

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

Zeitverlauf für die Entstehung des vaskulären oxidativen Stresses, endothelialer
Dysfunktion und Bluthochdruck durch Fluglärm im Mausmodell – Vergleich der
akuten und chronischen Exposition

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

Vorgelegt von

Ahmad Al Zuabi
aus Dara

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung	8
2 Literaturdiskussion.....	10
2.1 Oxidativer Stress	10
2.1.1 NADPH Oxidasen	12
2.1.2 Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS).....	13
2.1.3 Mitochondriale Atmungskette	15
2.1.4 Xanthinoxidoreduktase (XOR)	18
2.2 Endotheliale Dysfunktion	20
2.2.1 Das Endothel und seine Funktion.....	20
2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO)	21
2.2.3 Endotheliale Dysfunktion	24
2.3 Arteriosklerose	26
2.4 Lärm, KHK und Gefäßdysfunktion	28
3 Material und Methoden.....	35
3.1 Material.....	35
3.1.1 Allgemeine Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	35
3.1.2 Chemikalien.....	37
3.1.3 Antikörper und Primer	40
3.1.4 Puffer und Lösungen	41
3.1.5 Software-Programme	45
3.2 Methoden	47
3.2.1 Tiermodell und Behandlung.....	47
3.2.2 Auditory brainstem response (ABR)-Audiometrie	47
3.2.3 Nicht-invasive Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)	48
3.2.4 Organentnahme und Aortenpräparation.....	49
3.2.5 Gefäßfunktionsuntersuchung mittels Isometrischer Tonusstudien (Organbad).....	50
3.2.6 Detektion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS)	52
3.2.7 Western Blot	54

3.2.8	Dot Blot	57
3.2.9	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qrt-PCR)	58
3.2.10	Immunhistochemie	60
3.2.11	Statistische Auswertung	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Fluglärm erhöht den Blutdruck und die Erhöhung bleibt auch bei chronischer Beschallung erhalten	62
4.2	Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf die Endothelfunktion und vaskulären oxidativen Stress	64
4.2.1	Untersuchung der Endothelfunktion mittels isometrischer Tonusstudien (Organbad)	64
4.2.2	ROS-Detektion in Aorten-Kryoschnitten mittels DHE-Färbung	65
4.2.3	Immunhistochemie der Aorta	67
4.3	Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf den kardialen oxidativen Stress	68
4.4	Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf den zerebralen oxidativen Stress und den neuroinflammatorischen Phänotyp	70
4.5	Auswirkung von langfristigem Fluglärm auf die Hörschwelle	71
5	Diskussion	73
5.1	Folgen der akuten und chronischen Lärmbelastung auf Endothelfunktion, Blutdruck und oxidativen Stress	74
5.2	Akute und chronische Lärmexposition und das Gehirn	78
5.3	Akute und chronische Lärmexposition und die Hörschwelle	82
6	Zusammenfassung	83
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	98
	Publikationen	99
	Tagungsabstracts	99
	Lebenslauf	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Umgebungslärm-Effekte auf das Kardiovaskuläre System.	9
Abbildung 2: reaktive Sauerstoffspezies (ROS).....	11
Abbildung 3: Die NADPH-Oxidase Enzymfamilie im kardiovaskulären System	13
Abbildung 4: Redox Schalter und Struktur der humanen eNOS	15
Abbildung 5: Mitochondriale Atmungskette (oberer Teil) und Superoxidbildung (unterer Teil)	17
Abbildung 6: Xanthinoxidoreduktase.....	19
Abbildung 7: Vorgänge bei der Vasodilatation und der Vasokonstriktion	21
Abbildung 8: Stickstoffmonoxid (NO) Biosynthese.....	22
Abbildung 9: Überblick zur hemmenden Wirkung von Superoxid auf EDRF bzw. Stickstoffmonoxid (NO)	23
Abbildung 10: Endotheldysfunktion und oxidativer Stress	25
Abbildung 11: Entstehung der Arteriosklerose.....	27
Abbildung 12: Zeitverlauf der Forschung zu gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Lärm	29
Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Auswirkungen vom Lärm auf ischämische Herzerkrankungen und Bluthochdruck.....	31
Abbildung 14: Zusammenfassung der Studien zu den Auswirkungen von Lärm auf Bluthochdruck	32
Abbildung 15: Auswirkung von Fluglärm auf die Endothelfunktion und Stresshormonspiegel bei gesunden Probanden.....	34
Abbildung 16: Die Wirkung von Acetylcholin und Stickstoffmonoxid auf das Endothel und auf den glatten Gefäßmuskel.....	51
Abbildung 17: Reaktion zwischen L-012 und ROS	53
Abbildung 18: Die Polymerase-Kettenreaktion	59
Abbildung 19: Fluoreszenzmessung bei qrt-PCR	60
Abbildung 20: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf den Blutdruck	63
Abbildung 21: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die endotheliale und glattmuskuläre Funktion.....	64
Abbildung 22: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die ROS-Bildung in der Aorta.....	66
Abbildung 23: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die aortale Expression von Endothelin-1, NOX-2 und die Spiegel von 3-NT-positiven Proteinen mittels Immunhistochemie	67

