L-Arginin für das Enzym eher unwahrscheinlich ist. Aber auch Ca^{2+} /Calmodulin und ein Mangel an essentiellen Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin (BH_4) scheinen aktivitätsbestimmend zu sein. BH_4 wird durch die GTP-Cyclohydrolase 1 synthetisiert. Durch Peroxynitrit kann BH_4 zu Dihydrobiopterin (BH_2) oxidiert werden, was zur Funktionseinschränkung der eNOS führt. Die Dihydrofolatreduktase ist in der Lage, über den „salvage pathway“ aus BH_2 wieder BH_4 zu regenerieren. Chen et al. konnten 2010 einen weiteren Mechanismus beleuchten, der die eNOS-Funktionalität beeinflusst. Die S-Glutathionylierung ist eine posttranslationale Proteinmodifikation an Cysteinresten, die bei oxidativem Stress durch Thiol-Disulfid-Austausch mit oxidiertem Glutathion oder durch Reaktion von Protein-Disulfidbrücken mit Glutathion entsteht (139, 140). Diese Modifikation der eNOS durch S-Glutathionylierung begünstigt die Entkopplung, führt zur verminderten $\cdot\text{NO}$ -Bioverfügbarkeit und verschlechtert die endothelabhängige Relaxation (141). Auch der stärkste endogene eNOS Inhibitor

ADMA trägt zum Verlust der $\cdot\text{NO}$ Bioverfügbarkeit bei (142). Die redoxsensitiven Modifikationen der eNOS werden in der Abbildung 5.11 dargestellt.

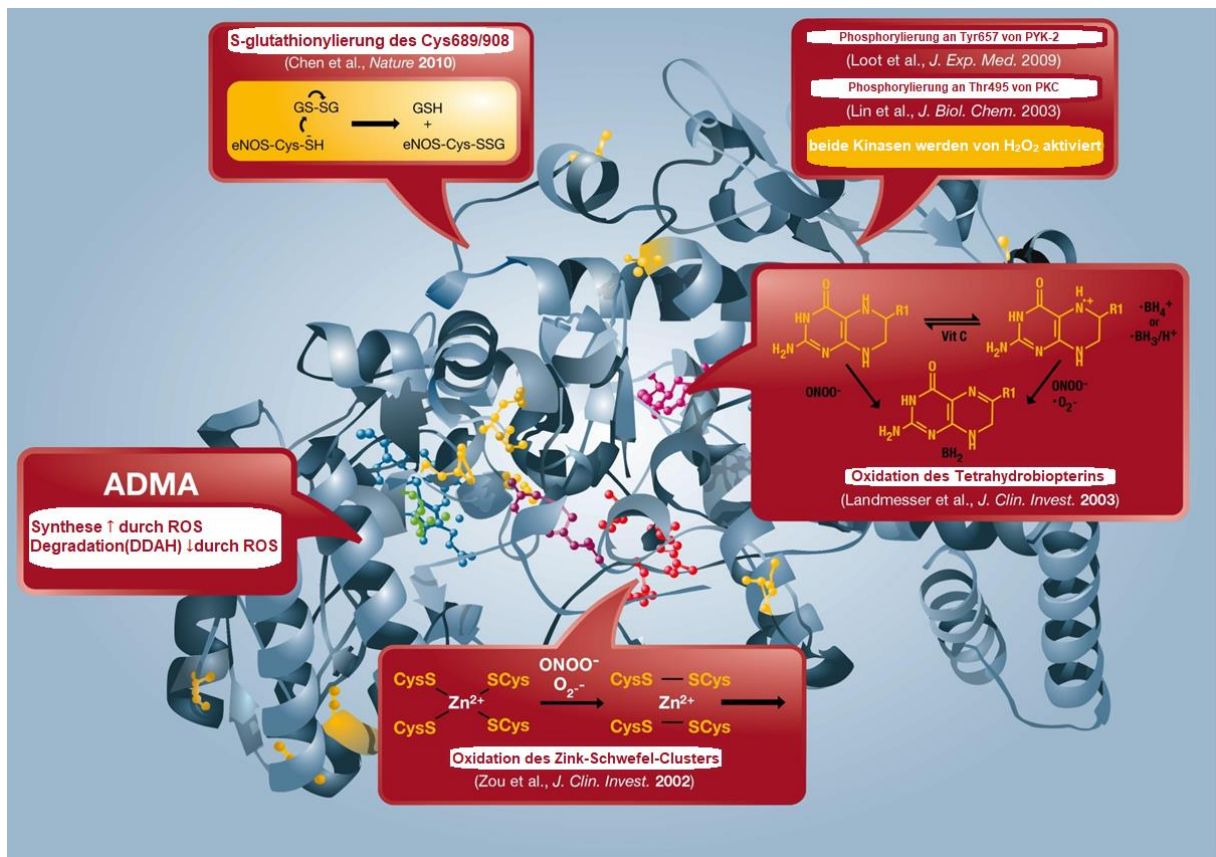


Abbildung 5.11 Redoxsensitive Modifikationen der endothelialen NO-Synthase (eNOS).

Hier wird die Röntgenstruktur der humanen eNOS mit dem Eisen-Porphyrin (blau), dem Substrat L-Arginin (grün), dem P450-bildenden axialen Eisen-Thiolat-Liganden aus einem Cysteinrest (gelb), dem Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) (violett), dem Zink-Thiolat-Komplex (rot, zwei von jeder Untereinheit) und dem Zink-Ion (braun) abgebildet. Die Kästen stellen die redoxsensitiven Modifikationen der eNOS dar, wie z. B. S-Glutathionylierung, PKC- und PYK-2-abhängige Phosphorylierung, oxidative BH₄-Depletion, Störung des Zink-Schwefel-Clusters sowie asymmetrische Dimethylarginin (ADMA)-Synthese/Degradation. Alle regulieren die enzymatische Aktivität der eNOS. Die Kristallstruktur wurde aus der Proteindatenbank 3NOS (DOI:10.2210/pdb3nos/pdb) mit dem PyMOL Molecular Graphics System Version 1.2r1 (DeLano Scientific LLC) generiert. Abbildung übersetzt aus (142).

Die Phosphorylierung an Aminosäureresten, ein Mangel an BH₄, die S-Glutathionylierung oder oxidative Zerstörung des Zink-Thiol-Komplexes an der Schnittstelle der Dimere verwandeln demnach die eNOS in eine „Superoxidsynthase“. Durch die oben genannten von oxidativem Stress abhängigen Mechanismen wird die Bindung des Dimer-Komplexes im Enzym verändert und es kommt zur Entkopplung des Elektronenflusses, d. h. zur Übertragung von Elektronen auf molekularen

Sauerstoff und damit zur Superoxidbildung. Es wird mit anderen Worten anstelle des gefäßprotektiv wirksamen Vasodilatators $\cdot\text{NO}$ das vasokonstriktorisch und proatherogen wirkende Superoxidanion gebildet. In dieser Situation wird die eNOS als „entkoppelt“ bezeichnet. Aus diesem Grund wird die eNOS auch als Janus-gesichtiges Enzym bezeichnet.

Das direkte Abfangen von $\cdot\text{NO}$ durch Superoxidanionen reduziert die $\cdot\text{NO}$ -Bioverfügbarkeit und lässt die endotheliale Dysfunktion folgendermaßen voranschreiten (95, 141, 143). Aus der Reaktion von $\cdot\text{NO}$ mit Superoxid entsteht das kurzlebige, aber auch sehr reaktionsfreudige Peroxynitrit. Das Letztere hat ein eigenes biologisches Wirkspektrum und ist in der Lage, durch Nitrierung von bestimmten Aminosäureresten die Funktion von Enzymen zu beeinflussen und im Endothel ein proatherosklerotisches Potential zu induzieren. Kurz zusammengefasst interferiert es mit Tyrosinkinase- und G-Protein-abhängigen Signaltransduktionswegen durch Nitrierung von Tyrosinresten von Proteinen und oxidiert eine Vielzahl Thiol-abhängiger Proteine. Es hemmt die Prostacyclinbildung und blockiert die Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase durch Nitrierung der Enzyme (144). Hierdurch steigt die mitochondriale Superoxidanionradikalkonzentration an und die Mitochondrien werden geschädigt. Im Folgenden werden die Pathomechanismen ausführlicher dargestellt.

Wie im Abschnitt 5.2.2. beschrieben dient die lösliche Guanylatzyklase (sGC) als Protein-Rezeptor für die $\cdot\text{NO}$ -vermittelte Relaxation und ist oxidationsempfindlich (145, 146). Durch Peroxynitrit und Superoxid werden essentielle Thiolgruppen in der $\cdot\text{NO}$ -Sensor- bzw. katalytischen Domäne oxidiert und die sGC dadurch inaktiviert. Somit wird die Vasodilatation inhibiert. Durch die Inaktivierung der sGC können selbst exogene $\cdot\text{NO}$ -Donoren wie Nitroglyzerin keine Gefäßrelaxation induzieren, da der Signalweg blockiert ist (147).

Neben der Beeinflussung des $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$ -Signalwegs kommt auch der oxidativen Inaktivierung der Prostacyclinsynthese (Cyclooxygenase) eine wichtige Bedeutung zu. Während COX-1 konstitutiv exprimiert wird, wird die Synthese von COX-2 erst bei Verletzungen, Entzündungen oder Sprossung von Zellen durch Zytokine und Mitogene induziert. Außerdem wird COX-2 durch Scherkräfte in Endothelzellen induziert. Wie unten in der Abbildung 5.12 dargestellt wird, bildet die Cyclooxygenase (COX) aus Arachidonsäure das Prostaglandinendoperoxid H_2 (PGH_2), welches als Substrat für

die Thromboxansynthase und Prostazyklinsynthase (PGIS) fungiert. Thromboxan A₂ und PGH₂ bewirken über den TP-Rezeptor eine Vasokonstriktion, während Prostazyklin (PGI₂) über den IP-Rezeptor eine Vasodilatation bewirkt. Über eine Eisen-katalysierte Reaktion nitriert Peroxynitrit einen Tyrosinrest im aktiven Zentrum der Prostazyklinsynthase, die dadurch inaktiviert wird. Die Inhibition des Enzyms hat als Folgen die Akkumulierung des Endoperoxids (PGH₂) aus der Umsetzung der Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase sowie die vermehrte Bildung von Thromboxan A₂. Die beiden Mediatoren wirken vasokonstriktiv und stimulieren zusätzlich die Plättchenaggregation. Dieser Sachverhalt wurde ausgiebig beschrieben (148).

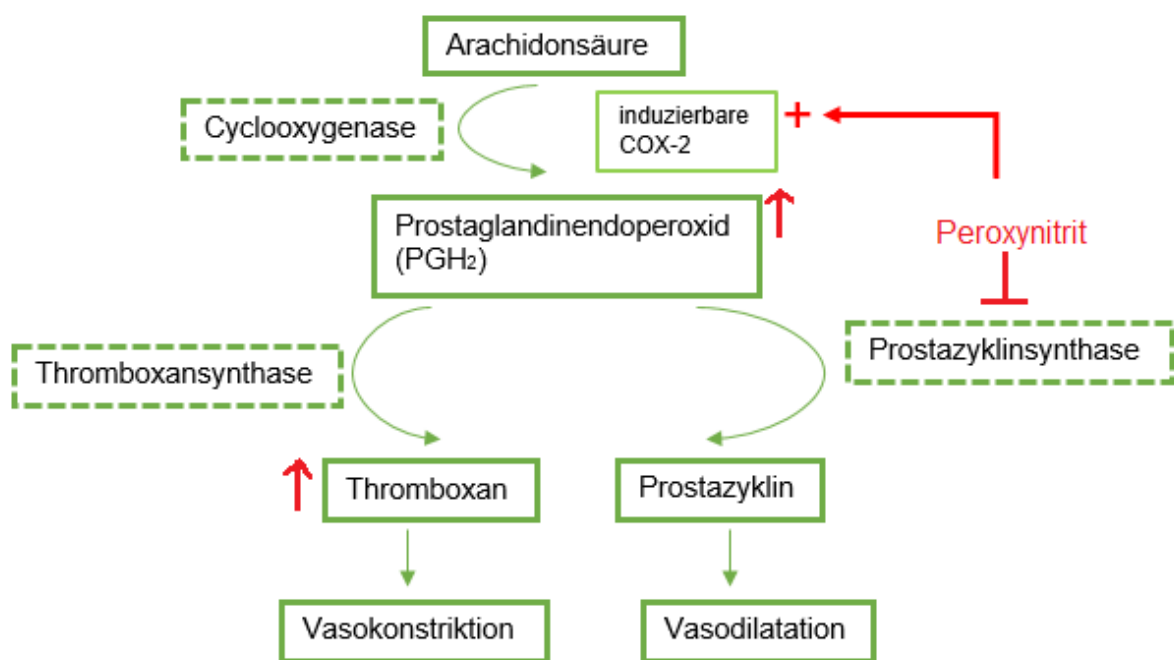


Abbildung 5.12 Einfluss von Peroxynitrit auf den Prostaglandin-Pathway.

Peroxynitrit inaktiviert die Prostazyklinsynthase, welches die Akkumulierung des Endoperoxids und die vermehrte Bildung von Thromboxan A₂ zur Folge hat. Gleichzeitig aktiviert Peroxynitrit die Cyclooxygenase durch einen höheren Peroxidtonus (vorallem die induzierbare COX-2) wodurch die Dysregulation des Protaglandin-Pathways weiter verstärkt wird, indem mehr PGH₂ gebildet wird und gleichzeitig die Prostazyklinsynthase durch Nitrierung inhibiert wird. Somit wird die Vasokonstriktion gefördert.

Das aus verschiedenen Quellen stammende Superoxid reagiert um einen Faktor 3-4 schneller mit ·NO zur Bildung von Peroxynitrit, als es durch die Superoxiddismutasen zu Wasserstoffperoxid entgiftet wird, und verringert auf diese Weise auch direkt die ·NO-Bioverfügbarkeit. Die Folgen davon sind die oben genannten oxidativen Schäden am Gefäßtonus modulierenden System. Kurz zusammengefasst bewirkt das gebildete

Peroxynitrit die Entkopplung der NOS, die Verminderung der ·NO-Biosynthese und die weitere Superoxidbildung aus der entkoppelten NOS. Zudem inaktiviert Peroxynitrit die sGC und die Prostazyklinsynthese und wirkt damit konstriktiv und proatherogen. Gleichzeitig führt die verminderte ·NO-Bioverfügbarkeit zur Vasokonstriktion und zu einem geringeren Schutz vor Atherosklerose und Thrombose. Kardiovaskuläre Erkrankungen bzw. Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Diabetes sind in hohem Maße mit einer eingeschränkten Funktion des Endothels assoziiert und stehen im kausalen Zusammenhang mit übermäßiger Produktion von ROS bei oxidativem Stress (149, 150).

Die endotheliale Dysfunktion ist eine fortschreitende Situation, da der Wegfall der protektiven Substanzen dazu führt, dass Entzündungszellen wie Neutrophile, Monozyten und Makrophagen am Endothel bleiben (vermehrtes Rolling und Adhäsion durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen) oder in die Subintima eindringen (151). Dort werden die phagozytären Mechanismen wie die NADPH-Oxidase aktiviert, welche im folgenden Kapitel ausführlich erläutert wird (Kapitel 5.2.4.).

Durch oxidative Prozesse wird auch die Xanthinoxidase generiert (durch einen Switch der Xanthindehydrogenase zur Oxidase Form durch Thioloxydation und proteolytische Spaltung) und es kann zusätzlich zur Entkopplung der mitochondrialen Atmung kommen, weil die Eisen-Schwefel-Cluster der mitochondrialen Komplexe sehr sensitiv auf Oxidantien reagieren (142). Die Tatsache, dass sowohl die mitochondriale Atmungskette als auch die NADPH-Oxidasen und die eNOS im Zytosol wesentliche Quellen von reaktiven Sauerstoffspezies sind, wurde bereits erwähnt. Es scheint einen Zusammenhang zwischen diesen Entstehungsorten für oxidativen Stress zu geben: ein sogenannter „Cross-Talk“ zwischen den ROS-generierenden Quellen im Mitochondrium und denen im Zytosol, der in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung gelangen ist (152). Die von den NADPH-Oxidasen und der entkoppelten eNOS ausgehenden ROS und RONS sind in der Lage, mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle (mtK_{ATP}) zu öffnen. Hierdurch kommt es zu einer Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials. Diese bewirkt einerseits eine Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette und somit eine verstärkte Produktion von ROS; andererseits werden die mitochondriale Permeabilität-Transitions-pore (mtPTP) sowie andere Poren/Kanäle geöffnet, die den Austritt von ROS aus dem

Mitochondrium ins Zytosol zulassen. Dies führt wiederum zu erhöhtem oxidativen Stress im Zytosol, zu einer verstärkten Aktivierung der zytosolischen NADPH-Oxidase Isoformen Nox-2 und eventuell Nox-1 über die Proteinkinase C und zu einer Entkopplung der eNOS. Hierdurch entsteht ein circulus vitiosus bei der Generierung von ROS zwischen Zytosol und Mitochondrium (153-155). Außerdem inhibiert der erhöhte oxidative Stress innerhalb des Mitochondriums die Aktivität der ALDH-2 und somit die Bioaktivierung von Nitroglycerin. Unter Inhibition der ALDH-2 kommt es zu einer Akkumulierung von 4-Hydroxynonenal, einem Lipidperoxidationsprodukt mit kardiotoxischer Wirkung. Der genaue Mechanismus wird ausführlich im Kapitel 5.2.5.3. diskutiert.

5.2.4. Aktivierung und Funktion der NADPH-Oxidasen

Die NADPH-Oxidasen (Nox) dienen der Abwehr von pathogenen Organismen wie Bakterien oder Parasiten (156). Ihre Aktivität wird insbesondere durch bakterielle Membranbestandteile (LPS) und Toxine getriggert. Zwecks Immunabwehr sind phagozytierende Zellen mit NADPH-Oxidasen beladen, die auch als Nox-2 bzw. gp91^{phox}, die phagozytäre NADPH Oxidase, bezeichnet werden. Die NADPH-Oxidase besteht aus mehreren Untereinheiten, von denen gp91^{phox} (Nox-1 und Nox-4) zusammen mit p22^{phox} in der Membran verankert sind, während Rac1, p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} im Zytosol lokalisiert sind. Die beiden membrangebundenen Untereinheiten bilden das katalytische Zentrum der NADPH-Oxidase, den Flavo-Hämprotein-Komplex (Cytochrom b558) (157, 158). Die Aktivierung der NADPH-Oxidase Nox-2 erfordert die Translokation der zytosolischen Untereinheiten an die membrangebundenen Untereinheiten. Dieses „Assembling“ wird über unterschiedliche Faktoren initiiert, z. B. durch die Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung von p47^{phox} oder die Bindung von GDP an Rac1. Nach Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase setzt der Enzymkomplex ein NADPH und zwei O₂ zu NADP⁺ und zwei O₂⁻ um. Die Superoxidanionradikale werden überwiegend extrazellulär ausgeschüttet und wirken zusammen mit freigesetzten Proteasen antibakterizid. Etwas anders werden auch die Homologen Nox-1 (Nox-3 und Nox-5) aktiviert, die andere regulatorische Untereinheiten und Cofaktoren besitzen (z. B. Noxo1 und Noxa1 für die Nox-1 als Homologe von p47^{phox} und p67^{phox}) (159). Die Nox-4 wird als konstitutive NADPH Oxidase bezeichnet, da sie immer aktiv ist und ausschließlich über ihre Gen- und Proteinexpression reguliert wird. Im Gegensatz zu den anderen

Isoformen produziert die Nox-4 auch direkt Wasserstoffperoxid anstelle des Superoxidanionradikals und trägt so maßgeblich zur Redox-Signaltransduktion bei (159). Auch Gefäßzellen exprimieren die verschiedenen NADPH Oxidase Isoformen, wobei der Nox-4 eher protektive und den anderen Isoformen eher schädliche Eigenschaften zugeschrieben werden. Die genaue Rolle der Isoformen Nox-1/2/3/5 im Gefäßsystem (ob ausschließlich schädlich oder auch physiologische Funktionen) ist noch nicht abschließend geklärt. Die Nox-5 Isoform kommt nicht in Nagern vor und wurde bislang überwiegend in humanem Gewebe untersucht. Die Funktionsweise der NADPH-Oxidase ist in der Abbildung 5.13 dargestellt.

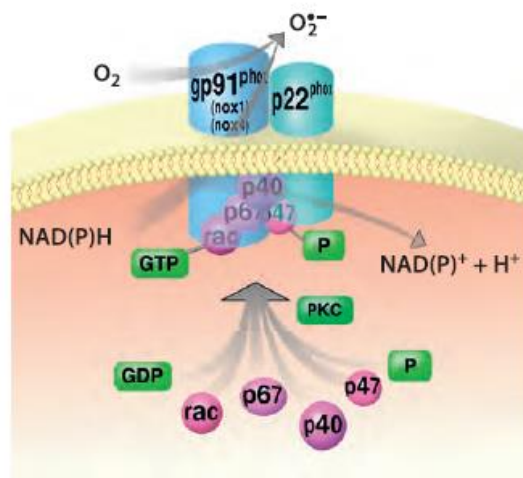
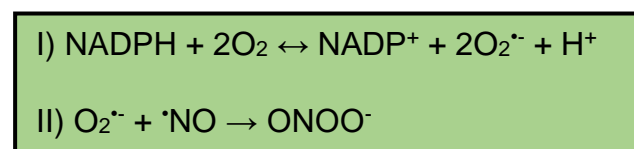


Abbildung 5.13 Funktionsweise der NADPH-Oxidasen (Nox).

Die Aktivierung der Nox-Isoform 2 (Nox-2), die in phagozytierenden Zellen und in Endothelzellen exprimiert wird, läuft in der Isoform Nox-1 der Gefäßzellen in ähnlicher Weise ab, wohingegen die Regulation der Nox-4 deutliche Unterschiede aufweist, da dies die konstitutiv aktive NADPH Oxidase ist und auch Wasserstoffperoxid statt Superoxid produziert. Der Ablauf der Aktivierung wird in Kapitel 5.2.4. detailliert erläutert. Abbildung aus (115).

In einem sogenannten „oxidativen Burst“ werden große Mengen Superoxid gebildet, die wiederum mit ·NO zur Bildung von Peroxynitrit führen (siehe Abbildung 5.14).



**Abbildung 5.14 I) Durch NADPH-Oxidase vermittelte Reaktion der Bildung von Superoxidanionen
II) Bildung von Peroxynitrit aus Superoxidanion und Stickstoffmonoxid.**

RONS und RNS haben eine wichtige Funktion in den Prozessen der Immunabwehr. Im Falle einer bakteriellen Sepsis allerdings kommt es durch bakterielle Toxine oder Antigene zu einer überschießenden Generierung von Sauerstoffradikalen durch phagozytierende Immunzellen. Der gesteigerte oxidative Stress führt dann zu Organschäden und die hohen Spiegel von $\cdot\text{NO}$ aus der induzierbaren NOS zu schweren hypotonen Blutdruckkrisen (116).

Die Bedeutung der NADPH-Oxidasen für den menschlichen Organismus wird deutlich, wenn man die X-chromosomal-rezessive septische Granulomatose (CGD) betrachtet. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer Mutation des gp91 (oder der regulatorischen Untereinheiten)-phox-Gens, das eine Untereinheit der NADPH-Oxidase auf dem X-Chromosom (Xp21.1) codiert. Durch diese Mutation ist die NADPH-Oxidase der Granulozyten nicht mehr in der Lage Superoxid zu generieren und die Erkrankten leiden unter rezidivierenden bakteriellen Infektionen, die nicht kontrollierbar sind und tödlich verlaufen können (160).

5.2.5. Entstehung der Nitrattoleranz

Organische Nitrate wie Nitroglyzerin sind ein wesentlicher Bestandteil der Therapie koronarer Herzkrankheiten wie die stabile und instabile Angina pectoris. Die organischen Nitrate wirken als endothelunabhängige, cGMP-abhängige Nitrovasodilatoren. Der vasoaktive Metabolit von GTN ($\cdot\text{NO}$ oder eine verwandte Spezies wie RSNO oder R-FeNO) stimuliert die lösliche Guanylatzyklase der glatten Gefäßmuskulatur, wodurch die Konzentration des zyklischen Guanosin-3',5'-Monophosphats (cGMP) steigt. cGMP wiederum aktiviert cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGK-I), die dafür sorgen, dass Ca^{2+} entweder vermehrt in intrazelluläre Speicher aufgenommen und aus der Zelle gepumpt wird (siehe auch Kapitel 5.2.2) Ein Abfall der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt letztendlich zur Relaxation (123). Die antiischämischen Effekte der organischen Nitrate beruhen überwiegend auf der Dilatation der venösen Kapazitätsgefäße und Koronararterien, was zur erwünschten Reduktion der kardialen Vorlast und demnach zur Blutdrucksenkung führt. Im Rahmen der Langzeittherapie kann es jedoch zur Entwicklung der sogenannten Nitrattoleranz kommen. Aktuelle Richtlinien zur Therapie mit organischen Nitraten empfehlen daher ein Absetzen dieser Medikamentengruppe für einen gewissen Zeitraum (Schaufeltherapie), um das Auftreten einer Toleranz zu verhindern (161).

Die Toleranz ist als ein multifaktorielles Geschehen anzusehen, dessen Entwicklung auf mehreren Mechanismen basiert. Grundsätzlich sind zwei Formen der Toleranz zu unterscheiden: die Pseudotoleranz und die echte oder vaskuläre Toleranz (Kreuztoleranz) (162), welche in den folgenden Kapiteln detailliert beleuchtet werden.

5.2.5.1. Pseudotoleranz

Die Behandlung mit Nitroglyzerin induziert eine Relaxation der venösen Kapazitätsgefäße und somit zur therapeutisch erwünschten Reduktion der Vorlast und somit auch des Blutdrucks. In Folge dieser Blutdrucksenkung kommt es durch den Baroreflex zu einer physiologischen Gegenregulation, die wiederum den Effekt von Nitroglyzerin abschwächt. Diese Form der Toleranzentwicklung im Rahmen der Therapie mit organischen Nitraten wird als Pseudotoleranz bezeichnet (163). Die Applikation von Nitroglyzerin führt nach einem Tag zu einer vermehrten Aktivierung hormoneller und neuronaler Regelkreise, die konsekutiv der Blutdrucksenkung entgegenwirken. Die Folgen sind erhöhte Katecholamin- und Vasopressin (ADH)-Spiegel, vermehrtes intravasales Volumen und eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (164). Nach etwa drei Tagen entwickeln sich über unterschiedliche Mechanismen die endotheliale und glattmuskuläre Dysfunktion im Rahmen der vaskulären Toleranz.

5.2.5.2. Vaskuläre Toleranz (Kreuztoleranz)

Wenn man Versuchstiere bzw. Patienten chronisch mit Nitroglyzerin behandelt und die isolierten Gefäße in einem Organbad untersuchen kann, wird man auch unabhängig vom Zirkulieren neurohumoraler Faktoren feststellen, dass die Gefäße gegenüber GTN nur abgeschwächt reagieren. Dies bezeichnet man als eine echte, vaskuläre Toleranz oder Kreuztoleranz. Dazu gehören die endotheliale sowie die glattmuskuläre Dysfunktion. Kreuztoleranz basiert hauptsächlich auf der bereits beschriebenen reduzierten Bioverfügbarkeit von $\cdot\text{NO}$ und der Entstehung von zytotoxischem Peroxynitrit. Abbildung 5.15 bildet die in diesem Kapitel beschriebenen Zusammenhänge anschaulich ab.

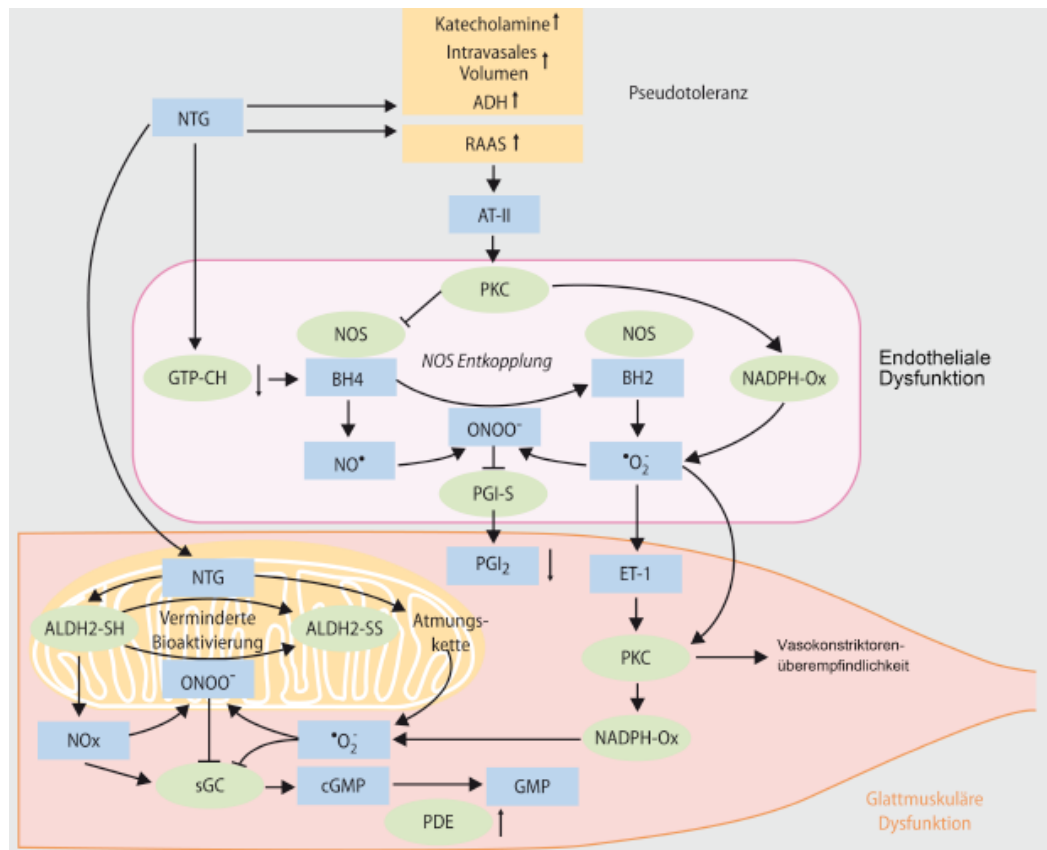


Abbildung 5.15 Mechanismus der Nitrattoleranz.

Die Toleranz-Phänomene können anhand von drei Mechanismen zusammengefasst werden: die sogenannte Pseudotoleranz, die endotheliale und die glattmuskuläre Dysfunktion im Rahmen der vaskulären Toleranz. Die Pseudotoleranz wird durch neurohumorale Gegenregulationsmechanismen induziert. Die endotheliale Dysfunktion wird durch oxidativ induzierte Schäden charakterisiert. Dabei können die ROS und RONS aus mitochondrialen Quellen, aus NADPH-Oxidase oder aus einer entkoppelten NOS stammen. Die in der Abbildung dargestellten Zusammenhänge werden in Kapiteln 5.2.5.1. und 5.2.5.2. eingehend erläutert. NTG, Nitroglycerin. Abbildung übersetzt nach (162).

Im Detail aktivieren die erhöhten AT-II-Spiegel PKC-abhängig die endothelialen NADPH-Oxidase. Die daraus resultierende Superoxidbildung verringert die $\cdot\text{NO}$ -Bioverfügbarkeit durch Peroxynitritbildung. ONOO^- oxidiert den Cofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) der endothelialen NO-Synthase zu BH_2 , was zur Entkopplung der eNOS führt, die nun ihrerseits Superoxid bildet. Gleichzeitig verringert Nitroglycerin die Expression der GTP-Cyclohydrolase und damit die Neusynthese von BH_4 . Diese Prozesse wirken der $\cdot\text{NO}$ -Biosynthese entgegen und rufen zusammen mit der Peroxynitrit-induzierten Inaktivierung der Prostazyklinsynthase eine endotheliale Dysfunktion hervor. Die glattmuskuläre Dysfunktion wird ebenfalls durch oxidativen Stress induziert. Die endotheliale Superoxidproduktion stimuliert die vermehrte

Bildung von Endothelin-1 im Glattmuskel und über PKC die Aktivierung der glattmuskulären NADPH-Oxidasen. Das Superoxid inaktiviert nicht nur die lösliche Guanylatzyklase, sondern auch das aus der GTN-Bioaktivierung stammende $\cdot\text{NO}$ unter Peroxynitritbildung. Peroxynitrit und Superoxid inaktivieren die ALDH-2 und beeinträchtigen somit die GTN-Bioaktivierung. Das akkumulierende GTN bildet durch Wechselwirkung mit der mitochondrialen Atmungskette Sauerstoffradikale und Peroxynitrit, die ebenfalls die sGC hemmen, und aktiviert Phosphodiesterasen die den Abbau von cGMP beschleunigen. Dadurch wird eine Kreuztoleranz gegenüber anderen $\cdot\text{NO}$ -Donatoren induziert, eine sogenannte glattmuskuläre Dysfunktion (115).

5.2.6. Funktion von ALDH-2

Die mitochondriale ALDH-2 ist aus dem Forschungsgebiet des Alkoholismus bekannt, da das Enzym verantwortlich für die Eliminierung der toxischen Acetaldehyde nach Ethanolkonsum durch ihre Umwandlung in Ethansäure ist (165). Die ALDH-2 ist ein tetrameres Enzym, das aus 54 kDa-Untereinheiten besteht und reichlich in den Mitochondrien der Leber und Lunge (166) oder im Zytosol des Gefäßgewebes (167) verteilt ist. Organe mit einer hohen mitochondrialen Kapazität zwecks ATP-Generation, wie Herz und Gehirn, sind ebenfalls durch eine gesteigerte ALDH-2-Expression charakterisiert (168). Die Arbeitsgruppe von Chen, Zhang et al. konnte 2002 die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) auch als GTN bioaktivierendes Enzym identifizieren, welches durch seine oxidative Inaktivierbarkeit ein wichtiger Teil des Prozesses ist, der zur Toleranz führt (169). Durch die Reduktase-Katalyse des Enzyms wird Nitroglyzerin in Nitrit und Glycerol-1,2-Dinitrat (1,2-GDN) umgewandelt, das einer weiteren Bioaktivierung zu $\cdot\text{NO}$ bzw. einer $\cdot\text{NO}$ -ähnlichen Spezies bedarf. 1,2-GDN kann im Anschluss über Cytochrom-P450 aktiviert werden. Nitrit hingegen wird vermutlich durch die Cytochrom-c-Oxidase der Atmungskette, durch die Xanthinoxidoreduktase oder durch Protonen im mitochondrialen Intermembranraum weiter zu $\cdot\text{NO}$ oder einer wirkungsäquivalenten Verbindung (NO_x) reduziert. $\cdot\text{NO}$ bzw. NO_x sind schließlich in der Lage, über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase eine Vasodilatation zu induzieren (162, 170-172). Nach diesem Reaktionsschritt liegt die ALDH-2 durch die Oxidation von Cysteinresten inaktiviert vor und muss durch intramitochondriale Thiole wieder reduziert werden, um nun einen weiteren Nitrat-Bioaktivierungszyklus durchlaufen zu können (173). Neben GTN werden weitere hochreaktive Nitrate wie das Tetranitrat PETN sowie dessen Trinitrat Metabolit PETriN

durch die ALDH-2 bioaktiviert (162). Dagegen werden weniger reaktive Nitrate wie ISDN, ISMN und die PETN-Metabolite PEDN und PEMN über andere Stoffwechselwege bioaktiviert. Zwecks Übersichtlichkeit wird auf die detaillierte Darstellung der anderen Wege im Rahmen dieser Arbeit verzichtet.

Eine wichtige Erkenntnis in Bezug auf die Entstehung von Nitrattoleranz konnte durch Sydow et al. 2004 hergestellt werden. Die Arbeitsgruppe konnte belegen, dass die mitochondriale ALDH-2 durch die langfristige Applikation von organischen Nitraten in seiner Funktion eingeschränkt wird (174). Insbesondere der durch „Cross-Talk“ getriggerte mitochondriale Stress scheint hierfür verantwortlich zu sein (153). Dies lässt sich leicht erklären, da das GTN-biotransformierende Enzym ALDH-2 im aktiven Zentrum benachbarte Cystein-Thiol-Gruppen besitzt, die oxidativ in eine Disulfidbrücke umgewandelt werden. Da die Reduktase-Aktivität der ALDH-2 diese Thiolgruppen in reduzierter Form benötigt, um die organischen Nitrate zu bioaktivieren, führt deren Oxidation zu einer Disulfidbrücke zu einer gestörten Nitrat-Bioaktivierung und damit zur klinischen Toleranz und Kreuztoleranz. Im intakten Gewebe wird die inhibierte ALDH-2 durch Dihydroliponsäure oder Thioredoxin/Reduktase reduziert (175, 176). Im toleranten Gewebe scheint jedoch der Reparaturmechanismus zu versagen, vermutlich ebenfalls aufgrund einer oxidativen Schädigung.

In den letzten Jahren häufen sich die Hinweise, dass die mitochondriale ALDH-2 eine zentrale Rolle auch in der Kardioprotektion spielt (177). Es ist erwähnenswert, dass unterschiedliche Studien ein wichtiges therapeutisches Potential der ALDH-2 zum Schutz des Herzwebes nach Ischämie aufzeigten (178-180). Nach akutem Myokardinfarkt gilt die Wiederherstellung des Blutflusses durch pharmakologische Intervention oder mechanische Rekanalisation als erste essentielle Maßnahme. Leider kann die erneute Durchbutung die durch die Ischämie ausgelösten Schäden in vielen Fällen verschlimmern. Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (181, 182). Bei der Förderung dieses Krankheitsprozesses spielt auch der oxidative Stress eine Rolle (183, 184). Die Lipidperoxidation ist der verantwortliche Hauptmechanismus für die zelluläre Toxizität, die durch ROS verursacht wird. Die führenden Endprodukte der Lipidperoxidation sind toxische Aldehyde, wie zum Beispiel 4-Hydroxynonenal (4-HNE) und Malondialdehyd (MDA) (185, 186). Aldehyde sind diffusionsfähige und hochreaktive Verbindungen, die innerhalb einer Zelle Addukte mit Lipiden, Proteinen und DNA bilden können, was in Proteindysfunktion und

zellulären Schäden resultiert. Unter ihnen ist 4-HNE von besonderem Interesse für den Reperfusionsschaden nach myokardialer Ischämie, weil es leicht mit Histidin-, Lysin- sowie Cysteinresten unter der Bildung von Proteinaddukten reagieren kann (179, 187, 188). Die Entgiftung von diesen toxischen Aldehyden hängt hauptsächlich von der mitochondrialen ALDH-2 ab (179, 189). Eine der Hauptfunktionen des Enzyms ist die Oxidation der toxischen Aldehyden zu Carbonsäuren. Diese Umwandlung reduziert deren Toxizität deutlich. Durch Präkonditionierung über die PKC wird die mitochondriale ALDH-2 aktiviert. Wird das Myokard durch kurze, für das Herz unschädliche, ischämische Phasen präkonditioniert und folgt darauf ein schwerer Infarkt, so sind die Schäden am Myokard, die durch den Sauerstoffmangel hervorgerufen werden, deutlich geringer als nach einem Infarkt ohne Präkonditionierung (190).

Die ersten Ergebnisse bezüglich der vorteilhaften Wirkung eines ALDH-2-Aktivators stammen aus der Forschungsgruppe von Mochly-Rosen et al. (179). Sie konnten den niedermolekularen Aktivator der ALDH-2 Alda-1 (N-(1,3-Benzodioxol-5-ylmethyl)-2,6-dichlorobenzamid) identifizieren. Die Forscher stellten fest, dass die Applikation von Alda-1 an Ratten vor einem ischämischen Ereignis sowohl in ex-vivo- als auch in in-vivo-Reperfusionsschaden-Versuchsmodellen die Infarktgröße um bis zu 60 % reduzierte (179). Mochly-Rosen et al. führten diesen günstigen Effekt auf die Aktivierung der ALDH-2 und die anschließende Verhinderung der Akkumulation von toxischen Aldehyden wie 4-HNE zurück. Bis dato wurden die schützenden Effekte der ALDH-2 auf die Myokardschaden nach Ischämie und Reperfusion von verschiedenen Laborgruppen bestätigt (178, 191-193). Alda-1 weist drei erwähnenswerte Charakteristika auf. Erstens ist die Aktivierung der ALDH-2 von Alda-1 spezifisch nur für diese Isoform. Zweitens kann Alda-1 direkt an ALDH-2 binden und sie aktivieren. Drittens findet die Aktivierung der ALDH-2 unabhängig von der PKC ϵ -vermittelten Phosphorylierung statt (194). Da die Mehrheit der berichteten positiven Effekte der ALDH-2-Aktivatoren auf Studien in Tier- und Zellmodellen basieren, ist noch weitere Forschung notwendig, bevor die ALDH-2-Aktivatoren in der klinischen Praxis zur Prävention von Reperfusionsschäden nach myokardialer Ischämie eingesetzt werden können.

Die einzelne ALDH-2-Punktmutation ist mit einer reduzierten Enzymaktivität assoziiert. Sie findet sich bei 600 Millionen Ostasiaten – dies entspricht fast 8 % der

Weltbevölkerung (177). Die ALDH-2-Defizienz ist mit Parametern des oxidativen Stresses verbunden (195). Das Risiko für essentielle Hypertension (196, 197), Schlaganfall (198), diabetische makrovaskuläre Komplikationen (199), akutes Koronarsyndrom (200), spastische Angina (201), KHK und Myokardinfarkt (202, 203) ist bei Personen mit der inaktiven ostasiatischen Variante von ALDH-2 erhöht. Weitere Studien mit größeren Populationen und mit einer genaueren Erhebung und Überwachung des Alkoholkonsums sind notwendig, da Alkoholkonsum einen wichtigen Confounder darstellt.

5.3. OGG1

5.3.1. Mit oxidativem Stress assoziierte Genotoxizität

Unter oxidativen Stressbedingungen (z. B. bei kardiometabolischen Erkrankungen oder auch Lärmexposition) kommt es zur vermehrten Bildung von Peroxynitrit bzw. Stickstoffdioxidradikalen. Diese Oxidationsprodukte von $\cdot\text{NO}$ üben genotoxische Wirkungen aus, wobei die erheblich hohe Genotoxizität durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Sauerstoff bzw. Superoxid entsteht (204). Die Wechselwirkung von Stickstoffmonoxid und seinen Produkten mit der DNA lässt sich in zwei Gruppen unterteilen: direkte und indirekte DNA-Schäden. Die Abbildung 5.16 veranschaulicht die möglichen Reaktionswege in diesen beiden Gruppen.

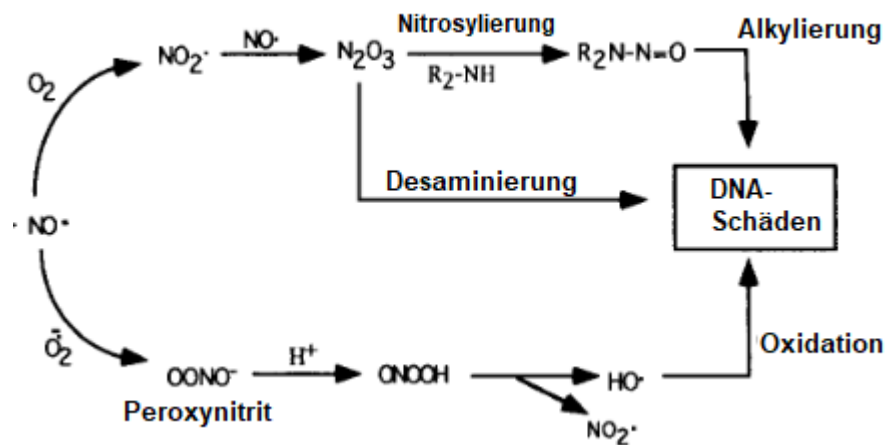


Abbildung 5.16 Mit oxidativem Stress assoziierte Genotoxizität.

Im Allgemeinen gibt es drei Wirkungsmechanismen, durch welche Stickstoffmonoxid oder $\cdot\text{NO}$ -ähnliche Spezies ihre genotoxischen Eigenschaften ausüben können: 1) durch die Bildung von N-Nitroso-Verbindungen und Alkylierung der DNA-Basen; 2) durch einen direkten Angriff von Peroxynitrit bzw. Hydroxyradikalen an den DNA-Basen; 3) durch die Desaminierung der Nucleobasen. Abbildung übersetzt aus (205).

$\cdot\text{NO}$ reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von $\cdot\text{NO}_2$ sowie nitrosierenden Agenzien wie N_2O_3 (206). Diese Spezies sowie Peroxynitrit können über drei Wirkungsmechanismen ihre genotoxischen Eigenschaften ausüben: erstens durch die Bildung von N-Nitroso-Verbindungen und Alkylierung der DNA-Basen, zweitens durch einen direkten Angriff von Peroxynitrit bzw. Hydroxyradikalen an der DNA und drittens durch die Desaminierung der Nucleobasen (205).

Die Nitrosierung von Aminen und Amiden führen zur Bildung von N-Nitroso-Verbindungen, die stark alkylierende Elektrophile darstellen, die mit den DNA-Basen

an mehreren nukleophilen Stellen reagieren: an N-7 und O-6-Position in Guanin und an N-3-Position in Adenin. Die Alkylierung an der O-6-Position von Guanin gilt als die mit dem höchsten mutagenen Potential, die während der DNA-Replikation Austausch der Guaninbase zur Adeninbase führt (G→A-Transition) (207).