Abbildung 24: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die kardiale Proteinexpression für ET-1 und NOX-2 sowie die Spiegel von 3-NT und MDA	69
Abbildung 25: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf das Gehirn	70
Abbildung 26: Lärm-induzierte Veränderungen der Hörschwelle.....	72
Abbildung 27: graphische Darstellung des Zeitverlaufs der Lärm-induzierten Schäden.....	73
Abbildung 28: Auswirkung der kurz- und langfristigen Fluglärmbelastung auf den oxidativen Burst im Vollblut sowie die vaskuläre und kardiale ROS-Bildung	76
Abbildung 29: Der Zusammenhang zwischen Lärm, Amygdala-Aktivierung, koronarer Atherosklerose und dem Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse	79
Abbildung 30: Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf die ROS-Bildung im Gehirn	81
Abbildung 31: Pathophysiologie der lärminduzierten Herz-Kreislauf- und Gehirnerkrankungen	84

Abkürzungsverzeichnis

2-HE	2-Hydroxyethidium
3-NT	Nitrotyrosin
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	advanced glycation end product
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AT II	Angiotensin II
AT1 Rezeptor	Angiotensin Rezeptor Typ 1
AT2 Rezeptor	Angiotensin Rezeptor Typ 2
ATP	Adenosintriphosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	engl. bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
CAM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cGK-1	cGMP abhängige Proteinkinase
CTR	Kontrolle, Kontrollgruppe
dest.	Destilliert
DHE	Dihydroethidium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	1,1-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl-Radikal
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-N, N, N'N'-Tetraacetat
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
gp91phox	Glycoprotein 91, phagozytäre NADPH Oxidase
G-Protein	GTP-bindendes Enzym
GTN	Glyceroltrinitrat (Nitroglyzerin)

GTP-CH	GTP-Cyclohydrolase
HO-1	Hämoxygenase-1
HPLC	high performance liquid chromatography
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-triphosphat
K ₂ HPO ₄	Di-Kaliumhydrogenphosphat
KH	Krebs-Hepes-Puffer
KHK	Koronare Herzkrankheit
L-012	8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyrido (3, 4-d) pyridazin-1, 4-(2H, 3H) Dion Natriumsalz
LDH	Laktatdehydrogenase
L-NAME	N-Nitro-L-Argininmethylester
LPS	Lipopolysaccharid
mA	Milliampere
MLKK	Myosin Leichtketten Kinase
MLKP	Myosin Leichtketten Phosphatase
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	Messenger RNA
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
·NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NO ₂ ⁻	Nitrit
Nox	NADPH-Oxidase
NTG	Glyceroltrinitrat (Nitroglyzerin)
·OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit Anion
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	phosphate buffered saline
PDBu	Phorbol 12, 13-dibutytrat
PDE	Phosphodiesterase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
Phox	Phagozyten Oxidase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N, N, N', N' -Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
V1	Vasopressin Rezeptor 1
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
WB	Western Blot
WHO	World health organization
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreduktase
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Während sich die meisten Forschungsarbeiten auf klassische Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie, Diabetes oder Rauchen konzentrierten, deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass Umweltfaktoren wie Verkehrslärm von Flugzeugen und Straßen zur Entwicklung einer chronischen nicht übertragbaren Krankheit wie Herz-Kreislauf- und neurodegenerative Erkrankungen beitragen können (1-4). Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die erste Todesursache in Europa aber auch weltweit. Eine Vielzahl von epidemiologischen Studien und Meta-Analysen haben gezeigt, dass die Belastung mit Verkehrslärm das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit, Herzinfarkt, Schlaganfall und Bluthochdruck signifikant steigern kann (5-8). Weitere translationale Studien bestätigten die negativen Auswirkungen des Fluglärms auf die Endothelfunktion, vaskulären oxidativen Stress, den Blutdruck sowie auf das Gehirn (9; 10).

Lärm, definiert sich als unerwünschter Schall, ist ein Umweltrisikofaktor und unspezifischer Stressfaktor, dessen Auswirkungen auf die Gesundheit bislang vernachlässigt wurden. Zwar neigen Menschen dazu, sich an Lärmbelastung zu gewöhnen (z.B. durch die Resilienz), jedoch unterscheidet sich der Grad der Gewöhnung für jeden Einzelnen und diese Gewöhnung ist selten vollständig. Sowohl die Stressforschung im Allgemeinen als auch die Lärmbelastungsforschung haben gezeigt, dass die Gewöhnung an Lärmbelastung bis zu einem gewissen Grad zu einer Verringerung akuter Stresseffekte führt, auch wenn die Stresssituation unverändert bleibt. Diese Art von Anpassungsverhalten kann jedoch langfristig mit gesundheitlichen Schäden verbunden sein. Andere Studien haben auch gezeigt, dass sich keine Gewöhnung gegenüber den Lärm-bedingten negativen kardialen und kognitiven Auswirkungen entwickelte (11; 12).

Wird die Lärmbelastung chronisch und werden bestimmte Werte überschritten, so kann dies negative gesundheitliche Auswirkungen wie Schlaf-/ Kommunikationsstörungen und psychische Störungen verursachen (13; 14). Lärm kann auch Lern- und Gedächtnisstörungen bei Kindern verursachen (9). Besonders im Schlaf reichen schon geringe Verkehrsgeräusche aus, um das sympathische Nervensystem und das endokrine System zu erregen, was letztendlich zu einer Stressreaktion mit erhöhten Konzentrationen von Stresshormonen im Blut führt (15-

18). Diese Stressreaktion kann dann zu Kardiovaskulären Risikofaktoren wie erhöhter Blutviskosität, Blutzuckerwerte und Blutfettwerte sowie Aktivierung der Blutgerinnung führen (19-21). Eine veröffentlichte Studie berichtete außerdem über einen linearen Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Verkehrslärm und der Häufigkeit ischämischer Herzerkrankungen (siehe Abbildung 1). Es wurde gefunden, dass die Menschen, die in einer Region mit erhöhtem Verkehrslärm wohnen, ein erhöhtes Risiko für Kardiovaskuläre Krankheiten wie Bluthochdruck haben als die die in Gebieten mit geringer Lärmbelastung leben (10; 22).

In dieser Studie wurde untersucht, ob die kardiovaskulären und zerebralen Nebenwirkungen einer langfristigen niedrigdosierten Fluglärmbelastung mit der Zeit zunehmen oder ob es Hinweise auf eine Anpassung (Resilienz) oder sogar Toleranzentwicklung gibt. Darüber hinaus wurde zum ersten Mal getestet, ob die Tiere unter der niedrigschwelligenen Fluglärmbelastung einen Hörverlust entwickeln.

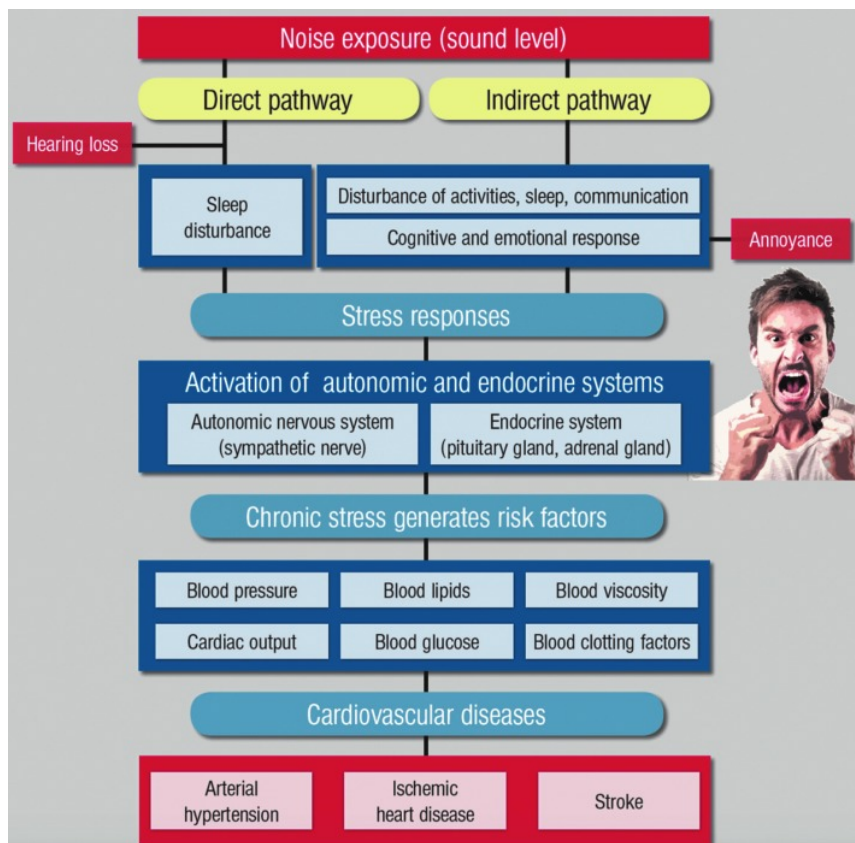


Abbildung 1: Schema der Umgebungslärm-Effekte auf das Kardiovaskuläre System.

Abbildung aus (1), Schema nach Babisch (8)

2 Literaturdiskussion

2.1 Oxidativer Stress

Vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) und/oder verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid in den Gefäßen erklärt allgemein den Pathomechanismus des Oxidativen Stresses und die endotheliale Dysfunktion, die durch vielfältige kardiovaskuläre Risikofaktoren verursacht werden können (23). Oxidativer Stress wird auch als eine Störung des Gleichgewichts zwischen der Produktion von Pro-Oxidantien (reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies) und Antioxidantien (z.B. Vitamin C und E oder Schutzenzyme wie Superoxiddismutasen) definiert (24-26). Dieses Ungleichgewicht kann durch gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, verminderte Bildung oder verminderte Aktivität der Antioxidantien und ihre Schutzmechanismen verursacht werden (27). Die meisten Oxidantien werden auch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species (ROS)) genannt. Dieser Begriff umfasst nicht nur freie Radikale, sondern auch die nicht-Radikale wie Wasserstoffperoxid, die vom Sauerstoff herkommen und sie werden in allen aeroben Organismen durch verschiedene zelluläre Mechanismen wie z.B. die mitochondriale Atmungskette hauptsächlich in den Mitochondrien gebildet. Die NADPH-Oxidasen und Xanthinoxidase, aber auch die Entkopplung der endothelialen NO-Synthase, können auch zur Bildung von Superoxidradikalen führen (28-30). Zu den biologisch wichtigsten ROS, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress in unserem Körper produziert werden können, zählen das Superoxidanionradikal, das Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal (siehe Abbildung 2) (31; 32). Superoxid hat die wichtigste Bedeutung im Kreislaufsystem, da dieses Radikal mit Stickstoffmonoxid reagieren und so hemmen kann (siehe Kapitel 2.2.3). Zu den antioxidativen Substanzen gehören Enzyme und nicht-enzymatische Antioxidantien wie zum Beispiel: Superoxiddismutase, die Gluthationperoxidase, die Katalase, Glutathion, Vitamin E und C. Die Hauptfunktion dieser Substanzen ist es, die Zelle vor der Akkumulation von ROS zu schützen (33-35).