Wie schon in den obigen Kapiteln ausführlich erläutert reagieren $\cdot\text{NO}$ und Superoxidanion zur Bildung von Peroxynitrit. Das Letztere ist ein potentes Oxidationsmittel mit einer Hydroxylradikal-ähnlichen Reaktivität. Als Konsequenz seiner Reaktion mit den Nukleinsäuren wurden DNA-Strangbrüche und oxidative Modifikationen nachgewiesen (208). Das genaue mutagene Profil von Peroxynitrit wurde in vitro unter Untersuchung von Bakterien- und Säugetierzellkulturen beleuchtet. Die Exposition der Zellen mit Peroxynitrit induzierte Transversionsmutationen in der DNA, meistens eine Umwandlung der Guaninbase zur Thyminbase bei Guanin-Cytosin-Paaren (G→T-Transversion) (209). Zudem verursachte Peroxynitrit die Bildung von 8-Nitroguanin-Addukten, welche rasch depuriniert wurden. Als Folge entstand eine apurinische Stelle, was wiederum die Wahrscheinlichkeit für eine G→T-Transversion erhöhte (210). Darüber hinaus können Hydroxylradikale der DNA schaden, indem sie Einzel- oder Doppel-Strangbrüche, Querverbindungen, abasische Stellen und Basenmodifikationen induzieren. Einen klassischen Marker für oxidative DNA-Schäden stellt 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanin oder 8-Oxoguanin (kurz 8-oxo-G) dar (211). Die letztere modifizierte Base entsteht durch das Hinzufügen einer Oxo-Gruppe an Kohlenstoff C8 und eines Wasserstoffs an Stickstoff N7 von Deoxyguanin (Abbildung 5.17).

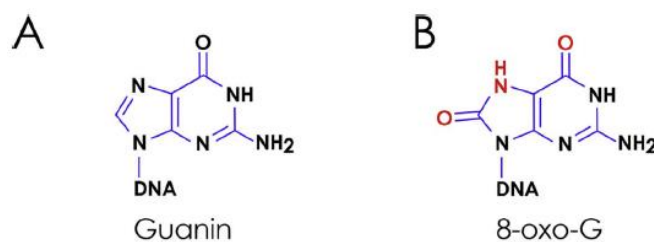


Abbildung 5.17 Links intakte Guaninbase und rechts 8-oxo-G. Abbildung aus (212).

Spontane DNA-Desaminierung ist ein eher seltenes Ereignis, so dass der Nachweis dieses Prozesses mit höherer Häufigkeit auf die schädlichen Auswirkungen von reaktiven Spezies hindeutet. Bereits 1991 wurden einige Publikationen veröffentlicht, die zeigten, dass $\cdot\text{NO}$ und seine Derivate bei physiologischem pH-Wert DNA desaminieren konnten (213). Die Desaminierung von Cytosin führt zur Bildung von

Uracil und infolgedessen zur Aktivierung der Uracil-Glykosylase, die für die Entfernung von Uracil aus DNA verantwortlich ist. Nach der Entfernung bleibt eine abasische Stelle, bei der es oft zu einer Insertion von Adenin folglich mit Mismatch im Replikationsprozess kommt. So kommt es zur G:C→A:T-Transition. Falls Uracil nicht von einer Glykosylase erkannt wird, kann Uracil sich mit Adenin bei der Replikation paaren. Auf der anderen Seite könnte die Desaminierung von Guanin zur G:C→T:A-Transition und G:C→C:G-Transition führen. Weiterhin resultiert die Bildung von Thymin bei der Desaminierung von methyliertem Cytosin. Dieser Defekt ist aus epigenetischer Sicht von besonderer Bedeutung, denn DNA-Methylierungsmuster beeinflussen die Genregulation, die Differenzierung und das genomische Imprinting (205). In der Abbildung 5.18 sind die Desaminierungsprozesse zusammengefasst.

Hypoxanthin und Xanthin sind keine regulären Bestandteile der DNA und RNA und folglich auch nicht im genetischen Code enthalten. Sie entstehen durch die Einwirkung von Mutagenen: durch Desaminierung entsteht Hypoxanthin aus Adenin, Xanthin aus Guanin und Uracil aus Cytosin. Außerdem sind sie wichtige Zwischenprodukte bei der Synthese von Purinen.

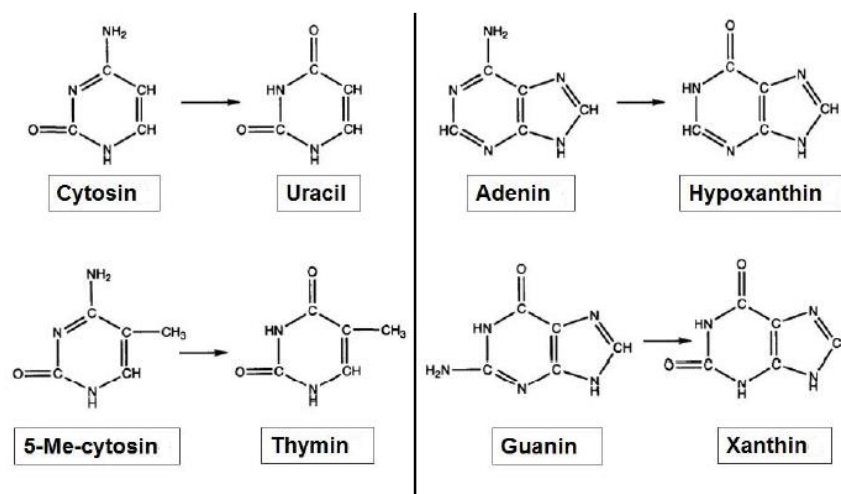


Abbildung 5.18 Produkte aus DNA-Desaminierung.

Durch Desaminierung entsteht Uracil aus Cytosin, Hypoxanthin aus Adenin, Thymin aus methyliertem Cytosin und Xanthin aus Guanin. Abbildung übersetzt aus (205).

5.3.2. DNA-Reparaturmechanismus als Reaktion auf die Genotoxizität

Je nach Art der DNA-Modifikation werden unterschiedliche Reparaturmechanismen aktiviert, um die entstandenen Schäden zu beseitigen. Beim Auftreten einer toxischen Modifikation an einer spezifischen Nukleobase oder bei der Bildung einer abasischen

Stelle kommt die Basenexzisionsreparatur (kurz BER) zum Einsatz, um dieses Problem zu lösen (214). Die wichtigsten Bestandteile der BER sind erstens DNA-Glykosylasen, die unterschiedliche Basenmodifikationen erkennen, wie zum Beispiel die Uracil-DNA-Glykosylase (215), die 8-Oxoguanin-Glykosylase (OGG1) (216), Nth-Endonuklease III-like Protein 1 (NTHL1) (217) und die Nei-Endonuklease VIII-like Proteine 1,2,3 (NEIL1/ NEIL2/ NEIL3) (218), zweitens DNA-Endonukleasen wie die apurinische bzw. apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) (219), drittens DNA-Polymerasen (Pol β) und viertens DNA-Ligasen (Lig1) (220).

Die Genauigkeit dieses Reparaturmechanismus wird durch die Glykosylase-Aktivität gewährleistet, welche DNA-Moleküle „einscannen“, indem das Enzym den Nukleotidstrang leicht zieht. Falls eine Störung der Helix durch einen Mangel an Wasserstoffbrückenbildungen zwischen geschädigten Watson-Crick-Basenpaaren vorhanden ist, wird die betreffende Base in eine Bindungstasche herausgedreht, die das aktive Zentrum enthält. Die spezifische Struktur dieser Taschen erlaubt auch die Detektion kleiner Basenveränderungen. Eine erfolgreiche Bindung führt zur Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der geschädigten Base und der 2'-Desoxyribose. Die Glykosylasen erkennen also geschädigte Basen und entfernen sie von ihrem Desoxyribosephosphatgerüst. Damit wird eine apurinische bzw. apyrimidinische Stelle (AP-Stelle) in der DNA erzeugt. Anschließend kann die apurinische bzw. apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) den DNA-Strang an der defekten Stelle öffnen, die Desoxyribose entfernen und somit freie 3'- und 5'-Enden generieren. Die DNA-Polymerase β kann dann das richtige Nukleosid hinzufügen und der DNA-Strang wird durch die DNA-Ligase 1 geschlossen (221).

In den letzten Jahren wurde das Verständnis zum BER-Mechanismus weitaus komplexer und umfasst viele DNA-Glykosylasen je nach Art der Basenmodifikation. Hier soll ein kleiner, für diese Arbeit relevanter Teil dieser Mechanismen besprochen werden: die 8-Oxoguanin-Glykosylase (OGG1).

5.3.3. Die Rolle der OGG1 im BER-Mechanismus und ihre weiteren Funktionen

Wie bereits im Kapitel 5.3.1 erläutert entsteht die mutagene 8-Oxoguanin-Base unter der Wirkung von ROS/RNS. In eukaryotischen Zellen wird 8-Oxoguanin von der OGG1 erkannt, deren kontinuierliche Aktivität die Konzentration von 8-Oxoguanin in einem Steady-State von unter eins pro Million Basenpaare unter physiologischen Bedingungen hält (222). 8-Oxoguanin-Glykosylase (kurz OGG1) ist eine DNA-Glykosylase, die vom

OGG1-Gen kodiert wird. OGG1 spielt eine wichtige Rolle in der Basenexzisionsreparatur und ist das Hauptenzym, das für die Exzision von 8-Oxoguanin verantwortlich ist. Per Definition ist die OGG1 ein bifunktionelles Enzym mit einer zusätzlichen assoziierten AP-Lyase-Aktivität (223). Es ist in der Lage, sowohl die glykosidische Bindung der mutagenen Läsion zu spalten und eine AP-Stelle zu generieren, als auch einen Strangbruch im DNA-Rückgrat zu verursachen. OGG1 enthält zwei DNA-Bindungssequenzmotive: ein HhH- und ein Cys2-His2-Zinkfingermotiv. Die Abbildung 5.19 zeigt die kristallographische Röntgenstruktur des Enzyms nach PyMOL.

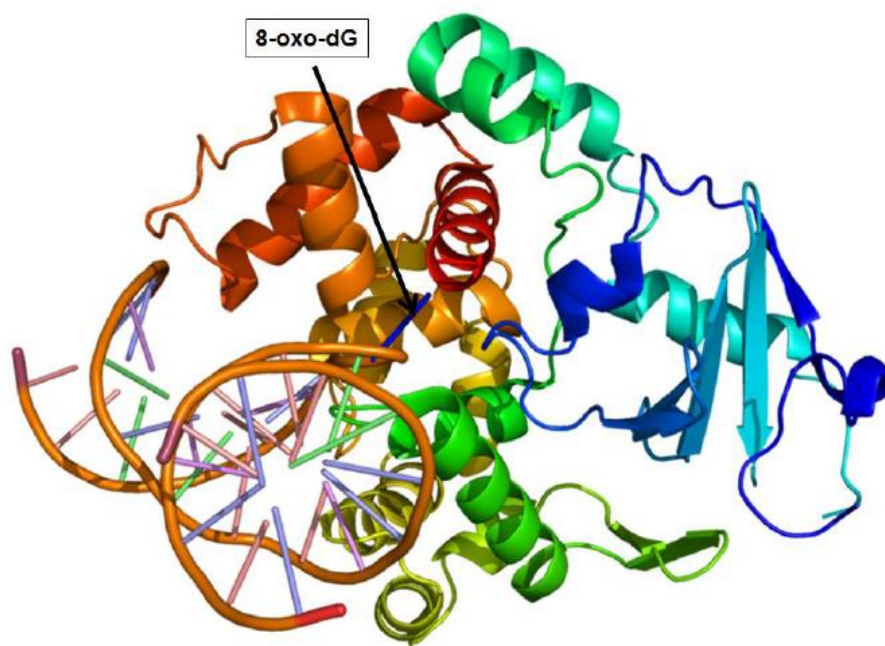


Abbildung 5.19 Kristallographische Röntgenstruktur vom OGG1-Enzym, während es mit der 8-Hydroxyguanin-Modifikation am DNA-Doppelstrang verbunden ist.

Die OGG1-Struktur wird in Form von β -Sheets und α -Helices mit verschiedenen Farben dargestellt. 8-Hydroxyguanin ist blau gefärbt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Protein-Datenbank pdb wurde für die Darstellung der Struktur mittels PyMOL verwendet (Schrödinger, USA).

Nach Erkennung der Cytosin-8-Oxoguanin-Basenpaarung spaltet die OGG1 die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Nucleobasen und führt 8-Oxoguanin in die katalytische Bindungstasche ein. Gleichzeitig findet auch die Glykosylase-Aktivität statt. Nach der Exzision von der geschädigten Base behält die OGG1 die Nucleobase und verwendet sie als Kofaktor für die nachfolgende β -Lyase-Kaskade (224). Falls das C:8-oxo-G-Fehlpaar jedoch dieser Reparatur entgeht und unkorrigiert als Vorlage bei

der DNA-Synthese verwendet wird, fügen die Replikationspolymerasen häufig eine Adeninbase gegenüber 8-Oxoguanin anstelle der korrekten Cytosinbase ein. Dadurch vermehren sich die A:8-Oxo-G-Fehlpaare und in einer weiteren Replikationsrunde käme es zum Einfügen einer Thyminbase gegenüber der Adeninbase und somit zu einer C:G→A:T-Transversionmutation. Im Fall vom Adenin-8-Oxo-G-Fehlpaar sollte deswegen die unbeschädigte Adeninbase aus der DNA entfernt werden, und nicht die oxidierte 8-Oxoguanin. Für diesen Zweck verwenden die Zellen eine andere DNA-Glykosylase und zwar die MUTYH (225). Das resultierende Produkt dieses Reparaturweges ist ein C:8-Oxo-G-Fehlpaar, welches wiederum Substrat für den oben diskutierten OGG1-initiierten BER-Mechanismus ist. Die Abbildung 5.20 fasst die OGG1- und MUTYH-BER anschaulich zusammen.

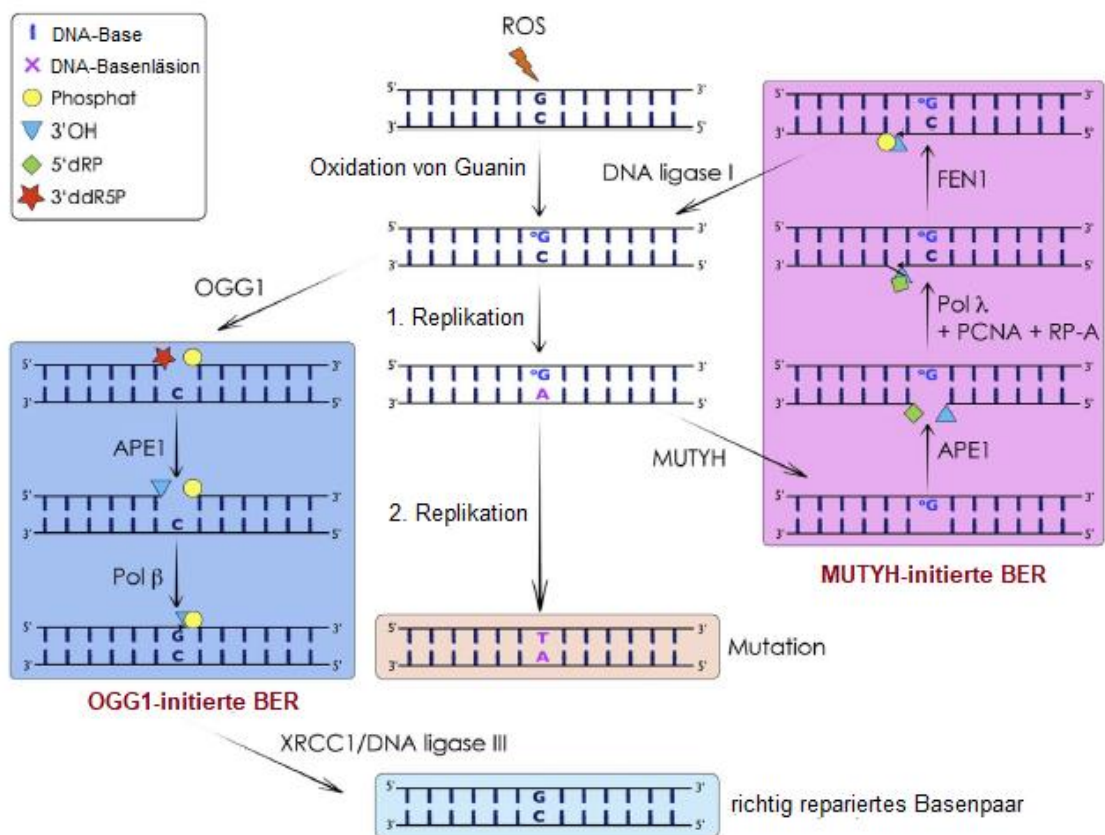


Abbildung 5.20 OGG1- und MUTYH- initiierte BER von C:8-Oxo-G-Fehlpaaren.

Unter ROS-Wirkung kommt es zu der Bildung von C:8-Oxo-G-Fehlpaaren wegen der Oxidation von Guanin.

linke Spalte: Diese falschen Basenpaare können von der DNA-Glykosylase OGG1 erkannt und repariert werden. Die OGG1 erkennt die geschädigte 8-Oxoguaninbase und entfernt sie von ihrem Desoxyribosephosphatgerüst. Damit wird eine AP-Stelle in der DNA erzeugt. Anschließend kann die apurinische bzw. apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1) den DNA-Strang an der defekten Stelle öffnen, die Desoxyribose entfernen und somit freie 3'- und 5'-

Enden generieren. Die DNA-Polymerase β kann dann das richtige Guanin gegenüber der Cytosinbase hinzufügen und der DNA-Strang wird durch die XRCC1/DNA-Ligase III geschlossen. So gelingt die Wiederherstellung einer korrekt basengepaarten doppelsträngigen DNA.

mittlere Spalte: Falls das C:8-oxo-G-Fehlpaar jedoch dieser Reparatur entgeht und unkorrigiert als Vorlage bei der DNA-Synthese verwendet wird, dann fügen die Replikationspolymerasen häufig eine Adeninbase gegenüber des 8-Oxoguanin anstelle der korrekten Cytosinbase ein. Dadurch vermehren sich die A:8-Oxo-G-Fehlpaare und in einer weiteren Replikationsrunde käme es zum Einfügen einer Thyminbase gegenüber der Adeninbase und somit zu einer C:G→A:T-Transversionmutation.

rechte Spalte: Das A:8-Oxo-G-Fehlpaar kann von der MUTYH-Glykosylase erkannt werden, die die Exzision der Adeninbase katalysiert. Somit wird eine AP-Stelle gebildet, welche von der APE1 weiterverarbeitet wird. Anschließend fügt die Polymerase β mit den Kofaktoren PCNA und RP-A die passende Cytosinbase gegenüber von 8-Oxo-G ein. Mithilfe von FEN1 und Ligase 1 wird der DNA-Doppelstrang geschlossen. Dieses C:8-Oxo-G-Fehlpaar ist dann wieder Substrat für die OGG1-vermittelte BER von 8-Oxo-G.

Abbildung übersetzt aus (212).

In manchen Studien wurde eine Inhibition von OGG1 durch oxidativen und nitrosativen Stress beobachtet (226-228). Unerwartet war der Effekt ausgeprägter bei der üblichen humanen Variante des Enzyms hOGG1-cys326 (229, 230). Es scheint widersprüchlich, dass ein schützendes Reparaturenzym unter den Bedingungen inaktiviert wird, die eigentlich mit häufigerem Auftreten von Schäden verbunden sind. Allerdings ist noch keine regulatorische Bedeutung dieser Inhibition nachgewiesen.

Erstaunlicherweise wird in neueren Studien 8-Oxoguanin auch eine Funktion als Signalmolekül für Signaltransduktion nach seiner Exzision vom Reparaturenzym OGG1 zugeschrieben. Dieser DNA-Schaden ist demnach möglicherweise nicht nur ein Risikofaktor für die Induktion von Mutationen, sondern er spielt eine Rolle bei der Initiierung der Transkription von bestimmten Transkriptionsfaktoren. Zudem wird in einigen Fällen 8-Oxoguanin lokal in spezifischen DNA-Regionen von Chromatin-assoziierten Enzymen gebildet, d. h. unabhängig von zellulärem oxidativem Stress (226, 231).

Gillespie et al. untersuchte die Beteiligung von genomischem 8-Oxoguanin und seiner Reparatur durch OGG1 bei der Genregulation (232, 233). Konkreter hat seine Arbeitsgruppe den Einfluss von Hypoxie-bedingtem oxidativen Stress in Endothelzellkulturen aus Pulmonalarterie untersucht. Die Autoren haben eine Anhäufung von oxidativ erzeugten DNA-Modifikationen in den sogenannten „hypoxic response elements“ in der Promotorregion von Genen wie VEGF; jedoch nicht in

anderen Regionen des Genoms gefunden. Als entscheidenden Anhaltspunkt für die regulatorische Rolle der 8-Oxoguanin-Modifikationen in der Promotorregion kann erwähnt werden, dass die OGG1-Defizienz die Bindung des Transkriptionsfaktor HIF-1 α an den VEGF-Promotor in den Zellen stark reduzierte und somit die Hypoxiebedingte Induktion der VEGF-mRNA-Translation inhibierte (234). Als mögliche Erklärung für die gezielte DNA-Beschädigung trugen die Forscher vor, dass bevorzugt Guanin-reiche Sequenzen wie die G-Quadruplex-Strukturen im VEGF-Promoter oxidativ angegriffen wurden (235). Eine sehr ähnliche 8-Oxoguanin- und OGG1-abhängige Induktion der Transkription wurde auch von der Arbeitsgruppe von Boldogh et al. für die Gene beobachtet, welche vom Transkriptionsfaktor NF- κ B reguliert werden (236, 237). Analog zu HIF-1 α zielt NF- κ B als Transkriptionsfaktor auf Promotorregionen mit einem hohen Anteil an Guanin ab (238). Sowohl in der Lunge von Mäusen als auch in Zellkultur konnten die Forscher zeigen, dass die NF- κ B-vermittelte Aktivierung der Transkription von Zytokinen und Chemokinen (TNF α , CXCL1, CXCL2) bei Herunterregulierung von OGG1 stark reduziert worden war. Der Effekt war mit einer reduzierten Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors an den Promotor verbunden.

Die Arbeitsgruppe von Boldogh et al. konnte außerdem feststellen, dass der Komplex aus OGG1 und der exzidierten freien modifizierten Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanin eine hohe Bindungsaffinität für die kleinen GTPasen wie Ras, Rac1 und Rho hatte. Dieser Komplex fungiert als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (aus englisch „guanine nucleotide exchange factor – GEF“) (239, 240) und aktiviert dadurch die nachgeschalteten Signalwege der kleinen GTPasen (241-244). Diese Funktion alleine kann die OGG1 nicht erfüllen. Diese Beobachtung wird in der Abbildung 5.21 dargestellt. Daher verursachte die Behandlung verschiedener Arten von kultivierten Zellen mit exogenem 8-Oxoguanin eine Phosphorylierung der Kinasen Raf-1 und ERK1,2 und im Fall von Rac1 die Aktivierung der NADPH-Oxidase Nox-4 in den Wildtyp-Zellen, aber nicht bei OGG1-Defizienz. Außerdem wurde eine N-Ras-vermittelte und OGG1-abhängige vorzeitige Seneszenz bei humanen Lungenfibroblasten beobachtet, die freiem 8-Oxoguanin ausgesetzt wurden (245).

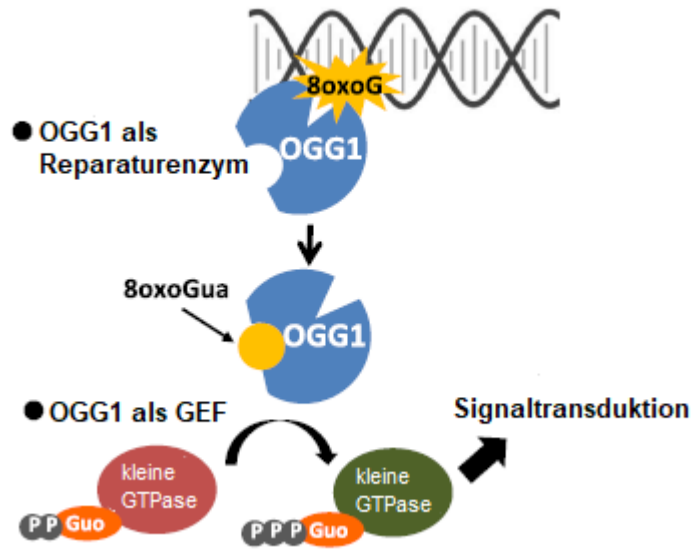


Abbildung 5.21 Ein Komplex aus OGG1 und der freien exzidierten Base 8-Oxoguanin fungiert als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (englisch kurz GEF) für die kleinen GTPasen wie zum Beispiel Ras, Rac und Rho und stimuliert so bestimmte Signaltransduktionswege.

Abbildung übersetzt aus (231).

5.3.4. Assoziation von OGG1 mit der Entstehung von Erkrankungen

Seit langem ist ein Zusammenhang zwischen oxidativen DNA-Schäden und der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Krebs, neurodegenerativen und inflammatorischen Erkrankungen bis hin zum Altern bekannt (216, 246-250). Sogar Einzelnukleotid-Polymorphismen in Genen können die Aktivität eines Proteins entweder direkt durch strukturelle Änderungen oder indirekt durch Änderungen in seiner Bindung mit anderen Interaktionspartnern, seiner Expression und seiner Lokalisation in der Zelle verändern.

Wenn eine solche Veränderung in einem DNA-Reparaturprotein auftritt, könnte dies zu einer Akkumulation von DNA-Schäden oder Mutationen führen, die wiederum die Entwicklung von Pathologien verursachen. Obwohl keine erblichen Defekte von OGG1 in Zusammenhang mit einer Prädisposition für Krebs berichtet sind, wurden somatische Mutationen und Polymorphismen in OGG1 beschrieben, welche die Funktion des Enzyms beeinträchtigen und sich mit einer Vielfalt von Tumorarten assoziieren (246, 251). Genetische Instabilität gilt als unverzichtbarer Parameter für die Entwicklung von Tumoren (252). Es ist daher nicht überraschend, dass oxidativer

Stress und oxidative DNA-Schäden mit der Initiierung und Progression von Krebs verbunden sind. In der Tat wurden in Studien erhöhte Spiegel von ROS und begleitende DNA-Schäden bei fast allen Krebsarten festgestellt (253-255). Es ist außerdem bemerkenswert, dass bei vielen Krebsarten die Transversionsmutation C:G→A:T gefunden wurde (256). Dieser Befund hebt erneut die Wichtigkeit von 8-Oxoguanin bei der Krebsentwicklung hervor. Angesichts seiner zentralen Rolle bei der Entfernung von 8-Oxoguanin aus dem Genom ist es sehr wahrscheinlich, dass OGG1 zur Prävention der Krebsentwicklung beiträgt. Um die Rolle der 8-Oxoguanin-Reparatur in vivo zu untersuchen, wurden Mäuse mit gezielten Knockouts der entsprechenden Gene für die Reparaturmechanismen verwendet (246). Der Begriff Knockout-Maus stammt aus dem Bereich der Gentechnik und beschreibt eine Maus, bei der mit Hilfe von Genmanipulation bestimmte Gene gezielt deaktiviert wurden. Studien zeigten, dass OGG1-knockout-Mäuse lebensfähig und fruchtbar sind, eine normale Lebensspanne und einen normalen Phänotyp aufweisen (257, 258), abgesehen von gewissen metabolischen Störungen bei fettreicher Ernährung (259, 260). Bei diesen OGG1-knockout-Mäusen akkumulierte 8-Oxoguanin in nuklearer und mitochondrialer Leber-DNA und in manchen, aber nicht in allen Geweben wurde eine gesteigerte Rate an spontanen C:G→A:T –Transversionen beobachtet. Es bestand möglicherweise auch eine leicht erhöhte Prädisposition für Lungenkarzinom im Alter von 18 Monaten (261). Der festgestellte normale Phänotyp bei den OGG1-defizienten Mäusen war überraschend für die Forscher, welche einen anderen alternativen Sicherungsmechanismus vermuteten, der den Verlust des Enzyms kompensiert. Allerdings zeigte ein neuer Multiorgan-Karzinogenese-Bioassay, dass OGG1-Knockout-Mäuse tatsächlich eventuell eine erhöhte Anfälligkeit für Tumorentwicklung in verschiedenen Organen haben könnten (262). In Anbetracht aller Befunde lässt sich sagen, dass der OGG1-Mangel weitgehend unter physiologischen Bedingungen kompensiert werden kann, aber diese Kompensation unter Bedingungen von erhöhter Bedrohung der genomischen Integrität, z. B. durch stark erhöhten oxidativen Stress, nicht ausreichend ist.

Abgesehen von der OGG1 gibt es auch andere DNA-Glykosylasen, wie zum Beispiel die MUTYH. Die Letztere nimmt an der Basenexzisionsreparatur bei oxidativem DNA-Schaden teil. Das Enzym entfernt Adeninbasen, wenn sie sich fälschlicherweise mit Guanin, Cytosin oder 8-Oxo-7,8-dihydroguanin paaren (225). Doppel-Knockout-

Mäuse für sowohl OGG1 als auch MUTYH wurden in einer Studie untersucht. Sie waren lebensfähig und fruchtbar, aber wiesen eine verkürzte Lebensdauer und eine starke Prädisposition für Lungen- und Ovarialkarzinom sowie für Lymphom auf (263). Zudem zeigten diese Mäuse ein verändertes Verhalten im Sinne von Angststörung, was auf die differentielle Genexpression im Gehirn zurückzuführen war (264). Zusammenfassend scheint der Reparaturmechanismus für 8-Oxoguanin bei einigen Geweben wichtiger zu sein als bei anderen, da die 8-Oxoguanin-Akkumulation auch organabhängig ist. Zudem gibt es alternative Mechanismen, die in der Lage sind, den Verlust eines bestimmten Reparaturmechanismus auszugleichen. Dennoch weisen die Befunde aus den tierexperimentellen Studien auf die Mitwirkung von 8-Oxoguanin-DNA-Schäden und deren Reparatur an der Entwicklung von Krebs hin (212).

Interessanterweise wurde eine Verbindung von OGG1 mit der Pathogenese von Asthma beobachtet (216). Aktuelle Forschungsergebnisse weisen auf folgenden Mechanismus hin, der diesem Phänomen zugrunde liegt: die freie 8-Oxoguaninbase bildet einen Komplex mit OGG1, der anschließend die GTPasen der Ras-Familie stimuliert, was zu einer Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems führt (246). Die resultierenden pathologischen Veränderungen können auch bei Asthmatikern festgestellt werden. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von OGG1 durch siRNA im Atemwegsepithel die durch Pollen induzierte allergische inflammatorische Reaktion reduziert (265). Gemäß dem vermuteten Mechanismus folgte die Rekrutierung der Neutrophilen in der Lunge nach der OGG1-induzierten Aktivierung von KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) und der KRAS-abhängigen Aktivierung von NF- κ B, was Zytokine und Chemokine wie zum Beispiel IL-1, TNF α , CXCL11, CCL20 induzierte.

Schließlich sind OGG1-Polymorphismus sowie veränderte Enzym Spiegel mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, wie zum Beispiel Alzheimer, Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, Chorea Huntington und Schlaganfall (266). Vor kurzem wurde die Expression von BER-Proteinen in peripherem Blut von Alzheimer-Patienten und gesunden Probanden untersucht, wobei eine signifikante Herunterregulierung von OGG1 bei den Alzheimer-Patienten festgestellt wurde, die nicht auf die differentielle Methylierung des Genpromoters zurückzuführen ist (267, 268). Eine mögliche Assoziation eines Einzelnukleotidpolymorphismus in OGG1 mit der Alzheimer-Krankheit wurde identifiziert (269). Zudem wurde gezeigt, dass dieser Einzelnukleotid-

polymorphismus bei Alzheimer die katalytische Aktivität von OGG1 veränderte und die Zellen für DNA-Schäden sensibilisierte (270). Es wurde auch beobachtet, dass vermehrte oxidative DNA-Schäden auch bei Autismus-Spektrum-Störungen und bei Schizophrenie eine Rolle spielen (250).

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Material

6.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller und Firmensitz
2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg
6-Methoxy-2-naphthylaldehyd (Monal)	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
ABC-Reagenz	Vector Lab., Burlingham, CA, USA
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamid-bis solution 40 % 29:1	BioRad Laboratories, München
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Hamburg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	AppliChem, Darmstadt
Calciumchlorid	Fluka & Riedel, Seelze
Citratpuffer pH 6	Agilent, Santa Clara, CA USA
D-(+)-Glukose 45 %	Sigma-Aldrich, Hamburg
DAB	Vector Lab., Burlingham, CA, USA
DC Protein Assay Kit	BioRad Laboratories, München
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Diethylamin NONOat (DEA/NO)	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI
DMSO Dimethylsulfoxide 99,5 %	Sigma-Aldrich, Hamburg
DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picryl-Hydrazyl)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol (70 %,80 %,96 %,100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis (aminoethylether)- N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe

Glycerin (wasserfrei)	AppliChem, Darmstadt
GTN (Glyzeryl- Trinitrat), 1mg/ ml	G.Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Hämatoxylin	Agilent, Santa Clara, CA USA
HCl	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium	Ratiopharm, Ulm
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) Hepes-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Hamburg
Horse Normalserum	Vector Lab., Burlingham, CA, USA
Indometacin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isofluran	Abbot North Chicago, IL USA
Isopropylalkohol (70 %,80 %,96 %,100 %)	Hedding,
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
L-012	Wako Chemicals, Osaka, Japan
Leupeptin HCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Methanol	VWR International, Darmstadt
MOM-Kit	Vector Lab., Burlingham, CA, USA
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Octylphenol Ethoxylate (Triton X-100)	ICN Biomedicals Inc.
Paraffin	Leica, Wetzlar
Paraformaldehyd (Roti-Histofix 4 %)	Carl-Roth, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phorbolsterdibutyrat (PDBu)	Sigma, Hamburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Perbio Science, Aalst, Belgien
Ponceau S (0,1 % in 5 % Eisessig)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BioRad Laboratories, München
Prostaglandin F2α	Cayman Chemicals, Michigan, USA

Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Roti®-Quant	Carl-Roth, Karlsruhe
TEMED	Sigma-Aldrich, Hamburg
AK-Verdünnungsmedium	Agilent, Santa Clara, CA USA
Wasserstoffperoxid (30 % H ₂ O ₂)	Merk, Darmstadt
Waschpuffer	Agilent, Santa Clara, CA USA
Xylol (Roti Histol)	Carl-Roth, Karlsruhe
Zymosan A	Sigma, Hamburg
Super Signal ECL-Kit	ThermoScientific, Waltham, USA

6.1.1.1. Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Organbadpuffer

Natriumchlorid 99,01 mM
Kaliumchlorid 4,69 mM
Calciumchlorid 2,5 mM
Magnesiumsulfat 1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat 1,03 mM
Glukose 11,1 mM
Natriumhydrogencarbonat 25 mM
Indometacin 17,875 mg in 15 ml
pH 7,35

Inhibitorenpufer

Aprotinin (1,2 mg/ml) 100 µl
Pepstatin (2,5 mg/ml) 40 µl
Leupeptin (5 mg/ml) 10 µl
ad 10 ml Krebs-HEPES-Puffer

Homogenisierungslösung

Protease Inhibitor Cocktail 100 µl
Phosphatase Inhibitor Cocktail 10 µl

Krebs-HEPES Puffer

Natriumchlorid 99,01 mM
Kaliumchlorid 4,69 mM
Calciumchlorid 2,5 mM
Magnesiumsulfat 1,2 mM
Di-Kaliumhydrogenphosphat 1,03 mM
Glukose 11,1 mM
Natriumhydrogencarbonat 25 mM
Natrium-HEPES 20 mM
pH 7,4

Homogenisierungspuffer (HG-Puffer)

Tris-HCL 20 mM
Saccharose 250 mM
EGTA 3 mM
EDTA 20 mM
pH 7,5

Strippingpuffer

Tris-HCL 24,76 mM

PMSF (0,1 M; in Methanol) 50 µl
Triton-X-100 (1 % v/v) 100 µl
ad 10 ml HG-Puffer

3x Laemmli-Puffer

Tris-HCL (1 M, pH 6,8) 1880 µl
SDS (20 %) 3000 µl
Glycerol 3000 µl
1 % Bromphenolblau in a.d. 300 µl
H₂O bidest. 320 µl
2-Mercaptoethanol 150 µl

Waschpuffer TBS-T

Tris-base 200 mM
NaCl 1,4 M
Tween-20 1 % (v/v)
pH 7,6

Trenngel (7,5 %)

H₂O bidest. 5,4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) 2,5 ml
Acrylamid (40 %) 1,88 ml
SDS (10 %) 100 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %) 100 µl
TEMED 10 µl

Trenngel (10 %)

H₂O bidest. 4,8 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) 2,5 ml
Acrylamid (40 %) 2,5 ml
SDS (10 %) 100 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %) 100 µl
TEMED 10 µl

SDS 34,62 mM
200 ml H₂O bidest.
700 µl 2-Mercaptoethanol

Laufpuffer

Tris-base 25 mM
Glycin 192 mM
SDS 3,5 mM
pH nicht adjustiert

Transferpuffer

Tris-base 25 mM
Glycin 192 mM
H₂O bidest. 800 ml
Methanol 200 ml
pH nicht adjustiert

Sammelgel (4 %)

H₂O bidest. 3,2 ml
0,5 M Tris (pH 6,6) 1,2 ml
Acrylamid (40 %) 0,5 ml
SDS (10 %) 50 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %) 50 µl
TEMED 5 µl

Trenngel (12 %)

H₂O bidest. 4,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) 2,5 ml
Acrylamid (40 %) 3 ml
SDS (10 %) 100 µl
Ammoniumpersulfat (APS) (10 %) 100 µl
TEMED 10 µl

HEPES-Puffer

HEPES 50 mM
 Saccharose 70 mM
 Mannitol 220 mM
 EGTA 1 mM
 BSA 0,033 mM

DAB

DAB Diluent 1 ml
 1 Tropfen Chromogen

Tris-Puffer

Tris 10 mM
 Saccharose 340 mM
 KCl 100 mM
 EDTA 1 mM

ABC-Reagenz

PBS 2,5 ml
 2 Tropfen Reagenz A
 2 Tropfen Reagenz B

6.1.2. Verbrauchsmaterial**Name**

Sheep anti-Rabbit IgG Beads
 Cellstar® PP-Test tubes, 15/50 ml
 Einwegsskalpell Nr.10
 Eppendorf- Pipettenspitzen 50-1000 µl
 Gel Blotting Papier

 Mikropräparierschere und Pinzette
 Mini-Trans-Blot Filterpapier
 Nitrozellulose Transfer Membran

 Nunc Lab Tec Chamber Slide

 Objektträger
 Optical Adhesive Covers (Deckgläschen)
 Pipettenspitze 10 µl, 200 µl ,1000 µl
 S-Monovette Blutentnahmesystem
 Sterican® Injektionskanüle Gr.18,
 0,45x25mm
 Tissue-Tek® OCT Compound

Hersteller und Firmensitz

Invitrogen, Karlsruhe
 Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Feather Safetz Razer, Osaka, Japan
 Eppendorf, Hamburg
 Whatmann-Schleicher und Schuell,
 Dassel
 Fine Science Tools
 BioRad Laboratories, München
 Whatmann-Schleicher und Schuell,
 Dassel
 Nalge Nunc International, Rochester,
 NY,USA
 Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
 Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 B.Braun, Melsungen

 Johnson / Johnson, Belgien

6.1.3. Verwendete Antikörper

Für Immunhistochemie

Primärer Antikörper			Sekundärer Antikörper		
AK	Verdünnt	Firma	AK	Verdünnt	Firma
3-Nitro-tyrosin (3-NT)	1:150	Merck- Millipore #06-284, Berlington, MA	Anti- Kaninchen IgG	1:1100	Lifetechnologies #B-2770
NADPH-Oxidase (Nox-2)	1:200	LSBio #B12365, Seattle, WA	Anti- Kaninchen IgG	1:1100	Lifetechnologies #B-2770
Interleukin-6 (IL-6)	1:400	Abcam #ab6672, Cambridge, UK	Anti- Kaninchen IgG	1:1100	Lifetechnologies #B-2770
8-oxo-Guanosin (8-oxoGua)	1:2000	Abcam #ab62623, Cambridge, UK	MOM-Kit		Vector Laboratories #PK-2200, Burlingame, USA
4-Hydroxy- nonenal (4-HNE)	1:150	Percipio Biosciences #24325, London, UK	MOM-Kit		Vector Laboratories #PK-2200, Burlingame, USA
Endothelin-1 (ET-1)	1:200	Pierce #MA3-005, Thermo- fisher Scientific, Waltham, MA	Anti- Kaninchen IgG	1:1100	Lifetechnologies #B-2770

induzierbare NO-Synthase (iNOS)	1:50	Santa Cruz #sc-651, Dallas	Anti-Kaninchen IgG	1:1100	Lifetechnologies #B-2770
---------------------------------	------	----------------------------------	-----------------------	--------	-----------------------------

Tabelle 6.1

Primäre und sekundäre Antikörper, die für Immunhistochemie verwendet wurden.

In der Tabelle sind alle primären Antikörper mit ihrer entsprechenden Verdünnung angeführt, die in der Immunhistochemie verwendet wurden. Neben jedem primären Antikörper steht auch der passende sekundäre Antikörper. Für 8-oxoGua und 4-HNE wurde das MOM-Kit mit dem entsprechenden biotinyliertem Anti-mouse-IgG sekundären Antikörper verwendet. Beim Lärm/Hypertonie-Projekt wurde 3-NT im Verhältnis 1:200 verdünnt. Beim Projekt mit der E-Zigarette-Exposition wurden die folgenden abweichenden Verdünnungen verwendet: 3-NT 1:200, ET-1 1:800 und 4-HNE 1:100.

Für Immunoblotting bei Western-Blot

Antigen	Protein -größe	Puffer	Block- medium	Host	Verdün- nung	Hersteller
endotheliale NO-Synthase (eNOS)	140 kDa	TBS-T	3 % BSA	Maus	1:1000	BD Biosciences, USA
Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH-2)	52 kDa	TBS-T	3 % BSA	Kaninchen	1:2500	*
Cyclooxygenase-2 (Cox-2)	74 kDa	TBS-T	3 % BSA	Kaninchen	1:1000	Cell Signalling, USA
β-Aktin	42 kDa	TBS-T	3 % BSA	Kaninchen	1:2500	Sigma-Aldrich, St. Lois, MO, USA
Peroxidase gekoppelter anti-Maus IgG Sekundärantikörper aus der Ziege (GAM-POX)	Es wurden die gleichen Puffer und Blockmedien verwendet wie für den primären Antikörper.				1:10000	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Peroxidase gekoppelter anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper aus der Ziege (GAR-POX)			1:10000	Vector Laboratories, Burlingame, USA
--	--	--	---------	--------------------------------------

Tabelle 6.2 Primäre und sekundäre Antikörper, die für die Immunassays Western-Blot verwendet wurden.

Abkürzungen zum Blockmedium: BSA=bovines Serumalbumin. Abkürzung zum Puffer: TBS-T=Tris Buffered Saline.

*der ALDH-2 Antikörper wurde freundlicherweise durch H.Weiner (166), Purdue Universität, West Lafayette, USA zur Verfügung gestellt.

6.1.4. Geräte

6.1.4.1. Organbad

Isometrische Transducer	Kent, Torrington, CO, USA
Isometrische Transducer	Radnoti, Monrovia, CA, USA
Organbäder	Kent, Torrington, CO, USA
Organbäder	Radnoti, Monrovia, CA, USA
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B. Sciences Inc., Dover, NH, USA
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney, Australien
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments, Sydney, Australien
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney, Australien

6.1.4.2. Immunhistochemie

Mikroskop	Olympus, Hamburg
Einbettungskarussell Leica TP 1020	Leica, Wetzlar
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Dampfkochtopf	Philips, Amsterdam, Niederlande

6.1.4.3. Western-blotting

Blotting-Anlage (Mini Trans-Blot®)	BioRAD Laboratories, München
Power Pac Basic	BioRAD Laboratories, München
Filterpapier (Mini Trans-Blot®)	BioRAD Laboratories, München
Minifold® I System (DotBlot System)	Whatman GmbH-Schleicher und Schuell, Dassel

Mini Protean™-III System (SDS-PAGE)	BioRad Laboratories, München
Western Blot Imager, CHEMICAM HR16	Intas, Göttingen
Nunclon 96-Well-Platten	Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

6.1.4.4. HLPC

HPLC-System	Jasco
HPLC-Column EC125/4 Nucleosil 100-3C18	Macherey & Nagel , Düren, Deu

6.1.4.5. Detektionskameras und Software

Image ProPlus 7.0 Software	Media Cybernetics, Rockville, MD
Mithras2-Chemilumineszenz-Plattenlesegerät	Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deu
ChemiLux Imager	CsX-1400M, Intas, Göttingen, Deu
Gel-Pro-Analyzer 3.0®	Media Cybernetics, Bethesda, MD
Prism für Windows, Version 7.01,	GraphPad Software Inc.
SigmaStat für Windows	Version 3.5, Systat Software Inc.
Revelation	ilf bioserve, Deu
MRX II-Plattenlesegerät	Dynex Technologies, Berlin

6.1.4.6. Allgemeine Laborausstattung

Test Tube Thermostat TCR 100	Roth
MiniShaker M52	Laboratory Equipment
RührerMR 1000	Heidolph
Cryostat Leica	Leica Biosystems, Nussloch
Rotofix 32 Typ 1202 (Serum)	Hettich
Mini Spin Plus 5435	Eppendorf
Mikro22R Typ 1110	Hettich
Ultrazentrifuge Discovery M120SE	Sorvall Kendro Laboratory Products
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern
pH-Meter Microprozessor PH211	Hanna Instruments
Zellcounter KX-21N	Sysmex
Vortex Genie 2 G560E	Scientif Industries
Microplate reader MRX 2	Magellan Biosciences/Dynex
Thermostat 2761	Ependorf

Thermostat B3DC3 0024082
Heizrührer MR 3001
Feinwaage LE225D
Waage KB800-2
Thermomixer comfort MTP 5355
pH-Meter GPHR 1400A

Photometer Helios alpha
Centro LB 960
Thermostat Plus
Langhaarrasierer
Homogenisator RW16 Basic

Haake Fisions
Heidolph
Sartorius
Kern
Eppendorf
Greißinger Elektronik Meß- und Regel-
technik
Thermo electron corporation
Berthold Technologies
Eppendorf
Philips
IKA Werk Laboratorz Equipment

6.2. Methoden

6.2.1. Versuchstiere

Die Effekte von Lärm auf das kardiovaskuläre System wurden in Tierexperimenten untersucht. Für die Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit wurden 32 C57BL/6-Mäuse (männlich und weiblich im Verhältnis 1:1) und 20 OGG1-knockout-Mäuse (männlich und weiblich im Verhältnis 1:1) verwendet. Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 6.3 alle Versuchsgruppen inklusive der im Verlauf der Arbeit verwendeten Gruppenkürzel aufgelistet.

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Grundsätzen für die Behandlung und den Umgang mit Labortieren, die aus der „Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals“ des US National Institutes of Health (271) hervorgehen, durchgeführt. Zudem überprüfte und genehmigte die Ethikkommission der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg Universität Mainz die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente an Tieren und die Genehmigung wurde durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz eingeholt (Koblenz, Deutschland; Zulassungsnummer: 23 177-07/G 15-1-094 und Erweiterung E2).

6.2.1.1. Versuchsgruppen und Lärmexposition

Die für diese Arbeit verwendeten Versuchstiere waren C57BL/6 und OGG1-knockout-Mäuse im Alter von 2-4 Monaten. Die knockout-Mäuse hatten C57BL/6-Hintergrund seit mindestens 32 Generationen. OGG1^{-/-}-Mäuse wurden nach der Methode von Sakumi et al erzeugt (261). und heterozygote OGG1^{+/-}-Zuchtpaare freundlicherweise von der Arbeitsgruppe C. Niehrs (Institut für molekulare Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. Beide Geschlechter wurden im Verhältnis 1:1 repräsentiert. Beide Mausstämme wurden in jeweils 2 Gruppen aufgeteilt. Daraus resultieren 4 Versuchsgruppen aus 2 Kontroll- (C57BL/6 und OGG1-knockout ohne Lärmexposition) und 2 Behandlungsgruppen (C57BL/6 und OGG1-knockout mit Lärmexposition) (Tabelle 6.3).

Gruppenkürzel	Versuchsgruppe	Behandlung
WT	C57BL/6-Mäuse (Kontrolle)	
WT+ noise	C57BL/6-Mäuse	+Lärmexposition
Ogg1 ^{-/-}	Ogg1 ^{-/-} -Mäuse (Kontrolle)	
Ogg1 ^{-/-} + noise	Ogg1 ^{-/-} -Mäuse	+Lärmexposition

Tabelle 6.3 Einteilung der Versuchstiergruppen.

Die Lärmexposition erfolgte laut einem 24-stündigen Protokoll über vier Tage, indem intermittierend repetitive Lärmereignisse eines zweistündigen Rauschmusters von 69 Fluglärmereignissen mit einer Länge von 43 Sekunden, einem maximalen Schalldruckpegel von 85 dB(A) und einem durchschnittlichen Schalldruckpegel von 72dB(A) in einer Dauerschleife durch 30 cm über den Käfigen installierten Lautsprechern abgespielt wurden (1, 7). Die genannten Schalldruckpegel wurden bewusst ausgewählt, da sie zu keinem in der Studie unerwünschten Hörverlust bei den Mäusen führen (272). Die Lärmereignisse wurden unregelmäßig von stillen Perioden unterbrochen, damit eine frühzeitige Anpassung verhindert wird. Die Schalldruckpegel wurden mit einem Schallpegelmessgerät der Klasse II (Casella CEL-246) kalibriert.

Nach einer Gesamtexpositionszeit von vier Tagen wurden die mit Lärm exponierten Versuchstiere sowie entsprechende Kontrolltiere unter Isoflurannarkose getötet und das Blut sowie die für die Untersuchungen benötigten Organe entnommen.

6.2.1.2. Tötung der Tiere und Organentnahme

Nachdem die Mäuse durch die Inhalation von Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl-difluoromethylether) narkotisiert worden waren, wurde das Abdomen mit einer Präparationsschere von cranial nach kaudal eröffnet. Anschließend wurde das Diaphragma zerschnitten, von der Thoraxwand gelöst und so das Herz für eine Blutentnahme zugänglich gemacht. Um eine reibungslose Blutentnahme aus dem Herz ohne frühzeitige stasebedingte Koagulation des Blutes zu gewährleisten, wurde in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens Heparin (1000 I.E. in 1 ml isotoner Kochsalzlösung) mit einer Injektionsnadel (20G Kanüle) injiziert. Aus dem rechten Ventrikel des Herzens wurde so viel Blut wie möglich entnommen (0,8-1 ml). Ein Teil des gewonnenen Blutes wurde für die Detektion von oxidativem Stress durch Chemilumineszenz verwendet. Der Rest des Blutes wurde zur Gewinnung des Serums in Serum-Gel-Monovetten überführt und zentrifugiert.

Das Herz wurde möglichst proximal von allen Gefäßen getrennt, aus dem Thorax entfernt und anschließend in 4 °C gekühltem Krebs-HEPES-Puffer gelagert. Die Leber wurde ebenfalls entnommen und vorübergehend in Krebs-HEPES Puffer gelagert. Sowohl die Herzen als auch die Lebern wurden im weiteren Verlauf in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, damit das Gewebe für Western-Blot und HPLC entsprechend weiter verwendet werden konnte.

Von der Iliakalbifurkation ausgehend wurden die Aorta abdominalis und thoracalis aus dem Retroperitoneum und dem Mediastinalraum in Richtung cranial freipräpariert und in 4 °C kaltem Krebs-HEPES Puffer gelagert. Bei der Entnahme der Aorten war insbesondere darauf zu achten, dass das Gefäß möglichst wenig Spannung ausgesetzt wird, um die Integrität des Endothels zu bewahren. Durch eine Beschädigung des Endothels kommt es zu verfälschten Ergebnissen der endothelabhängigen isometrischen Spannungsmessung im Organbad (siehe Kapitel 6.2.2.).

6.2.1.3. Aortenpräparation

Die entnommenen Aorten wurden unter einem Binokular von anhaftendem Bindegewebe befreit. Wie oben erklärt sollte auch hierbei das Endothel intakt bleiben und vor Beschädigungen geschützt werden. Die Präparation erfolgte deswegen behutsam mit Mikropräparierbesteck. Abschließend wurden die von Bindegewebe befreiten Aorten mit Krebs-HEPES Puffer vorsichtig gespült.

Für isometrische Spannungsmessungen im Organbad wurden von diesen Aorten 4 mm lange Ringe abgeschnitten. Die Aortenbögen wurden in 4 %-Paraformaldehyd zwecks Gewebefixierung gelagert, damit sie für die Immunohistochemie bearbeitet werden können. Die restlichen Teile der Aorta wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für spätere Western-Blot Experimente bei -80 °C gelagert.

6.2.2. Isometrische Spannungsmessung im Organbad

Die isometrische Spannungsmessung im Organbad ist eine Methode zur Beurteilung der Gefäßfunktion. Es wurden hier an isolierten Aortenringen zwei wichtige Aspekte der Gefäßfunktion überprüft:

- I) die endothelabhängige Relaxation
- II) die endothelunabhängige Relaxation.

I) Hierbei wurde die Funktionsfähigkeit des Endothels durch kumulative Zugabe von Acetylcholin ermittelt. Acetylcholin beeinflusst die Gefäßkontraktilität über zwei Mechanismen. Auf der einen Seite vermittelt Acetylcholin unabhängig vom Endothel bei direkter Wirkung auf die Gefäßmuskulatur eine Vasokonstriktion. Auf der anderen Seite führt Acetylcholin im Endothel zu einer Aktivierung der eNOS, die wiederum vermehrt $\cdot\text{NO}$ generiert. $\cdot\text{NO}$ bewirkt über den $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$ -Signalweg eine Relaxation der Gefäßmuskulatur. Physiologisch beim intakten Endothel überwiegt der zweite Mechanismus und es kommt zu einer Vasodilatation.

II) Die endothelunabhängige Relaxation wurde durch die kumulative Zugabe von Nitroglyzerin im Organbad überprüft. Die mitochondriale Isoform der Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) ist für die Bioaktivierung hochpotenter organischer Nitrate verantwortlich (273). Nitroglyzerin wird über die ALDH-2 zu $\cdot\text{NO}$ bzw. NO_x metabolisiert und vermittelt damit über eine Aktivierung der sGC eine Vasodilatation.

Die isometrische Spannungsmessung im Organbad wurde in dieser Studie so durchgeführt, wie schon in anderen Studien zuvor beschrieben (274, 275). Die Aorten wurden präpariert (Kapitel 6.2.1.3.) und zwischen zwei Drahtdreiecken aufgespannt. Diese Konstruktion wurde an einem Ende mit einem Transducer verbunden, der in der Lage ist, kleinste Tonusveränderungen der Gefäße zu messen. Das andere Ende wurde mit einem Widerlager verbunden. Die zwei Drahtdreiecke und die Aorta hängen im Organbad stabil und gleichzeitig freihängend. Die Messergebnisse wurden in ein digitales Signal umgewandelt und mithilfe eines Computers aufgezeichnet. Der Aufbau des Organbades ist in der Abbildung 6.1 zusammenfassend dargestellt. Dabei befindet sich die Aufhängung der Aorta in einem doppelwandigen Glasgefäß. Im Inneren befindet sich ein $37\text{ }^\circ\text{C}$ warmer Organbadpuffer mit physiologischen Eigenschaften. Dieser Puffer wird zusätzlich mit Carbogen (95 % CO_2 und 5 % O_2) begast. Der äußere Bereich des doppelwandigen Glasgefäßes wird stetig von einem auf $37\text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Wasserbad durchflossen, um die Temperatur ebenfalls physiologisch anzugleichen. In jeder Organbadkammer wurde ein einzelner 4 mm-langer Aortenring aufgehängt. Das Gewebe war somit Bedingungen ausgesetzt, was bestmöglichst einem biologischen System angeglichen war.

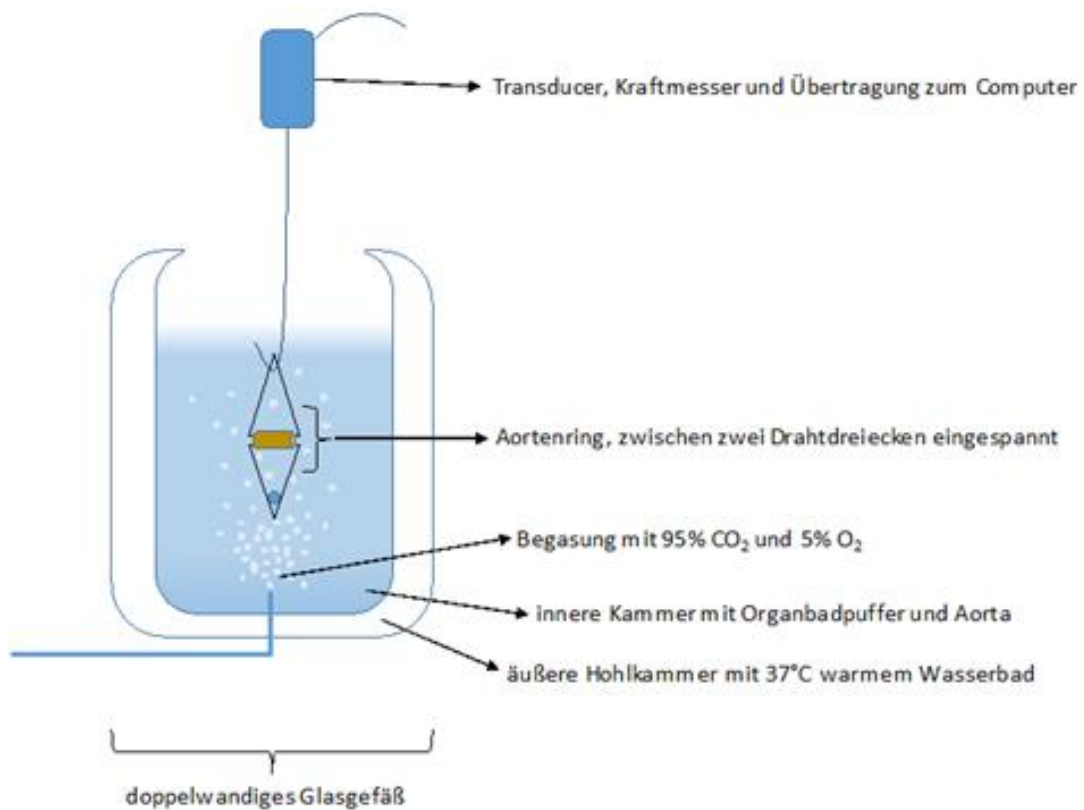


Abbildung 6.1 Schematische Darstellung einer Organbad-Kammer.

Die Abbildung wurde entnommen aus der Dissertation von Elisabeth Ullmann „Hypertonie mit dem organischen Nitrat Pentaerythryltetranitrat“, 2020, Zentrum für Kardiologie, Kardiologie 1 der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Nachdem die Aortenringe im Organbad aufgehängt wurden, mussten sie zunächst manuell unter Spannung gebracht werden. Hierzu wurde eine von 0,2 g auf bis zu 1,1 g gesteigerte Kraft über einen Zeitraum von sieben Minuten angewandt. Die zuletzt registrierte Spannung wurde als "null" definiert. Weiterhin wurde zur Abstimmung der Plateau-Vorkontraktion eine maximale Spannung mit 2 M KCl durchgeführt, anschließend das KCl aus dem Puffer ausgewaschen und gewartet, bis die Spannung wieder auf den vorher definierten Nullwert gefallen war. Damit die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe ermittelt werden konnte, mussten die Gefäße zunächst vorkontrahiert werden. Hierzu wurde Prostaglandin F_{2α} verwendet, das über die Prostaglandin F-bindenden Rezeptoren eine Konstriktion der glatten Muskulatur bewirkt. Nach etwa 20 Minuten erreichte die durch Prostaglandin F_{2α} vermittelte Gefäßkontraktion ein Plateau von ca. 80 % des maximalen Gefäßtonus, der durch KCl hervorgerufen wurde. Hiernach konnten die Messungen der Dosiswirkungskurven für Acetylcholin und Nitroglyzerin durchgeführt werden. Acetylcholin wurde in aufsteigenden

Konzentrationen von 10^{-9} M bis $10^{-5,5}$ M verwendet; Nitroglycerin in Konzentrationen von 10^{-9} M bis $10^{-4,5}$ M. Zwischen den einzelnen Messungen wurde das Organbad gespült und die Aortenringe erneut mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkontrahiert.

Die Messungen wurden mit Unterstützung von Herrn [REDACTED] (MTA) durchgeführt.

6.2.3. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie-Methode beruht der Nachweis auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Idealfall kommt es zu einer spezifischen und starken Bindung zwischen Antikörper und Epitop. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt, das sein Vorhandensein im Präparat sichtbar macht. Mittels verschiedener Detektionssysteme können schon geringe Mengen an Epitop verstärkt dargestellt werden. Ziel ist es, ein Signal am Ort des Epitops (und idealerweise nur dort) in ausreichender Stärke zu erkennen.

6.2.3.1. Probenvorbereitung

In dieser Studie wurde Paraffin-Immunhistochemie durchgeführt wie zuvor beschrieben (276). Nach der Aortenpräparation folgten die Fixierung des Gewebes, sein Einblocken und das Anfertigen von Schnittpräparaten.

Damit die Gewebe möglichst natürlich erhalten bleiben und sie in ihrer ursprünglichen Architektur beurteilt werden können, wurden die Aortenbögen in dieser Studie zuerst mit 4 % Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für ca. 8-18 Stunden fixiert, wobei die Dauer sich nach der Größe des Gewebes richtet. Dann wurde das Gewebe unter fließendem Leitungswasser für ca. 2-6 Stunden gespült und laut dem folgenden Protokoll bei aufsteigender Alkoholreihe fixiert:

5 min	aqua dest.
30 min	aqua dest.
120 min	70 % Isopropylalkohol
120 min	80 % Isopropylalkohol
120 min	96 % Isopropylalkohol
120 min	96 % Isopropylalkohol
120 min	100 % Isopropylalkohol
120 min	100 % Isopropylalkohol

120 min	Xylol
120 min	Xylol
120 min	Paraffin
240 min	Paraffin

Danach wurde das fixierte Gewebe auf Einbettkassetten in heißem Paraffin eingeblockt und nach mindestens zwei Stunden Lagerung bei -20 °C konnten Schnitte angefertigt werden. Dafür wurde ein Mikrotom benutzt. Hiermit war es möglich, 5 µm dicke Scheiben jedes eingebetteten Gewebes anzufertigen. Die erhaltenen Schnitte wurden zuerst auf einem Kaltwasserbad (ca. 20 °C) aufgefangen und dann auf einem Heißwasserbad (ca. 45 °C) gestreckt, um glatt auf einen Objektträger aufgezogen werden zu können. Die Schnitte wurden noch über zwei Nächte bei etwa 37 °C getrocknet, bevor sie für die Immunhistochemie verwendet wurden.

6.2.3.2. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im OGG1/Lärm-Projekt

Zuerst wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (3-mal Xylol, 100 %-Ethanol, 2-mal 96 %-Ethanol, 80 %-Ethanol, 70 %-Ethanol und aqua dest. jeweils 10 Minuten lang) entparaffiniert. Mithilfe der Methode der Immunhistochemie gelingt der Nachweis von Antigenen im Schnitt. Die Formalin-fixierten Paraffinschnitte wurden in einem Dampfdruckkochtopf vorbehandelt. Durch diese Behandlung werden demaskierte, also in ihrer räumlichen Struktur durch die Fixierung veränderte Proteine im Schnitt quasi wieder „renaturiert“. Die Schnitte wurden hierfür in ein offenes hitzestabiles Gefäß gestellt, das mit Citratpuffer (pH 6,0) gefüllt war. Am Ende der Prozedur folgten die Kühlung auf 30 °C und eine 30-minütige Inkubation der Schnitte mit 3 %-Wasserstoffperoxid zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Weiterhin wurden unspezifische Bindungen von Primär- oder Sekundär-Antikörpern durch eine Inkubation des Schnittes in Horse Normalserum für 60 Minuten unterdrückt. Bei den monoklonalen Maus-Antikörpern wurde ein MOM-Kit verwendet und die unspezifischen Bindungen wurden durch die Vorinkubation mit der Maus-IgG-Blockierungsreagenz aus dem MOM-Kit blockiert.

Zur Immunhistochemie wurden primäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtet waren und dadurch an diesen Strukturen im Schnitt hafteten. In dieser Arbeit wurde die indirekte Methode durchgeführt, bei der der Nachweis mit einem weiteren Antikörper, dem so genannten Sekundärantikörper

erfolgte. Dieser bindet an den ersten und ist selbst mit einem Marker versehen. Die primären und ihre entsprechenden sekundären Antikörper sowie die Verdünnungen werden unter Tabelle 6.1 angeführt. Als weiterer Schritt folgte die Inkubation mit dem so genannten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Die ABC-Methode stellt die gebräuchlichste Methode zum in situ Nachweis von Antigenen dar. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mindestens 15 Minuten lang im Waschpuffer (10 %) inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) inkubiert, was zu einer Braunfärbung des gesuchten Antigens führt. Anschließend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und dann wieder unter fließendem Leitungswasser gespült. Weiterhin erfolgte die Fixierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %-Ethanol, 96 %-Ethanol, 100 %-Ethanol, Xylol). Das DAB ist Alkohol- und Xylol-stabil, sodass am Ende die Objektträger mit Xylol-haltigem Cytoseal eingedeckt wurden.

Schließlich wurden die Schnitte mit dem Mikroskop sorgfältig untersucht, abfotografiert und das Ergebnis mit Image ProPlus 7.0 Software densitometrisch quantifiziert.

6.2.3.3. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im Projekt zu den Effekten der Lärmexposition während der Schlaf/Wachphase

Als studentische Hilfskraft in der Molekularen Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz hatte ich die Gelegenheit, am thematisch angelehnten Projekt mitzuarbeiten, bei dem die vaskulären und die zerebralen Folgen der chronischen Fluglärmexposition während der Wachphase und der Schlafphase für 1, 2 und 4 Tage untersucht wurden. Hierbei wurde die gleiche Lärm-Audiodatei wie in der vorliegenden Arbeit verwendet, nur nicht mit einer 24-stündigen Exposition, sondern nur 12 h tagsüber für die Exposition während der Schlafphase (7 bis 19 Uhr) und 12 h nachts für die Exposition während der Wachphase (19 bis 7 Uhr). Mäuse sind während der Nacht aktiv und schlafen während des Tages. Laut dem Protokoll wurden intermittierende, repetitive Lärmereignisse eines zweistündigen Geräuschemusters von 69 Fluglärmereignissen mit einer Dauer von jeweils 43 Sekunden und einem maximalen Schalldruckpegel von 85 dB(A) und einem durchschnittlichen Schalldruckpegel von 72 dB(A) abgespielt. Die Lärmereignisse wurden unregelmäßig von Stilleperioden unterbrochen, um eine frühzeitige Adaptation der Mäuse zu verhindern.

In diesem Projekt wurden immunhistochemische Untersuchungen und Auswertungen analog durchgeführt. In der Tabelle 6.1 sind die primären Antikörper ET-1 und iNOS

mit ihrer entsprechenden Verdünnung angeführt, die in der Immunhistochemie für diese an mein Hauptthema angelehnte Studie verwendet wurden. Neben jedem primären Antikörper steht der passende sekundäre Antikörper.

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Astrozyten und Mikrogliazellen wurde in Kooperation mit Frau Dr. Frauenknecht in Zürich nach einem dort etablierten Standardverfahren durchgeführt (277, 278). Die Schnitte wurden durch absteigende Alkoholkonzentrationen entparaffiniert und anschließend in Ventana-Puffer inkubiert und automatisch mithilfe vom NEXEX-Immunhistochemie-Roboter gefärbt. Dabei wurde der primäre Antikörper GFAP (in Verdünnung 1:300, polyklonal, aus Kaninchen, DAKO, Glostrup) für den Nachweis der Astrozyten verwendet. Gliofilament-Protein oder kurz GFAP (glial fibrillary acidic protein) gehört zu den Intermediärfilamenten und findet sich vor allem in den Astrozyten und Ependymzellen des ZNS. Schließlich erfolgte der Nachweis mittels iVIEW DAC Detection Kit (Ventana). Die Schnitte wurden bei 40-facher Vergrößerung mit einem Hamamatsu-Gewebe-Scanner (Nanozoomer) gescannt. Die Hamamatsu NDPI-Bilder jedes Schnittes wurden in einen Computer übertragen (Viewer Version DIH 4.0.0-20130402-63) und wurden von einem Neuropathologen im Hinblick auf die Aktivierung von Astrozyten untersucht. Dann wurden repräsentative Stellen aus der Hippocampus-Region CA1 mit angrenzendem Corpus Callosum fotografiert.

6.2.3.4. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im Hypertonie/Lärm-Projekt

In einem weiteren angelehnten Projekt wurden die potentiell additiven negativen kardiovaskulären Auswirkungen von Fluglärm in Kombination mit experimenteller arterieller Hypertonie untersucht (279). C57BL/6J-Mäusen wurden entweder 0,5 mg/kg/d Angiotensin II über 7 Tage intravenös appliziert, oder sie wurden Fluglärm mit einem maximalen Schalldruckpegel von 85 dB(A) und einem durchschnittlichen Schalldruckpegel von 72 dB(A) über 7 Tage hinweg ausgesetzt. In der dritten Versuchsgruppe wurden ATII-behandelte Mäuse zusätzlich beschallt. Die immunhistochemische Untersuchung und Auswertung wurden so durchgeführt, wie sie im Abschnitt 6.2. dieser Arbeit ausführlich beschrieben wurden. Hier wurden die primären Antikörper Endothelin-1 (Abcam #117757, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:1000 und 3-Nitrotyrosin (Millipore #06-284, Burlington, MA) in einer Verdünnung von

1:200 und ein sekundärer Antikörper aus Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) verwendet (siehe auch Tabelle 6.1).

6.2.3.5. Immunhistochemie und densitometrische Auswertung im E-Zigaretten-Projekt

Im Rahmen der Promotion hatte ich die Gelegenheit, als wissenschaftliche Hilfskraft an einem weiteren thematisch angelehnten Projekt mitzuarbeiten. Hierbei wurde ein Tiermodell mit C57BL/6-Mäusen und Nox-2-knockout-Mäusen entwickelt, bei dem die Tiere über 1, 3, oder 5 Tage für 2 Stunden pro Tag (6-mal jeweils 20 Minuten lang) E-Zigarettdampf ausgesetzt wurden (280). Die Flüssigkeit (Liquid), die für die Erzeugung des E-Zigarettdampfs verwendet wurde, bestand zu 50 % aus Propylenglykol und zu 50 % aus pflanzlichem Glycerin ohne zusätzliche Aromastoffe. In den Gruppen, die Nikotin-haltigem E-Zigarettdampf ausgesetzt wurden, wurde die gleiche Flüssigkeit mit einer zusätzlichen Konzentration von 12 mg/ml an Nikotin benutzt. Die Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Expositionsprotokoll frischer Luft ausgesetzt, damit Störfaktoren wie mentaler Stress durch Umgebungsveränderungen und durch den Umgang mit den Mäusen ausgeschlossen werden konnten.

Die immunhistochemische Untersuchung und Auswertung wurden so durchgeführt, wie sie im Abschnitt 6.2. dieser Arbeit ausführlich beschrieben wurden. Hier wurden die primären Antikörper Endothelin-1 (Abcam #117757, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:800, 3-Nitrotyrosin (Millipore #06-284, Burlington, MA) in einer Verdünnung von 1:200, Nox-2 (LSBio #B12365, Seattle, WA) in einer Verdünnung von 1:200 und 4-HNE (Percipio Biosciences #24325, London, UK) in einer Verdünnung von 1:100. verwendet. Die entsprechenden sekundären Antikörper stehen in Tabelle 6.1.

6.2.4. Detektion von oxidativem Stress durch Chemilumineszenz

Wenn Atome oder Moleküle, die sich als direkte Folge einer stark exergonen chemischen Reaktion in einem elektronisch angeregten Zustand befinden und eine elektromagnetische Strahlung in Form von Lichtquanten emittieren, dann spricht man von Chemilumineszenz (281). Die Emission der Lichtquanten begründet sich im Orbitalmodell des Atoms auf dem Übergang eines Elektrons von einem höheren Energieniveau auf ein tieferes (282). Bei der Chemilumineszenz verursacht eine chemische Reaktion den Übergang des Elektrons auf das höhere Energieniveau und

mithilfe eines Detektors können die emittierten Lichtquanten beim Abfall auf das Ausgangsniveau aufgezeichnet werden.

In Abhängigkeit von dem eingesetzten Reagenz können unterschiedliche Radikale nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde L-012 (8-Amino-5-chlor-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)-Dion-Natriumsalz) verwendet, was mit einem breiten Spektrum von Radikalen und anderen reaktiven Spezies reagiert und somit dem gesamten oxidativen Stress widerspiegelt. Die Emission des Lichts steht im linearen Verhältnis zur Entstehung von RONS (283).

Um RONS im Vollblut nachzuweisen, wurde der oxidative Burst mithilfe von Chemilumineszenz gemessen. Der sogenannte Leukozyten-abhängige oxidative Burst spiegelt die Leukozyten-abhängige Wasserstoffperoxid-Bildung wider, (im Wesentlichen die der NADPH-Oxidase vom Phagozyten-Typ, NOX-2). Wasserstoffperoxid wird durch Myeloperoxidase in hochreaktive Sauerstoff-Metall-Komplexe umgewandelt, welche zur Oxidation von L-012 zu einem Zwischenprodukt führen. Dieses Zwischenprodukt gibt durch eine chemische Reaktion Energie in Form von Chemilumineszenz-Emissionslicht ab.

Dadurch, dass die phagozytierenden Leukozyten mithilfe von der NADPH-Oxidase reaktive Sauerstoffspezies generieren, dienen sie der Abwehr von pathogenen Keimen (Bakterien und Parasiten). 1933 entdeckten Baldrige und Gerhard, dass der Sauerstoffverbrauch der Granulozyten durch Stimulation um das 50- bis 100-fache gesteigert werden kann (284). Diese Beschreibung reflektiert den sogenannten oxidativen Burst, der zur Abwehr von pathologischen Keimen dient. Die NADPH-Oxidase der Leukozyten stellt eine wesentliche Quelle für oxidativen Stress im Blut dar und dieses Enzym wird über den Signalweg der Proteinkinase C aktiviert, die durch Phorbolster wie PDBu stimuliert werden kann.

Zur Detektion von RONS im Vollblut wurde in dieser Arbeit das folgende Chemilumineszenzassay angewandt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurde L-012 (100µM) in vorgewärmtem PBS-Puffer, der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (1 mM) enthielt, beigegeben. Von der Gesamtmenge des abgenommenen Blutes der Versuchstiere wurden etwa 120 µl von jeder Versuchsgruppe mit einer finalen Verdünnung von 1:50 hinzugefügt. Die Stimulation erfolgte einmal mit dem Pilz-Endotoxin Zymosan A (50 mg/ml) sowie einmal mit Phorbolsterdibutytrat (PDBu, 10 mM). Zymosan hat eine langsamere

Kinetik als PDBu und erreicht somit ein späteres Maximum. Durch kurzes Schütteln wurde eine homogene Verteilung der Reagenzien gewährleistet. Anschließend wurde die Emission des Lichts durch ein Mithras2-Chemilumineszenz-Plattenlesegerät erfasst und das Ergebnis wurde auf einen Computer übertragen (285, 286). Das emittierte Licht wurde über einen Zeitraum von 30 Sekunden quantifiziert, was als Counts/Minute präsentiert wurde. Die Gesamtmessung dauerte 30 Minuten.

Die Chemilumineszenzassay wurde von [REDACTED] and [REDACTED] durchgeführt. Die Ergebnisse werden daher in der Diskussion erläutert.

6.2.5. Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE und Western-Blot

6.2.5.1. Probenvorbereitung

Mithilfe der Western-Blot-Methode wurden Proteine aus der Aorta und aus Herzgewebe analysiert. Das jeweilige entnommene Gewebe wurde zunächst in flüssigem Stickstoff zermörsert. Im Volumenverhältnis 1:1 wurde das gewonnene Pulver mit 4 °C kalter Homogenisierungslösung versetzt. Das nicht-ionische Tensid Triton-X 100 (1%ig) verursachte eine Lösung der Proteine aus der Zellmembran. Protease- und Phosphataseinhibitoren wie Aprotinin, Leupeptin und Cantharidin bzw. die hier verwendeten Inhibitoren-Cocktails verhinderten den Proteinabbau durch zelleigene Enzyme. Während einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Proteine gelöst. Zur Eliminierung des Zelldetritus aus dem Homogenat wurden die Proben bei 10000 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe Kapitel 6.2.5.2.) durchgeführt, damit sich für jede Probe gleiche Mengen von Protein im Western-Blot einsetzen ließen.

6.2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Die spektroskopische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zum ersten Mal 1976 vom M. Bradford beschrieben (287). Das Prinzip dieser Methode stützt sich auf den spezifischen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250. Die kationische Form bzw. proteinungebundene Form dieses Triphenylmethanfarbstoffs ist rot, aber die proteingebundene Form ist blau. Bei dieser Komplexbildung von Coomassie Brilliant Blue an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes: die ungebundene (kationische), rote Form hat im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 465 nm. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff aber in seiner

blauen, anionischen Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm. Da der Extinktionskoeffizient des Komplexes außerdem sehr viel höher als der des freien Farbstoffes ist, kann die Zunahme der Absorption bei 595 nm durch die Komplexbildung mit hoher Empfindlichkeit gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden und ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Zunahme der Absorption bei dieser Wellenlänge ist proportional zur Konzentration des Proteins. Dieses Verhältnis ist für den Proteinbereich von 10-100 µg/ml linear. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden an einer Eichkurve berechnet, die aus Verdünnungen definierter Konzentrationen Rinderserumalbumin (BSA: 1, 5, 10, 20 und 30 µg/ml) erstellt wurde. Als Leerwertlösung wurde destilliertes Wasser verwendet.

Nach der im Abschnitt 6.2.5.1. beschriebenen Probenvorbereitung wurden alle Proben zunächst im Verhältnis 1:200 (Aorten) bzw. 1:800 (Herz) mit destilliertem Wasser vorverdünnt, da diese Verdünnung für den Nachweisbereich der BSA-Eichkurve geeignet ist. Jede Messung wurde in transparenten Nunclon 96-Well-Platten durchgeführt. Nach der Verdünnung wurden jeweils 2 x 80 µl der Proteinlösungen in einer Doppelbestimmung auf die Platte übertragen. Anschließend wurden 200 µl eines den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 enthaltenden Reagenzes (Roti-Quant®) zugegeben und gründlich gemischt, bevor die Platte am MRX II-Photometer bei 595 nm gemessen wurde. Mithilfe des Programmes Revelation wurden aus den Absorptionswerten die Proteinkonzentrationen der Lysate berechnet.

6.2.5.3. SDS-PAGE und Western-Blot

Durch die Western-Blot Methode lassen sich aus Proteingemischen einzelne Proteine sowohl identifizieren als auch quantifizieren. Im Anschluss an die Proteinkonzentrationsbestimmung, wie im Abschnitt 6.2.5.2. beschrieben, wurden die Proben einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese unterzogen (288). Polyacrylamid-Gele haben konzentrations-abhängig Poren von einheitlicher Größe, sodass in Laemmli-Puffer gelöste Proteine im Strom eines elektrischen Feldes aufgrund ihrer durch SDS maskierten Eigenladung wandern und vorwiegend aufgrund ihres Molekulargewichts im Gel aufgetrennt werden.

Vor der Beladung des Gels wurden alle Proteinproben im Verhältnis 2:1 mit 3x Laemmli-Puffer gemischt und anschließend 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Infolgedessen wurden alle Proteine denaturiert und Disulfidbindungen durch 2-Mercaptoethanol

aufgebrochen. Da die verschiedenen Proteinmoleküle unterschiedliche Ladungen haben, ist Natriumdodecylsulfat (SDS) im Laemmli-Puffer als auch in den Gelen enthalten, was einen lipophilen und einen hydrophilen Teil besitzt. Es überdeckt dadurch die Eigenladung von Proteinen, sodass diese eine konstant negative Ladungsverteilung aufweisen.

Das Elektrophorese-Verfahren mit SDS-PAGE-Gelen wurde mit einem Mini Protean™-System durchgeführt. Polyacrylamid-Gele wurden wie folgt hergestellt: Das Trenngel mit 12 % Polyacrylamid wurde in das zusammengebaute Elektrophorese-System gegossen. Um eine gleichmäßige Oberflächenlinie auf dem polymerisierenden Gel zu erhalten, wurde das Gel mit 1 ml Isopropanol überlagert. Nach ca. 20 Minuten war das Gel auspolymerisiert, das Isopropanol wurde abgenommen, ein vierprozentiges Sammelgel aufgetragen und ein Kamm (für 10 oder 15 Taschen) für die Probeneinfüllung eingesetzt. Nach weiteren 20 Minuten Polymerisationsdauer konnten die Kämmen entfernt und das Gel in die durch den Kamm geformten Taschen mit den zuvor beschriebenen Proben in der gewünschten Reihenfolge beladen werden.

Die Elektrophorese wurde für ca. 10 Minuten bei +4 °C in SDS-PAGE-Laufpuffer in einem Vorlauf mit 60 V durchgeführt, bis die Proteine das Trenngel erreichten. Dann wurde die Spannung auf konstant 120 V eingestellt. Da der Laemmli-Puffer Bromphenolblau enthielt, konnte die Bewegung der Proben deutlich beobachtet werden. Dieser Prozess dauerte etwa 2 Stunden, bis der parallel zu den Proben laufende, vorgefärbte Protein-Größenstandard die gewünschte Auftrennung erreicht hatte.

Nach Beendigung des Elektrophoreseprozesses wurden die nach Größe aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel mit Hilfe des Mini-Trans Blot®-Systems auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der elektrophoretische Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran wird als Blot bezeichnet. Das Transfersystem besteht aus einer Halterkassette mit befestigten Elektroden, einer Transferkassette, Schwämme, einem Tank und einer Kühleinheit. Alle Schwämme, Filterpapiere und Membranen wurden zunächst in einem vorgekühlten Transferpuffer äquilibriert. Für die Montage des sogenannten „Gel-Transfer-Sandwiches“ wurde zunächst ein Schwamm auf eine Gel-Transferkassette gelegt, gefolgt von einem Filterpapier, der Nitrozellulosemembran und dem Gel. Der Herstellungsprozess des Transfer-

Sandwiches wurde in umgekehrter Weise mit Filterpapier und Schwamm fortgesetzt, wobei alle Komponenten vollständig im eiskalten Transferpuffer eingetaucht blieben, um ein Austrocknen der einzelnen Komponenten und eine eventuelle Luftblasenbildung zu verhindern. Schließlich wurde die Transferkammer geschlossen und mit der Membran in Richtung Anode in die Halterkassette eingesetzt. Der Transfertank wurde mit Transferpuffer gefüllt und das Blotting für 2,5 Stunden bei 4 °C und bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA durchgeführt. Um einen zu hohen Anstieg der Temperatur des Transferpuffers während der Proteinübertragung auf die Membran zu vermeiden, wurde der Transferpuffer zuvor gekühlt (-20 °C) und die Transferkammer auf Eis gestellt.

Nach erfolgreichem Blotting wurde das System demontiert und die Nitrozellulosemembran, die nun die transferierten Proteine enthält, zur Überprüfung von Ladung und Transfer als auch zur Kennzeichnung der 10 kDa Molekulargewichtsmarkerbanden mittels einer Ponceau-S Färbung (10 min bei Raumtemperatur) auf der Membran sichtbar gemacht. Mithilfe des Molekulargewichtsmarkers BenchMark ließ sich die Membran entsprechend der erwarteten Proteinbanden aufteilen und entsprechend horizontal in Streifen auftrennen. Dies ermöglichte eine spezifische Antikörperinkubation für mehrere Bandenreihen. Dann folgte der immunologische Nachweis der Proteine wie im Abschnitt 6.2.5.4. beschrieben.

6.2.5.4. Immunologischer Nachweis der Proteine

Das Entfärben der Membranstreifen wurde mit TBS-T-Waschpuffer durchgeführt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen von Antikörpern an der Nitrozellulosemembran wurden die freien Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer (BSA) besetzt. Darauf folgte die Inkubation der Membranstreifen mit den im Blockierungspuffer gelösten primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C. Die Bedingungen für die entsprechenden Antikörper sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Beim immunologischen Nachweis wurden die Proben auf die folgenden Antigene analysiert: β -Aktin als Ladungs- und Transfer-Kontrolle, eNOS, ALDH-2 und Cox-2. Vor der Inkubation der Membranstreifen mit dem sekundären Antikörper wurden vier Waschschrte mit Waschpuffer für 5 Minuten durchgeführt. Der sekundäre Antikörper (GAM-POX oder GAR-POX) ist speziesspezifisch für den primären Antikörper. An ihn ist eine Peroxidase gekoppelt, die eine Spaltung von Wasserstoffperoxid in einer Chemilumineszenzreaktion bewirken kann. Für 1,5 Stunden wurden die

Membranstreifen mit dem im Blockierungspuffer gelösten sekundären Antikörper inkubiert. An diesen Schritt schloss sich ein erneuter, wie oben beschriebener Waschvorgang an. Der Nachweis und die Quantifizierung von positiven Banden erfolgte durch das für Chemilumineszenz geeignete Substrat im Super Signal ECL-Kit. Zur Übersicht werden unter Kapitel 6.1.3, Tabelle 6.2 alle primären und sekundären Antikörper dargestellt, die hier verwendet wurden.

6.2.5.5. Densitometrische Auswertung der Western-Blots

Nach Zugabe der ECL-Reagenz wurde die durch die Peroxidase erzeugte Chemilumineszenz in einer Dunkelkammer mit einer PC-gekoppelten Detektionskamera (ChemiLux Imager) aufgezeichnet. Die Belichtungszeiten wurden entsprechend der besten Beurteilbarkeit der Proteinbanden gewählt. Mit der Software Gel-Pro-Analyzer 3.0[®] wurden die optischen Dichten der einzelnen Banden densitometrisch bestimmt. Mithilfe dieser Grauwerte konnten die relativen Unterschiede der Expression einzelner Proteine aus den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (C57BL/6 ohne Lärmexposition) untersucht werden. β -Actin wird ubiquitär als Strukturprotein exprimiert und deswegen fungierte es als Ladungskontrolle. Um potentielle Unterschiede durch ungleiche Proteinmengen zu kompensieren, wurden die Grauwerte jeder Gruppe mit dem entsprechenden Normierungswert der Ladungskontrolle abgeglichen.

6.2.5.6 Entfernen von Antikörpern von einer Membran – „Stripping“

Da das β -Aktin als Ladungskontrolle und die ALDH-2 aufgrund ihrer nah beieinander liegenden Größe auf einem Membranstreifen lokalisiert sind (42 bzw. 52 kDa, siehe auch Tabelle 6.2) müssen die immunologischen Antikörper-Reaktionen nacheinander durchgeführt werden, was eine Entfernung des ersten Antikörpers (ALDH-2) erforderlich macht („Stripping“). Proteine, die nach einem Western-Blot auf einer Nitrozellulosemembran gebunden sind, können somit ein weiteres Mal mit einem anderen Antikörper inkubiert werden.

Für das sogenannte „Stripping“, also das Entfernen von Antikörpern von einer Membran, wurden die entsprechenden Membranstreifen mit Strippingpuffer (Kapitel 6.1.1.1.) in ein wasserdichtes Gefäß gegeben. Das verschlossene Gefäß wurde für 45 Minuten bei 55 °C im Wasserbad leicht geschaukelt. Hiernach waren alle zuvor gebundenen Antikörper abgelöst und die Membran wurde über 30 Minuten wiederholt mit Waschpuffer gründlich gewaschen.

Die Western-Blot-Experimente wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau [REDACTED] (Biotechnologin BSc, PhD) durchgeführt.

6.2.6. Bestimmung der ALDH-2-Aktivität mittels HPLC

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch high performance liquid chromatography, HPLC) ist eine analytische Methode in den Naturwissenschaften. Die HPLC ist ein chromatographisches Verfahren, mit dem man nicht nur Stoffgemische trennt, sondern die einzelnen Bestandteile auch über Standards identifizieren und quantifizieren kann. Das zu untersuchende Stoffgemisch wird zusammen mit einem Laufmittel (der mobilen Phase) durch eine sogenannte Trennsäule gepumpt, welche die stationäre Phase enthält. Wechselwirkt ein Bestandteil des zu untersuchenden Stoffgemisches stark mit der stationären Phase, verbleibt er relativ lange in der Säule. Wechselwirkt er hingegen schwach mit der stationären Phase, verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile des Stoffgemisches zu verschiedenen Zeiten am Ende der Trennsäule, wo sie dann mit einem geeigneten Detektor (meist UV/Vis oder Fluoreszenz) nachgewiesen werden können.

6.2.6.1. Mitochondrienisolation und Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Bestimmung der Aktivität des ALDH-2-Enzyms wurden zunächst die Mitochondrien isoliert wie zuvor beschrieben (285). Kurz zusammengefasst wurden die Leberproben in HEPES-Puffer homogenisiert und bei 1500 g für 10 Minuten bei 4 °C und bei 2000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Pellets wurden verworfen. Anschließend wurde der Überstand bei 20000 g für 20 Minuten zentrifugiert und das Mitochondrien-Pellet wurde in 1 ml HEPES-Puffer resuspendiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde dann in 1 ml Tris-Puffer resuspendiert.

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte durch die photometrische Farbumschlagmessung basierend auf zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen mit Kupfer und Folin modifiziert nach Lowry (289, 290). Der erste Schritt beruht auf der Bildung eines Farbstoffkomplexes zwischen den Peptidbindungen und dem zweiwertigen Kupfer in einer alkalischen Kupfertartratlösung. In einem zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das Folin-Reagenz, wodurch es zu einem weiteren Farbumschlag kommt. Wegen der zweiten zusätzlichen Farbreaktion ist die Lowry-Methode wesentlich empfindlicher und die Nachweisgrenze wird um den Faktor 100

gesenkt. Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie genutzt.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die zu messenden Proben in 0,1 % SDS für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 1,5 ml Reagenz A und 30 µl Reagenz S (DC Protein Assay Kit aus BioRad Laboratories) gemischt. Anschließend wurden 125 µl dieser Mischung in Küvetten vorgelegt und 25 µl der Probe sowie 1000 µl Reagenz B zugegeben. Als Leerwert wurde Tris-DTT-Puffer verwendet. Die Proben wurden kurz vermischt, für 10 Minuten dunkel inkubiert und dann erfolgte die Proteinbestimmung mittels Extinktionsmessung bei 700 nm mit dem Photometer Helios alpha.