Zu hohe ROS Konzentrationen sind pathogen und durch ihre Zelltoxische Wirkung bekannt. Sie erhöhen die Apoptoserate der Zellen innerhalb des Organismus und verursachen zahlreiche Mutationen im Genom oder Chromosomenaberrationen,

indem sie durch oxidative Schädigung und Reaktion mit Nukleinsäuren die Einzel- und Doppelstränge der DNA schädigen und brechen, Onkogene aktivieren und Tumorsuppressorgene hemmen und somit spielen ROS eine wichtige Rolle bei der Entstehung vieler Tumorkrankheiten (36-38). ROS haben außerdem eine hohe Reaktivität und so können sie mit allen molekularen Bestandteilen der Zellen reagieren. Durch diese Eigenschaft können ROS die Membranlipide peroxidieren und schädigen, was zur Zerstörung der Zellmembrane und somit zur zellulären Dysfunktion führt (33; 39; 40). Auch Oxidationen an den DNA-Basen unter Bildung mutagener Läsionen wie 8-Oxo-dG bzw. Generierung von DNA-Strangbrüchen sowie oxidative Schäden und Inaktivierung zahlreicher Enzyme wurden unter Einwirkung von ROS und RNS beobachtet (26; 41).

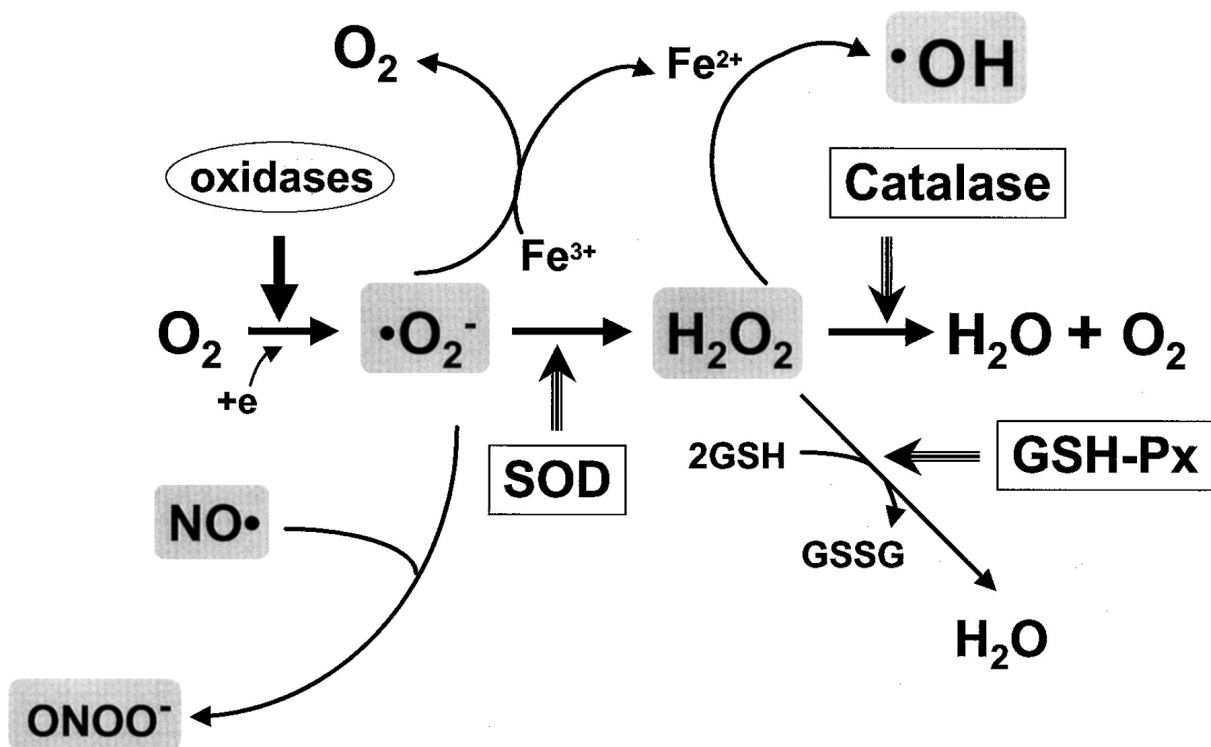


Abbildung 2: reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die Abbildung zeigt die wichtigsten freien Sauerstoffradikale und/oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Superoxidradikal ($O_2^{\cdot -}$), Stickstoffmonoxid-Radikal ($\cdot NO$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$)), die in unserem Körper durch den oxidativen Stress produziert werden können und eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Pathophysiologie spielen. Das wichtigste Radikal im Kreislaufsystem ist das Superoxidradikal, weil dieses Radikal mit Stickstoffmonoxid schnell reagieren kann und es zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) umwandeln kann. Stickstoffmonoxid-Radikale und

Peroxynitrit werden auch als reaktive Stickstoffspezies (RNS) bezeichnet. Superoxid kann durch Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 umgewandelt werden. Weiterhin wird H_2O_2 durch Katalase oder Glutathionperoxidase (GSH-Px) zu H_2O konvertiert oder im Rahmen der Fenton Reaktion zu $\cdot OH$ nach Reaktion mit Fe^{2+} .

Abbildung und Text aus (31; 42)

2.1.1 NADPH Oxidasen

NADPH-Oxidasen (NOXs) umfassen eine Familie von Proteinen, deren Hauptfunktion die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist, nämlich Superoxidanion und Wasserstoffperoxid (43-45). Vier Mitglieder der (Nox)-Enzymfamilie sind wichtige Quellen für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) besonders im Gefäßsystem: die Superoxid-erzeugenden Enzyme Nox1, Nox2, Nox5 und das Wasserstoffperoxid-erzeugende Enzym Nox4, das u.a. durch die endotheliale Dysfunktion die Atherosklerose beschleunigt (46) (siehe Abbildung 3). Die Expression und Aktivität dieser Enzyme und ihrer regulatorischen Untereinheiten wie p47phox, Noxa1, Noxo1 und p67phox, werden durch verschiedene Signalfaktoren wie Stress, Hormone, vasoaktive Substanzen und Zytokine gesteuert. Außerdem wird die NADPH-Oxidase Aktivität durch Angiotensin II, AGE/RAGE und LPS erhöht (47-50).

Mehrere Nox-Subtypen befinden sich gleichzeitig in verschiedenen subzellulären Kompartimenten besonders in Endothelzellen der Blutgefäße (51). Es wurde gefunden, dass sich die Isoform Nox1 in allen Schichten der Gefäßwand befindet und bei ihrer Aktivierung zum oxidativen Stress und somit zur Atherosklerose führt (52; 53). Die Multikomponenten-Phagozytenoxidase (Phox) oder auch (Nox2) befindet sich in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und umfasst die katalytische Untereinheit gp91phox in der Membran (mit der Strukturuntereinheit p22phox) sowie die regulatorischen zytosolischen Untereinheiten p47phox, p67phox, p40phox und Rac1 (54).

Diese Nox-Isoformen produzieren Superoxid, welches rasch in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Deshalb kann ein leichtes Ungleichgewicht in der Aktivitätsregulierung zu einer pathophysiologischen Zunahme der Superoxid-Bildung führen. Die Identität und der Ort dieser reaktiven Sauerstoffspezies und der Enzyme,

die sie abbauen, bestimmen ihre nachgeschalteten Signalwege. Trotz der schädlichen Wirkung großer ROS Konzentrationen sind Nox-Enzyme an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt wie Zelldifferenzierung, Fibrose, Wachstum, Proliferation, Apoptose, Zytoskelettregulation, Zellmigration und Kontraktion (55-59). Sie spielen außerdem eine wichtige Rolle in der Entstehung vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Hypertonie, Atherosklerose, Diabetes, Herzhypertrophie, Herzversagen und ischämische Herzkrankheiten (55-59).

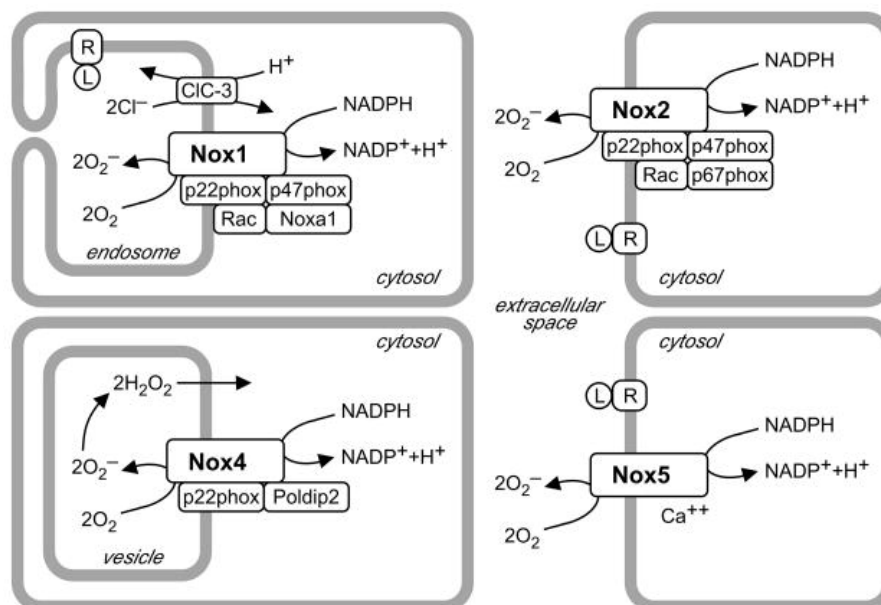


Abbildung 3: Die NADPH-Oxidase Enzymfamilie im kardiovaskulären System

Abbildung aus (55)