6.2.6.2. HPLC-Aktivitätsmessung

Die Mitochondrienfraktion (Gesamtprotein ca. 5-10 mg/ml, ermittelt mittels Lowry) wurde auf Eis aufbewahrt und auf ca. 1 mg/ml Protein in 0,25 ml PBS verdünnt. Dann folgte die Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Messung der ALDH-2-Aktivität in isolierten Leber-Mitochondrien wurde zusätzlich die Umwandlung des spezifischen ALDH-2-Substrats 2-Hydroxy-3-nitro-benzaldehyd zur Benzoesäure über 60 Minuten bei 37 °C mit einer HPLC-Analyse bei Absorption von 360 nm detektiert. Nach der obigen Behandlung der Lebermitochondrien wurde 2-Hydroxy-3-nitro-benzaldehyd (100 µM) zugegeben, und die Proben wurden weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden weiterhin beschallt und bei 20000 g bei 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Größenausschluss-zentrifugation über einen 10 kDa-Filtereinsatz aufgereinigt, so dass nur Bestandteile <10 kDa im Eluat zu finden waren. Von jeder Probe wurden 50 µl einer HPLC-Analyse unterzogen. Das System bestand aus einem HPLC-System von Jasco und einer C18-Nukleosil 125×4 100-3 Umkehrphasen-Säule. Die mobile Phase bestand aus Lösungsmittel A (50 mM Zitronensäure pH 2,2) und Lösungsmittel B (Acetonitril (90 v/v %) und Wasser (10 v/v %)). Das Substrat und seine Produkte wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min unter Verwendung eines Gradienten (0 min: 25 % B; 7 min: 50 % B; 8 min: 100 % B; 9 min: 25 % B; 11 min: 25 % B) eluiert, durch ihre Absorption bei 360 nm detektiert und mit internen und externen Standards (2-Hydroxy-3-nitro-benzoesäure und 2-Hydroxy-3-nitro-benzaldehyd) quantifiziert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µM Benomyl, einem unspezifischen ALDH Inhibitor, gestoppt. Die

typischen Retentionszeiten betragen jeweils 2,4 Minuten (2-Hydroxy-3-nitrobenzoesäure) und 3,7 Minuten (2-Hydroxy-3-nitro-benzaldehyd).

Daneben wurde die Aktivität von ALDH-2 in isolierten Lebermitochondrien anhand der Umwandlung des unspezifischen ALDH-Substrats 6-Methoxy-2-naphthylaldehyd (Monal 62, 100 µM) zur fluoreszierenden Naphthoesäure über 30 Minuten bei 37 °C durch eine HPLC-basierte Methode (Ex 310 nm/Em 360 nm) untersucht und mit internen und externen Standards (6-Methoxy-2-naphthylaldehyd und 6-Methoxy-2-naphthoesäure) quantifiziert (176). Von jeder Probe wurden 50 µl einer HPLC-Analyse unterzogen. Das System bestand aus einem HPLC-System von Jasco und einer C18-Nukleosil 125×4 100-3 Umkehrphasen-Säule. Die mobile Phase bestand aus Lösungsmittel A (50 mM Zitronensäure pH 2,2) und Lösungsmittel B (Acetonitril (90 v/v %) und Wasser (10 v/v %)). Das Substrat und seine Produkte wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min unter Verwendung eines Gradienten (0 min: 40 % B; 8 min: 60 % B; 8-10 min: 100 % B; 11 min: 40 % B) eluiert. Die typische Retentionszeit für 6-Methoxy-2-naphthoesäure betrug 5,6 Minuten.

6.2.7. Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwert plus/minus Standardabweichung (SD) dargestellt. Zum Vergleich der Konzentrations-Relaxationskurven im Organbad wurde die zweifache Varianzanalyse ANOVA mit Bonferronis Korrektur für den Vergleich mehrerer Mittelwerte verwendet (Prism für Windows, Version 7.01, GraphPad Software Inc.). Mithilfe des T-Tests wurden zwei Gruppen in der ALDH-2-Aktivitätsbestimmung verglichen. Zur Darstellung der restlichen Ergebnisse wurden entweder die einfache Varianzanalyse ANOVA zusätzlich mit Tukey-Korrektur für den Vergleich mehrerer Mittelwerte, oder, wenn möglich, der entsprechende nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test (Dunns multiple Mittelwertvergleiche) verwendet (Prism für Windows, Version 7.01, GraphPad Software Inc.). Die Tests für die Gleichheit der Varianz und die Normalverteilung wurden mit SigmaStat für Windows (Version 3.5, Systat Software Inc.) berechnet. Definitionsgemäß wurden nur p-Werte <0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

7. ERGEBNISSE

7.1. Vaskuläre Funktion

Die vier unterschiedlichen Gruppen von Tieren wurden dem Fluglärm nach dem beschriebenen Lärmprotokoll vier Tage lang ausgesetzt. Um die Relaxationsfähigkeit der Aorten zu untersuchen, wurden diese im Organbad zunächst mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ vorkonstringiert. Acetylcholin wurde zur Beurteilung der endothelabhängigen Relaxation verwendet und Nitroglyzerin zur Beurteilung der endothelunabhängigen Relaxation. Die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven wurden im Organbad digital registriert und grafisch dargestellt.

7.1.1. Endothelabhängige Relaxation

Der $\cdot\text{NO}/\text{cGMP}$ -Signalweg ist maßgeblich für die endothelabhängige Relaxation verantwortlich. Deswegen gibt die Dilatation des Gefäßes auf Acetylcholin darüber Auskunft, ob die Endothelfunktion eingeschränkt ist.

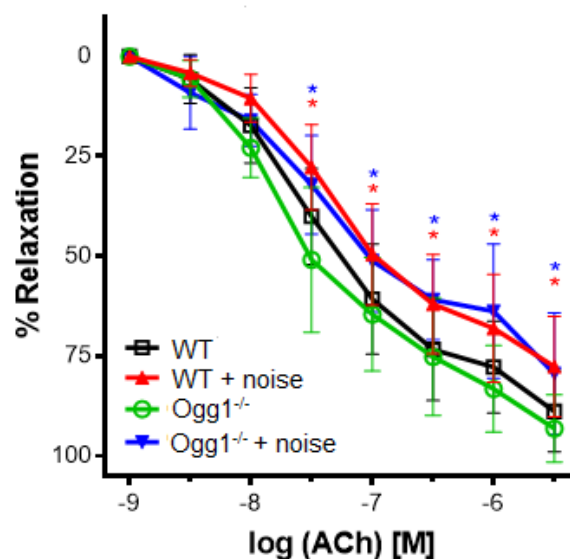


Abbildung 7.1 Isometrische Spannungsmessung nach Acetylcholin-Zugabe zum Einfluss von Lärmexposition auf die endothelabhängige Relaxation bei Wild-Typ und OGG1-Defizienz.

Die Gefäßfunktion wurde durch isometrische Spannungsmessung im Organbad ermittelt und die Relaxation durch Acetylcholin induziert. Hierdurch lässt sich die endothelabhängige Gefäßfunktion messen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von Aortenringen von $n=17$ WT, 15 WT+Lärm, 6 Ogg1^{-/-}, 14 Ogg1^{-/-}+Lärm Tieren pro Gruppe.

* $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition bei der gleichen Acetylcholin-Konzentration.

Sowohl in der Gruppe der Wildtyp-Mäuse als auch in der Gruppe der Tiere mit OGG1-Defizienz wurde ersichtlich, dass die Lärmexposition zu einer signifikanten Verschlechterung der Endothelfunktion führte. Die Relaxationsfähigkeit der Aorten von beiden Gruppen durch Acetylcholin war erheblich eingeschränkt, allerdings ohne Unterschied zwischen den beiden Stämmen (Abbildung 7.1). Bei den beiden Kontrollgruppen, d. h. bei Wild-Typ und OGG1-Defizienz ohne Lärmexposition war die Relaxationsfähigkeit der Aorta gut erhalten und es gab folglich keinen Unterschied im Hinblick auf die endothelabhängige Relaxation.

7.1.2. Endothelunabhängige Relaxation

Im Organbad wurde auch die endothelunabhängige Relaxation untersucht, indem die Änderungen des Gefäßtonus durch Zugabe von Nitroglyzerin beobachtet wurden. Wie schon bei den Untersuchungen zur endothelabhängigen Relaxation wurden die Aortenringe durch Inkubation mit Prostaglandin F₂α vorkontrahiert. Im Folgenden wurde die Reaktion der Gefäße auf kumulative Nitroglyzerin-Dosen untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass in der Versuchsgruppe mit OGG1-Defizienz plus Lärmexposition eine signifikant verschlechterte endothelunabhängige Relaxation vorliegt (Abbildung 7.2). Interessanterweise wurde keine Beeinträchtigung der GTN-abhängigen Vasodilatation in den restlichen Versuchsgruppen beobachtet und vor allem nicht in der lärmexponierten WT-Gruppe, was auf das Vorliegen einer Nitrattoleranz bei OGG1-Defizienz unter gleichzeitiger Lärmexposition hinweist.

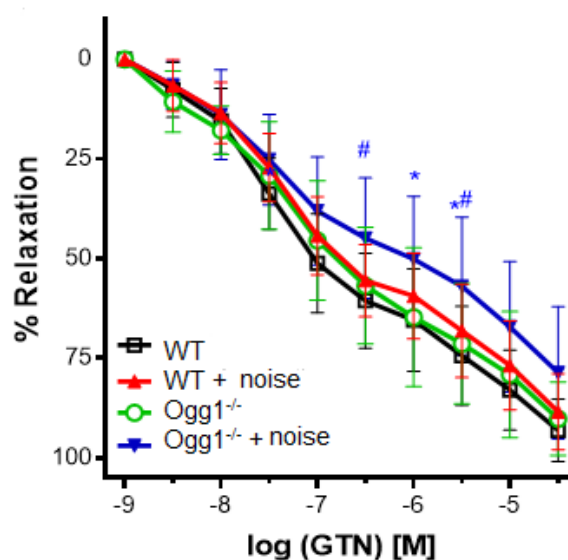


Abbildung 7.2 Isometrische Spannungsmessung nach Nitroglyzerin-Zugabe zum Einfluss von Lärmexposition auf die endothelabhängige Relaxation bei Wild-Typ und OGG1-Defizienz.

Die Gefäßfunktion wurde durch isometrische Spannungsmessung im Organbad ermittelt und die Relaxation durch Nitroglyzerin induziert. Hierdurch lässt sich die endothelunabhängige Gefäßfunktion messen. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von Aortenringen von n= 7 WT, 15 WT+Lärm, 6 Ogg1^{-/-}, 14 Ogg1^{-/-}+Lärm Tieren pro Gruppe.

*p < 0,05 vs. WT ohne Lärmexposition bei der gleichen GTN-Konzentration; #p < 0,05 vs. WT mit Lärmexposition bei der gleichen GTN-Konzentration.

Die Aldehyddehydrogenase (ALDH2) ist ein Schlüsselenzym in der Aktivierung hochpotenter organischer Nitrate wie Nitroglyzerin. Um zu ermitteln, ob die Ursache für die ausbleibende Relaxation des Gefäßes in der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe in einer Störung der ALDH-2-Aktivität oder in der Expression des Enzyms liegt, wurde die ALDH-2 näher mit Western-Blot und mittels HPLC untersucht, was im Abschnitt 7.2. erläutert wird.

7.2. Untersuchung der ALDH-2-Funktion

Zur näheren mechanistischen Betrachtung der obigen Befunde hinsichtlich der beeinträchtigten Vasodilatation bei der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe wurden die Expression der ALDH-2 mit Western-Blot sowie die Aktivität des Enzyms mittels HPLC im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

7.2.1. Expression von ALDH-2-Protein in Herz- und Aortengewebe

Zur Quantifizierung der Expression der Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) in Aorta und Herz wurde ein spezifischer Antikörper im Western-Blot verwendet, wie unter 6.2.5 beschreiben. Im Aortengewebe konnte festgestellt werden, dass ALDH-2 ausschließlich in der lärmbelasteten Ogg1^{-/-}-Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe signifikant hochreguliert wurde; tendentiell auch gegenüber der Ogg1^{-/-}-Kontrollgruppe und der lärmbelasteten WT-Gruppe (Abbildung 7.3 (A)). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich im Herzgewebe. Hier stellte sich heraus, dass die Expression von ALDH-2 durch Lärm und unter OGG1-Defizienz sowohl im Verhältnis zur WT-Kontrollgruppe als auch im Verhältnis zur beschallten WT-Gruppe signifikant erhöht war (Abbildung 7.3 (B)). Die Proteinexpression der anderen Gruppen war auf dem Niveau der WT-Kontrollgruppe.

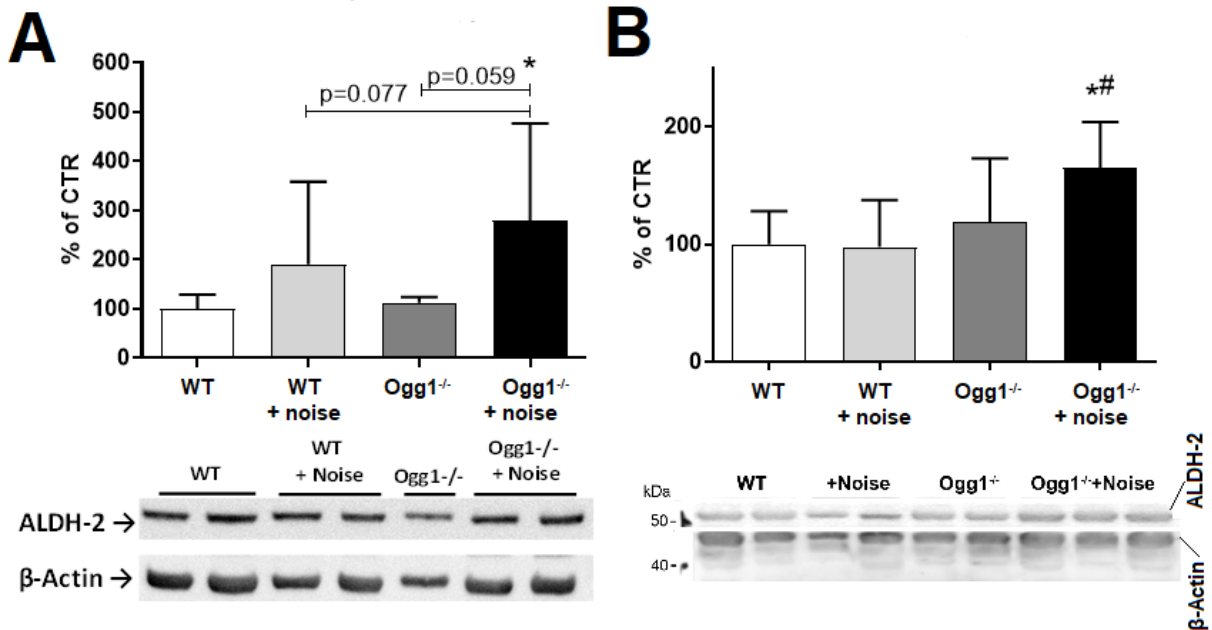


Abbildung 7.3 Lärmeffekte auf die Proteinexpression von ALDH-2.

Die Expression der ALDH-2 wurde mithilfe von Western-Blot im Aortengewebe (A) und im Herzgewebe (B) untersucht. Repräsentative Western-Blots sind unter der densitometrischen Auswertung dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von mindestens 4 Tieren pro Gruppe.

* $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition; # $p < 0,05$ vs. WT mit Lärmexposition; ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

7.2.2. Bestimmung der ALDH-2-Aktivität im Lebergewebe mittels HPLC

Um nähere Hinweise über die ALDH-2-Aktivität zu erlangen, wurden isolierte Mitochondrien aus Lebergewebe mittels HPLC untersucht. In der Versuchsanordnung mit Monal verringerte sich die Aktivität der ALDH-2 signifikant in den lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Mäusen im Verhältnis zur WT-Kontrollgruppe (Abbildung 7.4 (A)). Unter der Zugabe von 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd ließ sich eine tendentielle Abnahme der ALDH-2-Aktivität in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe (Abbildung 7.4 (B)) feststellen.

In Korrelation zu den zuvor dargestellten Ergebnissen aus den Organbadstudien bezüglich der gestörten Nitroglycerin-abhängigen Vasodilatation lässt sich eine inhibitorische posttranslationale Modifikation der ALDH-2 in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe herausleiten. Der obige Befund im Hinblick auf die Proteinexpression von ALDH-2 weist folglich vermutlich auch auf eine kompensatorische Hochregulation einer dysfunktionalen ALDH-2 bei Lärmbelastung und unter OGG1-Defizienz hin.

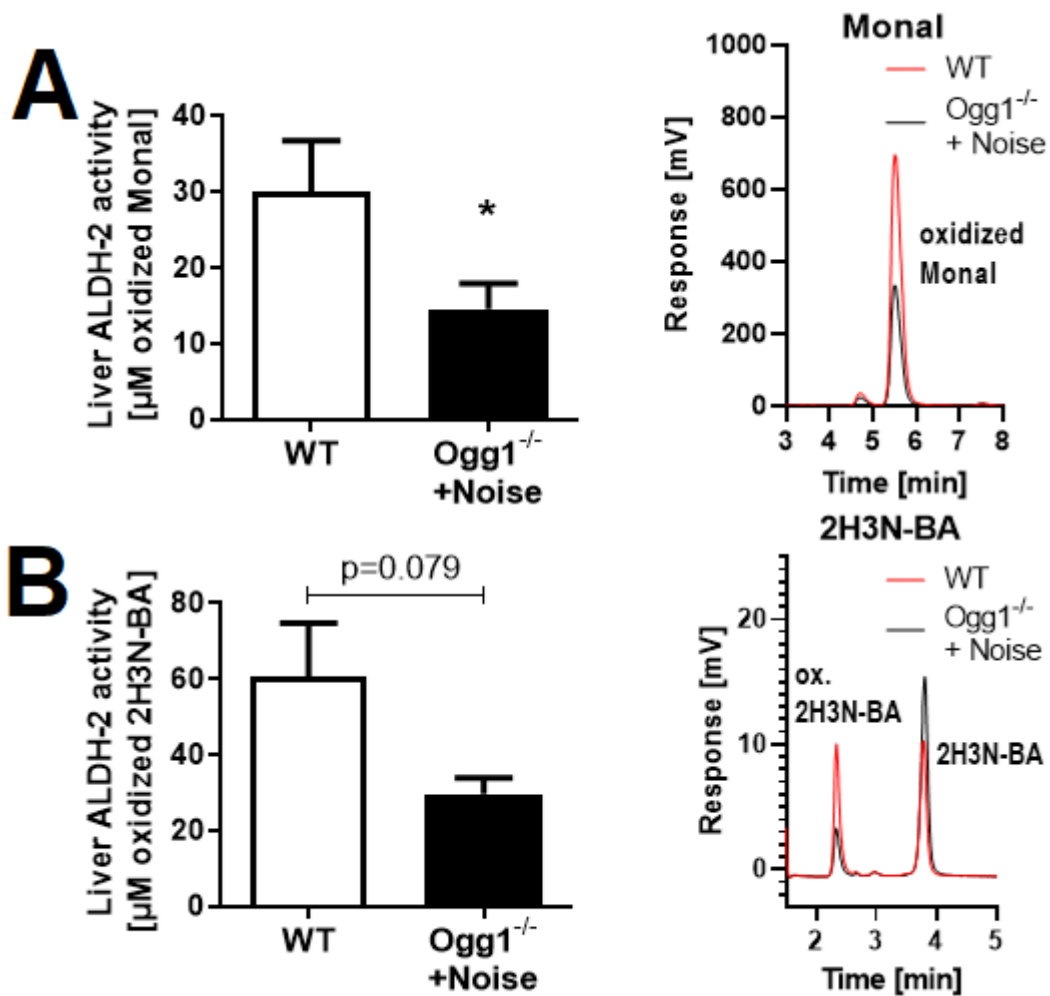


Abbildung 7.4 Lärmeffekte auf die ALDH-2-Aktivität.

Die ALDH-2-Aktivität wurde mittels HPLC unter Zugabe von Monal (A) und 2-Hydroxy-3-nitrobenzaldehyd (B) in isolierten Lebermitochondrien untersucht. Repräsentative Chromatogramme sind neben den Quantifikationsdiagrammen dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von mindestens 4 Tieren pro Gruppe.

* $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition; ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

7.3. Oxidativer Stress im vaskulären Gewebe

7.3.1. Proteinexpression der endothelialen NO-Synthase

Die Expression der 140 kDa großen eNOS in den Aorten der Versuchstiere wurde durch Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper untersucht. In der vorliegenden Studie konnte statistisch signifikant gezeigt werden, dass Lärm zu einem Anstieg der Expression von eNOS im Aortagewebe in Ogg1^{-/-}-Mäusen führt (Abbildung 7.5).

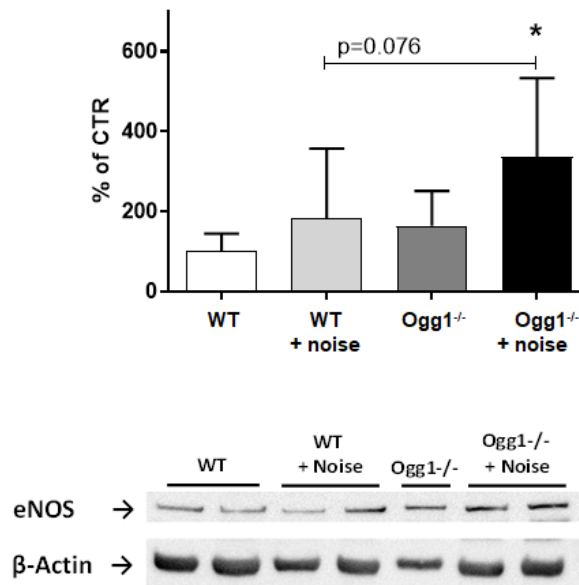


Abbildung 7.5 Lärmeffekte auf die Expression der eNOS im Aortengewebe.

Die Proteinexpression der eNOS im Aortengewebe wurde über Western-Blot mit einem Antikörper gegen eNOS detektiert. Ein repräsentativer Western-Blot ist unter der densitometrischen Auswertung dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von mindestens 4 Tieren pro Gruppe.

* $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition; ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Dieser Befund weist auf eine kompensatorische Hochregulation der eNOS aufgrund einer oxidativen Entkopplung des Enzyms und folglich seiner Dysfunktion hin. Zusätzlich liegt tendentiell eine additive Zunahme der Proteinbiosynthese in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe im Vergleich zur der beschallten WT-Gruppe vor.

7.3.2. Nachweis von 3-Nitrotyrosin im vaskulären Gewebe

Zur Beurteilung des oxidativen Stresses im vaskulären Gewebe wurde die Quantität an 3-Nitrotyrosin-positiven Proteinen bestimmt, indem ein spezifischer Antikörper gegen diese Proteinmodifikation mittels Immunhistochemie eingesetzt wurde. Bezüglich der Produktion von 3-Nitrotyrosin-positiven Proteinen konnte ein signifikanter Unterschied in der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Versuchsgruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe und ein stabiler Trend im Vergleich zur Ogg1^{-/-}-Kontrollgruppe festgestellt werden. Zudem war der 3-NT-Spiegel auch in der beschallten WT-Gruppe im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 7.6).

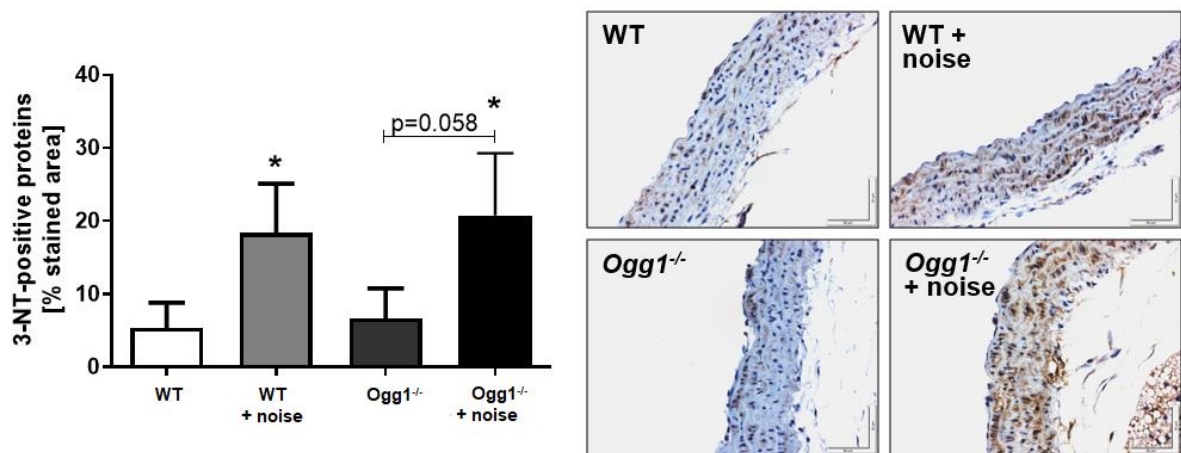


Abbildung 7.6 Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen Markers 3-NT in Aorta.

Lärmeffekte auf die Produktion von 3-Nitrotyrosin-positiven Proteinen wurden mit Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 μ m entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von n=14 WT, 10 WT+Lärm, 4 Ogg1^{-/-}, 10 Ogg1^{-/-}+Lärm.

*p < 0,05 vs. WT ohne Lärmexposition; ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

7.3.3. Nachweis von 4-Hydroxynonenal im vaskulären Gewebe

Als weiterer Marker für oxidativen Stress im vaskulären Gewebe wurde ein spezifischer Antikörper gegen proteingebundenes 4-Hydroxynonenal (4-HNE) verwendet. Die Ergebnisse aus den Immunhistochemie-Analysen, in denen ein 4-HNE-Antikörper verwendet wurde, glichen denen, die schon für 3-Nitrotyrosin-positive Proteine beobachtet werden konnten. In der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe konnte ein zur WT- und Ogg1^{-/-}-Kontrollgruppe signifikant erhöhter Nachweis von 4-HNE festgestellt werden. In der beschallten WT-Gruppe konnte nur ein stabiler Trend im Hinblick von gesteigerter 4-HNE-Produktion im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe registriert werden (Abbildung 7.7).

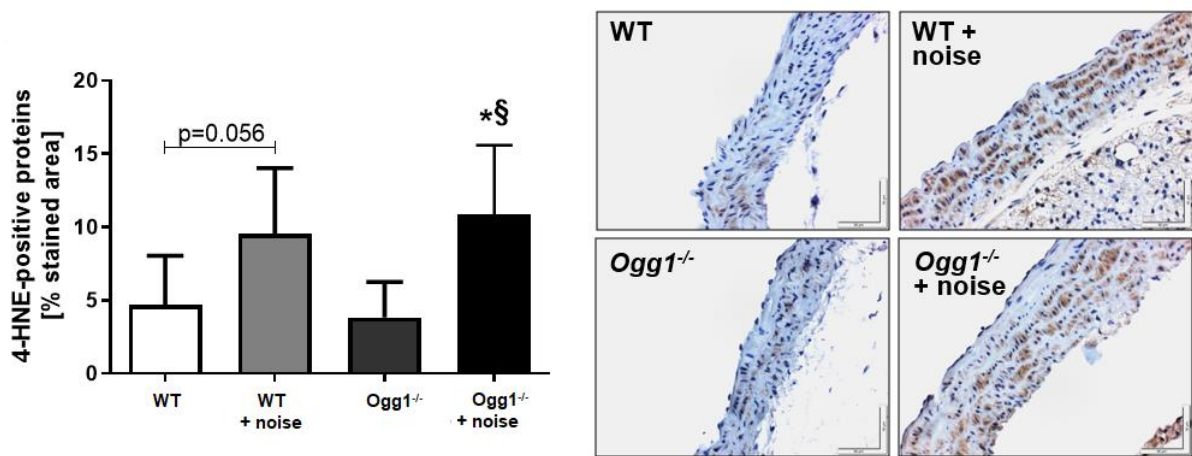


Abbildung 7.7 Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen Markers 4-HNE in Aorta.

Lärmeffekte auf die Produktion von 4-HNE-positiven Proteinen wurden mit Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von 4-12 Tieren pro Gruppe.

*p < 0,05 vs. WT ohne Lärmexposition; §p < 0,05 versus Ogg1^{-/-} ohne Lärmexposition; ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Die Ergebnisse aus den Immunhistochemie-Analysen für die beiden Marker für oxidativen Stress (3-NT und 4-HNE) lassen Rückschlüsse darauf zu, dass sich die Produktion von oxidativem Stress und somit der Nachweis von dessen Markern durch ausschließliche OGG1-Defizienz nicht wesentlich verändert. Es gab folglich keinen Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen. Die zusätzliche Lärmbelastung in beiden Versuchsgruppen hatte hingegen einen signifikanten Einfluss auf die Erzeugung von oxidativem Stress.

7.4. Inflammationsmarker im kardialen und vaskulären Gewebe

7.4.1. Nachweis des oxidativen und inflammatorischen Markers NOX-2 in Aortengewebe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von Immunhistochemie der oxidative und gleichzeitig inflammatorische Marker Nox-2 in der Aorta detektiert. In Kohärenz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen wurden auch hier erhöhte Spiegel der phagozytären NADPH-Oxidase (Nox-2) in der Aorta in beiden lärmexponierten Tiergruppen identifiziert, d. h. in der beschallten WT-Gruppe als auch in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe, wie es in der Abbildung 7.8 dargestellt ist.

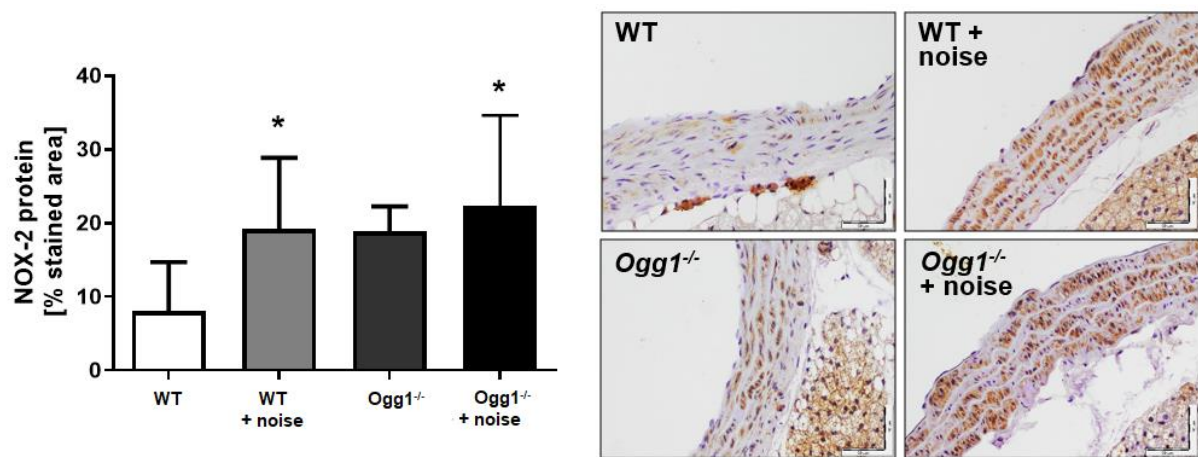


Abbildung 7.8 Immunhistochemischer Nachweis des oxidativen und inflammatorischen Markers NOX-2 in Aorta.

Lärmeffekte auf die Expression von NOX-2-Proteinen wurden mit Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte ± SD von 4-14 Tieren pro Gruppe.

*p < 0,05 vs. WT ohne Lärmexposition.

7.4.2. Nachweis von IL-6 in Aortengewebe

Interleukin-6 (kurz IL-6) gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Interleukine bzw. Zytokine und stellt eine Signalsubstanz des Immunsystems dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von IL-6 im vaskulären Gewebe mit einem spezifischen Antikörper mittels Immunhistochemie untersucht. In der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Versuchsgruppe wurde eine im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe tendentiell gesteigerte Produktion von IL-6 festgestellt. Weder in der Ogg1^{-/-}- noch in der beschallten WT-Gruppe konnte ein signifikanter Unterschied registriert werden (Abbildung 7.9).

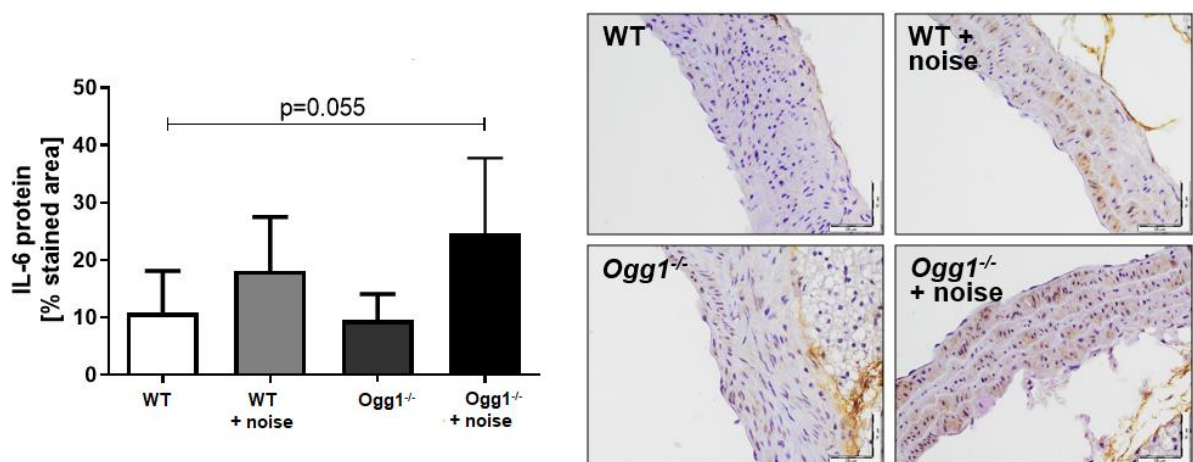


Abbildung 7.9 Immunhistochemischer Nachweis des inflammatorischen Markers IL-6 in Aorta.

Lärmeffekte auf die Produktion von IL-6-Protein wurden mit Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 μ m entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von 4-14 Tieren pro Gruppe.

Ein stabiler Trend ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

7.4.3. COX-2-Protein-Expression

Zur Quantifizierung der Proteinexpression von COX-2 wurde ein spezifischer Antikörper im Western-Blot sowohl im Aorten- als auch im Herzgewebe verwendet. In der *Ogg1*^{-/-}-Versuchsgruppe zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression sowohl im Verhältnis zu den beiden Kontrollgruppen als auch im Verhältnis zur lärmexponierten WT-Gruppe (Abbildung 7.10 (A)). Die vergleichbar signifikant gesteigerte Proteinexpression von COX-2 konnte auch im Herzgewebe festgestellt werden (Abbildung 7.10 (B)).

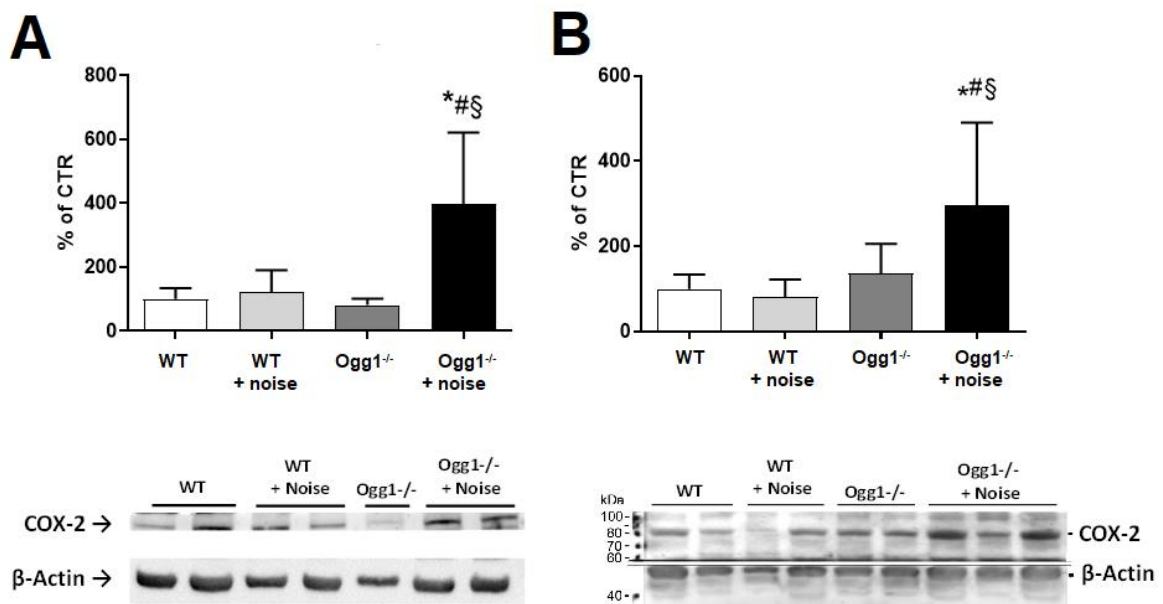


Abbildung 7.10 Lärmeffekte auf die Expression der COX-2 in Aorta (A) und im Herzgewebe (B).

Die COX-2-Proteinexpression im Aorten- und im Herzgewebe wurde über Western-Blot mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Repräsentative Western-Blots sind unter der densitometrischen Auswertung dargestellt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von mindestens 4 Tieren pro Gruppe.

*p < 0,05 vs. WT ohne Lärmexposition; #p < 0,05 vs. WT mit Lärmexposition; §p < 0,05 vs. *Ogg1*^{-/-} ohne Lärmexposition.

7.5. Detektion von DNA-Schäden in der Aorta mittels Immunhistochemie

Zur Detektion von DNA-Schäden wurde ein spezifischer Antikörper gegen 8-OxoGua (8-Oxoguanin) mittels Immunhistochemieanalyse verwendet. Es zeigte sich in der lärmexponierten *Ogg1*^{-/-}-Gruppe ein in Bezug auf die WT-Kontrollgruppe signifikant erhöhtes Signal für 8-oxoGua als Marker für oxidative DNA-Läsionen (Abbildung 7.11). Interessanterweise wurde auch im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der beschallten WT-Gruppe registriert, was darauf hinweist, dass Lärm zu DNA-Schäden führen kann.

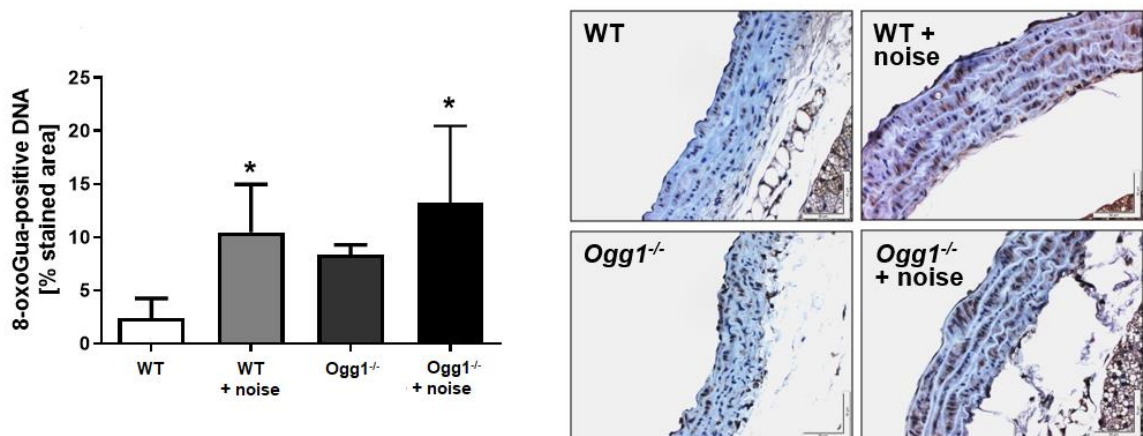


Abbildung 7.11 Immunhistochemischer Nachweis von 8-oxoGua in Aorta.

Lärmeffekte auf die Erzeugung von DNA-Schäden wurden über Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen 8-oxoGua untersucht. Die densitometrische Quantifizierung wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche von der Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von $n = 14$ WT, 10 WT+Lärm, 4 *Ogg1*^{-/-}, 10 *Ogg1*^{-/-} +Lärm. * $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition.

7.6. Nachweis von ET-1, iNOS und GFAP mittels Immunhistochemie im Projekt zu den Effekten der Lärmexposition während der Schlaf-/Wachphase

In der immunhistochemischen Analyse wurde festgestellt, dass die Lärmexposition während der Schlafphase eine gesteigerte vaskuläre Expression von Endothelin-1 (Abbildung 7.12) und eine Erhöhung des Inflammationsmarkers iNOS (Abbildung 7.13) im Aortengewebe induzierte. Dies wurde allerdings nicht bei der Lärmexposition während der Wachphase beobachtet.

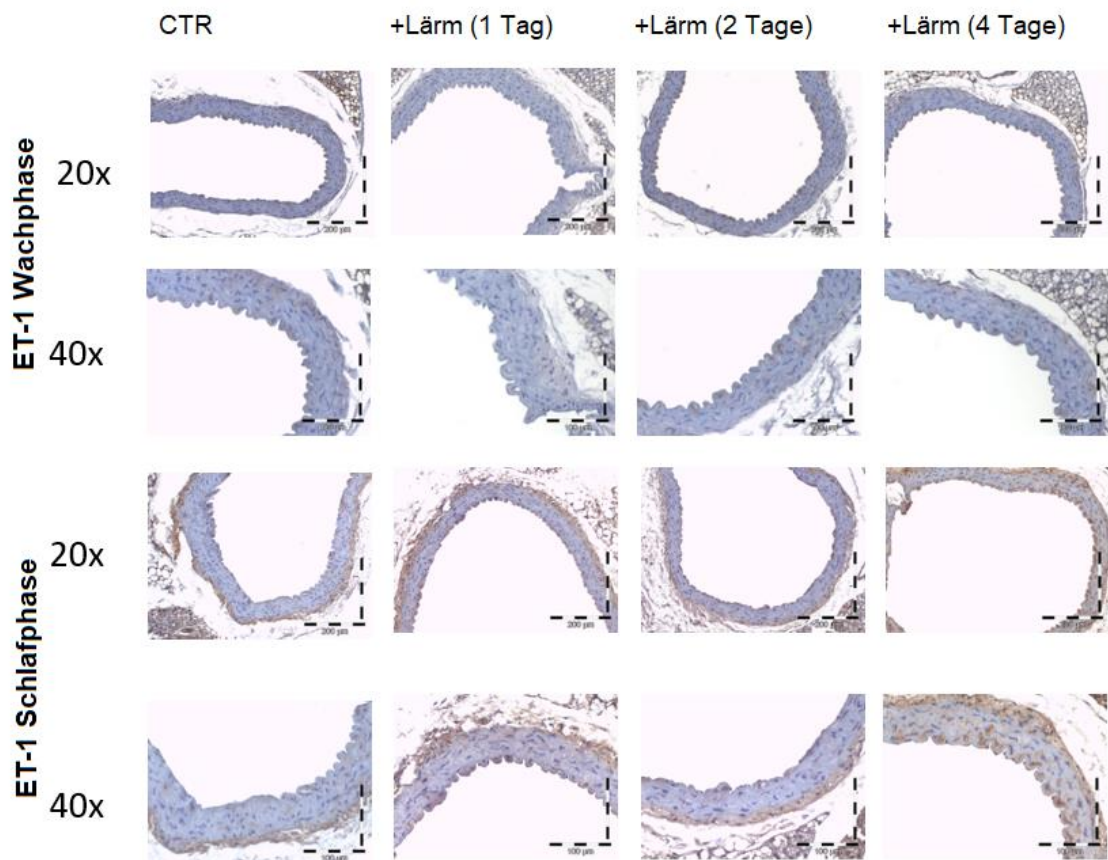
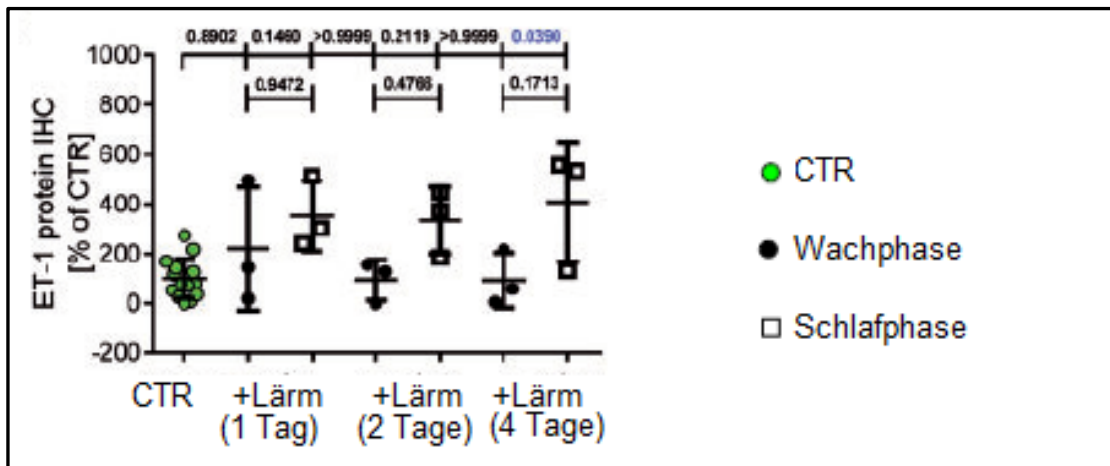


Abbildung 7.12 Immunhistochemischer Nachweis von Endothelin-1 (ET-1) im Aortengewebe.

Lärmeffekte während der Wach- und Schlafphase nach 1, 2 und 4 Tagen auf die Produktion der ET-1 Expression wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind unter der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 20x sowie 40x). Die Daten von n= 6- 8 Tiere pro Gruppe werden in einem Open-High-Low-Chart dargestellt. Die Signifikanz ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben. Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (7).