2.1.2 Entkopplung der endothelialen NO-Synthase (eNOS)

Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) ist ein Flavoprotein, welches Häm(Eisen)-haltig ist (60), eine zentrale Kalzium-Bindungsstelle und zwei Typen von

Domänen (Reduktase und Oxygenase) enthält (61; 62). Eine funktionsfähige eNOS katalysiert die Synthese von Stickstoffmonoxid durch die Oxidation von L-Arginin zu L-Zitrullin und Stickstoffmonoxid (63). Während dieser Reaktion fließen die Elektronen von NADPH über Coenzyme wie Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) zum Häm-(Eisen)-Zentrum in der eNOS. Tetrahydrobiopterin (BH₄) ist auch als weiteres Coenzym sehr wichtig für die NO-Synthese (64). Da Tetrahydrobiopterin (BH₄) den Zerfall des Zwischenproduktes (Eisensauerstoffkomplex) verhindern kann und unterdrückt BH₄ die Bildung von Superoxidradikalen während der NO-Biosynthese (63; 65-67). (siehe Kapitel 2.2.2)

Im Falle von oxidativem Stress werden die Elektronen jedoch auf molekularen Sauerstoff und nicht mehr auf L-Arginin übertragen, was man als Entkopplung der eNOS bezeichnet (68), das heißt, es wird durch eNOS Superoxid anstelle des Stickstoffmonoxids produziert (69). Daher wird die eNOS als Peroxynitritsynthase oder als (janusköpfiges Enzym) bezeichnet (70; 71). Die wichtigsten Mechanismen, die zur eNOS-Entkopplung führen können, sind z.B. oxidativer Abbau des Cofaktors BH₄ (72) und Zerstörung des Zink-Schwefel-Komplexes der eNOS (73; 74). Mehr Mechanismen für die eNOS-Entkopplung sind in der unten eingefügten Abbildung 4 zu sehen.

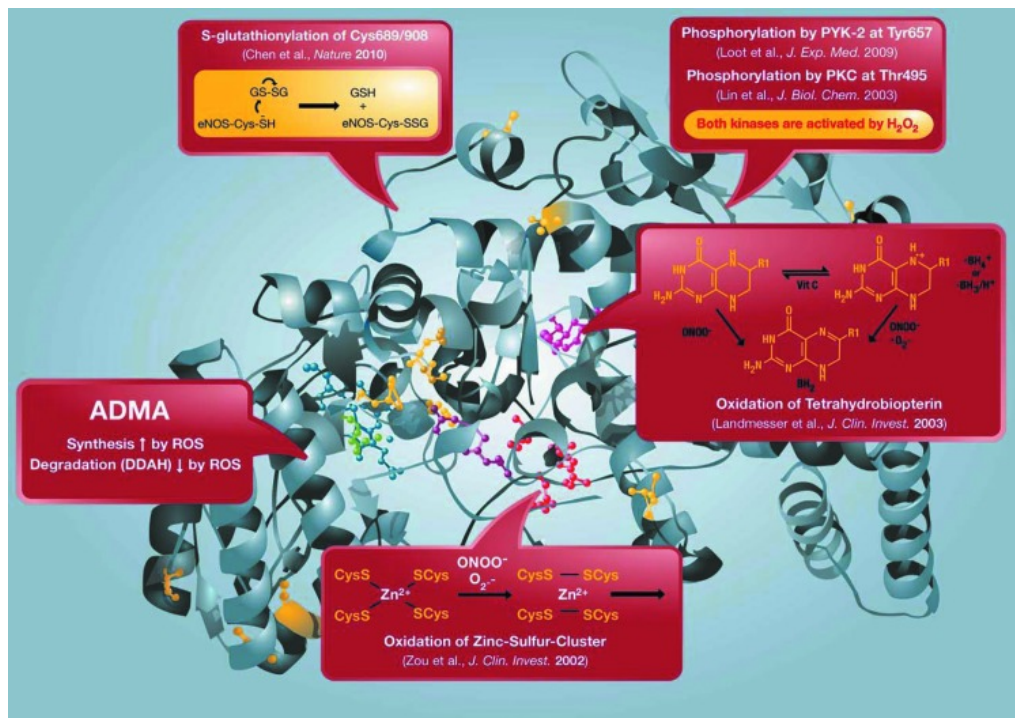


Abbildung 4: Redox Schalter und Struktur der humanen eNOS

Struktur der humanen eNOS mit der Eisen-Porphyrin-Gruppe (blau), dem Substrat L-Arginin (grün), dem P450-bildenden axialen Eisen-Thiolat-Liganden aus einem Cysteinrest (gelb), dem Cofaktor Tetrahydrobiopterin ((BH₄) (violett)), den Zink-Thiolat-Komplex bildenden Cysteinen (rot) und dem Zinkion (braun). Die Kästchen repräsentieren die "Redox-Schalter" der eNOS, wie S-Glutathionylierung, PKC- und Proteintyrosinkinase-2 (PYK-2) -abhängige Phosphorylierung, oxidativer BH₄-Abbau, Zerstörung des Zink-Schwefel-Clusters sowie einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA = potenter eNOS Inhibitor), die alle zur Dysregulation der enzymatischen Aktivität der eNOS beitragen. GSH, Glutathion; GSSG, Glutathiondisulfid.

Abbildung und Text aus (30)

2.1.3 Mitochondriale Atmungskette

Ein Großteil der Energie, die in Abbaureaktionen der Kohlenhydrate, Proteine und Fette entsteht, wird meistens intrazellulär in Form von NAD(P)H+H⁺ und FADH₂ gespeichert. In Mitochondrien werden energiereiche Reaktionsprodukte wie NADPH und ATP generiert wofür NADH und FADH₂ verwendet wird. Mitochondrien sind

röhrenförmige Zellorganellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Im Rahmen der Atmungskette besteht die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien darin, Energie in Form von ATP für die Zellen herzustellen. In der inneren Membran der Mitochondrien befinden sich die Komplexe der Atmungskette (siehe Abbildung 5). Durch den Elektronenfluss zwischen diesen Komplexen werden Protonen durch die innere Membran der Mitochondrien gepumpt (30). Dadurch entsteht ein Protonengradient entlang der Membran, was für die Aktivierung der ATP-Synthase aus ADP und Phosphat durch die ATP-Synthase essentiell ist (75; 76).

Der Elektronenfluss wird durch sogenannte Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 gewährleistet. Bei einem Elektronenüberschuss oder einer gestörten Atmungskette werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, was dann zur Bildung von Superoxidradikalen führen kann (77). Physiologisch werden die anfallenden Radikale durch die antioxidativ-wirkende-Substanzen wie die mitochondriale Superoxiddismutase (Mn-SOD oder SOD2), Vitamin E, Glutathion und Coenzym Q eliminiert (78; 79). Werden die anfallende Superoxidradikale nicht vollständig abgefangen, kommt es zu mitochondrialem oxidativen Stress (80). Entsprechend werden unter oxidativen Stress Bedingungen ROS nicht nur durch die NADPH-Oxidasen oder eine entkoppelte eNOS (81), sondern auch durch die mitochondriale Atmungskette vermehrt gebildet (82-85). Neben oxidativem Stress, kann z.B. die genetische Störung eines Komplexes der Atmungskette zur vermehrten Bildung von ROS führen (86).

Die Superoxidbildung in der Atmungskette geschieht vor allem an den Komplexen I und III (siehe Abbildung 5) (87; 88). Komplex I ist der größte Komplex der Atmungskette und besteht aus einer NADH-Dehydrogenase und dem Cofaktor FMN. Die Elektronen und Protonen werden hier von $\text{NADH} + \text{H}^+$ auf Coenzym Q (Ubichinon) übertragen, wobei Protonen durch die Membran der Mitochondrien gepumpt werden. Komplex II überträgt Elektronen auch auf Coenzym Q zum Transfer auf Komplex III und oxidiert dabei Succinat zu Fumurat im Rahmen des Zitratzyklus (89). Im Komplex III werden die Elektronen auf Cytochrom c übertragen, dabei wird Ubichinol wieder zu Ubichinon oxidiert und Protonen durch die Membran gepumpt. Komplex IV ist die letzte Station der Atmungskette, enthält die Cytochrom-Oxidase und überträgt die Elektronen auf molekularen Sauerstoff, wobei der Sauerstoff zu Wasser reduziert wird und Protonen durch die Membran gepumpt. Anschließend wird durch den

entstandenen Protonengradient die ATP-Synthase (Komplex V) aktiviert, die die für die Zelle wichtige Energie in Form von ATP bildet (90-93).