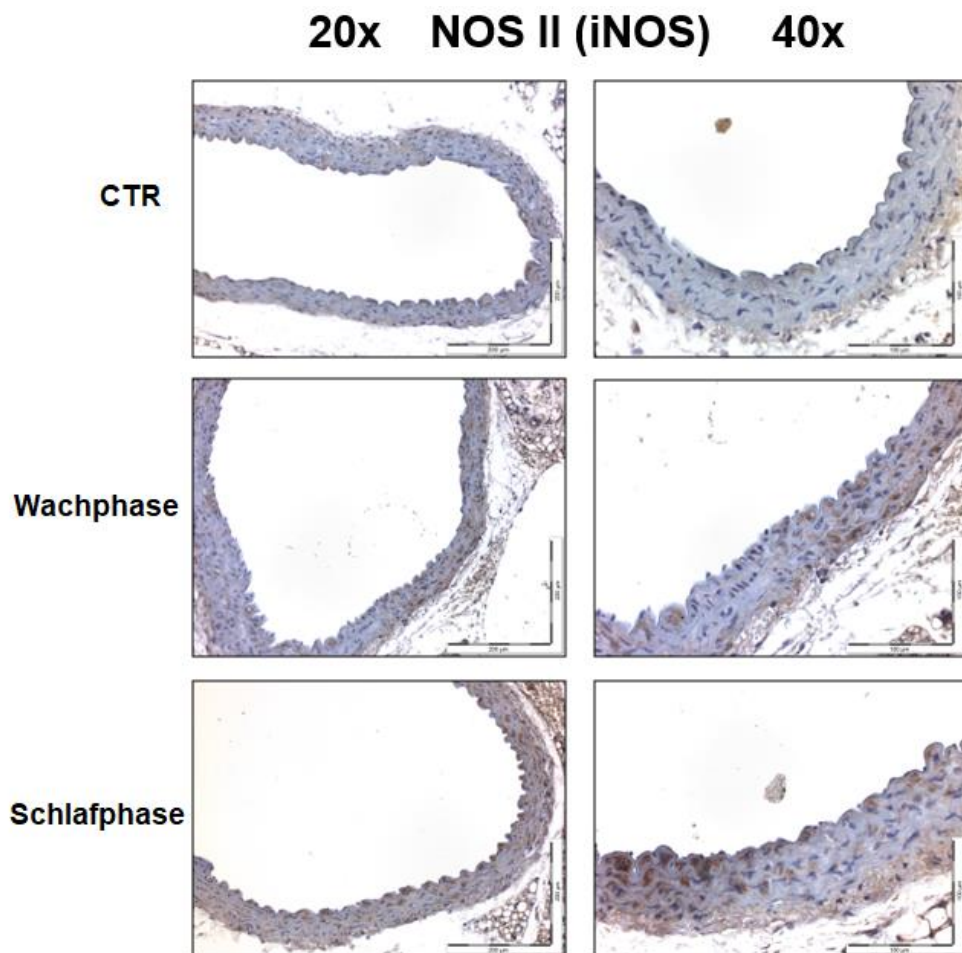


Abbildung 7.13 Immunhistochemischer Nachweis der induzierbaren NO Synthase (iNOS) im Aortengewebe.

Lärmeffekte während der Wach- und Schlafphase nach 4 Tagen auf die Expression der iNOS wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Gefärbte IHC-Bilder sind dargestellt (mit Objektiv 20x sowie 40x), die repräsentativ für n= 3 Mäuse pro Gruppe sind. Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (7).

Der entzündliche und prooxidative Phänotyp im Gehirngewebe der nachts beschallten Mäuse wurde durch vermehrte GFAP-positive astrozytäre Prozesse und Akkumulation von Astrozyten im Corpus Callosum nachgewiesen (Abbildung 7.14) (277, 278).

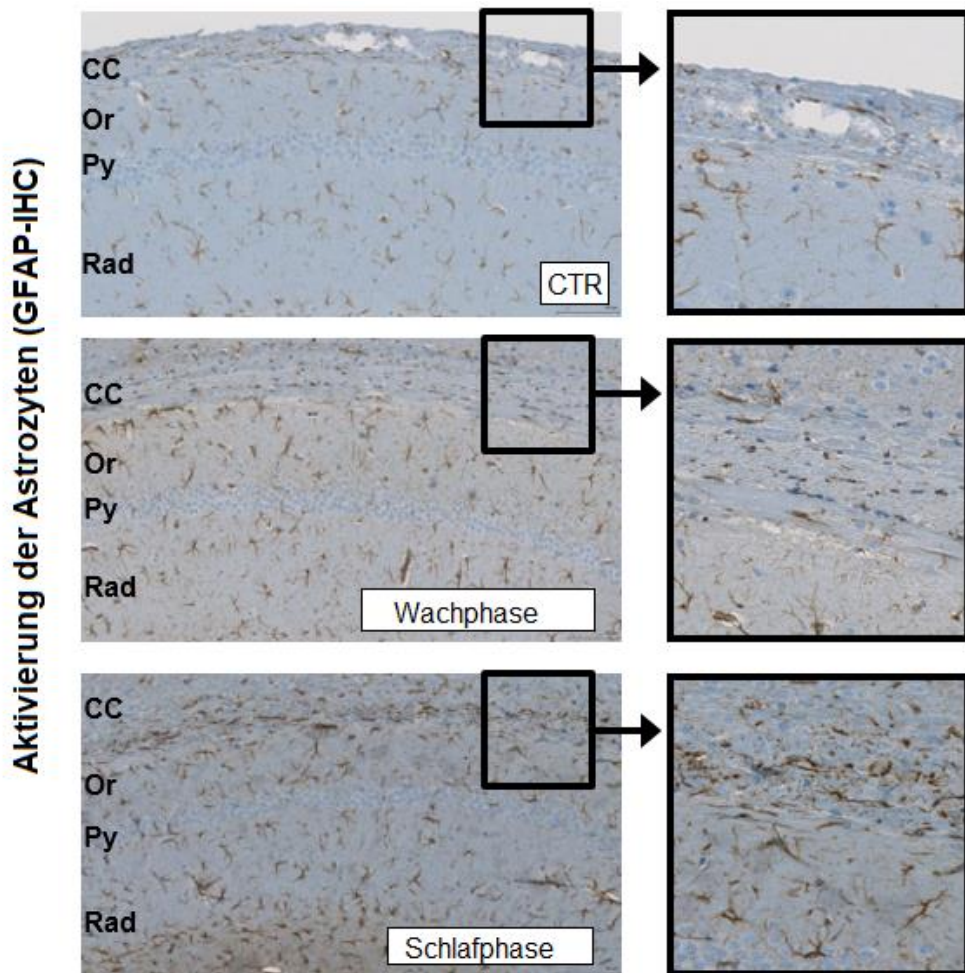


Abbildung 7.14 Immunhistochemischer Nachweis von GFAP-positiven Astrozyten im Hirngewebe.

Lärmeffekte während der Wach- und Schlafphase nach 4 Tagen auf die Aktivierung der Astrozyten wurden mittels Immunhistochemie mit GFAP Färbung untersucht. Gefärbte IHC-Bilder sind repräsentativ für n= 4 Mäuse pro Gruppe. CC: corpus callosum, Or: stratum oriens, Py: stratum pyramidale, Rad: stratum radiatum.

Die Daten wurden in Kooperation mit Frau Dr. Frauenknecht in Zürich erhoben. Aus (7).

7.7. Nachweis von ET-1 und 3-NT mittels Immunhistochemie im Lärm/Hypertonie-Projekt

Die immunhistochemischen Analysen zeigten deutlich erhöhte Spiegel des Vasokonstriktors Endothelin-1 im Aortengewebe bei der beschallten und bei der mit ATII behandelten Gruppe, mit einem Trend für additive Effekte bei der Versuchsgruppe, die beiden Behandlungen unterzogen wurde (Abbildung 7.15). Der Oxidationsmarker 3-Nitrotyrosin war bei allen Versuchsgruppen im Gefäß gesteigert; mit einer potenzierten Verschlechterung in der Gruppe mit ATII-Infusion und Lärmexposition (Abbildung 7.16).

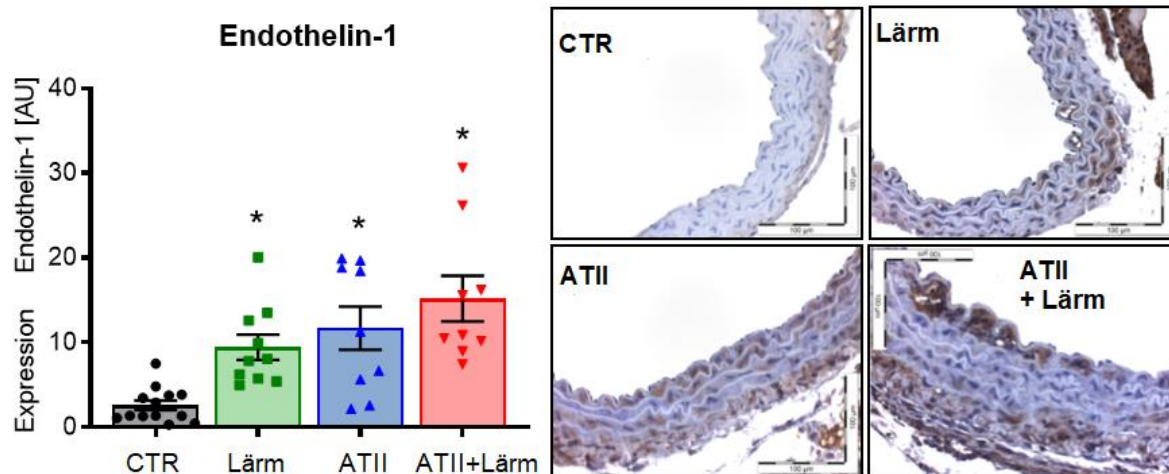


Abbildung 7.15 Immunohistochemischer Nachweis von Endothelin-1 in der Aorta.

Effekte der Lärmexposition und der experimentellen ATII-induzierten Hypertension wurden mit Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen Endothelin-1 untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Abbildung zeigt die Mittelwerte \pm SD von n= 9-13 Mäusen. *p < 0,05 vs. unbehandelte Kontrollgruppe. Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (279).

3-Nitrotyrosin IHC

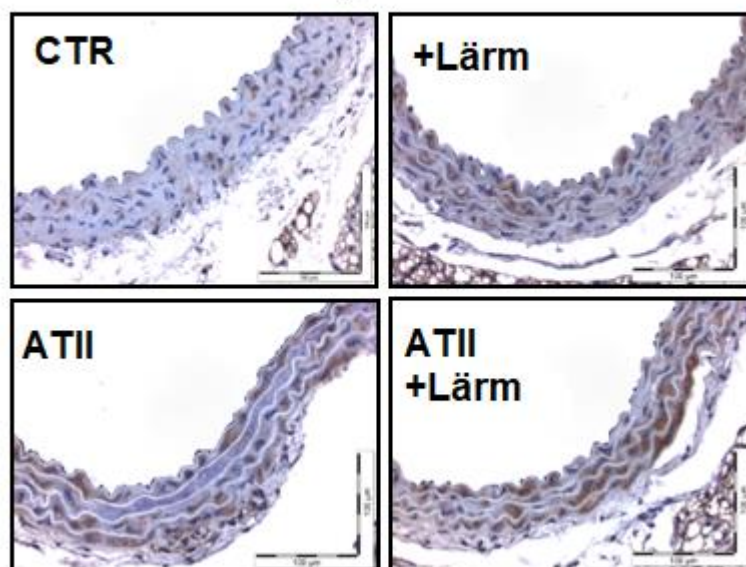


Abbildung 7.16 Immunohistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin in der Aorta.

Effekte der Lärmexposition und der experimentellen ATII-induzierten Hypertension wurden mit Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen 3-Nitrotyrosin untersucht. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder von n= 4 pro Gruppe sind dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der

Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (279).

7.8. Nachweis von 3-NT, ET-1, iNOS und NOX-2 mittels Immunhistochemie im E-Zigaretten-Projekt

Anhand der immunhistochemischen Analyse wurde festgestellt, dass Vaping (Exposition mit Dampf von E-Zigaretten) über 3 Tage eine signifikante Steigerung des Markers für oxidativen Stress 3-Nitrotyrosin (3-NT) und des Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) im vaskulären Gewebe bewirkte (Abbildung 7.17). Darüber hinaus steigerte das E-Zigaretten dampfen auch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), das ROS-produzierende Enzym Nox-2 (Abbildung 7.18) und die 4-HNE-Spiegel in der Aorta (Abbildung 7.19). In der Lunge war das Signal des Immunostainings für Nox-2 in der durch Nikotin-haltiges Liquid exponierten Gruppe signifikant erhöht. In der exponierten Gruppe ohne Nikotin wurde lediglich ein Trend beobachtet (Abbildung 7.20).

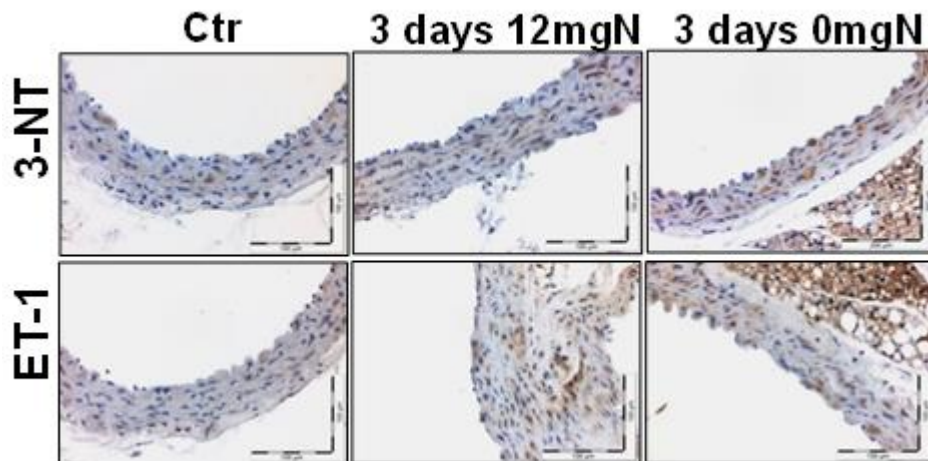
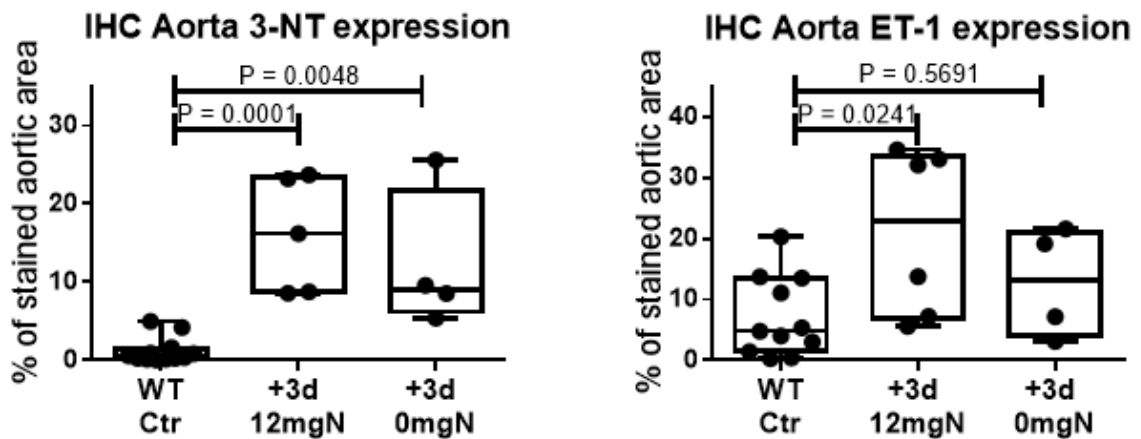


Abbildung 7.17 Immunhistochemischer Nachweis von Nitrotyrosin (3-NT) und Endothelin-1 (ET-1) im Aortengewebe.

Effekte der kurzzeitigen E-Zigarettdampfexposition auf die Bildung von 3-NT- und ET-1-positiven Proteinen wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind unter der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Daten von n= 4-8 Tiere pro Gruppe werden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt (erstes und drittes Quartil; Linie= Median). Die Signifikanz ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Ctr: Kontrollgruppe; 3 days 12 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang plus nikotinhaltige Flüssigkeit; 3 days 0 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang ohne nikotinhaltige Flüssigkeit.

Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (280).

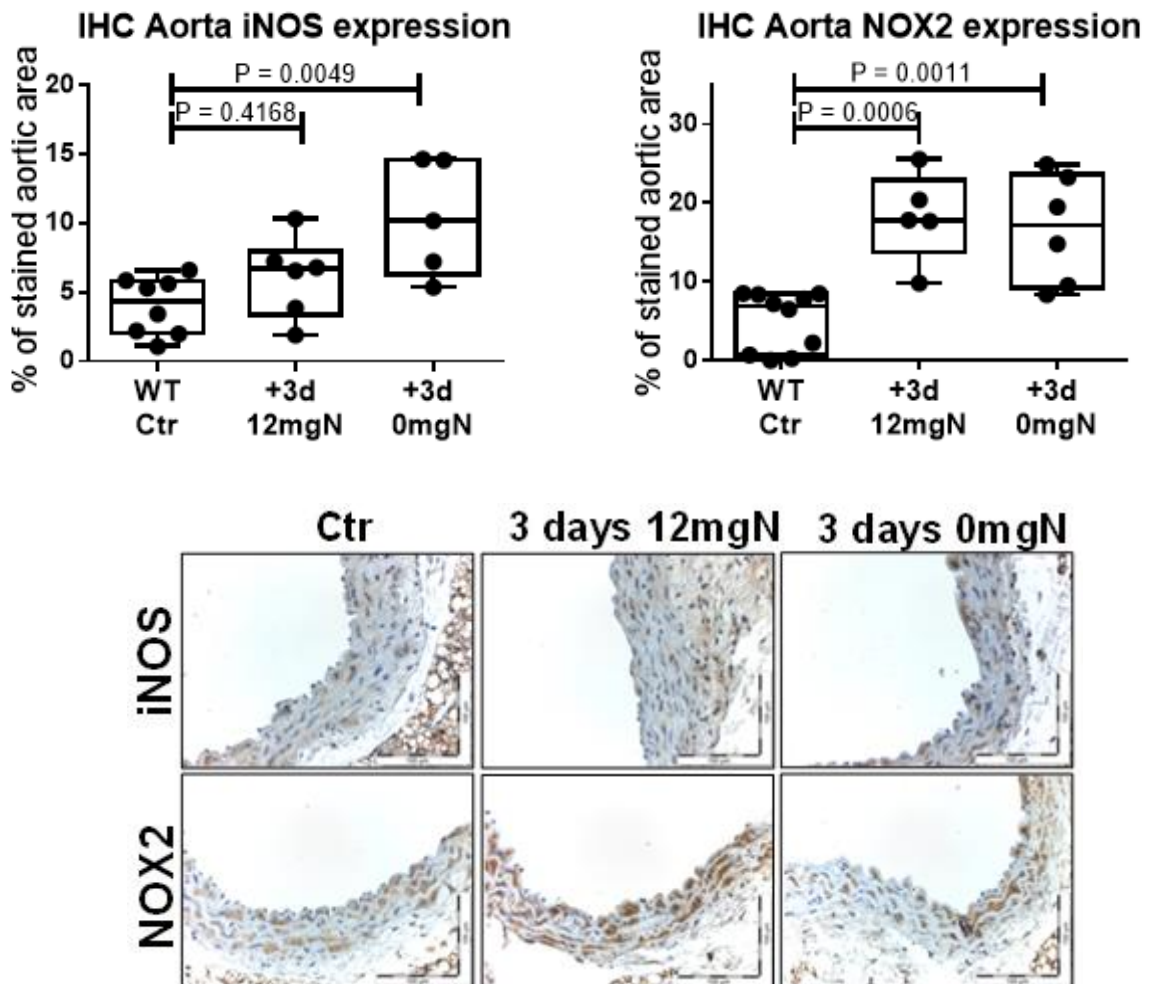


Abbildung 7.18 Immunhistochemischer Nachweis der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und Nox-2 im Aortengewebe.

Effekte der kurzzeitigen E-Zigarettdampfexposition auf die Expression der iNOS und Nox-2 wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind unter der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Daten von n= 5-8 Tiere pro Gruppe werden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt (erstes und drittes Quartil; Linie= Median). Die Signifikanz ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Ctr: Kontrollgruppe; 3 days 12 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang plus nikotinhaltige Flüssigkeit; 3 days 0 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang ohne nikotinhaltige Flüssigkeit.

Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (280).

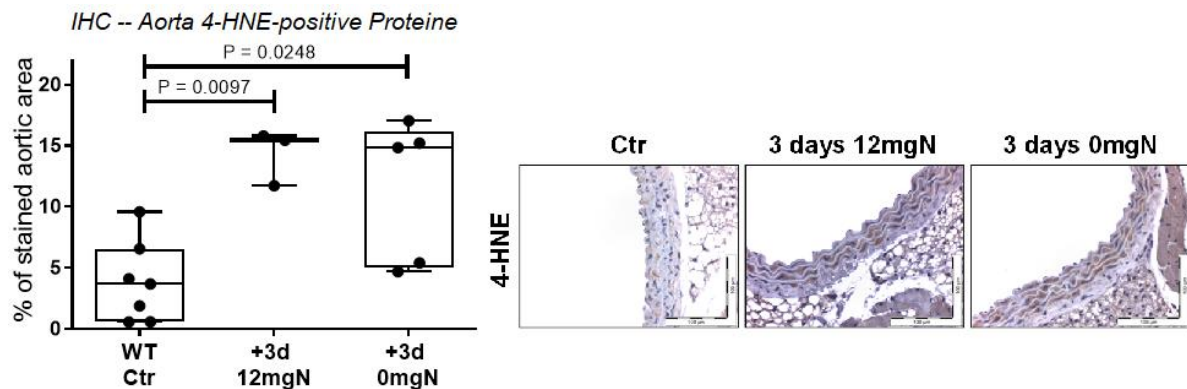


Abbildung 7.19 Immunhistochemischer Nachweis von 4-HNE im Aortengewebe.

Effekte der kurzzeitigen E-Zigarettdampfexposition auf die Konzentrationen des Produkts der Lipidperoxidation 4-HNE wurden mittels Immunhistochemie anhand von 4-HNE-Proteinaddukten untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 µm entspricht). Die Daten von n= 9-12 Tiere pro Gruppe werden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt (erstes und drittes Quartil; Linie= Median). Die Signifikanz ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Ctr: Kontrollgruppe; 3 days 12 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang plus nikotinhaltige Flüssigkeit; 3 days 0 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang ohne nikotinhaltige Flüssigkeit.

Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (280).

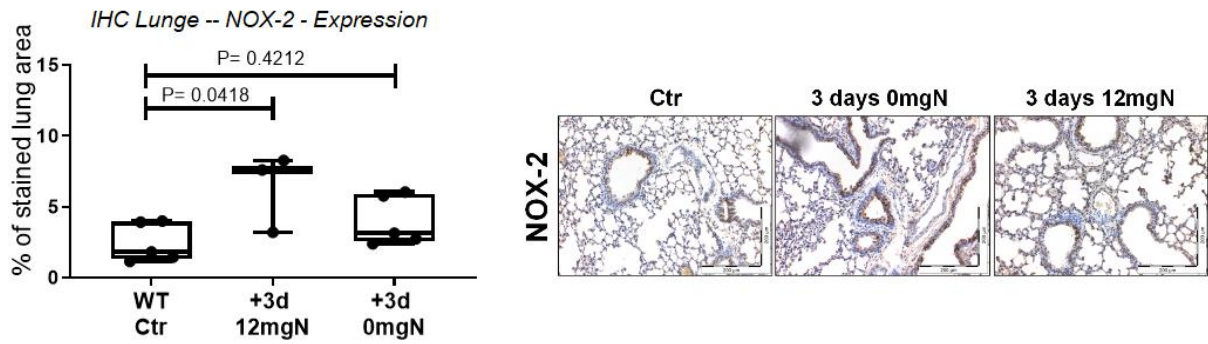


Abbildung 7.20 Immunhistochemischer Nachweis der Nox-2 im Lungengewebe

Effekte der kurzzeitigen E-Zigarettdampfexposition auf die pulmonale Expression der Nox-2 wurden mittels Immunhistochemie untersucht. Die densitometrische Quantifikation wurde über Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Fläche zur Gesamtfläche durchgeführt. Repräsentative gefärbte IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Auswertung dargestellt (mit Objektiv 40x, wobei der Maßstabsbalken 50 μ m entspricht). Die Daten von n= 3-5 Tiere pro Gruppe werden in einem Box-Whisker-Plot dargestellt (erstes und drittes Quartil; Linie= Median). Die Signifikanz ist mit dem entsprechenden p-Wert angegeben.

Ctr: Kontrollgruppe; 3 days 12 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang plus nikotinhaltige Flüssigkeit; 3 days 0 mgN: E-Zigarettdampfexposition 3 Tage lang ohne nikotinhaltige Flüssigkeit.

Diese Daten wurden im Rahmen eines thematisch an das Hauptthema meiner Doktorarbeit (Umwelt/Lebensstil-induzierte kardiovaskuläre Schäden) angelehnten Nebenprojekts von mir erhoben. Aus (280).

8. DISKUSSION

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der vaskulären Konsequenzen der Lärmexposition in einem Tiermodell basierend auf Mäusen mit einer genetischen Defizienz des Reparaturenzyms OGG1. Oxidativer Stress wird als Missverhältnis zwischen der Entstehung radikaler Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies und der Elimination dieser reaktiven Metabolite durch antioxidativ wirksame Moleküle definiert. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion und folglich der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist seit über 30 Jahren bekannt und wurde im Laufe der Jahre durch unterschiedliche Arbeitsgruppen intensiv untersucht. In den folgenden Abschnitten soll diskutiert werden, welche Auswirkungen Fluglärm auf oxidativen Stress, Inflammation und endotheliale Funktion auch in Kombination mit OGG1-Defizienz hatte. Im Rahmen der Promotion hatte ich die Chance, als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie von Univ.-Prof. Dr. [REDACTED] und Univ.-Prof. Dr. [REDACTED] in der Klinik für Kardiologie der Johannes Gutenberg Universität Mainz tätig zu sein. Neben dem Hauptthema der vorliegenden Arbeit habe ich auch an anderen thematisch angelehnten Projekten mitgearbeitet, deren Ergebnisse in den Abschnitten 8.3, 8.4 und 8.7 diskutiert werden.

8.1 Das Exposom-Konzept

Die Risikofaktoren in der physischen und psychosozialen Umwelt gewinnen immer mehr an Bedeutung für die Entstehung und die Pathogenese der nicht-übertragbaren Krankheiten, wobei das neue Forschungsgebiet als Exposom bezeichnet wird. Das Exposom-Konzept wurde zum ersten Mal 2005 detailliert von Christopher P. Wild beschrieben und umfasst die Gesamtheit der externen und internen Expositionen eines Individuums, von der Geburt bis zum Tod (291). Das Exposom und die internen expositionsbedingten biochemischen Veränderungen akkumulieren sich im Laufe des Alterungsprozesses und führen zu erhöhten Gesundheitsrisiken (292). Neben den Umweltstressoren (z. B. Lärmexposition und Luftverschmutzung) definieren auch die verhaltens- oder lebensstilbedingten Faktoren (z. B. Ernährung, Tabakkonsum und physische Aktivität) sowie die generellen Umweltfaktoren (z. B. sozioökonomischer Status, städtische Umwelt, Krankheitserreger, UV-Strahlung und Klima) das Exposom (293). In einem Bericht der Lancet-Kommission 2018 wurden zwischen 9 und 12,6 Millionen vorzeitige Todesfälle weltweit und pro Jahr mit allen Formen der Umweltverschmutzung in Verbindung gebracht (294). In der Abbildung 8.1 ist das Exposom-Konzept gezeigt.

In seiner vollständigen Form erfasst das Exposom-Konzept lebenslange Umweltexpositionen (einschließlich Lebensstilfaktoren) ab der pränatalen Periode. Die Entwicklung zuverlässiger Messinstrumente für die gesamte Expositionsgeschichte stellt eine Herausforderung dar. Im Gegensatz zum Genom ist das Exposom hochvariabel und dynamisch und entwickelt sich im Laufe des Lebens eines Individuums (291). Was üblicherweise in Studien über das Exposom gemessen wird, sind das innere biochemische Milieu, das Transkriptom (einschließlich des Epigenoms), das Proteom und das Mikrobiom. Es werden Korrelationen mit den Umweltfaktoren sowie den gesundheitlichen Outcomes hergestellt, die eine Abschätzung des Beitrags spezifischer oder allgemeiner Umweltfaktoren zu den Gesundheitsrisiken, der Krankheitslast und der Mortalität ermöglichen. Die Kenntnis der inneren biochemischen Umgebung liefert tiefe mechanistische Einblicke in diese Assoziationen und neue Informationen über umweltbedingte Krankheiten und mögliche Überschneidungen mit klassischen metabolischen, kardiovaskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebs (295). Wichtig ist, dass der Einfluss

des Exposoms auf die Entwicklung und das Fortschreiten chronischer Krankheiten sogar größer als der Einfluss der genetischen Prädisposition sein kann (296).

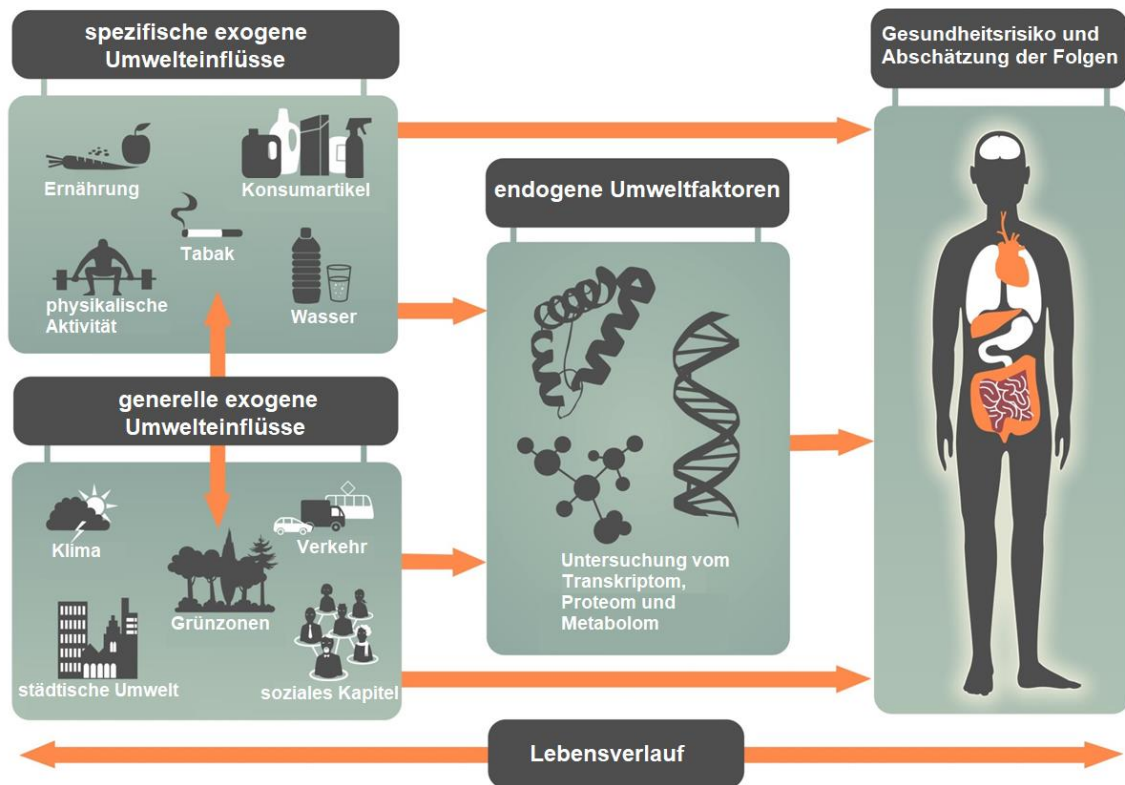


Abbildung 8.1 Das Exposom-Konzept.

Das externe Exposom stellt die Summe aller Umweltexpositionen einschließlich der Verhaltens- und Lebensstilfaktoren dar, während das interne Exposom alle biologischen Veränderungen (d. h. das Expressionsniveau von Biomolekülen) widerspiegelt, die durch Umweltfaktoren ausgelöst werden. Die Forschung bezüglich des Exposom-Konzepts widmet sich der Identifizierung von Zusammenhängen zwischen Umweltexposition und gesundheitlichen Auswirkungen (z. B. Krankheit und Mortalität). Abbildung übersetzt aus (295).

8.2. Verschlechterung der Gefäßfunktion durch Lärm

Das Endothel erfüllt im Rahmen der Gefäßfunktion eine Reihe wichtiger Aufgaben. Der Schwerpunkt dieser Arbeit war insbesondere die Frage nach dem Einfluss vom Lärm auf die Gefäßfunktion. Das Vorhandensein von $\cdot\text{NO}$ ist für eine effiziente Gefäßrelaxation essentiell. Ist die Reaktion des Gefäßes auf Acetylcholin verschlechtert, kann eine Fehlfunktion des Endothels angenommen werden. Ein Mangel an $\cdot\text{NO}$ kann zwei wesentliche Gründe haben: die Synthese durch die eNOS

kann vermindert sein, oder $\cdot\text{NO}$ reagiert nach seiner Synthese mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu ONOO^- und steht dadurch nicht mehr für die Aktivierung der sGC zur Verfügung. Für die Funktionsfähigkeit des Gefäßes sind die endothelabhängige und endothelunabhängige Relaxation interessant. Diese Aspekte der Gefäßfunktion wurden in der vorliegenden Arbeit durch isometrische Spannungsmessungen und die vaskulären Schäden bzw. Veränderungen wurden im weiteren Verlauf mittels Western-Blot und Immunhistochemie untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Befunde der vorangegangenen Studien. Sowohl bei Gesunden als auch bei Probanden mit bekannter KHK beeinträchtigt die Lärmbelastung bereits nach einer Nacht die endotheliale Funktion, steigert die Stresshormonkonzentrationen, verschlechtert die Schlafqualität und erhöht den Blutdruck (52, 53). Insbesondere die endotheliale Dysfunktion in der beschallten Probanden-Gruppe konnte durch Vitamin C korrigiert werden. In Kohärenz zu diesen dargestellten Ergebnissen wurde auch hier nachgewiesen, dass Lärm eine Störung der endothelabhängigen Gefäßfunktion auf Acetylcholin verursachte. Allerdings hatte die Abwesenheit des Reparaturenzyms OGG1 keine additive Auswirkung in diesem Hinblick. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Einschränkung der Endothelfunktion in den lärmausgesetzten Gruppen eher durch den Lärm verursacht wurde.

Die Reaktion des Gefäßes auf Acetylcholin wird als Surrogatparameter für die Funktionsfähigkeit des Endothels angesehen (297). Wie bereits oben erläutert ist die Reaktion des Superoxidradikals $\text{O}_2^{\cdot-}$ mit $\cdot\text{NO}$ ein wesentlicher Faktor, der zur Verminderung der $\cdot\text{NO}$ -Bioverfügbarkeit führt. Das bei dieser Reaktion entstehende Peroxynitrit schränkt den Einfluss des Endothels auf die Steuerung des Gefäßtonus deutlich ein. Die Bildung von Peroxynitrit führt nicht nur zur Verminderung der Bioverfügbarkeit von $\cdot\text{NO}$, es hat auch die Eigenschaft, Enzyme durch Nitrierung an Tyrosinresten oder Oxidation von Cysteinresten zu modifizieren und dadurch ihre Funktion zu ändern. Es ist bekannt, dass es zur Desensitivierung der sGC und Tyrosin-Nitrierung der Prostaglandin- I_2 -Synthase durch Peroxynitrit kommt (146, 298). Letztlich hat das Radikal Peroxynitrit sogar Einfluss auf die NO-Synthase. Indem es BH_4 oxidiert, ist Peroxynitrit in der Lage, die eNOS direkt zu entkoppeln und sie dadurch von der NO-Synthase in eine ROS-Quelle zu verwandeln (299, 300). Im Tiermodell dieser Arbeit ließ sich in den Immunhistochemie-Analysen anhand der 3-NT-Spiegel eine Erhöhung der Peroxynitrit-Konzentrationen unter OGG1-Defizienz durch Fluglärm

zeigen. Im Aortengewebe konnte eine vermehrte Nitrierung an Tyrosinresten festgestellt werden. Die Entkopplung der eNOS ist auch ein Schlüsselmechanismus in der Genese der endothelialen Dysfunktion (301). Bezüglich der Expression der eNOS im Aortengewebe konnten in dieser Arbeit erwähnenswerte Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit Hilfe der Western-Blot Methode festgestellt werden. Lärm führte zu einem Anstieg der Expression von eNOS im Aortengewebe in *Ogg1^{-/-}*-Mäusen (Abbildung 7.5). Dieser Befund weist vermutlich auf eine kompensatorische Hochregulation der eNOS aufgrund der oxidativen Entkopplung des Enzyms und folglich seiner Dysfunktion hin. Zusätzlich liegt tendentiell eine additive Zunahme der Proteinbiosynthese in der beschallten *Ogg1^{-/-}*-Gruppe im Vergleich zur beschallten WT-Gruppe vor.

8.2.1. Redox-Sensitivität der ALDH-2 führt zur Nitrattoleranz

Die vorliegende Arbeit lieferte auch die unerwartete neue Schlüsselerkenntnis, dass die Mäuse mit OGG1-Defizienz eine ausgeprägte Resistenz gegenüber organischen Nitraten unter Fluglärmexposition zeigten, was in den anderen Tiergruppen nicht beobachtet wurde. Die Nitratresistenz im Sinne einer gestörten Nitroglycerin-abhängigen Vasodilatation ist ein häufiges Merkmal bei Diabetikern (302-304), was im erhöhten oxidativen Stress bei diesen Patienten begründet ist (305, 306). Nitroglycerin erfordert eine Bioaktivierung durch die ALDH-2 (169, 307). Ein übermäßiger Metabolismus von Nitroglycerin verursacht jedoch ROS/RNS-Bildung, was zu schwerem nitrooxidativem Stress führt (174, 308). Die ALDH-2 ist ein redox-sensitives Enzym und wird leicht durch Thiol-Oxidation gehemmt (175, 274, 309). Kennzeichen der Nitrattoleranz sind der oxidative Stress, die oxidative Inhibition der ALDH-2 und die daraus resultierende gestörte Bioaktivierung von Nitroglycerin (163, 309). Das Fehlen oder die Inaktivierung der ALDH-2 führt zur Akkumulation von 4-HNE, welches wiederum in der Regel von ALDH-2 entgiftet wird, das eine Herzfunktionsstörung auslösen kann (179, 310) (Abbildung 8.2). Gegenwärtig wird auch diskutiert, ob diese kardiale Dysfunktion pharmakologisch durch den ALDH-2-Aktivator Alda-1 positiv beeinflusst werden kann (311). Diese Situation wird dadurch weiter verschlechtert, dass 4-HNE in hohen Konzentrationen die ALDH-2 inhibiert und so ein Teufelskreislauf entsteht (176).

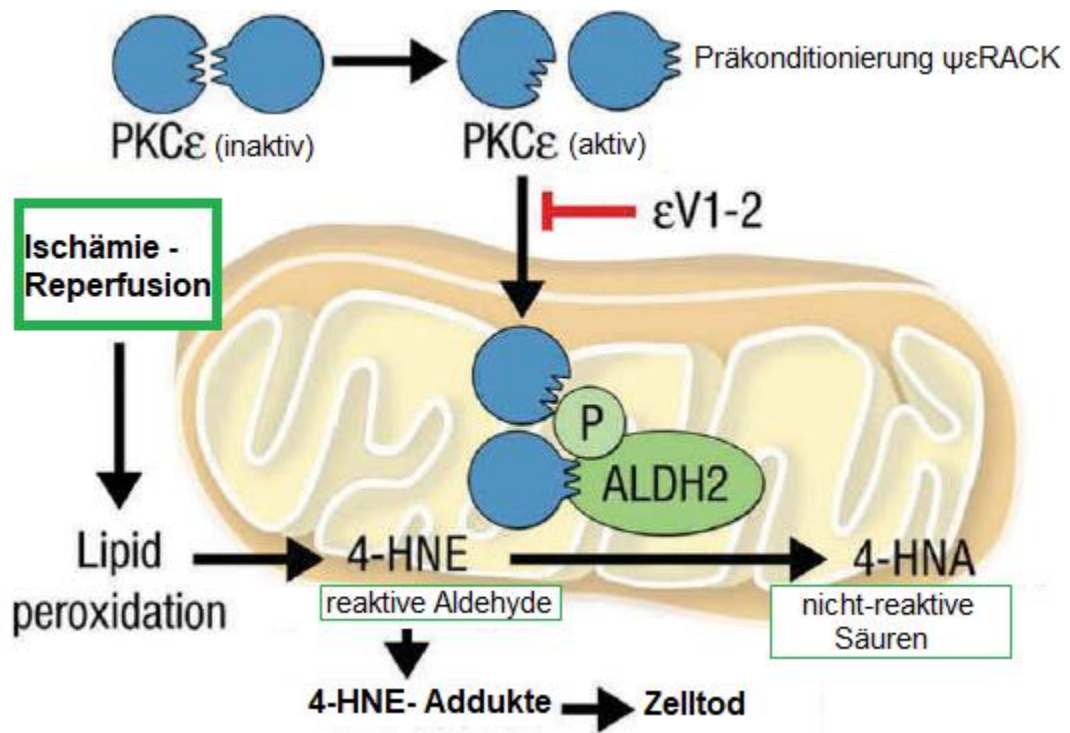


Abbildung 8.2 Die ALDH-2-Aktivität korreliert sich mit dem kardialen Schutz vor ischämischer Schädigung und ist auch an der Kardiprotektion durch Präkonditionierung über die PKC-vermittelte Aktivierung der ALDH-2 beteiligt. Die kardioprotektiven Effekte basieren hauptsächlich auf der effizienten Entgiftung des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE.

Im Rahmen der myokardialen Ischämie und der anschließenden Reperfusion ist die Produktion von ROS signifikant erhöht, begleitet von einer verstärkten Lipidperoxidation. Die entstandenen Aldehyde sind hochtoxisch und können Addukte mit Lipiden, Proteinen und DNA bilden, was zum Zelltod führt. ALDH-2 ist verantwortlich für die Umwandlung der hochtoxischen Aldehyde in Carbonsäuren, wodurch die Toxizität signifikant reduziert wird. Daher kann die Aktivierung von ALDH-2 durch den PKC-vermittelten Signalweg oder durch den Aktivator Alda-1 das Herz vor ischämischer Schädigung und Reperfusionsschaden schützen. Die ALDH-2-Aktivität wird vom spezifischen Inhibitor der PKC εV1-2 gehemmt. Abbildung übersetzt aus (177).

Um die Funktionsfähigkeit der ALDH-2 im Tiermodell dieser Arbeit zu überprüfen, wurden drei verschiedene Methoden angewendet. Es wurde die durch Nitroglycerin ausgelöste Relaxationsfähigkeit der Mausearten im Organbad untersucht, wobei die ALDH-2 Aktivität für die Bioaktivierung von Nitroglycerin benötigt wird. Zum anderen wurde durch Western-Blot-Analysen geprüft, inwieweit sich die Expression der ALDH-2 sowohl in der Aorta als auch im Herzgewebe zwischen den Versuchsgruppen unterscheidet. Drittens wurde die ALDH-2-Aktivität mittels HPLC beleuchtet. Auf Aktivitätsebene konnte in dieser Studie eine Verminderung der Funktionsfähigkeit des Enzyms in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe festgestellt werden, zum einen anhand der

Verschlechterung der Nitroglycerin-abhängigen Relaxation (mittels isometrischer Spannungsmessungen) und zum anderen anhand der verminderten Enzymaktivität (mittels HPLC Assay gemessen). Es gibt ein weiteres indirektes Indiz dafür, dass der lärminduzierte oxidative Stress eine oxidative Hemmung der ALDH-2 und folglich eine Nitrattoleranz verursacht. Auf Expressionsebene versuchten vermutlich die Zellen, diese oxidative Inaktivierung durch eine Hochregulierung der ALDH-2 im Aortengewebe der beschallten Gruppen zu kompensieren. Diese Hochregulierung der ALDH-2 war offensichtlich erfolglos, da die Nitratresistenz in der beschallten OGG1-Knockout-Gruppe trotz Hochregulation der ALDH-2 am stärksten ausgeprägt war.

In anderen Studien wurden oxidative Modifikationen wie S-Glutathionylierung (175) oder Tyrosin-Nitrierung der ALDH-2 (312) berichtet. Obwohl diese Modifikationen durch die Daten dieser Arbeit im Herzgewebe der beschallten Ogg1^{-/-}-Mäusen nicht bestätigt werden konnten, kann man nicht ausschließen, dass andere Redox-Modifikationen wie zum Beispiel die S-Nitrosylierung (313), die Sulfoxidation oder die Reaktion mit anderen Elektrophilen wie 4-HNE oder Malondialdehyd (177) für die verminderte ALDH-2-Aktivität verantwortlich sein können. Der Grund, warum diese ALDH-2-Beeinträchtigung in der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe sehr ausgeprägt war, bleibt bisher unklar. Trotz des erhöhten oxidativen Stresses in dieser Tiergruppe ist kein direkter Zusammenhang zwischen ALDH-2 und OGG1 oder 8-Oxoguanin wissenschaftlich belegt. Die beobachtete Nitrattoleranz und die unter OGG1-Defizienz und Lärmbelastung stärker ausgeprägte Inhibition trotz Hochregulierung der ALDH-2 waren nur in diesen Tiergruppen besonders ausgeprägt. Allerdings war diese Erhöhung der ALDH-2-Expression unter oxidativen Stressbedingungen eher unerwartet, denn dieser Befund widerspricht Berichten von anderen Autoren, die eine Herunterregulierung der ALDH-2 bei diabetischen (310) und hypertensiven (314) Mäusen feststellten. Die ALDH-2-Expression wurde über das 26S-Proteasom unter oxidativem Stress vermindert (315) und eine Aktivierung des 26S-Proteasoms durch Tyrosin-Nitrierung wurde zuvor bei hypertensiven Tieren berichtet (316).

8.3. Lärm erhöht den oxidativen Stress und oxidative Schäden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fluglärm den oxidativen Stress im Aortengewebe steigern konnte, wobei die NADPH-Oxidase Isoform 2 als ein Schlüsselenzym für die ROS-Produktion fungiert. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln näher erläutert, wurde eine Erhöhung des oxidativen Stresses und der

Inflammation innerhalb des zirkulierenden Blutes, des Herzens und der Gefäße in der lärmexponierten WT-Gruppe und teilweise in der *Ogg1*^{-/-}-Kontrollgruppe festgestellt. Es konnte ein klarer Trend für eine synergistische bzw. additive Verschlechterung dieser Parameter in der beschallten *Ogg1*^{-/-}-Gruppe beobachtet werden. Die inhaltliche Verbindung zwischen oxidativem Stress und lärmbedingten kardiovaskulären Komplikationen lässt sich besonders durch eine Publikation von Münzel und Daiber et al. aus dem Jahr 2017 herstellen. Die Arbeitsgruppe konnte eine Hochregulierung der Nox-2, eine Steigerung von Markern für oxidativen Stress im Plasma, im Aorten- und Herzgewebe, eine erhöhte ROS-Bildung und eine Entkopplung der eNOS identifizieren (1). Die Schlüssel-Ergebnisse sind in der Abbildung 8.3 zusammengefasst. Diese Erkenntnisse stimmen sehr gut mit den Befunden der vorliegenden Arbeit überein. Hier wurden in den beschallten Tiergruppen eine gestörte Gefäßfunktion, erhöhte Nox-2-Spiegel und gesteigerte Konzentrationen von oxidativen Stress-Markern wie 4-HNE und 3-NT sowie von Inflammationsmarkern festgestellt.

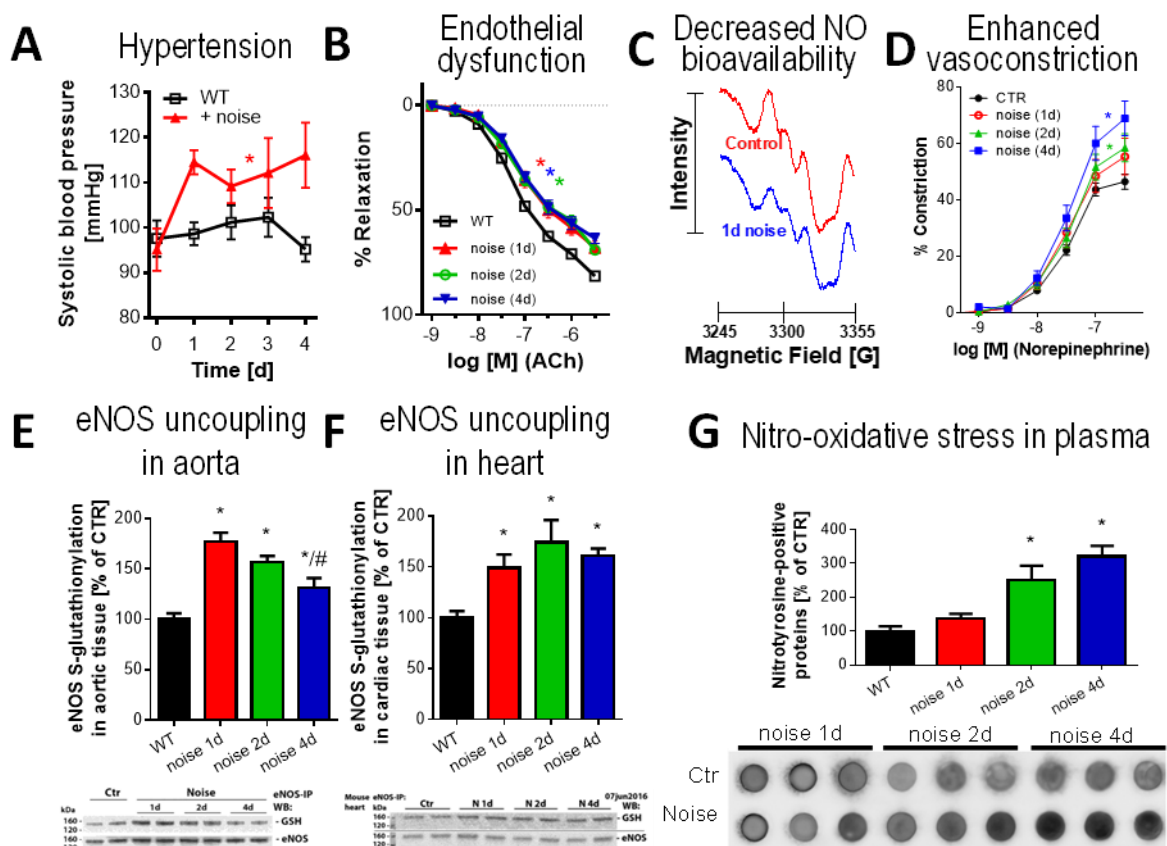


Abbildung 8.3 Zusammenfassung der kardiovaskulären Lärmeffekte in unserem neuen Tiermodell.

Fluglärm erhöhte den systolischen Blutdruck (gemessen mittels „Tail-Cuff-Plethysmographie“) (A), führte zur endothelialen Dysfunktion (nachgewiesen mittels isometrischer Spannungsmessung) (B), reduzierte die vaskulären NO-Spiegel (gemessen mittels

Elektronenspinresonanz wie in (317) beschrieben) (C) und induzierte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Vasokonstriktoren (nachgewiesen mittels isometrischer Spannungsmessung) (D). Die Fluglärmexposition erhöhte die S-Glutathionylierung der eNOS in der Aorta (E) und im Herz (F) (bestimmt durch eNOS-Immunpräzipitation und anschließendes Immunblotting mit einem spezifischen S-Glutathionylierungsantikörper). Die Spiegel der 3-Nitrotyrosin-positiven Proteine im Plasma waren auch erhöht (gemessen mittels Dot-Blot-Analyse) (G). Die Daten und die Graphen stammen aus (1) und (19).

8.4. Unterschiede der Lärmauswirkung in der Wach- und Schlafphase und die entscheidende Rolle der Nox-2

Die Ergebnisse früherer Studien lassen Rückschlüsse auf die Auswirkungen von nächtlichem Fluglärm zu. Die Simulation von Fluglärm für eine Nacht verursachte Stress und endotheliale Dysfunktion bei gesunden Probanden (52) und bei Patienten mit bekannter KHK (53), was mit einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies korrelierte (1). Bemerkenswert ist es, dass nächtlicher Lärm mit größerer Wahrscheinlichkeit zu kardiovaskulären Erkrankungen führt, als Tageslärm (37, 46, 318). Dieses Phänomen ist mit der Aktivierung metabolischer, endokriner und immunologischer Signalwege assoziiert (319, 320). Eine Einschränkung oder Fragmentierung der Schlafphase beeinträchtigt die Gefäßfunktion und erhöht den oxidativen Stress im Gehirn und die kardiovaskuläre Mortalität (321-323).

Als studentische Hilfskraft in der Molekularen Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz hatte ich die Gelegenheit, am thematisch angelehnten Projekt mitzuarbeiten, bei dem die vaskulären und die zerebralen Folgen der chronischen Fluglärmexposition während der Wachphase und der Schlafphase für 1, 2 und 4 Tage untersucht wurden. In dieser Studie konnte auf der vaskulären Ebene festgestellt werden, dass der Fluglärm zu einer endothelialen Dysfunktion, einem Anstieg des Blutdrucks, einer Erhöhung der Endothelin-1-Proteinexpression und einer Entkopplung der eNOS führte. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den immunhistochemischen Untersuchungen durch eine Steigerung der vaskulären Expression von Endothelin-1 und des Inflammationsmarkers iNOS im Aortengewebe unter Fluglärmexposition während der Schlafphase wider. Auf der zerebralen Ebene erhöhte der Fluglärm die ROS- und Superoxidbildung im Gehirn (hauptsächlich im frontalen Kortex) stärker als in der Wachphase. Interessanterweise wurden Superoxid und ROS vollständig durch Nox-2-Inhibition eliminiert. Die Inflammationsmarker CD68 und die ROS-produzierende Nox-1 waren erhöht, während die antioxidativen/protektiven Gene

Foxo3 und nNOS auf mRNA-Ebene unter Lärmexposition in der Schlafphase herunterreguliert waren. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 8.4 dargestellt.

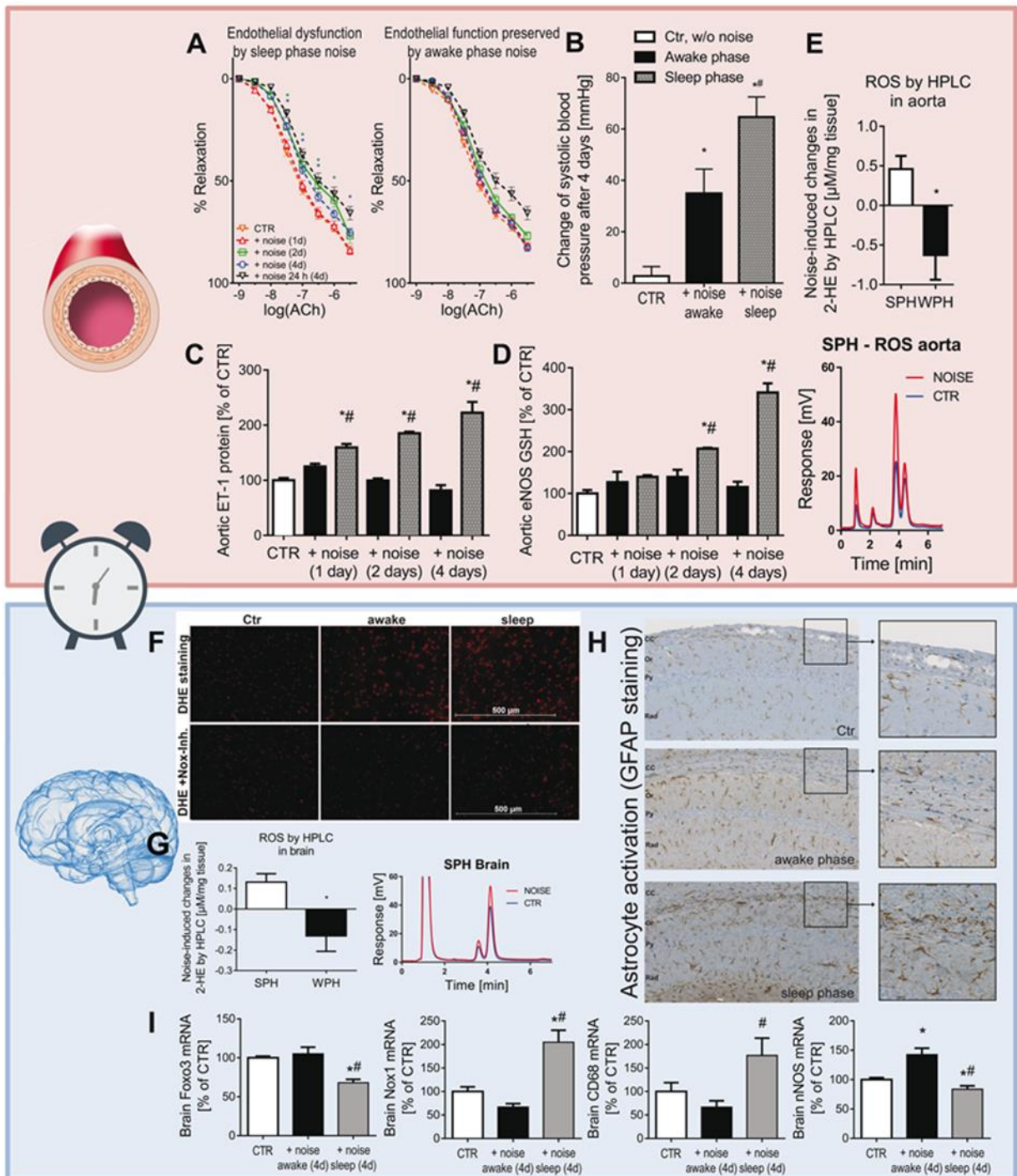


Abbildung 8.4 Die Auswirkungen des Fluglärms während der Schlaf- und Wachphase auf das Gefäßsystem und das Gehirn der Mäuse.

Hier wurde ein mittlerer Schalldruckpegel von 72 dB(A) 12 Stunden lang pro Tag für 1, 2 und 4 Tage appliziert. Die Lärmexposition während der Schlafphase verursachte eine signifikant stärkere endotheliale Dysfunktion (A), einen Anstieg des Blutdrucks (B), eine Erhöhung der Endothelin-1-Proteinexpression (C) und eine Entkopplung der eNOS in der Aorta (D). Die

Lärmexposition während der Schlafphase erhöhte auch die Superoxid-Bildung in der Aorta (gemessen durch HPLC-Assay) ausgeprägter als während der Wachphase (E). Die Lärmexposition in der Schlafphase induzierte auch eine stärkere ROS- und Superoxidbildung im Gehirn (im frontalen Kortex; gemessen durch DHE-Färbung für zytoplasmatische ROS) als in der Wachphase (F). Superoxid und ROS wurden vollständig durch Nox-2-Inhibition eliminiert (F). Die lärminduzierte zerebrale ROS-Produktion, die mittels HPLC-Analyse gemessen wurde, war höher in der Schlafphase als in der Wachphase (G). Astrozyten waren bei während der Schlafphase lärmexponierten Mäusen in Corpus Callosum aktiviert (H). Die Inflammationsmarker CD68 und die ROS-produzierende Nox-1 waren erhöht, während die antioxidativen/protektiven Gene Foxo3 und nNOS auf mRNA-Ebene unter Lärmexposition in der Schlafphase vermindert waren (I). Die Daten und die Graphen stammen aus (7) und (324).

Der Schwerpunkt dieses Projektes war insbesondere, dass Lärm nicht während der Wachphase, sondern während der Schlafphase die obengenannten Folgen hat. Diese Beobachtung ist bereits durch andere Autoren belegt worden. Zum Beispiel beleuchtete die HYENA-Studie den signifikanten Zusammenhang zwischen nächtlichem Fluglärm mit den assoziierten erhöhten Stresshormonspiegeln (88) und dem Risiko für arterielle Hypertonie, KHK und Schlaganfall (37, 325, 326). Diese Korrelation ergab sich nicht beim Tageslärm. Die zusätzliche wichtige Feststellung war die Erhöhung des oxidativen Stresses im Gehirn teilweise durch nNOS-Entkopplung und durch Nox-2. Dies induzierte einen neuroinflammatorischen Phänotyp, was sich auch in der Aktivierung der Astrozyten widerspiegelt (siehe auch Abbildung 7.14).

Als eine Quelle für den vermehrten oxidativen Stress konnte die gesteigerte Aktivität der membrangebundenen NADPH-Oxidasen identifiziert werden. Chronische Fluglärmexposition führte zu Lern- und Gedächtnisstörungen bei Kindern (327), vermutlich durch die Aktivierung der zerebralen Nox-2 (328). Außerdem waren die Nox-2-knockout-Mäuse in verschiedenen Tiermodellen einschließlich experimenteller Hypertension vor endothelialer Dysfunktion geschützt (329). In einer weiteren Studie von Kröller-Schön und Daiber et al. wurde der Nox-2 eine Schlüsselrolle in der Produktion von oxidativem Stress nach Lärmexposition zugeschrieben. Die Forscher beobachteten eine Normalisierung fast aller unerwünschten Lärmauswirkungen, wie Bluthochdruck, endothelialer Dysfunktion, vaskulären oxidativen Stresses und Inflammation unter genetischer Deletion der Nox-2 (siehe Abbildung 8.5). Die Nox-2-Knockout-Mäuse waren also vor lärminduzierten kardiovaskulären Schäden geschützt (7).

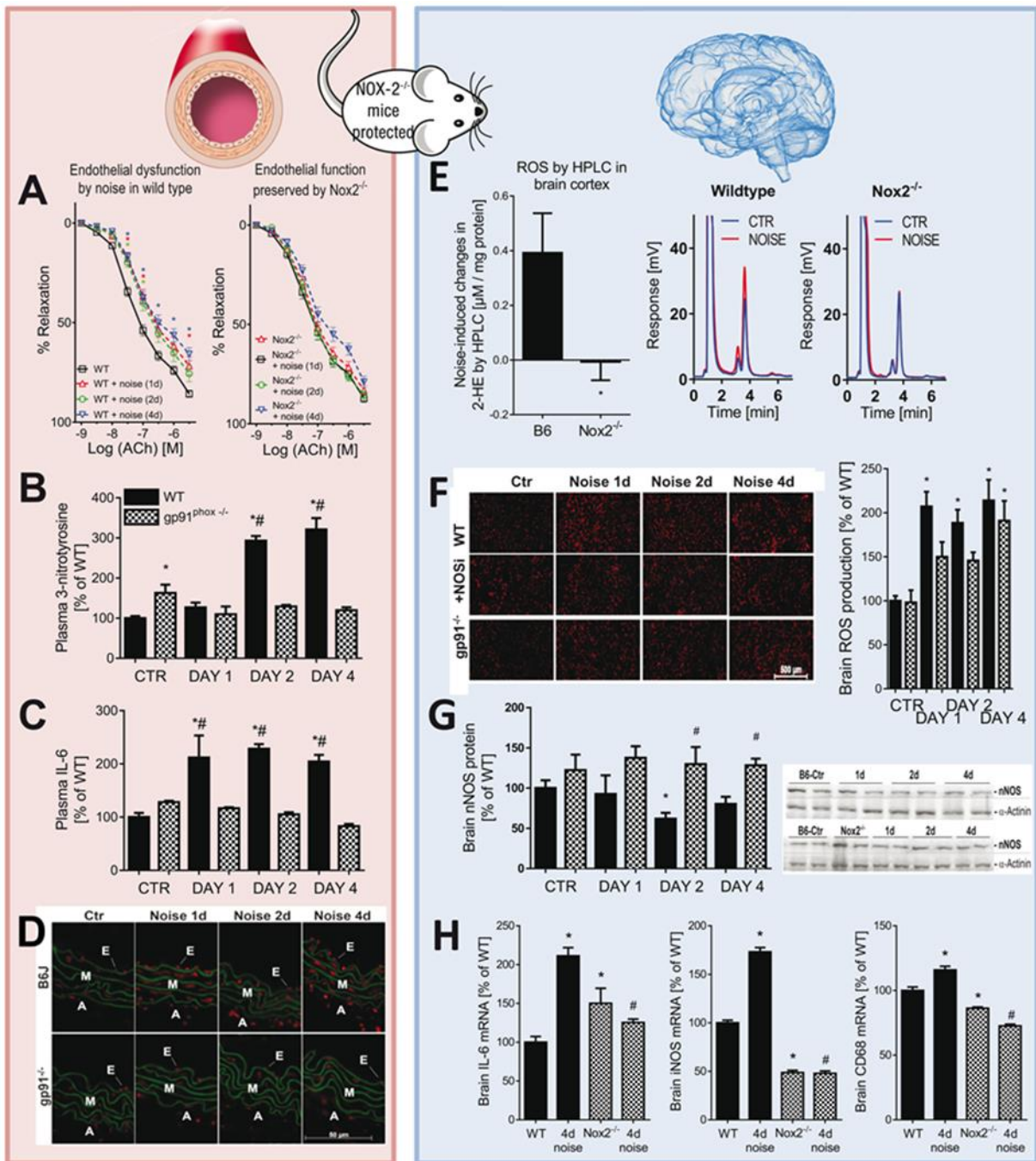


Abbildung 8.5 Die Schlüsselrolle der Nox-2 für die lärmbedingten schädlichen zerebrovaskulären Effekte bei Mäusen.

Auf der vaskulären Ebene waren die Nox-2-Knockout-Mäuse vor endothelialer Dysfunktion (A), systemischem oxidativen Stress (B) und Entzündung (C) sowie vor ROS-Bildung in der Aorta (D) nach Fluglärmexposition (mittlerer Schalldruckpegel von 72 dB(A) 24 Stunden lang pro Tag für 1, 2 und 4 Tage) geschützt. Auf der zerebralen Ebene waren die Nox-2-defizienten Mäuse vor Superoxid- und ROS-Bildung im Gehirn geschützt, die teilweise durch die entkoppelte NOS (E,F), durch Herunterregulierung der nNOS (G) und durch Neuroinflammation (H) als Reaktion auf Fluglärm entstanden. Die Daten und die Graphen stammen aus (7) und (324).

Diese Ergebnisse zeigten eindrücklich, dass Fluglärm den oxidativen Stress auch im Hirngewebe, hauptsächlich im frontalen Cortex, erhöhte und eine Herunterregulierung der zerebralen nNOS sowie Neuroinflammation verursachte (Abbildung 8.5). Unter Nox-2 (gp91phox)-Defizienz ließ sich eine Normalisierung der lärmbedingten Endotheldysfunktion, der Hyperglykämie, der 3-NT-, Malondialdehyd- und IL-6-Spiegel, der Superoxid-Produktion und der veränderten Proteinexpression zum Beispiel von p-VASP, ET-1 und HO-1 nachweisen (7).

Die Lokalisierung des erhöhten oxidativen Stresses ist wichtig, denn der frontale Kortex reguliert die autonomen und neuroendokrinen Stressreaktionen (330) und kann somit zur Entwicklung der lärmbedingten kognitiven Störungen beitragen. Interessanterweise beeinträchtigt der Schlafentzug das Redox-Gleichgewicht im Gehirn und kann durch die Aktivierung der HPA-Achse und des Sympathikus vermehrten oxidativen Stress, ein abnormales Verhalten im Sinne von Manie und Gedächtnisstörungen verursachen (82, 331, 332).

8.5. Lärmeffekte auf oxidativen Burst in Leukozyten

Die NADPH-Oxidasen wurden als wesentliche Quelle für oxidativen Stress in unterschiedlichen Geweben identifiziert. Weiße phagozytierende Blutzellen haben die Fähigkeit, einen sogenannten „oxidativen Burst“ zu erzeugen, um Bakterien oder Parasiten durch reaktive Sauerstoffspezies zu zerstören. Offensichtlich tragen auch der sinkende pH-Wert durch die gebildeten Protonen und die damit einhergehende Aktivierung von Proteasen zur Immunabwehr bei. Diese ROS werden über die NADPH-Oxidase über den Proteinkinase C-Signalweg generiert. An der Induktion der leukozytären NADPH-Oxidase ist auch Ca^{2+} beteiligt, welches die PKC aktiviert und die Translokation der Untereinheit Rac1 der NADPH-Oxidase vermittelt. Phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu), sind in der Lage, die PKC zu stimulieren und somit den oxidativen Burst der Leukozyten auszulösen. Zymosan A ist ein Homoglykan, das über die Bindung an den β -Glucanrezeptor Dectin-1 und über den Signalweg mit den Toll-like-Rezeptoren die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Erzeugung von oxidativem Burst in Immunzellen induziert. Um nähere Hinweise über den oxidativen Burst zu erlangen, wurde die Bildung dieser RONS mithilfe eines Chemilumineszenzassays im Rahmen des vorliegenden Forschungsprojekts von [REDACTED] and [REDACTED] quantifiziert. Die Methode ist ausführlich im Kapitel 6.2.4. beschrieben.

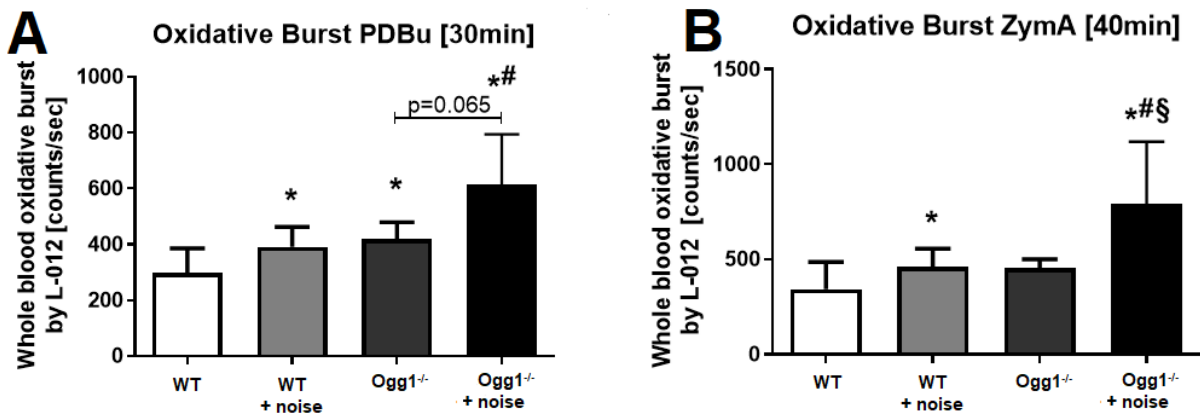


Abbildung 8.6 Chemilumineszenz zum Einfluss von Lärm auf den oxidativen Stress im Vollblut.

Durch PDBu (A) und Zymosan A (B) wurde der oxidative Burst weißer Blutzellen induziert und mittels eines Chemilumineszenzassays (L-012) quantifiziert. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte \pm SD von 4-12 Blutproben von 4-12 Tieren pro Gruppe.

* $p < 0,05$ vs. WT ohne Lärmexposition; # $p < 0,05$ vs. WT mit Lärmexposition; § $p < 0,05$ versus Ogg1^{-/-} ohne Lärmexposition; ein stabiler Trend wird in den Graphen mit p-Werten gezeigt.

Der oxidative Burst im Vollblut wurde als Surrogatparameter für den Aktivitätsstatus der NADPH-Oxidase der Leukozyten und deren Produktion von ROS nach Stimulierung mit PDBu und Zymosan A bestimmt. Im Vollblut der lärmbelasteten Wildtyp-Gruppe und der Ogg1^{-/-}-Kontrollgruppe war der oxidative Burst signifikant erhöht. Insbesondere wurde deutlich gezeigt, dass in der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe eine, um etwa 50 %, signifikant erhöhte Generierung von ROS im Vergleich zur beschallten Wildtyp-Kontrollgruppe auftrat (Abbildung 8.6 (A)). Die Untersuchungen, in denen Zymosan A verwendet wurde, um den oxidativen Burst der Leukozyten zu induzieren, zeigten ähnliche Ergebnisse. Der Zymosan A-induzierte oxidative Burst war in der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Gruppe im Verhältnis zu den beiden Kontrollgruppen und auch im Verhältnis zu der beschallten Wildtyp-Gruppe signifikant gesteigert. Auch in der lärmexponierten Wildtyp-Gruppe war der oxidative Burst signifikant erhöht gegenüber der WT-Kontrollgruppe (Abbildung 8.6 (B)).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Lärmbelastung zum gesteigerten oxidativen Burst im Vollblut (vermutlich überwiegend aus Leukozyten) führt und dass es unter OGG1-Defizienz zu einem deutlichen additiven Anstieg kommt. Diese Beobachtung könnte in Zusammenhang mit der Tatsache stehen, dass bestimmte Subtypen der Leukozyten begrenzte DNA-Reparaturkapazitäten aufweisen und deswegen anfälliger für oxidative DNA-Schäden sind (333). Die neutrophilen

Granulozyten im peripheren Blut, die für den größten Teil des oxidativen Bursts verantwortlich sind (286, 334), zeigten in früheren Studien eine starke Herunterregulierung der DNA-Reparaturmechanismen (335). Zudem könnte sich dieser Befund mit der Akkumulation von 8-Oxoguanin in DNA assoziieren, was einen starken Auslöser für sterile Inflammation darstellt. Obwohl frühere Studien eher von einem reduzierten oxidativen Burst in Lymphozyten nach medikamentöser Induktion von oxidativen DNA-Läsionen und in Granulozyten durch Bildung von 8-oxo-GTP (336) berichteten, stellt 8-Oxoguanin-haltige DNA ein schadenassoziiertes molekulares Muster dar, welches eine sterile Entzündung auslösen kann. Dadurch werden die Granulozyten aktiviert, Zytokine werden NLRP3-bedingt freigesetzt und oxidativer Burst wird induziert (96). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über die Steigerung des oxidativen Bursts unter Lärmexposition und OGG1-Defizienz weisen darauf hin, dass die zusätzliche Rekrutierung der Granulozyten durch 8-Oxoguanin-haltige DNA die früher berichtete Reduktion des oxidativen Bursts durch schwere DNA-Schäden der Leukozyten überschreiten könnte. Es gibt mehrere Studien, die in diesen Punkten bei unterschiedlichen Versuchsansätzen zu gleichen Ergebnissen kommen, aber daneben auch Studien mit gegensätzlichen Ergebnissen. Interessanterweise gelang es der Arbeitsgruppe von Aguilera-Aguirre in ihren Studien eine proinflammatorische Rolle der OGG1 zu zeigen, da in der $Ogg1^{-/-}$ -Tiergruppe eine reduzierte Entzündung festgestellt wurde. Die Studie lieferte mechanistische Einblicke diesbezüglich und zwar, dass die Verbindung zwischen OGG1 und der proinflammatorischen Genexpression auf die Aktivität von OGG1 als Guaninnukleotid-Austauschfaktor zurückzuführen ist (337). Allerdings stellte sich in einer Studie von Tumurkhuu et al. eine entzündungshemmende Wirkung von OGG1 heraus (338). Weitere Forschung ist erforderlich, um die teils gegensätzlichen Wirkungen der OGG1 auf die Inflammation, im jeweiligen Tiermodell oder Zellmodell besser verstehen zu können.

8.6. Auswirkungen von OGG1-Defizienz

In der ADVANCE-Studie ergab sich, dass bei Erwachsenen mit Diabetes mellitus vom Typ 2 die gesteigerten Spiegel von 8-Oxoguanin mit einer erhöhten Gesamtmortalität, vor allem der kardiovaskulären Mortalität, verbunden waren (339). Zu ähnlichen Ergebnissen kam es auch in anderen Kohortstudien: eine hohe Anzahl oxidativer RNA-Schäden ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit der Gesamtmortalität und kardiovaskulären Mortalität assoziiert (340). Die Behandlung mit Dapagliflozin

verbessert die endotheliale Funktion und senkt die 8-Oxoguanin-Spiegel im Urin bei Diabetikern vom Typ 2 (341). Darüber hinaus wurde auch belegt, dass OGG1-Defizienz die Atherosklerose in ApoEx-OGG1-doppel-knockout-Mäusen förderte, wobei die Wiederherstellung der OGG1-Aktivität die Plaquebildung reduzierte. Diese Beobachtung betont die schädlichen Auswirkungen von 8-Oxoguanin auf das Gefäßsystem (342). In der gleichen Studie wurde eine erhebliche Hochregulierung der inflammatorischen Gene wie zum Beispiel IL-1b, IL-6, TNF- α , MCP-1 und NLRP3 in ApoEx-OGG1-doppel-knockout-Mäusen nachgewiesen. Dieser Befund zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit im inflammatorischen Phänotyp der lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Mäusen anhand einer erhöhten Expression der Cox-2, des IL-6 und vermehrtem oxidativem Burst.

Den Befunden dieser Arbeit zufolge können erhöhte 8-Oxoguanin-Spiegel (bzw. OGG-1 Defizienz) unter Lärmbelastung den oxidativen Stress verschlimmern, was sich am Trend für die Erhöhung von 4-HNE und 3-NT widerspiegelt. Dies könnte die oxidative Inhibition der ALDH-2 direkt durch ROS oder durch 4-HNE-Addukte trotz der gesteigerten Proteinexpression des Enzyms in der beschallten Ogg1^{-/-}-Gruppe erklären. Diese oxidative ALDH-2-Hemmung in den lärmexponierten Ogg1^{-/-}-Mäusen scheint auch ursächlich für die oben beschriebene gestörte Nitroglyzerin-abhängige Relaxation (Nitratresistenz).

In Tierversuchen war die OGG1-Defizienz mit einer höheren Anfälligkeit für Adipositas und metabolische Dysfunktion (259), für UVB-induzierte Karzinogenese (343) und mit der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (344). Bezüglich der endothelialen Funktion konnte in dieser Arbeit keine zusätzliche Beeinträchtigung der Gefäßkontraktilität in der Ogg1^{-/-}-Gruppe festgestellt werden, und nur ein additiver Trend in manchen Parametern. In früheren Arbeiten konnten hingegen eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate der Endothelzellen und somit eine endotheliale Dysfunktion unter 8-Oxoguanin-Bildung gezeigt werden (345). Es bleibt hierbei fraglich, ob dieser Unterschied darauf beruht, dass Ogg1^{-/-}-Mäuse nur eine mäßige Anhäufung von 8-Oxoguanin in ihrer DNA zeigen, da es wie bereits in der Einleitung/Literaturdiskussion beschrieben alternative kompensatorische Reparaturmechanismen der oxidativen DNA-Läsionen geben muss.

Um das Mutationspotential von 8-oxo-G zu eliminieren, haben die Zellen eine Vielzahl von Wegen entwickelt, um diese oxidative DNA Läsion zu reparieren. Dazu gehören:

i) die Mechanismen zur Vermeidung des Einbaus von oxidierten Nukleotiden in die DNA durch sogenannte „Nukleotidpool-Sanierungsenzyme“ (MTH1, MTH2, MTH3 und NUDT5). Die Entfernung von 8-oxo-dGTP aus dem Nukleotidpool vor seiner Integration in DNA ist ein wichtiger Weg zum Schutz des Genoms vor 8-oxo-G-Schaden. Bis heute wurden die folgenden vier Enzyme identifiziert: MutT-Homolog 1 (MTH1 oder NUDT1), MutT-Homolog 2 (MTH2 oder NUDT15), MutT-Homolog 3 (MTH3 oder NUDT18) und Nudix-Typ 5 (NUDT5) (212). Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse von 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGDP oder 8-oxo-dGMP. Das Letztere kann nicht für die DNA-Synthese von den Polymerasen benutzt werden. Dadurch verhindert diese Hydrolyse den Einbau von 8-oxo-dGTP in die entstehende DNA. Die MTH1 erweist sich als das wichtigste Nukleotidpool-Sanierungsenzym für 8-oxo-dGTP in den Säugetierzellen (212).

ii) die Basenexzisionsreparatur von 8-oxo-G mithilfe von OGG1 und MUTYH, was im Abschnitt 5.3.3. ausführlich erläutert wurde. In diesem Punkt ist die Rolle der Polymerase λ in der MUTYH-BER zu betonen. So wie in der OGG1-BER wird in der MUTYH-BER die Entfernung der Base durch Anpassung der DNA-Enden durch APE1 gefolgt, sodass eine Polymerase die richtige Cytosin-Base gegenüber von 8-oxo-G einfügen kann. Allerdings können die meisten Polymerasen diese Aufgabe nicht erfüllen. In den letzten 20 Jahren hat sich die Polymerase λ als die einzige Polymerase erwiesen, die mithilfe der Kofaktoren PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und RP-A (replication protein A) effizient eine korrekte Cytosin Base gegenüber von 8-oxo-G einfügen kann (346). Das daraus resultierende Produkt aus dem MUTYH- und Pol λ -vermittelten Reparaturweg ist ein C:8-oxo-G-Basenpaar, das wiederum für die OGG1-BER zugänglich ist, wie im Abschnitt 5.3.3. erklärt wird.

iii) der „Bypass“ von 8-oxo-G-Läsionen während der Replikation durch eine Wechselwirkung zwischen der Replikationspolymerase δ und der Polymerase λ . Idealerweise sollten alle C:8-oxo-G-Fehlpaare vor der Replikation repariert werden; jedoch wird Guanin während des gesamten Zellzyklus oxidiert. Deswegen hat die Zelle einen Mechanismus entwickelt, um 8-oxo-G-Läsionen auch während der Replikation zu umgehen. Obwohl 8-oxo-G per se keine blockierende Läsion ist, induziert sie dennoch eine Verlangsamung der Replikationspolymerasen. Die humane Polymerase δ hält vor 8-oxo-G und ist bereit, sowohl Cytosin als auch Adenin gegenüber der Läsion einzufügen (347). Die experimentell gewonnenen Daten aus Studien zeigten, dass nur

die Polymerase λ in der Lage ist, Polymerase δ dabei zu helfen, selektiv richtig die Cytosinbase gegenüber von 8-oxo-G einzufügen. Mit anderen Worten ist der korrekte Bypass von 8-oxo-G während der Replikation auf die Polymerase δ zurückzuführen (212, 348). Diese Befunde weisen auf eine Wechselwirkung zwischen der Replikationspolymerase δ und der Reparaturpolymerase λ für eine optimale Umgehung von 8-oxo-G-Läsionen hin. In der Tat wurde gezeigt, dass die Polymerase λ bevorzugt C:8-oxo-G-Fehlpaare mit einer höheren Effizienz verlängert, als sie die unbeschädigten C:G-Basenpaare verlängert (348). Die einzigartige Kompetenz der Polymerase λ bei der korrekten Insertion von Cytosin gegenüber 8-oxo-G ist in dem besonders flexiblen aktiven Zentrum des Enzyms und in der Veränderung seiner Kinetik bei mutagenen Läsionen begründet (349).

iv) andere zusätzliche Reparaturwege wie MMR (mismatch repair), TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair), GG-NER (global-genome nucleotide excision repair) und andere Glykosylasen (246, 350, 351). Außerdem integrieren die Replikationspolymerasen trotz ihrer Spezifität ribonukleosidische Monophosphate (rNMP) während der DNA-Replikation (352-354). Eine Untersuchung der Polymerase 4 aus *Schizosaccharomyces pombe* zeigte, dass dieses Enzym 8-oxo-G-Läsionen fast ausschließlich durch Einfügen von ribonukleosidischem ATP umging. So wurden rA:8-oxo-G-Fehlpaare erzeugt, die effizient von der RNase H2 entfernt werden (355). Dieser Befund ist interessant und es ist noch unklar, ob ein ähnlicher Mechanismus auch in menschlichen Zellen vorhanden ist.

Schließlich soll auch auf die Regulation der OGG1 eingegangen werden. Zu den Mechanismen gehört die Regulation der Proteinaktivität und seiner subzellulären Lokalisation durch posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung. Es wurde gezeigt, dass eine transkriptionelle Hochregulierung der OGG1 durch verschiedene Signalmoleküle stimuliert wurde, wie zum Beispiel durch 5'-AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) nach Stimulierung durch Hemmung des mTORs (mammalian target of rapamycin) (356), durch Aktivierung des Transkriptionsaktivators NRF2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) (357, 358) sowie durch den Transkriptionsfaktor NF-YA (nuclear transcription factor Y subunit alpha) (356, 359, 360). Außerdem war auch das Brustkrebsgen BRCA 1 an der transkriptionellen Regulation der OGG1 beteiligt (361). Interessanterweise haben Manzella et al. auch eine zirkadiane Modulation der OGG1-Spiegel beobachtet (362).

In einer Gruppe von 15 gesunden Probanden stellten die Autoren in den Morgenstunden höhere OGG1-Konzentrationen als in den Abendstunden fest, was ebenfalls mit der 8-oxo-G-Reparaturaktivität einherging. Zudem wurde eine signifikante Verschiebung in einer Gruppe von Schichtarbeitern mit einer begleitenden Deregulation der Gene der zirkadianen Rhythmik im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (362). Diese Ergebnisse implizieren, dass die zirkadiane Modulation der OGG1 die Anfälligkeit für oxidativen Stress während des Tages beeinflussen könnte, was die Komplexität der DNA-Reparatur von oxidativen Schäden bestätigt. OGG1 wird also auf vielen unterschiedlichen Ebenen reguliert und das Zusammenspiel aller dieser Faktoren bedarf weiterer Forschung.

8.7. Andere Noxen in Kombination mit Lärmexposition

Im Rahmen der Promotion war ich als wissenschaftliche Hilfskraft in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. [REDACTED] und Univ.-Prof. Dr. [REDACTED] in der Klinik für Kardiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz tätig. Abgesehen des Hauptthemas in der vorliegenden Arbeit konnte ich auch immunhistochemische Untersuchungen für zwei weitere Projekte beitragen, deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten der Diskussion erläutert werden. Hierbei wurden die additiven kardiovaskulären Schäden durch Lärm und arterielle Hypertonie bzw. als alternativer Umwelt-Risikofaktor die schädliche Wirkung von E-Zigaretten-Dampf untersucht.

8.7.1. Verstärkung der lärmbedingten kardiovaskulären Schäden in Kombination mit experimenteller arterieller Hypertonie

Arterielle Hypertonie ist der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Eine Metaanalyse von 42 Studien und 144.220 Patienten offenbarte einen linearen Zusammenhang zwischen jedem Blutdruckanstieg von 5 mmHg und dem Risiko für kardiovaskuläre Mortalität (1). Zudem hat arterielle Hypertonie eine sehr hohe Prävalenz von 1,3 Milliarden Menschen weltweit (363). Da ATII neben seiner direkten konstriktiven Wirkung über den AT1-Rezeptor auch über die NADPH-Oxidase Bluthochdruck und oxidativen Stress verursacht, würde man unter der Kombination von ATII und Lärm zusätzliche oder sogar potenzierende negative Auswirkungen auf den Blutdruck erwarten.

Im Projekt von Steven et al. beleuchteten wir die potentiell additiven negativen kardiovaskulären Auswirkungen von Fluglärm in Kombination mit experimenteller

arterieller Hypertonie (279). Bei den Studien mit Tieren mit nur einem Stressor (entweder ATII oder Lärm) wurde festgestellt, dass Lärm und Angiotensin II zu einem ähnlich erhöhten Blutdruck, endothelialer Dysfunktion, oxidativem Stress und Inflammation im Aorten-, Herz- und Hirngewebe führten. Bei den Mäusen, die beiden Stressoren ausgesetzt wurden, wurde eine Potenzierung der negativen Veränderungen dieser Risikofaktoren beobachtet. Die immunhistochemischen Analysen zeigten deutlich erhöhte Spiegel des Vasokonstriktors Endothelin-1 im Aortengewebe bei der beschallten und bei der mit ATII behandelten Gruppe, mit einem Trend für additive Effekte bei der Versuchsgruppe, die beiden Behandlungen unterzogen wurde (Abbildung 7.15). Der Oxidationsmarker 3-Nitrotyrosin war bei allen Versuchsgruppen im Gefäß gesteigert; mit einer potenzierten Verschlechterung in der Gruppe mit ATII-Infusion und Lärmexposition (Abbildung 7.16). Diese Beobachtungen wurden auch durch andere Untersuchungsmethoden festgestellt (Abbildung 8.7).

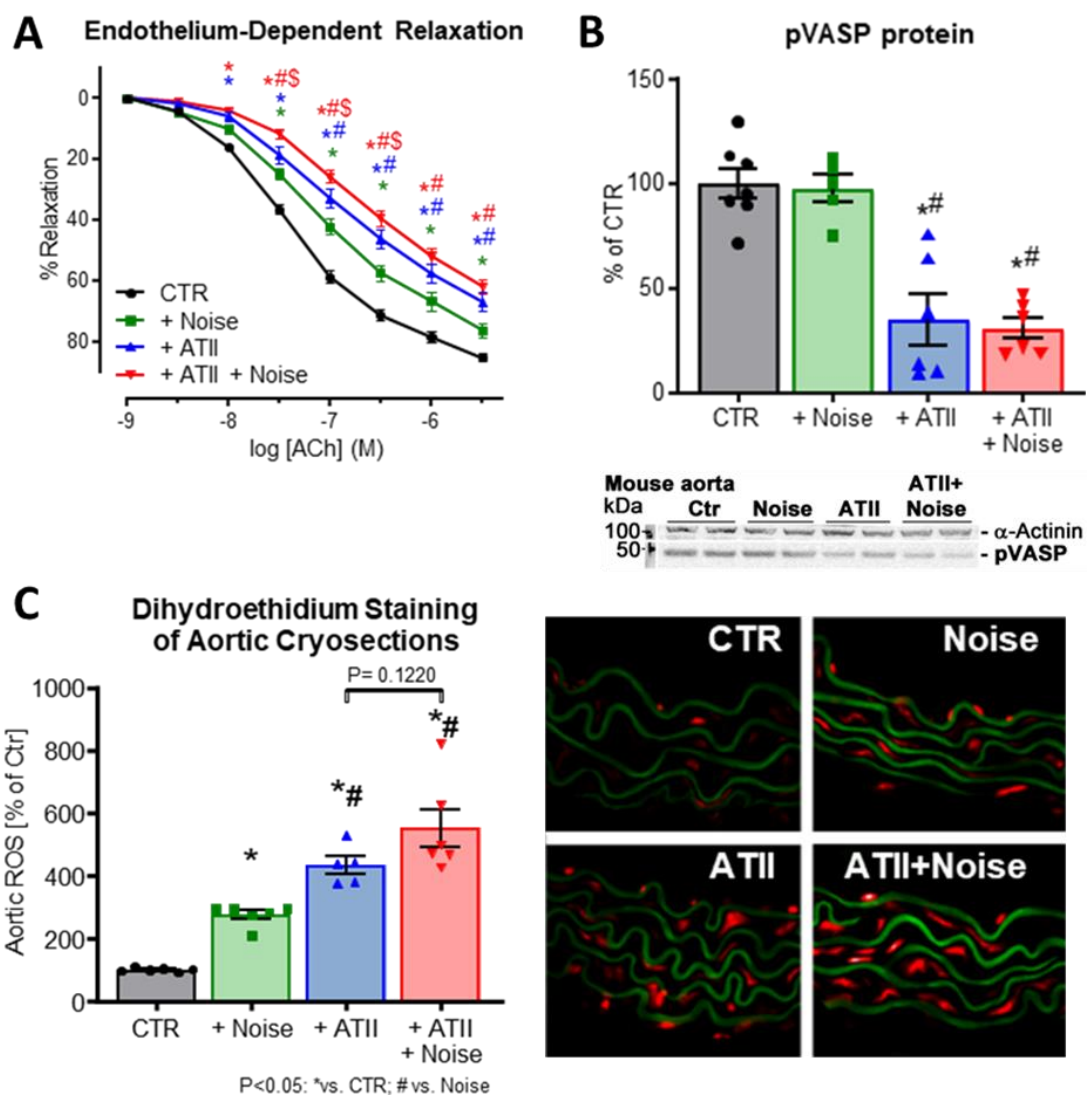


Abbildung 8.7 Additive bzw. synergistische Effekte der Lärmexposition und der Angiotensin-II-Behandlung auf dem hypertensiven Phänotyp der Mäuse.

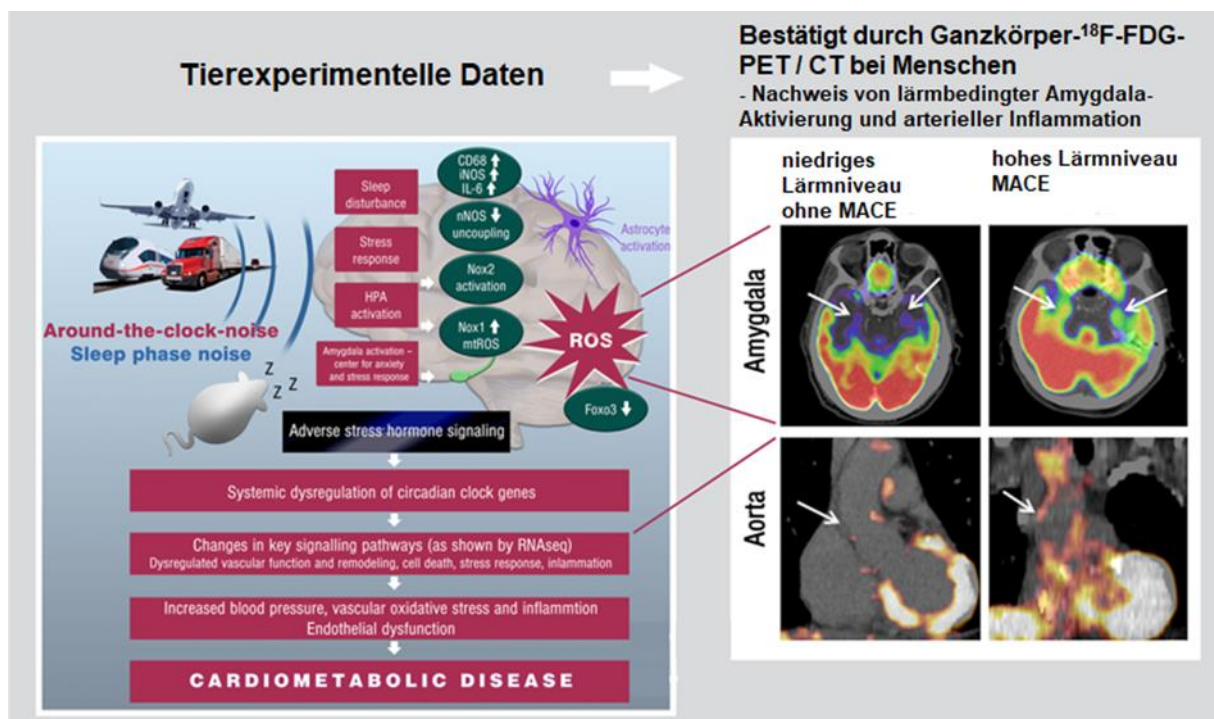
Die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholin (A) und der NO/cGMP-Signalweg in der Aorta (Verhältnis der cGMP-abhängigen Kinase I und des phosphorylierten (pSer239) Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (P-VASP)) (B) wurden unter Lärmexposition sowie unter ATII-Behandlung allein jeweils beeinträchtigt und bei lärmexponierten hypertensiven Mäusen weiter verschlimmert (A). Der oxidative Stress in der Aorta (nachgewiesen durch DHE-Färbung von Kryoschnitten) war durch Lärm tendenziell erhöht, unter ATII-Behandlung weiter erhöht und synergistisch bei der lärmexponierten hypertensiven Tiergruppe stärker gesteigert (C). Die Daten und die Graphen stammen aus (279).

Die Lärmexposition bei ATII-behandelten hypertensiven Mäusen war mit erhöhtem Blutdruck, gestörter Endothelfunktion, erhöhten Entzündungswerten, Abnahme der vaskulären NO-Konzentrationen, reduzierter NO-Bioverfügbarkeit und vermehrter Superoxid-Produktion assoziiert. Dementsprechend konnten wir feststellen, dass Fluglärm zu einer gesteigerten Nox-2-Proteinexpression bei den mit ATII behandelten Tieren führte. Zusätzlich wurde eine Entkopplung der eNOS durch die Zunahme der eNOS-S-Glutathionylierung und die Abnahme der eNOS-Phosphorylierung bei Ser1177 identifiziert. Die phagozytäre Nox-2 ist ein Schlüsselenzym bei der Vermittlung der nachteiligen Auswirkungen im Hinblick auf Lärmexposition und ATII-bedingte Hypertonie. Diese Theorie würde zumindest teilweise erklären, warum die Patienten mit bestehenden Herz-Kreislauf-Erkrankungen empfindlicher auf die lärmbedingten kardiovaskulären Auswirkungen reagieren (53).

Außerdem wurden erhebliche nachteilige Auswirkungen von Fluglärm in Bezug auf oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen im Gehirn gezeigt (279). ROS-Konzentrationen waren im Hirngewebe bei allen Behandlungsgruppen deutlich gesteigert, wobei der Unterschied in der Gruppe mit beiden Stressoren signifikant größer im Vergleich zur mit ATII behandelten Gruppe war. Analog dazu waren die Zytokinen IL-1 β und IL-6 erhöht und die Astrozyten waren stärker aktiviert in der Gruppe, die Lärmexposition und ATII-Behandlung unterzogen war. Dieser Befund deutet auf einen neuroinflammatorischen Phänotyp hin. Die Aktivierung des Signalweges über die Stresshormone ist die wahrscheinlichste Erklärung für den Zusammenhang zwischen den schädlichen zerebralen Auswirkungen von Lärm und den nachfolgenden kardiovaskulären Schäden (7). In anderen Studien war die Exposition gegenüber Flug- und Straßenverkehrslärm mit erhöhter Amygdala-Aktivität,

vaskulärer Entzündung und höherer Rate an kardiovaskulären Ereignissen verbunden (364, 365).

Bislang fehlte der zerebrale Zusammenhang zwischen dem Lärmreiz und den nachfolgenden Stressreaktionen. Die Studie von Osborne et al. lieferte den Beweis, dass die Amygdala, ein limbisches Zentrum mit Wirkung auf die Stresswahrnehmung und die Kontrolle der Emotionen, an den Stressreaktionen auf Lärm beteiligt ist (364). Es ist wichtig anzumerken, dass eine erhöhte Stoffwechselaktivität in der Amygdala mit einem gesteigerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen verbunden ist. Der Mechanismus beinhaltet eine erhöhte arterielle Inflammation (366, 367). Die Forschungsgruppe von Osborne stellte einen Zusammenhang zwischen der hohen Lärmbelastung, der gesteigerten Aktivität der Amygdala und der arteriellen Inflammation fest. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Lärmexposition mit schwerwiegenden unerwünschten kardiovaskulären Ereignissen über einen Mechanismus verbunden ist, der mit einer erhöhten stressassoziierten limbischen Aktivität beginnt und schließlich zur gesteigerten arteriellen Entzündung und somit zur Atherosklerose führt (364) (siehe Abbildung 8.8).



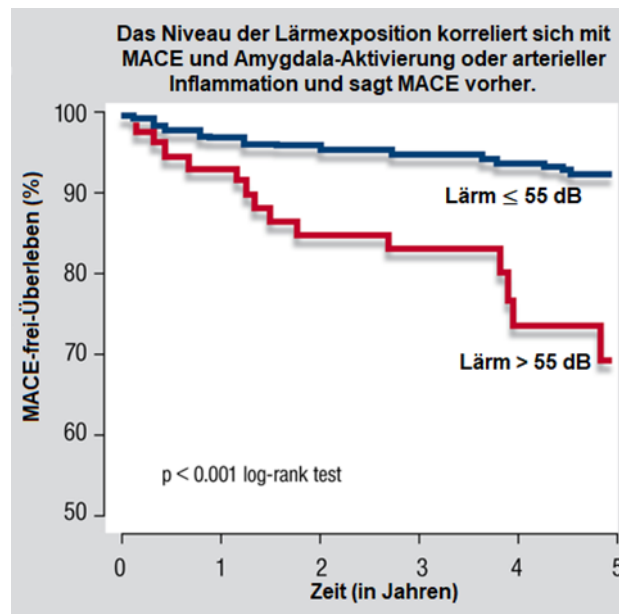


Abbildung 8.8 Mechanistische Daten zur lärminduzierten Neuroaktivierung des endokrinen Systems, zur Neuroinflammation und zum zerebralen oxidativen Stress, welche zur Dysregulation der zirkadianen und vaskulären Genexpression, zum Bluthochdruck, zur vaskulären Inflammation, zum oxidativen Stress und zur endothelialen Dysfunktion führen.

Diese stellen wichtige Auslöser für kardimetabolische Erkrankungen dar, wie die tierexperimentellen Studien von Münzel, Daiber et al. (1) und Kröller-Schön, Daiber et al. (7) zeigten. Bei der translationalen Studie von Osborne et al. konnte eine lärmbedingte Amygdala-Aktivierung und arterielle Inflammation mit einem erhöhten Risiko für schwerwiegende unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse (MACE) in Zusammenhang gebracht werden (364). Die Abbildungen sind aus (1) und (364) modifiziert und stammen aus (365). MACE= major adverse cardiovascular events

Zusätzlich war die chronische Fluglärmexposition mit kognitiver Beeinträchtigung bei Kindern (327) und mit psychischen Pathologien bei Erwachsenen (368) assoziiert. Dies könnte durch gesteigerten oxidativen Stress im Gehirn sowie Herunterregulierung und Entkopplung der neuronalen NO-Synthase vor allem im präfrontalen Kortex erklärt werden, was insgesamt zu einem Absinken der neuronalen NO Spiegel führen muss und damit zum Verlust eines wichtigen neuronalen Botenstoffs für Gedächtnis- und Denkprozesse (7). Dort werden die autonomen und neuroendokrinen Signalwege reguliert und lärmbedingt kann es vermutlich zur zerebralen Funktionsstörung kommen (369). Zahlreiche Studien zeigten auch einen Zusammenhang zwischen Hypertension und erhöhtem Risiko für kognitive Beeinträchtigung und Demenz (370).

Aus den genannten Beschreibungen in der Literatur und den Ergebnissen dieses Projekts lässt sich auf eine ausgeprägte Verschlechterung der kardiovaskulären Endpunkte im Beisein beider Risikofaktoren, Lärmexposition und arterieller

Hypertonie, schlussfolgern. Dies wird hauptsächlich durch die vaskuläre Entzündung und den oxidativen Stress induziert. Lärm potenziert die Neuroinflammation und den zerebralen oxidativen Stress, was den Zusammenhang zwischen den beiden Risikofaktoren darstellt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Kombination eines klassischen (arterielle Hypertonie) mit einem neuartigen (Lärmexposition) Risikofaktor dem kardiovaskulären System mehr schaden kann, als die jeweils einzelnen Stressoren (279). Daneben legen diese Befunde nahe, dass Umweltrisikofaktoren wie Lärm die Entstehung und Progression klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren bzw. Erkrankungen wie Hypertonie negativ beeinflussen können.

8.7.2. Kurzzeitige Zigarettdampf-Exposition (E-Zigarette)

Laut den Ergebnissen der weltweiten epidemiologischen „Global Burden of Disease“ Studie rangiert 2015 Tabakrauchen an der zweiten Stelle aller Risikofaktoren für Todesfälle, direkt nach arterieller Hypertonie (371). Die schädlichen Wirkungen des Tabakrauchens auf das Herz-Kreislauf-System sind unumstritten (372). In den letzten Jahren wurden die elektronischen Zigaretten (E-Zigaretten) als eine angeblich gesunde Alternative in den Markt eingeführt und wurden als eine wirksame Methode zur Raucherentwöhnung propagiert (373). Die Folge war ein rapider Anstieg des E-Zigaretten-Konsums, vor allem bei jungen Menschen. Beispielhaft berichtet das amerikanische Zentrum für Kontrolle und Prävention von Krankheiten (CDC), dass unter 3,05 Millionen Schülern der E-Zigarettenkonsum deutlich von 1,5 % auf 20,8 % zwischen 2011 und 2018 gestiegen ist. Ein besseres Verständnis der gesundheitlichen Folgen des E-Zigaretten-Konsums ist aufgrund dieser sprunghaften Zuwächse bei den Nutzern auf jeden Fall nötig. In früheren Studien wurde bereits belegt, dass E-Zigaretten-Dampfen (Vaping) eine kardiovaskuläre Dysfunktion, oxidativen Stress oder Entzündung im Gefäß induzieren kann (374, 375). Vaping wurde außerdem mit Bluthochdruck und gesteigerter Thrombogenese korreliert (375-378). Alle diese Folgen können zur Initiierung oder Progression von Atherosklerose führen (379, 380).

In diesen Punkten haben neuere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe den Horizont erweitert, indem wir ein neuartiges Expositionssystem für E-Zigarettdampf verwendet haben (Abbildung 8.9). Diese Daten deuten darauf hin, dass E-Zigaretten-Vaping über einen Nox-2-abhängigen Mechanismus einen prooxidativen und entzündlichen Zustand im Gefäß und in der Lunge induziert, die zu einer kardiovaskulären Dysfunktion beitragen (280).

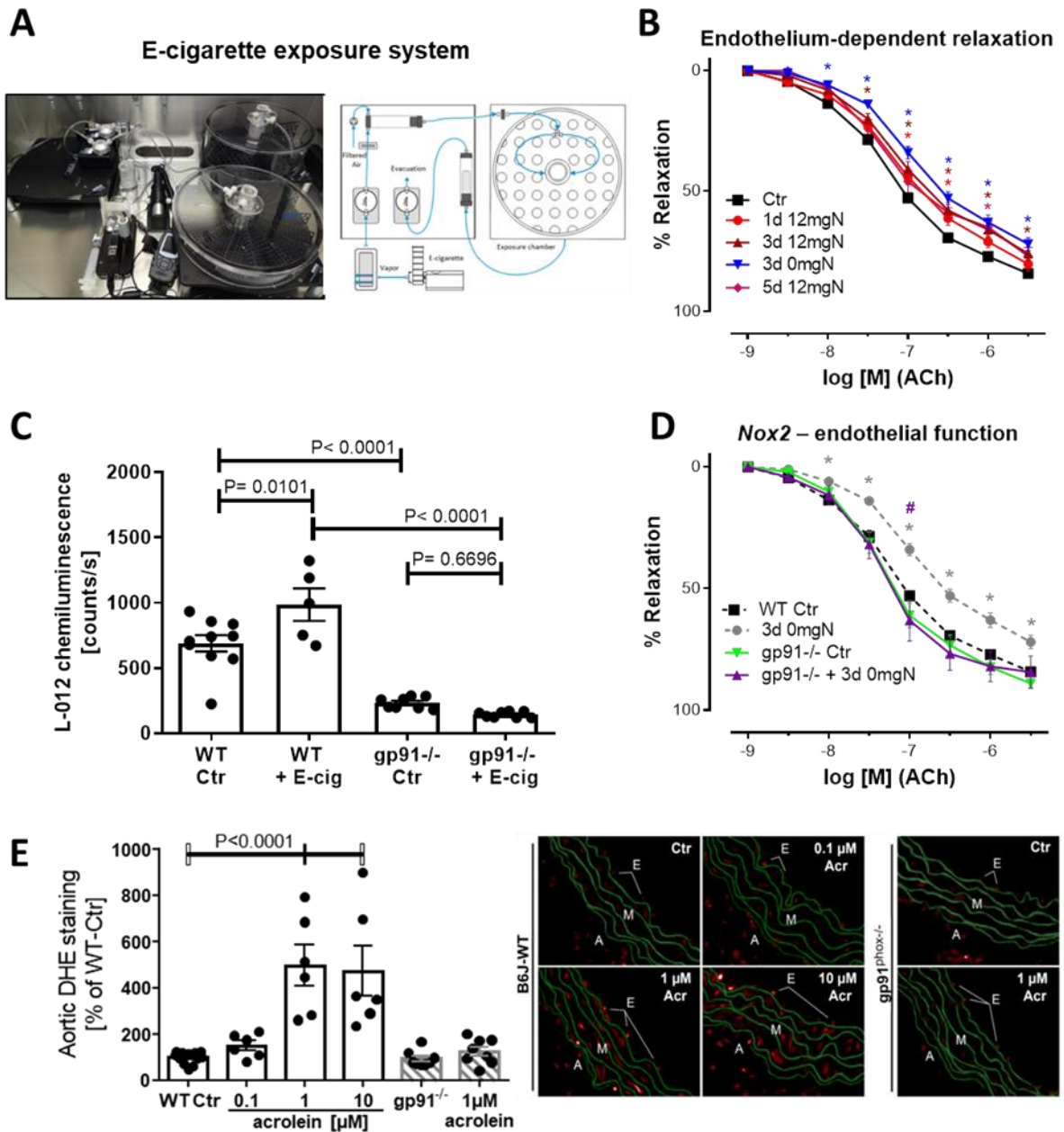


Abbildung 8.9 Effekte des kurzzeitigen E-Zigaretten-Vapings auf die Gefäßfunktion und den oxidativen Stress in *Nox-2^{-/-}* gegenüber Wildtyp-Mäusen.

Ein Bild des E-Zigaretten-Dampfsystems und eine schematische Darstellung mit den Luftstromwegen (A). Alle Expositionsprotokolle (6 Stunden lang pro Tag für 1, 3 und 5 Tage) führten zu einer signifikanten Beeinträchtigung der endothelialen Funktion (gemessen als acetylcholinabhängige Relaxation) in der Wildtyp-Tiergruppe (B). Unter der Abwesenheit von Nikotin wurden die ausgeprägtesten Effekte beobachtet (B). Das E-Zigaretten-Vaping verursachte eine gesteigerte NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Bildung (d. h. einen erhöhten oxidativen Burst) in den Leukozyten im Vollblut der Wildtyp-Mäuse, während keine Veränderung im Vollblut der *Nox-2*-defizienten Mäuse nachgewiesen wurde und insgesamt das stimulierte Signal viel geringer in der *Nox-2^{-/-}*-Gruppe war (C). Unter *Nox-2*-Defizienz wurde auch keine Beeinträchtigung der Gefäßfunktion nach E-Zigarettenexposition beobachtet (D). Im Gegensatz dazu führte das E-Zigaretten-Vaping in der Wildtyp-Gruppe zu

einer signifikanten endothelialen Dysfunktion (gestrichelte Linien in (D) reproduziert aus (B)). Die vaskuläre ROS-Bildung durch Acrolein wurde mittels Dihydroethidium-abhängiger Fluoreszenz in den Aorten-Kryoschnitten nachgewiesen. Der Beitrag der Nox-2 zu diesem ROS-Signal wurde durch den Vergleich von Aortenschnitten der Wildtyp- und Nox-2^{-/-}-Gruppe ermittelt (E). Repräsentative IHC-Bilder sind neben der densitometrischen Quantifikation dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte \pm SEM für n = 8-38 (B), 5-10 (C), 4-14 (D) und mindestens 6 (E) Tiere pro Gruppe. *p < 0,05 vs. nicht-exponierte Kontrollgruppe. Die Daten und die Graphen stammen aus (381).

Wir stellten eine Störung der Endothelfunktion und gesteigerte Marker für oxidativen Stress im Aorten- (siehe Abbildung 8.9) und Hirngewebe in der Gruppe mit E-Zigarettenexposition fest (280). Wie bereits erwähnt zeigte die immunhistochemische Analyse, dass Vaping eine Steigerung des Markers für oxidativen Stress 3-Nitrotyrosin, des Vasokonstriktors Endothelin-1, der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase, der Nox-2 und des 4-HNE-Spiegels im vaskulären Gewebe bewirkte (siehe Abbildungen 7.17, 7.18 und 7.19). Auch in der Lunge war das Signal des Immunostainings für Nox-2 in der durch Nikotin-haltiges Liquid exponierten Gruppe signifikant erhöht (siehe Abbildung 7.20).

Wie schon erläutert führt oxidativer Stress zur endothelialen Dysfunktion durch vermehrten Abbau von NO und Peroxynitrit-Bildung sowie durch Einschränkung der Verfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin. Als eine Quelle für den durch E-Zigaretten-Vaping induzierten oxidativen Stress konnten wir die Nox-2 in diesem Projekt identifizieren. Die E-Zigarettenexposition führte zu einer Hochregulierung der Nox-2-Aktivität. Interessanterweise zeigten die Nox-2-knockout-Mäuse keinen erhöhten oxidativen Stress und keine Störung der Gefäßfunktion als Reaktion auf E-Zigaretten-Vaping. Diese Befunde stehen in Kohärenz zu den zuvor dargestellten Ergebnissen im Hinblick auf die Fluglärmexposition. Nox-2-knockout-Mäuse waren vor den Auswirkungen von Fluglärm geschützt (7). Darüber hinaus induziert Endothelin-1 die Expression der Nox-2 und die Bildung von ROS. Umgekehrt aktivieren die aus Nox-2 produzierten ROS den Promotor für die Endothelin-1-Translation. So kommt es zu einer verstärkten Vasokonstriktion (382). Diese in der Literatur bekannte Tatsache konnte in diesem Projekt durch die erhöhten Werte von Endothelin-1 bestätigt werden (Abbildung 7.17). Schließlich wurde beobachtet, dass das toxische Aldehyd Acrolein, das während des Verdampfungsprozesses des Liquids bei höheren Temperaturen im Verdampfungsgerät der E-Zigarette produziert wurde, Nox-2-getrieben die Produktion von Superoxid im Aortengewebe stimulierte (siehe auch Abbildung 8.9). Bei Nox-2-

Knockout-Mäusen war dieser Effekt fast vollständig unterdrückt. Angesichts des steigenden E-Zigaretten-Konsums unter den Heranwachsenden sollten die Auswirkungen dieses Umwelt- oder besser Lebensstil-Risikofaktors auf das kardiovaskuläre System mit weiteren experimentellen Ansätzen untersucht werden.

8.8. Ausblick bezüglich der DNA-Schäden

Die Feststellung, dass die Lärmexposition oxidative DNA-Schäden in Mäusen verursachte, ist besorgniserregend, vor allem da die erhöhten 4-HNE-Konzentrationen auch andere Basenexzisionsreparaturenzyme wie zum Beispiel die Thymin-DNA-Glykosylase oder die Alkyl-N-purin-DNA-Glykosylase hemmen können (383). Zudem könnte die Akkumulation von potentiell mutagenen Läsionen zur Krebsprogression beitragen (231). In einer Studie mit Ex- und Nicht-Rauchern korrelierten sich die 8-Oxoguanin-Spiegel positiv mit der Inzidenz von Lungenkarzinom mit einem Trend für ein erhöhtes Risiko für die Probanden mit OGG1-Ser326Cys-Polymorphismus (384). Allerdings waren die Ergebnisse populationsbasierter Studien über den Zusammenhang der Lärmbelastung mit der Inzidenz von verschiedenen Krebsformen nicht eindeutig (385-387). Deswegen sind weitere Humanstudien notwendig, um zu beleuchten, ob sich oxidative DNA-Schäden auch in Stadtpopulationen mit erhöhter Lärmexposition häufen und ob diese eine Auswirkung auf die Inzidenz von Krebs haben.

8.9. Limitationen und Stärken der Studie

Abschließend möchte ich auf die Limitationen der vorliegenden Arbeit hinweisen. Generell handelt es sich um tierexperimentelle Studien, die die Übertragbarkeit der Befunde auf die klinische Situation nur bedingt erlauben. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Tiere mussten männliche und weibliche Mäuse verwendet werden und genderspezifische Unterschiede wurden in der Studie nicht berücksichtigt. Weiterhin ergeben sich Probleme aus der Tatsache, dass in der Versuchstierhaltung auch Lärm vorhanden ist. Je nach Intensität des Hintergrundlärms könnte auch die Kontrollgruppe bereits lärminduzierte Schäden aufweisen. Deswegen werden im Lärmprotokoll alle Tiergruppen gleich behandelt, was zum Beispiel den Transport oder die Umgebungsbedingungen angeht, sodass man bei der Bewertung von der gleichen Basissituation ausgehen kann. Weiterhin kann die Versuchssituation an sich stressig sein, z. B. bei E-Zigarette wo die Tiere mehrmals täglich vom Käfig in die Expositionskammer umgesetzt werden. Was den Qualitätsvergleich der Methoden

betrifft, wurden viele Parameter mittels Immunhistochemie untersucht. Die immunhistochemische Analyse spiegelt die Akkumulation der Schäden wider. Somit bestehen größere Chancen, die Auswirkungen nachzuweisen.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen des Exposom-Konzeptes führt der Umweltlärm zur Entwicklung und zum Fortschreiten chronischer Krankheiten und somit zur Beeinträchtigung der Gesundheit im Allgemeinen. In den letzten Dekaden häufen sich im Besonderen die Hinweise sowohl in Tiermodellen als auch in klinischen Studien, dass ein enger Zusammenhang zwischen Lärmexposition und der Inzidenz von arterieller Hypertonie, ischämischer Herzkrankheit, metabolischem Syndrom und ischämischem Schlaganfall und der Mortalität wegen kardiovaskulärer Erkrankungen besteht (1-4).

Was den Pathomechanismus angeht, verursacht Lärm Belästigung und Stressreaktionen, die durch Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse, oxidativen Stress, Entzündung, Thrombose und veränderte Genexpression charakterisiert sind. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies können die endotheliale Dysfunktion über mehrere Mechanismen verstärken. Der wichtigste davon ist die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase.

In der vorliegenden Arbeit wurden die nicht-auditorischen Effekte von Lärm auf das Gefäßsystem, den oxidativen Stress und zusätzlich die DNA-Schäden unter genetischer OGG1-Defizienz in einem Tiermodell untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein 24-stündiges Lärmexpositionsprotokoll angewandt. Anschließend wurden isometrische Spannungsmessung im Organbad, Immunhistochemie, Western-Blot und HPLC als Untersuchungsmethoden verwendet.

Hier konnten die synergistischen Effekte von Fluglärm und OGG1-Defizienz beleuchtet werden, wobei ein direkter Zusammenhang für manche Parameter bisher nicht bekannt war. Die Lärmexposition verursachte oxidative DNA-Schäden und erhöhte die Nox-2-Expression in der Wildtyp-Gruppe, mit einer synergistischen Erhöhung in der der *Ogg1*^{-/-}-Gruppe. Ein ähnliches Ergebnismuster wurde auch für den oxidativen Burst in den Leukozyten und für die oxidativen (4-HNE und 3-NT) sowie inflammatorischen Marker (Cox-2) beobachtet. In den beschallten Tiergruppen wurde auch eine endotheliale Dysfunktion festgestellt. Interessanterweise konnte ein signifikanter Grad von Nitratresistenz in der lärmexponierten *Ogg1*^{-/-}-Gruppe in der endothelunabhängigen Spannungsmessung im Organbad beobachtet werden. Dieser Befund war unerwartet und erfordert weitere Untersuchungen, insbesondere weil die Nitratresistenz mit einer beeinträchtigten ALDH-2-Funktion assoziiert war. Eine eingeschränkte ALDH-2-Aktivität sowie die hier gemessenen erhöhten 4-HNE-Spiegel

korrelieren mit einem gesteigerten kardiovaskulären Risiko (177). Zudem sind gesteigerte 4-HNE-Spiegel als potenter Inhibitor der ALDH-2 nachgewiesen (176).

Nach der bisher vorgestellten Literatur und den in dieser Arbeit gewonnenen Untersuchungsergebnissen sollte man davon ausgehen, dass Lärmexposition als signifikanter kardiovaskulärer Risikofaktor anerkannt werden sollte. Nach Berücksichtigung des Exposom-Konzeptes spielen die Umwelteinflüsse in dicht besiedelten Städten eine prominente Rolle im täglichen Leben und können die menschliche Gesundheit systemisch beeinträchtigen. Trotz der in den letzten Jahrzehnten revolutionären Entwicklung der Therapiestrategien der Menschen auf individueller Ebene sind auch ernsthafte und langfristige Maßnahmen zur Bekämpfung gesundheitsgefährdender Umweltexpositionen auf Bevölkerungsniveau notwendig. In diesem Sinne sollte Lärm entsprechend in den Leitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie aufgenommen werden, sodass verwundbare Populationen künftig vor dessen negativen Auswirkungen geschützt werden.

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. Munzel T, Daiber A, Steven S, Tran LP, Ullmann E, Kossmann S, et al. Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur Heart J.* 2017;38(37):2838-49.
2. Vienneau D, Schindler C, Perez L, Probst-Hensch N, Roosli M. The relationship between transportation noise exposure and ischemic heart disease: a meta-analysis. *Environ Res.* 2015;138:372-80.
3. Munzel T, Schmidt FP, Steven S, Herzog J, Daiber A, Sorensen M. Environmental Noise and the Cardiovascular System. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(6):688-97.
4. Kempen EV, Casas M, Pershagen G, Foraster M. WHO Environmental Noise Guidelines for the European Region: A Systematic Review on Environmental Noise and Cardiovascular and Metabolic Effects: A Summary. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(2).
5. Munzel T, Sorensen M, Gori T, Schmidt FP, Rao X, Brook J, et al. Environmental stressors and cardio-metabolic disease: part I-epidemiologic evidence supporting a role for noise and air pollution and effects of mitigation strategies. *Eur Heart J.* 2017;38(8):550-6.
6. Munzel T, Sorensen M, Gori T, Schmidt FP, Rao X, Brook FR, et al. Environmental stressors and cardio-metabolic disease: part II-mechanistic insights. *Eur Heart J.* 2017;38(8):557-64.
7. Kroller-Schon S, Daiber A, Steven S, Oelze M, Frenis K, Kalinovic S, et al. Crucial role for Nox2 and sleep deprivation in aircraft noise-induced vascular and cerebral oxidative stress, inflammation, and gene regulation. *Eur Heart J.* 2018;39(38):3528-39.
8. Basner M, Babisch W, Davis A, Brink M, Clark C, Janssen S, et al. Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet.* 2014;383(9925):1325-32.
9. *Praktische Arbeitsmedizin.* 6. Jansing, P.-J.: Berufskrankheit Lärmschwerhörigkeit, ISSN 1861- 6704 *Prakt. Arb.med.* 2006; 6: 6-11
10. Bauer, M., Engel, H., Koelsch, F., Krohn, J.; Die Ausdehnung der Unfallversicherung auf Berufskrankheiten, Zweite Verordnung des Reichsarbeitsministers vom 11. Februar 1929; in: Martineck (Hrsg.); *Arbeit und Gesundheit, Schriftenreihe zum Reichsarbeitsblatt, Heft 12;* Verlag von Reimar Hobbing, Berlin 1929
11. Wickenhagen, E.; *Geschichte der gewerblichen Unfallversicherung, Wesen und Wirken der gewerblichen Berufsgenossenschaften;* R. Oldenbourg Verlag, München, Wien 1980
12. *Verordnung zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen durch Lärm und Vibrationen, BGBl. I S. 261 (2007)*
13. Munzel T, Sorensen M, Schmidt F, Schmidt E, Steven S, Kroller-Schon S, et al. The Adverse Effects of Environmental Noise Exposure on Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *Antioxid Redox Signal.* 2018;28(9):873-908.
14. Babisch W. Cardiovascular effects of noise. *Noise Health.* 2011;13(52):201-4.
15. Babisch W. Stress hormones in the research on cardiovascular effects of noise. *Noise Health.* 2003;5(18):1-11.
16. Guski R, Schreckenber D, Schuemer R. WHO Environmental Noise Guidelines for the European Region: A Systematic Review on Environmental Noise and Annoyance. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(12).

17. Collaborators GBDRF. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392(10159):1923-94.
18. https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/383921/noise-guidelines-eng.pdf
19. Daiber A, Lelieveld J, Steven S, Oelze M, Kroller-Schon S, Sorensen M, et al. The "exposome" concept - how environmental risk factors influence cardiovascular health. *Acta Biochim Pol*. 2019;66(3):269-83.
20. Babisch W. Updated exposure-response relationship between road traffic noise and coronary heart diseases: a meta-analysis. *Noise Health*. 2014;16(68):1-9.
21. Roswall N, Raaschou-Nielsen O, Ketzel M, Gammelmark A, Overvad K, Olsen A, et al. Long-term residential road traffic noise and NO₂ exposure in relation to risk of incident myocardial infarction - A Danish cohort study. *Environ Res*. 2017;156:80-6.
22. Selander J, Nilsson ME, Bluhm G, Rosenlund M, Lindqvist M, Nise G, et al. Long-term exposure to road traffic noise and myocardial infarction. *Epidemiology*. 2009;20(2):272-9.
23. Sorensen M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Jensen SS, Lillelund KG, Beelen R, et al. Road traffic noise and incident myocardial infarction: a prospective cohort study. *PLoS One*. 2012;7(6):e39283.
24. Sorensen M, Hvidberg M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Lillelund KG, Jakobsen J, et al. Road traffic noise and stroke: a prospective cohort study. *Eur Heart J*. 2011;32(6):737-44.
25. Hansell AL, Blangiardo M, Fortunato L, Floud S, de Hoogh K, Fecht D, et al. Aircraft noise and cardiovascular disease near Heathrow airport in London: small area study. *BMJ*. 2013;347:f5432.
26. Halonen JI, Hansell AL, Gulliver J, Morley D, Blangiardo M, Fecht D, et al. Road traffic noise is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality and all-cause mortality in London. *Eur Heart J*. 2015;36(39):2653-61.
27. Heritier H, Vienneau D, Foraster M, Eze IC, Schaffner E, Thiesse L, et al. Transportation noise exposure and cardiovascular mortality: a nationwide cohort study from Switzerland. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(4):307-15.
28. Monrad M, Sajadieh A, Christensen JS, Ketzel M, Raaschou-Nielsen O, Tjonneland A, et al. Residential exposure to traffic noise and risk of incident atrial fibrillation: A cohort study. *Environ Int*. 2016;92-93:457-63.
29. Seidler A, Wagner M, Schubert M, Droge P, Romer K, Pons-Kuhnemann J, et al. Aircraft, road and railway traffic noise as risk factors for heart failure and hypertensive heart disease-A case-control study based on secondary data. *Int J Hyg Environ Health*. 2016;219(8):749-58.
30. Beutel ME, Junger C, Klein EM, Wild P, Lackner K, Blettner M, et al. Noise Annoyance Is Associated with Depression and Anxiety in the General Population- The Contribution of Aircraft Noise. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155357.
31. Sherwood A, Hinderliter AL, Watkins LL, Waugh RA, Blumenthal JA. Impaired endothelial function in coronary heart disease patients with depressive symptomatology. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(4):656-9.
32. van Kempen E, Babisch W. The quantitative relationship between road traffic noise and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens*. 2012;30(6):1075-86.
33. Dimakopoulou K, Koutentakis K, Papageorgiou I, Kasdagli MI, Haralabidis AS, Sourtzi P, et al. Is aircraft noise exposure associated with cardiovascular disease and

- hypertension? Results from a cohort study in Athens, Greece. *Occup Environ Med.* 2017;74(11):830-7.
34. Eriksson C, Rosenlund M, Pershagen G, Hilding A, Ostenson CG, Bluhm G. Aircraft noise and incidence of hypertension. *Epidemiology.* 2007;18(6):716-21.
 35. Fuks KB, Weinmayr G, Basagana X, Gruziova O, Hampel R, Oftedal B, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and traffic noise and incident hypertension in seven cohorts of the European study of cohorts for air pollution effects (ESCAPE). *Eur Heart J.* 2017;38(13):983-90.
 36. Babisch W, Kamp I. Exposure-response relationship of the association between aircraft noise and the risk of hypertension. *Noise Health* 2009;11:161 – 168.
 37. Jarup L, Babisch W, Houthuijs D, Pershagen G, Katsouyanni K, Cadum E, et al. Hypertension and exposure to noise near airports: the HYENA study. *Environ Health Perspect.* 2008;116(3):329-33.
 38. Kalsch H, Hennig F, Moebus S, Mohlenkamp S, Dragano N, Jakobs H, et al. Are air pollution and traffic noise independently associated with atherosclerosis: the Heinz Nixdorf Recall Study. *Eur Heart J.* 2014;35(13):853-60.
 39. Zijlema W, Cai Y, Doiron D, Mbatchou S, Fortier I, Gulliver J, et al. Road traffic noise, blood pressure and heart rate: Pooled analyses of harmonized data from 88,336 participants. *Environ Res.* 2016;151:804-13.
 40. Foraster M, Eze IC, Schaffner E, Vienneau D, Heritier H, Endes S, et al. Exposure to Road, Railway, and Aircraft Noise and Arterial Stiffness in the SAPALDIA Study: Annual Average Noise Levels and Temporal Noise Characteristics. *Environ Health Perspect.* 2017;125(9):097004.
 41. Christensen JS, Raaschou-Nielsen O, Tjonneland A, Nordsborg RB, Jensen SS, Sorensen TI, et al. Long-term exposure to residential traffic noise and changes in body weight and waist circumference: A cohort study. *Environ Res.* 2015;143(Pt A):154-61.
 42. Eriksson C, Hilding A, Pyko A, Bluhm G, Pershagen G, Ostenson CG. Long-term aircraft noise exposure and body mass index, waist circumference, and type 2 diabetes: a prospective study. *Environ Health Perspect.* 2014;122(7):687-94.
 43. Pyko A, Eriksson C, Oftedal B, Hilding A, Ostenson CG, Krog NH, et al. Exposure to traffic noise and markers of obesity. *Occup Environ Med.* 2015;72(8):594-601.
 44. Pyko A, Eriksson C, Lind T, Mitkovskaya N, Wallas A, Ogren M, et al. Long-Term Exposure to Transportation Noise in Relation to Development of Obesity-a Cohort Study. *Environ Health Perspect.* 2017;125(11):117005.
 45. Sorensen M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Becker T, Tjonneland A, Overvad K, et al. Long-term exposure to road traffic noise and incident diabetes: a cohort study. *Environ Health Perspect.* 2013;121(2):217-22.
 46. Eze IC, Foraster M, Schaffner E, Vienneau D, Heritier H, Rudzik F, et al. Long-term exposure to transportation noise and air pollution in relation to incident diabetes in the SAPALDIA study. *Int J Epidemiol.* 2017;46(4):1115-25.
 47. Clark C, Sbihi H, Tamburic L, Brauer M, Frank LD, Davies HW. Association of Long-Term Exposure to Transportation Noise and Traffic-Related Air Pollution with the Incidence of Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Environ Health Perspect.* 2017;125(8):087025.
 48. Cai Y, Hansell AL, Blangiardo M, Burton PR, BioShaRe, de Hoogh K, et al. Long-term exposure to road traffic noise, ambient air pollution, and cardiovascular risk factors in the HUNT and lifelines cohorts. *Eur Heart J.* 2017;38(29):2290-6.

49. Roswall N, Ammitzboll G, Christensen JS, Raaschou-Nielsen O, Jensen SS, Tjonneland A, et al. Residential exposure to traffic noise and leisure-time sports - A population-based study. *Int J Hyg Environ Health*. 2017;220(6):1006-13.
50. Foraster M, Eze IC, Vienneau D, Brink M, Cajochen C, Caviezel S, et al. Long-term transportation noise annoyance is associated with subsequent lower levels of physical activity. *Environ Int*. 2016;91:341-9.
51. Roswall N, Christensen JS, Bidstrup PE, Raaschou-Nielsen O, Jensen SS, Tjonneland A, et al. Associations between residential traffic noise exposure and smoking habits and alcohol consumption-A population-based study. *Environ Pollut*. 2018;236:983-91.
52. Schmidt FP, Basner M, Kroger G, Weck S, Schnorbus B, Muttray A, et al. Effect of nighttime aircraft noise exposure on endothelial function and stress hormone release in healthy adults. *Eur Heart J*. 2013;34(45):3508-14a.
53. Schmidt F, Kolle K, Kreuder K, Schnorbus B, Wild P, Hechtner M, et al. Nighttime aircraft noise impairs endothelial function and increases blood pressure in patients with or at high risk for coronary artery disease. *Clin Res Cardiol*. 2015;104(1):23-30.
54. Babisch W, Ising H, Gallacher JE, Sweetnam PM, Elwood PC. Traffic noise and cardiovascular risk: the Caerphilly and Speedwell studies, third phase--10-year follow up. *Arch Environ Health*. 1999;54(3):210-6.
55. Amir O, Alroy S, Schliamser JE, Asmir I, Shiran A, Flugelman MY, et al. Brachial artery endothelial function in residents and fellows working night shifts. *Am J Cardiol*. 2004;93(7):947-9.
56. Takase B, Akima T, Uehata A, Ohsuzu F, Kurita A. Effect of chronic stress and sleep deprivation on both flow-mediated dilation in the brachial artery and the intracellular magnesium level in humans. *Clin Cardiol*. 2004;27(4):223-7.
57. Ferrie JE, Shipley MJ, Cappuccio FP, Brunner E, Miller MA, Kumari M, et al. A prospective study of change in sleep duration: associations with mortality in the Whitehall II cohort. *Sleep*. 2007;30(12):1659-66.
58. Chien KL, Chen PC, Hsu HC, Su TC, Sung FC, Chen MF, et al. Habitual sleep duration and insomnia and the risk of cardiovascular events and all-cause death: report from a community-based cohort. *Sleep*. 2010;33(2):177-84.
59. Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126(6):753-67.
60. Lauer AM, May BJ, Hao ZJ, Watson J. Analysis of environmental sound levels in modern rodent housing rooms. *Lab Anim (NY)*. 2009;38(5):154-60.
61. Peterson EA, Augenstein JS, Tanis DC, Augenstein DG. Noise raises blood pressure without impairing auditory sensitivity. *Science*. 1981;211(4489):1450-2.
62. Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Effects of noise on blood pressure and vascular reactivities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1992;19(12):833-8.
63. Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Attenuation of Endothelium-Dependent Relaxation in Mesenteric Artery during Noise-Induced Hypertension. *J Biomed Sci*. 1994;1(1):49-53.
64. Altura BM, Altura BT, Gebrewold A, Ising H, Gunther T. Noise-induced hypertension and magnesium in rats: relationship to microcirculation and calcium. *J Appl Physiol (1985)*. 1992;72(1):194-202.
65. Said MA, El-Gohary OA. Effect of noise stress on cardiovascular system in adult male albino rat: implication of stress hormones, endothelial dysfunction and oxidative stress. *Gen Physiol Biophys*. 2016;35(3):371-7.

66. Gannouni N, Mhamdi A, Tebourbi O, El May M, Sakly M, Rhouma KB. Qualitative and quantitative assessment of noise at moderate intensities on extra-auditory system in adult rats. *Noise Health*. 2013;15(67):406-11.
67. Baldwin AL, Primeau RL, Johnson WE. Effect of noise on the morphology of the intestinal mucosa in laboratory rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006;45(1):74-82.
68. Cui B, Gai Z, She X, Wang R, Xi Z. Effects of chronic noise on glucose metabolism and gut microbiota-host inflammatory homeostasis in rats. *Sci Rep*. 2016;6:36693.
69. Ersoy A, Koc ER, Sahin S, Duzgun U, Acar B, Ilhan A. Possible effects of rosuvastatin on noise-induced oxidative stress in rat brain. *Noise Health*. 2014;16(68):18-25.
70. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992;267(9):1244-52.
71. Ising H, Braun C. Acute and chronic endocrine effects of noise: Review of the research conducted at the Institute for Water, Soil and Air Hygiene. *Noise Health*. 2000;2(7):7-24.
72. Vaernes R, Ursin H, Darragh A, Lambe R. Endocrine response patterns and psychological correlates. *J Psychosom Res*. 1982;26(2):123-31.
73. Babisch W. The Noise/Stress Concept, Risk Assessment and Research Needs. *Noise Health*. 2002;4(16):1-11.
74. Spreng M. Central nervous system activation by noise. *Noise Health*. 2000;2(7):49-58.
75. Daiber A, Kroller-Schon S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Vujacic-Mirski K, et al. Environmental noise induces the release of stress hormones and inflammatory signaling molecules leading to oxidative stress and vascular dysfunction-Signatures of the internal exposome. *Biofactors*. 2019;45(4):495-506.
76. Munzel T, Gori T, Babisch W, Basner M. Cardiovascular effects of environmental noise exposure. *Eur Heart J*. 2014;35(13):829-36.
77. Lundberg U. Coping with Stress: Neuroendocrine Reactions and Implications for Health. *Noise Health*. 1999;1(4):67-74.
78. Henry JP. Biological basis of the stress response. *Integr Physiol Behav Sci*. 1992;27(1):66-83.
79. Meyer T, Wirtz PH. Mechanisms of Mitochondrial Redox Signaling in Psychosocial Stress-Responsive Systems: New Insights into an Old Story. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(9):760-72.
80. Xia N, Li H. Loneliness, Social Isolation, and Cardiovascular Health. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(9):837-51.
81. Schiavone S, Sorce S, Dubois-Dauphin M, Jaquet V, Colaianna M, Zotti M, et al. Involvement of NOX2 in the development of behavioral and pathologic alterations in isolated rats. *Biol Psychiatry*. 2009;66(4):384-92.
82. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(12):1475-90.
83. Schafer SC, Wallerath T, Closs EI, Schmidt C, Schwarz PM, Forstermann U, et al. Dexamethasone suppresses eNOS and CAT-1 and induces oxidative stress in mouse resistance arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(1):H436-44.
84. Wallerath T, Witte K, Schafer SC, Schwarz PM, Prellwitz W, Wohlfart P, et al. Down-regulation of the expression of endothelial NO synthase is likely to contribute to glucocorticoid-mediated hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13357-62.

85. Yang S, Zhang L. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2(1):1-12.
86. Powell ND, Sloan EK, Bailey MT, Arevalo JM, Miller GE, Chen E, et al. Social stress up-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome via beta-adrenergic induction of myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16574-9.
87. Lefevre M, Carlier MC, Champelovier P, Lambert J, Laumon B, Evrard AS. Effects of aircraft noise exposure on saliva cortisol near airports in France. *Occup Environ Med*. 2017;74(8):612-8.
88. Selander J, Bluhm G, Theorell T, Pershagen G, Babisch W, Seiffert I, et al. Saliva cortisol and exposure to aircraft noise in six European countries. *Environ Health Perspect*. 2009;117(11):1713-7.
89. Wagner J, Cik M, Marth E, Santner BI, Gallasch E, Lackner A, et al. Feasibility of testing three salivary stress biomarkers in relation to naturalistic traffic noise exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213(2):153-5.
90. Evans GW, Lercher P, Meis M, Ising H, Kofler WW. Community noise exposure and stress in children. *J Acoust Soc Am*. 2001;109(3):1023-7.
91. Wallas A, Eriksson C, Gruziova O, Lind T, Pyko A, Sjostrom M, et al. Road traffic noise and determinants of saliva cortisol levels among adolescents. *Int J Hyg Environ Health*. 2018;221(2):276-82.
92. Munzel T, Knorr M, Schmidt F, von Bardeleben S, Gori T, Schulz E. Airborne disease: a case of a Takotsubo cardiomyopathie as a consequence of nighttime aircraft noise exposure. *Eur Heart J*. 2016;37(37):2844.
93. Kryter KD. The effects of noise on man. *J Speech Hear Disord Monogr Suppl*. 1950;1:1-95.
94. Babisch W. Transportation noise and cardiovascular risk: updated review and synthesis of epidemiological studies indicate that the evidence has increased. *Noise Health*. 2006;8(30):1-29.
95. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
96. Wenzel P, Kossmann S, Munzel T, Daiber A. Redox regulation of cardiovascular inflammation - Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med*. 2017;109:48-60.
97. Brotman DJ, Golden SH, Wittstein IS. The cardiovascular toll of stress. *Lancet*. 2007;370(9592):1089-100.
98. Steptoe A, Hamer M, Chida Y. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2007;21(7):901-12.
99. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
100. Fetoni AR, Eramo SL, Paciello F, Rolesi R, Samengo D, Paludetti G, et al. The redox protein p66(shc) mediates cochlear vascular dysfunction and transient noise-induced hearing loss. *Sci Rep*. 2016;6:25450.
101. Tan WJ, Thorne PR, Vlajkovic SM. Characterisation of cochlear inflammation in mice following acute and chronic noise exposure. *Histochem Cell Biol*. 2016;146(2):219-30.
102. Molina SJ, Miceli M, Guelman LR. Noise exposure and oxidative balance in auditory and extra-auditory structures in adult and developing animals.

- Pharmacological approaches aimed to minimize its effects. *Pharmacol Res.* 2016;109:86-91.
103. Ramkumar V, Whitworth CA, Pingle SC, Hughes LF, Rybak LP. Noise induces A1 adenosine receptor expression in the chinchilla cochlea. *Hear Res.* 2004;188(1-2):47-56.
 104. Fujita T, Yamashita D, Katsunuma S, Hasegawa S, Tanimoto H, Nibu K. Increased inner ear susceptibility to noise injury in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes.* 2012;61(11):2980-6.
 105. Cui B, Su D, Li W, She X, Zhang M, Wang R, et al. Effects of chronic noise exposure on the microbiome-gut-brain axis in senescence-accelerated prone mice: implications for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):190.
 106. Cui B, Li K, Gai Z, She X, Zhang N, Xu C, et al. Chronic Noise Exposure Acts Cumulatively to Exacerbate Alzheimer's Disease-Like Amyloid-beta Pathology and Neuroinflammation in the Rat Hippocampus. *Sci Rep.* 2015;5:12943.
 107. Kim A, Sung JH, Bang JH, Cho SW, Lee J, Sim CS. Effects of self-reported sensitivity and road-traffic noise levels on the immune system. *PLoS One.* 2017;12(10):e0187084.
 108. Hage FG, Szalai AJ. C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(12):1115-22.
 109. Ramamoorthy RD, Nallasamy V, Reddy R, Esther N, Maruthappan Y. A review of C-reactive protein: A diagnostic indicator in periodontal medicine. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S422-6.
 110. Fouladseresht H, Ghamar Talepoor A, Farjadian S, Khosropanah S, Doroudchi M. Anti-varicella Zoster Virus IgG and hsCRP Levels Correlate with Progression of Coronary Artery Atherosclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2019;18(5):543-53.
 111. Atanackovic D, Brunner-Weinzierl MC, Kroger H, Serke S, Deter HC. Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species. *Immunol Invest.* 2002;31(2):73-91.
 112. Herbert TB, Cohen S, Marsland AL, Bachen EA, Rabin BS, Muldoon MF, et al. Cardiovascular reactivity and the course of immune response to an acute psychological stressor. *Psychosom Med.* 1994;56(4):337-44.
 113. Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985;311(1152):617-31.
 114. Keele BB, Jr., McCord JM, Fridovich I. Further characterization of bovine superoxide dismutase and its isolation from bovine heart. *J Biol Chem.* 1971;246(9):2875-80.
 115. Daiber A. Pentaerithryltetranitrat: Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit - experimentelle und klinische Aspekte. Damstadt: Steinkopff Verlag; 2006.
 116. Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47(2):167-77.
 117. Fishman AP. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;401:1-8.
 118. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 1993;28:97-9.
 119. Purves WK, Markl J. *Biologie.* 7. Aufl., Nachdr.. ed. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2010.

120. Klinker R, Baumann R. Physiologie : 68 Tabellen. 6., vollst. überarb. Aufl.. ed. Stuttgart {[u.a.]: Thieme; 2010.
121. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase I β . *Nature*. 2000;404(6774):197-201.
122. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res*. 2000;87(9):825-30.
123. Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation*. 2003;108(18):2172-83.
124. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci*. 2015;129(2):83-94.
125. Munzel T, Steven S, Daiber A. Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction. *Vascul Pharmacol*. 2014;63(3):105-13.
126. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . *Science*. 1999;286(5444):1583-7.
127. Victor VM, Rocha M, Sola E, Banuls C, Garcia-Malpartida K, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des*. 2009;15(26):2988-3002.
128. Daiber A, Münzel T. Vaskulärer oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion. *Krankenhauspharmazie*. 2007(28):313–22.
129. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989;83(5):1774-7.
130. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*. 1987;92(3):639-46.
131. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1551-7.
132. Schachinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation*. 1995;92(8):2087-94.
133. Rosenberger G, Fichtlscherer S. [Analysis of forearm circulation--a substitute for diagnosis of coronary atherosclerosis?]. *Herz*. 1998;23(2):130-4.
134. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, et al. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(10):1849-57.
135. Daiber et al, *Chemie in unserer Zeit* 6, 366-375; 2002
136. Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(2):F178-90.
137. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(3):818-24.

138. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res.* 2001;88(11):E68-75.
139. Ying J, Clavreul N, Sethuraman M, Adachi T, Cohen RA. Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(8):1099-108.
140. Hill BG, Bhatnagar A. Role of glutathiolation in preservation, restoration and regulation of protein function. *IUBMB Life.* 2007;59(1):21-6.
141. Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, Reyes LA, Hemann C, Talukder MA, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. *Nature.* 2010;468(7327):1115-8.
142. Schulz E, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(2):308-24.
143. Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch.* 2010;459(6):793-806.
144. Daiber A, Oelze M, Steven S, Kroller-Schon S, Munzel T. Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. *Redox Biol.* 2017;12:35-49.
145. Brune B, Schmidt KU, Ullrich V. Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur J Biochem.* 1990;192(3):683-8.
146. Weber M, Lauer N, Mulsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1360-7.
147. Jabs A, Oelze M, Mikhed Y, Stamm P, Kroller-Schon S, Welschof P, et al. Effect of soluble guanylyl cyclase activator and stimulator therapy on nitroglycerin-induced nitrate tolerance in rats. *Vascul Pharmacol.* 2015;71:181-91.
148. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
149. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):691-728.
150. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(5):687-706.
151. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(7):1126-67.
152. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1670-89.
153. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):897-906.
154. Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res.* 2008;102(4):488-96.
155. Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, Muller J, et al. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived

- reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(8):1435-47.
156. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):342-4.
157. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999;93(5):1464-76.
158. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(3):217-26.
159. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med*. 2014;76:208-26.
160. Kuhns DB, Alvord WG, Heller T, Feld JJ, Pike KM, Marciano BE, et al. Residual NADPH oxidase and survival in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2010;363(27):2600-10.
161. <http://leitlinien.dkg.org/>
162. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97(7):618-28.
163. Munzel T, Daiber A, Gori T. Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance. *Circulation*. 2011;123(19):2132-44.
164. Munzel T, Heitzer T, Kurz S, Harrison DG, Luhman C, Pape L, et al. Dissociation of coronary vascular tolerance and neurohormonal adjustments during long-term nitroglycerin therapy in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(2):297-303.
165. Bosron WF, Ehrig T, Li TK. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. *Semin Liver Dis*. 1993;13(2):126-35.
166. McMichael M, Hellstrom-Lindahl E, Weiner H. Identification and selective precipitation of human aldehyde dehydrogenase isozymes using antibodies raised to horse liver aldehyde dehydrogenase isozymes. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(3):323-9.
167. Beretta M, Wolkart G, Schernthaner M, Griesberger M, Neubauer R, Schmidt K, et al. Vascular bioactivation of nitroglycerin is catalyzed by cytosolic aldehyde dehydrogenase-2. *Circ Res*. 2012;110(3):385-93.
168. Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc*. 2004;63(1):49-63.
169. Chen Z, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(12):8306-11.
170. Klemenska E, Beresewicz A. Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance. *Cardiol J*. 2009;16(1):11-9.
171. Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Munzel T. New insights into bioactivation of organic nitrates, nitrate tolerance and cross-tolerance. *Clin Res Cardiol*. 2008;97(1):12-20.
172. Chen Z, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends Cardiovasc Med*. 2006;16(8):259-65.
173. Aktories K, Forth W, Allgaier C. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker ; mit 305 Tabellen. 10., überarb. Aufl.. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2009.
174. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, Wendt M, et al. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*. 2004;113(3):482-9.

175. Wenzel P, Hink U, Oelze M, Schuppan S, Schaeuble K, Schildknecht S, et al. Role of reduced lipoic acid in the redox regulation of mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity. Implications for mitochondrial oxidative stress and nitrate tolerance. *J Biol Chem*. 2007;282(1):792-9.
176. Oelze M, Knorr M, Schell R, Kamuf J, Pautz A, Art J, et al. Regulation of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2) activity by electrophiles in vitro. *J Biol Chem*. 2011;286(11):8893-900.
177. Munzel T, Daiber A. The potential of aldehyde dehydrogenase 2 as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(3):217-31.
178. Ma H, Guo R, Yu L, Zhang Y, Ren J. Aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) rescues myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of autophagy paradox and toxic aldehyde. *Eur Heart J*. 2011;32(8):1025-38.
179. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 2008;321(5895):1493-5.
180. Sun A, Zou Y, Wang P, Xu D, Gong H, Wang S, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 plays protective roles in heart failure after myocardial infarction via suppression of the cytosolic JNK/p53 pathway in mice. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(5):e000779.
181. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology*. 2007;49(2):93-102.
182. Fauconnier J, Roberge S, Saint N, Lacampagne A. Type 2 ryanodine receptor: a novel therapeutic target in myocardial ischemia/reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2013;138(3):323-32.
183. Zhang YS, He L, Liu B, Li NS, Luo XJ, Hu CP, et al. A novel pathway of NADPH oxidase/vascular peroxidase 1 in mediating oxidative injury following ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(3):266.
184. Chen H, Yoshioka H, Kim GS, Jung JE, Okami N, Sakata H, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1505-17.
185. Zheng R, Po I, Mishin V, Black AT, Heck DE, Laskin DL, et al. The generation of 4-hydroxynonenal, an electrophilic lipid peroxidation end product, in rabbit cornea organ cultures treated with UVB light and nitrogen mustard. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(2):345-55.
186. Nam TG. Lipid peroxidation and its toxicological implications. *Toxicol Res*. 2011;27(1):1-6.
187. Suda S, Katsura K, Kanamaru T, Saito M, Katayama Y. Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2013;707(1-3):26-31.
188. Zhang P, Xu D, Wang S, Fu H, Wang K, Zou Y, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 activity enhances antimycin-induced rat cardiomyocytes apoptosis through activation of MAPK signaling pathway. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(8):590-3.
189. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(4):735-46.
190. Pang JJ, Barton LA, Chen YG, Ren J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase in myocardial ischemia-reperfusion injury: from bench to bedside. *Sheng Li Xue Bao*. 2015;67(6):535-44.

191. Ping P. Getting to the heart of proteomics. *N Engl J Med*. 2009;360(5):532-4.
192. Koda K, Salazar-Rodriguez M, Corti F, Chan NY, Estephan R, Silver RB, et al. Aldehyde dehydrogenase activation prevents reperfusion arrhythmias by inhibiting local renin release from cardiac mast cells. *Circulation*. 2010;122(8):771-81.
193. Robador PA, Seyedi N, Chan NY, Koda K, Levi R. Aldehyde dehydrogenase type 2 activation by adenosine and histamine inhibits ischemic norepinephrine release in cardiac sympathetic neurons: mediation by protein kinase Cepsilon. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;343(1):97-105.
194. Luo XJ, Liu B, Ma QL, Peng J. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, a potential drug target for protection of heart and brain from ischemia/reperfusion injury. *Curr Drug Targets*. 2014;15(10):948-55.
195. Ohsawa I, Kamino K, Nagasaka K, Ando F, Niino N, Shimokata H, et al. Genetic deficiency of a mitochondrial aldehyde dehydrogenase increases serum lipid peroxides in community-dwelling females. *J Hum Genet*. 2003;48(8):404-9.
196. Hui P, Nakayama T, Morita A, Sato N, Hishiki M, Saito K, et al. Common single nucleotide polymorphisms in Japanese patients with essential hypertension: aldehyde dehydrogenase 2 gene as a risk factor independent of alcohol consumption. *Hypertens Res*. 2007;30(7):585-92.
197. Kato N, Takeuchi F, Tabara Y, Kelly TN, Go MJ, Sim X, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies common variants associated with blood pressure variation in east Asians. *Nat Genet*. 2011;43(6):531-8.
198. Shin C, Kwack K, Cho NH, Kim SH, Baik I. Sex-specific differences in the association of a common aldehyde dehydrogenase 2 gene polymorphism and alcohol consumption with stroke risk in a Korean population: a prospective cohort study. *Nutr Res Pract*. 2015;9(1):79-86.
199. Idewaki Y, Iwase M, Fujii H, Ohkuma T, Ide H, Kaizu S, et al. Association of Genetically Determined Aldehyde Dehydrogenase 2 Activity with Diabetic Complications in Relation to Alcohol Consumption in Japanese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: The Fukuoka Diabetes Registry. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143288.
200. Xu F, Chen YG, Xue L, Li RJ, Zhang H, Bian Y, et al. Role of aldehyde dehydrogenase 2 Glu504lys polymorphism in acute coronary syndrome. *J Cell Mol Med*. 2011;15(9):1955-62.
201. Mizuno Y, Harada E, Morita S, Kinoshita K, Hayashida M, Shono M, et al. East asian variant of aldehyde dehydrogenase 2 is associated with coronary spastic angina: possible roles of reactive aldehydes and implications of alcohol flushing syndrome. *Circulation*. 2015;131(19):1665-73.
202. Wang Q, Zhou S, Wang L, Lei M, Wang Y, Miao C, et al. ALDH2 rs671 Polymorphism and coronary heart disease risk among Asian populations: a meta-analysis and meta-regression. *DNA Cell Biol*. 2013;32(7):393-9.
203. Han H, Wang H, Yin Z, Jiang H, Fang M, Han J. Association of genetic polymorphisms in ADH and ALDH2 with risk of coronary artery disease and myocardial infarction: a meta-analysis. *Gene*. 2013;526(2):134-41.
204. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1998;17(1):25-37.
205. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res*. 1995;339(2):73-89.
206. Daiber A, Schildknecht S, Muller J, Kamuf J, Bachschmid MM, Ullrich V. Chemical model systems for cellular nitros(yl)ation reactions. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(4):458-67.

207. Marnett LJ, Burcham PC. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chem Res Toxicol*. 1993;6(6):771-85.
208. Zingarelli B, O'Connor M, Wong H, Salzman AL, Szabo C. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly-adenosine diphosphate ribosyl synthetase and causes cellular energy depletion in macrophages stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*. 1996;156(1):350-8.
209. Juedes MJ, Wogan GN. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat Res*. 1996;349(1):51-61.
210. Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*. 1995;16(9):2045-50.
211. Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res*. 1991;250(1-2):3-16.
212. Markkanen E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2017;59:82-105.
213. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*. 1991;254(5034):1001-3.
214. Kim YJ, Wilson DM, 3rd. Overview of base excision repair biochemistry. *Curr Mol Pharmacol*. 2012;5(1):3-13.
215. Lee DH, Liu Y, Lee HW, Xia B, Brice AR, Park SH, et al. A structural determinant in the uracil DNA glycosylase superfamily for the removal of uracil from adenine/uracil base pairs. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(2):1081-9.
216. Ba X, Aguilera-Aguirre L, Sur S, Boldogh I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-driven DNA base excision repair: role in asthma pathogenesis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2015;15(1):89-97.
217. Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, et al. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J*. 2013;27(1):379-90.
218. Hegde ML, Hegde PM, Bellot LJ, Mandal SM, Hazra TK, Li GM, et al. Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(33):E3090-9.
219. Park JS, Kim HL, Kim YJ, Weon JI, Sung MK, Chung HW, et al. Human AP endonuclease 1: a potential marker for the prediction of environmental carcinogenesis risk. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:730301.
220. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett*. 2012;327(1-2):26-47.
221. Brennerman BM, Illuzzi JL, Wilson DM, 3rd. Base excision repair capacity in informing healthspan. *Carcinogenesis*. 2014;35(12):2643-52.
222. European Standards Committee on Oxidative DNAD. Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(8):1089-99.
223. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(15):8010-5.
224. Dianov G, Bischoff C, Piotrowski J, Bohr VA. Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33811-6.

225. Markkanen E, Dorn J, Hubscher U. MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA. *Front Genet.* 2013;4:18.
226. Jaiswal M, LaRusso NF, Nishioka N, Nakabeppu Y, Gores GJ. Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res.* 2001;61(17):6388-93.
227. Phoa N, Epe B. Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 2002;23(3):469-75.
228. Eiberger W, Volkmer B, Amouroux R, Dherin C, Radicella JP, Epe B. Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(6):912-21.
229. Moritz E, Pauly K, Bravard A, Hall J, Radicella JP, Epe B. hOGG1-Cys326 variant cells are hypersensitive to DNA repair inhibition by nitric oxide. *Carcinogenesis.* 2014;35(6):1426-33.
230. Morreall J, Limpose K, Sheppard C, Kow YW, Werner E, Doetsch PW. Inactivation of a common OGG1 variant by TNF-alpha in mammalian cells. *DNA Repair (Amst).* 2015;26:15-22.
231. Seifermann M, Epe B. Oxidatively generated base modifications in DNA: Not only carcinogenic risk factor but also regulatory mark? *Free Radic Biol Med.* 2017;107:258-65.
232. Grishko V, Solomon M, Breit JF, Killilea DW, Ledoux SP, Wilson GL, et al. Hypoxia promotes oxidative base modifications in the pulmonary artery endothelial cell VEGF gene. *FASEB J.* 2001;15(7):1267-9.
233. Pastukh V, Ruchko M, Gorodnya O, Wilson GL, Gillespie MN. Sequence-specific oxidative base modifications in hypoxia-inducible genes. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(12):1616-26.
234. Pastukh V, Roberts JT, Clark DW, Bardwell GC, Patel M, Al-Mehdi AB, et al. An oxidative DNA "damage" and repair mechanism localized in the VEGF promoter is important for hypoxia-induced VEGF mRNA expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309(11):L1367-75.
235. Merino EJ, Boal AK, Barton JK. Biological contexts for DNA charge transport chemistry. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(2):229-37.
236. Ba X, Bacsı A, Luo J, Aguilera-Aguirre L, Zeng X, Radak Z, et al. 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors. *J Immunol.* 2014;192(5):2384-94.
237. Pan L, Zhu B, Hao W, Zeng X, Vlahopoulos SA, Hazra TK, et al. Oxidized Guanine Base Lesions Function in 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1-mediated Epigenetic Regulation of Nuclear Factor kappaB-driven Gene Expression. *J Biol Chem.* 2016;291(49):25553-66.
238. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1412-7.
239. Zhang B, Zhang Y, Shacter E, Zheng Y. Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase--evidence for a GTP/GDP displacement model. *Biochemistry.* 2005;44(7):2566-76.
240. Hennig A, Markwart R, Esparza-Franco MA, Ladds G, Rubio I. Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem.* 2015;396(8):831-48.
241. Boldogh I, Hajas G, Aguilera-Aguirre L, Hegde ML, Radak Z, Bacsı A, et al. Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. *J Biol Chem.* 2012;287(25):20769-73.

242. Hajas G, Bacsi A, Aguilera-Aguirre L, Hegde ML, Tapas KH, Sur S, et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. *Free Radic Biol Med*. 2013;61:384-94.
243. German P, Szaniszló P, Hajas G, Radak Z, Bacsi A, Hazra TK, et al. Activation of cellular signaling by 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-initiated DNA base excision repair. *DNA Repair (Amst)*. 2013;12(10):856-63.
244. Luo J, Hosoki K, Bacsi A, Radak Z, Hegde ML, Sur S, et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1-mediated DNA repair is associated with Rho GTPase activation and alpha-smooth muscle actin polymerization. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:430-8.
245. German P, Saenz D, Szaniszló P, Aguilera-Aguirre L, Pan L, Hegde ML, et al. 8-Oxoguanine DNA glycosylase1-driven DNA repair-A paradoxical role in lung aging. *Mech Ageing Dev*. 2017;161(Pt A):51-65.
246. Boiteux S, Coste F, Castaing B. Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. *Free Radic Biol Med*. 2017;107:179-201.
247. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*. 2004;567(1):1-61.
248. Scott TL, Rangaswamy S, Wicker CA, Izumi T. Repair of oxidative DNA damage and cancer: recent progress in DNA base excision repair. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(4):708-26.
249. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med*. 2004;10 Suppl:S18-25.
250. Markkanen E, Meyer U, Dianov GL. DNA Damage and Repair in Schizophrenia and Autism: Implications for Cancer Comorbidity and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6).
251. Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM, 3rd. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol*. 2012;31(10):981-1005.
252. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
253. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 2010;44(5):479-96.
254. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2017;313(6):R646-R53.
255. Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(6):e2253.
256. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-8.
257. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, et al. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(23):13300-5.
258. Minowa O, Arai T, Hirano M, Monden Y, Nakai S, Fukuda M, et al. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4156-61.
259. Sampath H, Vartanian V, Rollins MR, Sakumi K, Nakabeppu Y, Lloyd RS. 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. *PLoS One*. 2012;7(12):e51697.

260. Sampath H. Oxidative DNA damage in disease--insights gained from base excision repair glycosylase-deficient mouse models. *Environ Mol Mutagen.* 2014;55(9):689-703.
261. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, Xu P, Tsuzuki T, Sekiguchi M, et al. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res.* 2003;63(5):902-5.
262. Kakehashi A, Ishii N, Okuno T, Fujioka M, Gi M, Wanibuchi H. Enhanced Susceptibility of Ogg1 Mutant Mice to Multiorgan Carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
263. Xie Y, Yang H, Cunanan C, Okamoto K, Shibata D, Pan J, et al. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res.* 2004;64(9):3096-102.
264. Bjorge MD, Hildrestrand GA, Scheffler K, Suganthan R, Rolseth V, Kusnierczyk A, et al. Synergistic Actions of Ogg1 and Mutyh DNA Glycosylases Modulate Anxiety-like Behavior in Mice. *Cell Rep.* 2015;13(12):2671-8.
265. Bacsi A, Aguilera-Aguirre L, Szczesny B, Radak Z, Hazra TK, Sur S, et al. Down-regulation of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 expression in the airway epithelium ameliorates allergic lung inflammation. *DNA Repair (Amst).* 2013;12(1):18-26.
266. Bosshard M, Markkanen E, van Loon B. Base excision repair in physiology and pathology of the central nervous system. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):16172-222.
267. Sliwinska A, Sitarek P, Toma M, Czarny P, Synowiec E, Krupa R, et al. Decreased expression level of BER genes in Alzheimer's disease patients is not derivative of their DNA methylation status. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017;79(Pt B):311-6.
268. Sliwinska A, Kwiatkowski D, Czarny P, Toma M, Wigner P, Drzewoski J, et al. The levels of 7,8-dihydrodeoxyguanosine (8-oxoG) and 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) - A potential diagnostic biomarkers of Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2016;368:155-9.
269. Mao G, Pan X, Zhu BB, Zhang Y, Yuan F, Huang J, et al. Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(8):2759-66.
270. Jacob KD, Noren Hooten N, Tadokoro T, Lohani A, Barnes J, Evans MK. Alzheimer's disease-associated polymorphisms in human OGG1 alter catalytic activity and sensitize cells to DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:115-25.
271. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/PHSPolicyLabAnimals.pdf>
272. Turner JG, Parrish JL, Hughes LF, Toth LA, Caspary DM. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comp Med.* 2005;55(1):12-23.
273. Daiber A, Wenzel P, Oelze M, Schuhmacher S, Jansen T, Munzel T. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2)--maker of and marker for nitrate tolerance in response to nitroglycerin treatment. *Chem Biol Interact.* 2009;178(1-3):40-7.
274. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol.* 2004;66(6):1372-82.
275. Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Muller J, Schuhmacher S, Alhamdani MS, et al. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(5):619-26.

276. Romeis, Mikroskopische Technik; Hrsg. P. Böck; Urban und Schwarzenberg; München, Wien, Baltimore; 17. Auflage; 1989
277. Zhu C, Herrmann US, Falsig J, Abakumova I, Nuvolone M, Schwarz P, et al. A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J Exp Med.* 2016;213(6):1047-59.
278. Frauenknecht K, Katzav A, Grimm C, Chapman J, Sommer CJ. Neurological impairment in experimental antiphospholipid syndrome is associated with increased ligand binding to hippocampal and cortical serotonergic 5-HT1A receptors. *Immunobiology.* 2013;218(4):517-26.
279. Steven S, Frenis K, Kalinovic S, Kvandova M, Oelze M, Helmstadter J, et al. Exacerbation of adverse cardiovascular effects of aircraft noise in an animal model of arterial hypertension. *Redox Biol.* 2020:101515.
280. Kuntic M, Oelze M, Steven S, Kroller-Schon S, Stamm P, Kalinovic S, et al. Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *Eur Heart J.* 2019.
281. Albrecht S, Brandl H, Zimmermann T. *Chemilumineszenz : Reaktionssysteme und ihre Anwendung unter besonderer Berücksichtigung von Biochemie und Medizin.* Heidelberg:Hüthig; 1996.
282. Albrecht S, Brandl H, Zimmermann T. *Chemilumineszenz : Reaktionssysteme und ihre Anwendung unter besonderer Berücksichtigung von Biochemie und Medizin.* Heidelberg: Hüthig; 1996.
283. Munzel T, Afanas'ev IB, Kleschyov AL, Harrison DG. Detection of superoxide in vascular tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(11):1761-8.
284. Baldrige C.W. GRW. The extra respiration of phagocytosis. *Am J Physiol.* 1933(103/1933):235-6.
285. Oelze M, Kroller-Schon S, Welschhof P, Jansen T, Hausding M, Mikhed Y, et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS One.* 2014;9(11):e112394.
286. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, et al. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med.* 2004;36(1):101-11.
287. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
288. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
289. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
290. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem.* 1979;100(2):201-20.
291. Wild CP. Complementing the genome with an "exposome": the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(8):1847-50.
292. Hahad O, Frenis K, Kuntic M, Daiber A, Munzel T. Accelerated Aging and Age-Related Diseases (CVD and Neurological) Due to Air Pollution and Traffic Noise Exposure. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
293. Vrijheid M. The exposome: a new paradigm to study the impact of environment on health. *Thorax.* 2014;69(9):876-8.

294. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN, et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*. 2018;391(10119):462-512.
295. Li H, Kilgallen AB, Munzel T, Wolf E, Lecour S, Schulz R, et al. Influence of mental stress and environmental toxins on circadian clocks: Implications for redox regulation of the heart and cardioprotection. *Br J Pharmacol*. 2020;177(23):5393-412.
296. Rappaport SM. Genetic Factors Are Not the Major Causes of Chronic Diseases. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154387.
297. Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Munzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673-8.
298. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(10):1826-34.
299. Munzel T, Li H, Mollnau H, Hink U, Matheis E, Hartmann M, et al. Effects of long-term nitroglycerin treatment on endothelial nitric oxide synthase (NOS III) gene expression, NOS III-mediated superoxide production, and vascular NO bioavailability. *Circ Res*. 2000;86(1):E7-E12.
300. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-9.
301. Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):271-9.
302. McVeigh G, Brennan G, Hayes R, Johnston D. Primary nitrate tolerance in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994;37(1):115-7.
303. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(8):771-6.
304. Oelze M, Schuhmacher S, Daiber A. Organic nitrates and nitrate resistance in diabetes: the role of vascular dysfunction and oxidative stress with emphasis on antioxidant properties of pentaerithrityl tetranitrate. *Exp Diabetes Res*. 2010;2010:213176.
305. Heitzer T, Finckh B, Albers S, Krohn K, Kohlschutter A, Meinertz T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(1):53-61.
306. Mansournia MA, Ostadmohammadi V, Doosti-Irani A, Ghayour-Mobarhan M, Ferns G, Akbari H, et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018;50(6):429-40.
307. Chen Z, Foster MW, Zhang J, Mao L, Rockman HA, Kawamoto T, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(34):12159-64.
308. Munzel T, Daiber A, Gori T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. *Eur Heart J*. 2013;34(34):2666-73.
309. Daiber A, Munzel T. Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(11):899-942.
310. Wang J, Wang H, Hao P, Xue L, Wei S, Zhang Y, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase 2 by oxidative stress is associated with cardiac dysfunction in diabetic rats. *Mol Med*. 2011;17(3-4):172-9.

311. Sun L, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. ALDH2 activator inhibits increased myocardial infarction injury by nitroglycerin tolerance. *Sci Transl Med.* 2011;3(107):107ra11.
312. Mollace V, Muscoli C, Dagostino C, Giancotti LA, Gliozzi M, Sacco I, et al. The effect of peroxynitrite decomposition catalyst MnTBAP on aldehyde dehydrogenase-2 nitration by organic nitrates: role in nitrate tolerance. *Pharmacol Res.* 2014;89:29-35.
313. Moon KH, Kim BJ, Song BJ. Inhibition of mitochondrial aldehyde dehydrogenase by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *FEBS Lett.* 2005;579(27):6115-20.
314. Choi H, Tostes RC, Webb RC. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase prevents ROS-induced vascular contraction in angiotensin-II hypertensive mice. *J Am Soc Hypertens.* 2011;5(3):154-60.
315. Wolkart G, Beretta M, Wenzl MV, Stessel H, Schmidt K, Maeda N, et al. Tolerance to nitroglycerin through proteasomal down-regulation of aldehyde dehydrogenase-2 in a genetic mouse model of ascorbate deficiency. *Br J Pharmacol.* 2013;168(8):1868-77.
316. Xu J, Wang S, Wu Y, Song P, Zou MH. Tyrosine nitration of PA700 activates the 26S proteasome to induce endothelial dysfunction in mice with angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension.* 2009;54(3):625-32.
317. Kleschyov AL, Munzel T. Advanced spin trapping of vascular nitric oxide using colloid iron diethyldithiocarbamate. *Methods Enzymol.* 2002;359:42-51.
318. Dratva J, Phuleria HC, Foraster M, Gaspoz JM, Keidel D, Kunzli N, et al. Transportation noise and blood pressure in a population-based sample of adults. *Environ Health Perspect.* 2012;120(1):50-5.
319. Spiegel K, Tasali E, Leproult R, Van Cauter E. Effects of poor and short sleep on glucose metabolism and obesity risk. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(5):253-61.
320. Miller MA, Cappuccio FP. Inflammation, sleep, obesity and cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2007;5(2):93-102.
321. Calvin AD, Covassin N, Kremers WK, Adachi T, Macedo P, Albuquerque FN, et al. Experimental sleep restriction causes endothelial dysfunction in healthy humans. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(6):e001143.
322. Carreras A, Zhang SX, Peris E, Qiao Z, Gileles-Hillel A, Li RC, et al. Chronic sleep fragmentation induces endothelial dysfunction and structural vascular changes in mice. *Sleep.* 2014;37(11):1817-24.
323. Cappuccio FP, Cooper D, D'Elia L, Strazzullo P, Miller MA. Sleep duration predicts cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur Heart J.* 2011;32(12):1484-92.
324. Munzel T, Kroller-Schon S, Oelze M, Gori T, Schmidt FP, Steven S, et al. Adverse Cardiovascular Effects of Traffic Noise with a Focus on Nighttime Noise and the New WHO Noise Guidelines. *Annu Rev Public Health.* 2020;41:309-28.
325. Floud S, Blangiardo M, Clark C, de Hoogh K, Babisch W, Houthuijs D, et al. Exposure to aircraft and road traffic noise and associations with heart disease and stroke in six European countries: a cross-sectional study. *Environ Health.* 2013;12:89.
326. Haralabidis AS, Dimakopoulou K, Vigna-Taglianti F, Giampaolo M, Borgini A, Dudley ML, et al. Acute effects of night-time noise exposure on blood pressure in populations living near airports. *Eur Heart J.* 2008;29(5):658-64.
327. Stansfeld SA, Berglund B, Clark C, Lopez-Barrio I, Fischer P, Ohrstrom E, et al. Aircraft and road traffic noise and children's cognition and health: a cross-national study. *Lancet.* 2005;365(9475):1942-9.

328. Kan H, Hu W, Wang Y, Wu W, Yin Y, Liang Y, et al. NADPH oxidase-derived production of reactive oxygen species is involved in learning and memory impairments in 16-month-old female rats. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):4546-53.
329. Jung O, Schreiber JG, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. gp91phox-containing NADPH oxidase mediates endothelial dysfunction in renovascular hypertension. *Circulation.* 2004;109(14):1795-801.
330. McKlveen JM, Myers B, Herman JP. The medial prefrontal cortex: coordinator of autonomic, neuroendocrine and behavioural responses to stress. *J Neuroendocrinol.* 2015;27(6):446-56.
331. Kanazawa LKS, Vecchia DD, Wendler EM, Hocayen PAS, Dos Reis Livero FA, Stipp MC, et al. Quercetin reduces manic-like behavior and brain oxidative stress induced by paradoxical sleep deprivation in mice. *Free Radic Biol Med.* 2016;99:79-86.
332. Alzoubi KH, Khabour OF, Albawaana AS, Alhashimi FH, Athamneh RY. Tempol prevents chronic sleep-deprivation induced memory impairment. *Brain Res Bull.* 2016;120:144-50.
333. Bauer M, Goldstein M, Christmann M, Becker H, Heylmann D, Kaina B. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(52):21105-10.
334. Dopheide JF, Doppler C, Scheer M, Obst V, Radmacher MC, Radsak MP, et al. Critical limb ischaemia is characterised by an increased production of whole blood reactive oxygen species and expression of TREM-1 on neutrophils. *Atherosclerosis.* 2013;229(2):396-403.
335. Ponath V, Heylmann D, Haak T, Woods K, Becker H, Kaina B. Compromised DNA Repair and Signalling in Human Granulocytes. *J Innate Immun.* 2019;11(1):74-85.
336. Kim HJ, Yoon SH, Ryu HO, Yoon BH, Choi S, Ye SK, et al. 8-oxo-7,8-dihydroguanosine triphosphate(8-oxoGTP) down-regulates respiratory burst of neutrophils by antagonizing GTP toward Rac, a small GTP binding protein. *Free Radic Res.* 2007;41(6):655-62.
337. Aguilera-Aguirre L, Bacsı A, Radak Z, Hazra TK, Mitra S, Sur S, et al. Innate inflammation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-KRAS-NF-kappaB pathway. *J Immunol.* 2014;193(9):4643-53.
338. Tumorhhu G, Shimada K, Dagvadorj J, Crother TR, Zhang W, Luthringer D, et al. Ogg1-Dependent DNA Repair Regulates NLRP3 Inflammasome and Prevents Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016;119(6):e76-90.
339. Thomas MC, Woodward M, Li Q, Pickering R, Tikellis C, Poulter N, et al. Relationship Between Plasma 8-OH-Deoxyguanosine and Cardiovascular Disease and Survival in Type 2 Diabetes Mellitus: Results From the ADVANCE Trial. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(13).
340. Kjaer LK, Cejvanovic V, Henriksen T, Petersen KM, Hansen T, Pedersen O, et al. Cardiovascular and All-Cause Mortality Risk Associated With Urinary Excretion of 8-oxoGuo, a Biomarker for RNA Oxidation, in Patients With Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Diabetes Care.* 2017;40(12):1771-8.
341. Shigiyama F, Kumashiro N, Miyagi M, Ikehara K, Kanda E, Uchino H, et al. Effectiveness of dapagliflozin on vascular endothelial function and glycemic control in patients with early-stage type 2 diabetes mellitus: DEFENCE study. *Cardiovasc Diabetol.* 2017;16(1):84.

342. Shah A, Gray K, Figg N, Finigan A, Starks L, Bennett M. Defective Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Atherosclerosis. *Circulation*. 2018;138(14):1446-62.
343. Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y, Budiyo A, Ueda M, Ichihashi M, et al. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 2005;65(14):6006-10.
344. Abolhassani N, Leon J, Sheng Z, Oka S, Hamasaki H, Iwaki T, et al. Molecular pathophysiology of impaired glucose metabolism, mitochondrial dysfunction, and oxidative DNA damage in Alzheimer's disease brain. *Mech Ageing Dev*. 2017;161(Pt A):95-104.
345. Mikhed Y, Fahrner J, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Welschof P, et al. Nitroglycerin induces DNA damage and vascular cell death in the setting of nitrate tolerance. *Basic Res Cardiol*. 2016;111(4):52.
346. Maga G, Villani G, Crespan E, Wimmer U, Ferrari E, Bertocci B, et al. 8-oxoguanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*. 2007;447(7144):606-8.
347. Markkanen E, Castrec B, Villani G, Hubscher U. A switch between DNA polymerases delta and lambda promotes error-free bypass of 8-oxo-G lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(50):20401-6.
348. Picher AJ, Blanco L. Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(12):1749-56.
349. Burak MJ, Guja KE, Hambardjjeva E, Derkunt B, Garcia-Diaz M. A fidelity mechanism in DNA polymerase lambda promotes error-free bypass of 8-oxo-dG. *EMBO J*. 2016;35(18):2045-59.
350. Russo MT, De Luca G, Degan P, Bignami M. Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine. *Mutat Res*. 2007;614(1-2):69-76.
351. van Loon B, Markkanen E, Hubscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)*. 2010;9(6):604-16.
352. Nick McElhinny SA, Watts BE, Kumar D, Watt DL, Lundstrom EB, Burgers PM, et al. Abundant ribonucleotide incorporation into DNA by yeast replicative polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(11):4949-54.
353. Williams JS, Kunkel TA. Ribonucleotides in DNA: origins, repair and consequences. *DNA Repair (Amst)*. 2014;19:27-37.
354. Yao NY, Schroeder JW, Yurieva O, Simmons LA, O'Donnell ME. Cost of rNTP/dNTP pool imbalance at the replication fork. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(32):12942-7.
355. Sastre-Moreno G, Sanchez A, Esteban V, Blanco L. ATP insertion opposite 8-oxo-deoxyguanosine by Pol4 mediates error-free tolerance in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(15):9821-37.
356. Habib SL, Kasinath BS, Arya RR, Vexler S, Velagapudi C. Novel mechanism of reducing tumorigenesis: upregulation of the DNA repair enzyme OGG1 by rapamycin-mediated AMPK activation and mTOR inhibition. *Eur J Cancer*. 2010;46(15):2806-20.
357. Singh B, Chatterjee A, Ronghe AM, Bhat NK, Bhat HK. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:253.
358. Kim KC, Lee IK, Kang KA, Cha JW, Cho SJ, Na SY, et al. 7,8-Dihydroxyflavone suppresses oxidative stress-induced base modification in DNA via induction of the repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase-1. *Biomed Res Int*. 2013;2013:863720.

359. von der Lippen C, Sahu S, Seifermann M, Tiwari VK, Epe B. The repair of oxidized purines in the DNA of human lymphocytes requires an activation involving NF-YA-mediated upregulation of OGG1. *DNA Repair (Amst)*. 2015;25:1-8.
360. Lee MR, Kim SH, Cho HJ, Lee KY, Moon AR, Jeong HG, et al. Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. *J Biol Chem*. 2004;279(11):9857-66.
361. Saha T, Rih JK, Roy R, Ballal R, Rosen EM. Transcriptional regulation of the base excision repair pathway by BRCA1. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19092-105.
362. Manzella N, Bracci M, Strafella E, Staffolani S, Ciarapica V, Copertaro A, et al. Circadian Modulation of 8-Oxoguanine DNA Damage Repair. *Sci Rep*. 2015;5:13752.
363. Bloch MJ. Worldwide prevalence of hypertension exceeds 1.3 billion. *J Am Soc Hypertens*. 2016;10(10):753-4.
364. Osborne MT, Radfar A, Hassan MZO, Abohashem S, Oberfeld B, Patrich T, et al. A neurobiological mechanism linking transportation noise to cardiovascular disease in humans. *Eur Heart J*. 2020;41(6):772-82.
365. Munzel T, Steven S, Hahad O, Daiber A. The sixth sense is involved in noise-induced stress responses and vascular inflammation: evidence for heightened amygdalar activity in response to transport noise in man. *Eur Heart J*. 2020;41(6):783-5.
366. Dar T, Radfar A, Abohashem S, Pitman RK, Tawakol A, Osborne MT. Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2019;21(5):23.
367. Tawakol A, Ishai A, Takx RA, Figueroa AL, Ali A, Kaiser Y, et al. Relation between resting amygdalar activity and cardiovascular events: a longitudinal and cohort study. *Lancet*. 2017;389(10071):834-45.
368. Stansfeld SA, Haines MM, Burr M, Berry B, Lercher P. A Review of Environmental Noise and Mental Health. *Noise Health*. 2000;2(8):1-8.
369. Manikandan S, Padma MK, Srikumar R, Jeya Parthasarathy N, Muthuvel A, Sheela Devi R. Effects of chronic noise stress on spatial memory of rats in relation to neuronal dendritic alteration and free radical-imbalance in hippocampus and medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*. 2006;399(1-2):17-22.
370. Aronow WS. Hypertension and cognitive impairment. *Ann Transl Med*. 2017;5(12):259.
371. Cohen AJ, Brauer M, Burnett R, Anderson HR, Frostad J, Estep K, et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015. *Lancet*. 2017;389(10082):1907-18.
372. Munzel T, Hahad O, Kuntic M, Keaney JF, Deanfield JE, Daiber A. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J*. 2020;41(41):4057-70.
373. Hajek P, Phillips-Waller A, Przulj D, Pesola F, Myers Smith K, Bisal N, et al. A Randomized Trial of E-Cigarettes versus Nicotine-Replacement Therapy. *N Engl J Med*. 2019;380(7):629-37.
374. Carnevale R, Sciarretta S, Violi F, Nocella C, Loffredo L, Perri L, et al. Acute Impact of Tobacco vs Electronic Cigarette Smoking on Oxidative Stress and Vascular Function. *Chest*. 2016;150(3):606-12.
375. Kaiser MA, Villalba H, Prasad S, Liles T, Sifat AE, Sajja RK, et al. Offsetting the impact of smoking and e-cigarette vaping on the cerebrovascular system and stroke injury: Is Metformin a viable countermeasure? *Redox Biol*. 2017;13:353-62.

376. Cooke WH, Pokhrel A, Dowling C, Fogt DL, Rickards CA. Acute inhalation of vaporized nicotine increases arterial pressure in young non-smokers: a pilot study. *Clin Auton Res.* 2015;25(4):267-70.
377. Qasim H, Karim ZA, Silva-Espinoza JC, Khasawneh FT, Rivera JO, Ellis CC, et al. Short-Term E-Cigarette Exposure Increases the Risk of Thrombogenesis and Enhances Platelet Function in Mice. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(15).
378. Moheimani RS, Bhetraratana M, Yin F, Peters KM, Gornbein J, Araujo JA, et al. Increased Cardiac Sympathetic Activity and Oxidative Stress in Habitual Electronic Cigarette Users: Implications for Cardiovascular Risk. *JAMA Cardiol.* 2017;2(3):278-84.
379. Vlachopoulos C, Ioakeimidis N, Abdelrasoul M, Terentes-Printzios D, Georgakopoulos C, Pietri P, et al. Electronic Cigarette Smoking Increases Aortic Stiffness and Blood Pressure in Young Smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2016;67(23):2802-3.
380. Olfert IM, DeVallance E, Hoskinson H, Branyan KW, Clayton S, Pitzer CR, et al. Chronic exposure to electronic cigarettes results in impaired cardiovascular function in mice. *J Appl Physiol (1985).* 2018;124(3):573-82.
381. Kuntic M, Oelze M, Steven S, Kroller-Schon S, Stamm P, Kalinovic S, et al. Short-term e-cigarette vapour exposure causes vascular oxidative stress and dysfunction: evidence for a close connection to brain damage and a key role of the phagocytic NADPH oxidase (NOX-2). *Eur Heart J.* 2020;41(26):2472-83.
382. Kahler J, Mendel S, Weckmuller J, Orzechowski HD, Mittmann C, Koster R, et al. Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(8):1429-37.
383. Winczura A, Czubaty A, Winczura K, Maslowska K, Nalecz M, Dudzinska DA, et al. Lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal modulates base excision repair in human cells. *DNA Repair (Amst).* 2014;22:1-11.
384. Loft S, Svoboda P, Kawai K, Kasai H, Sorensen M, Tjønneland A, et al. Association between 8-oxo-7,8-dihydroguanine excretion and risk of lung cancer in a prospective study. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):167-72.
385. Roswall N, Bidstrup PE, Raaschou-Nielsen O, Solvang Jensen S, Overvad K, Halkjaer J, et al. Residential road traffic noise exposure and colorectal cancer survival - A Danish cohort study. *PLoS One.* 2017;12(10):e0187161.
386. Roswall N, Eriksen KT, Hjortebjerg D, Jensen SS, Overvad K, Tjønneland A, et al. Residential Exposure to Road and Railway Noise and Risk of Prostate Cancer: A Prospective Cohort Study. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135407.
387. Sorensen M, Kettel M, Overvad K, Tjønneland A, Raaschou-Nielsen O. Exposure to road traffic and railway noise and postmenopausal breast cancer: A cohort study. *Int J Cancer.* 2014;134(11):2691-8.