Mitochondrial respiratory chain complexes

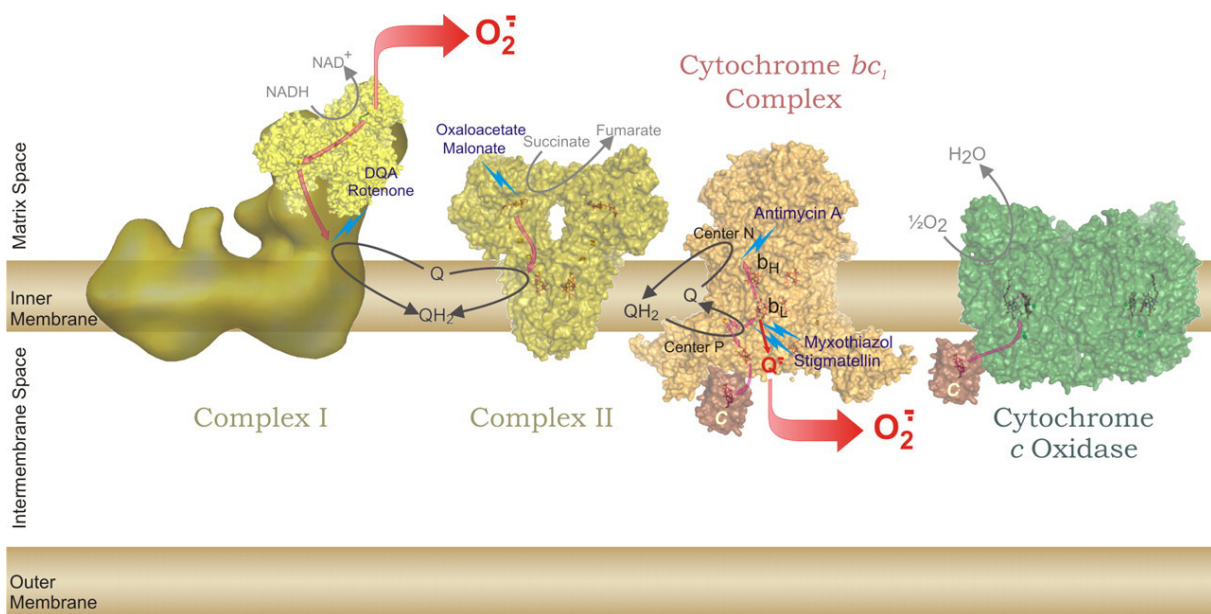
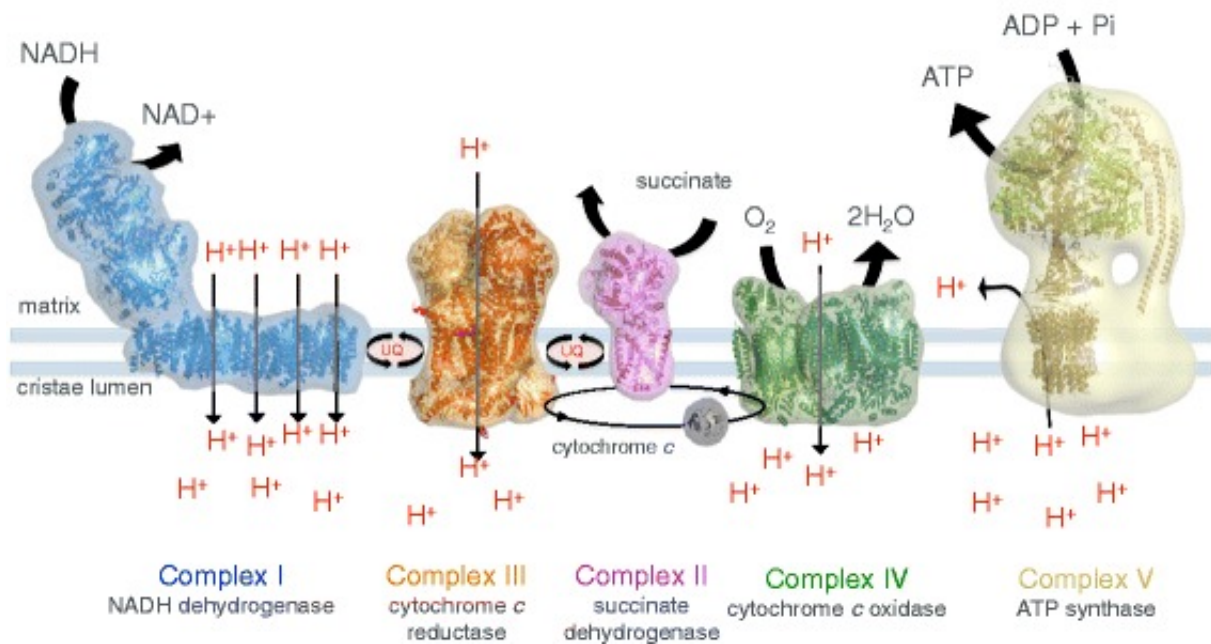


Abbildung 5: Mitochondriale Atmungskette (oberer Teil) und Superoxidbildung (unterer Teil)

Abbildung aus (88; 91)

2.1.4 Xanthinoxidoreduktase (XOR)

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) kommt im Organismus in zwei verschiedenen Formen vor: die Dehydrogenaseform (Typ D) und Oxidaseform (Typ O) (94). Im Rahmen des Purinstoffwechsels werden Xanthin und Hypoxanthin durch die XOR zu Harnsäure abgebaut (95; 96). Hierbei werden die Elektronen im Typ D, der Xanthindehydrogenase (XDH), auf NAD^+ übertragen. Während im Typ O, Xanthinoxidase (XO), die Elektronen ausschließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, was dann zur Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid führt (97; 98). Daher zählt die Xanthinoxidoreduktase (XOR) neben den NADPH-Oxidasen zu den Hauptquellen des Superoxids im vaskulären oxidativen Stress (99-101). Wie in Abbildung 6 gezeigt, kann die XDH in die XO Form überführt werden, indem es ROS-abhängig zu einer Oxidation von Thiolgruppen in Cystein 535 und 992 kommt (30). Gleichzeitig werden unter oxidativen Stress Bedingungen Proteaseinhibitoren gehemmt wodurch es zu einer Aktivierung der proteolytischen Aktivität kommt, wodurch es zu einer Protease-vermittelten Abspaltung einer Domäne nahe des aktiven Zentrums der XDH kommt, was ebenfalls die Überführung in die XO Form begünstigt (30). Viele Studien haben gezeigt, dass die Inhibition von Xanthinoxidase durch Allopurinol zur Verbesserung der endothelialen Dysfunktion besonders bei Diabetikern und Rauchern führen kann, entweder durch Verminderung der Superoxidbildung oder durch Stimulierung des NO-stimulierten Blutflusses (102-104).

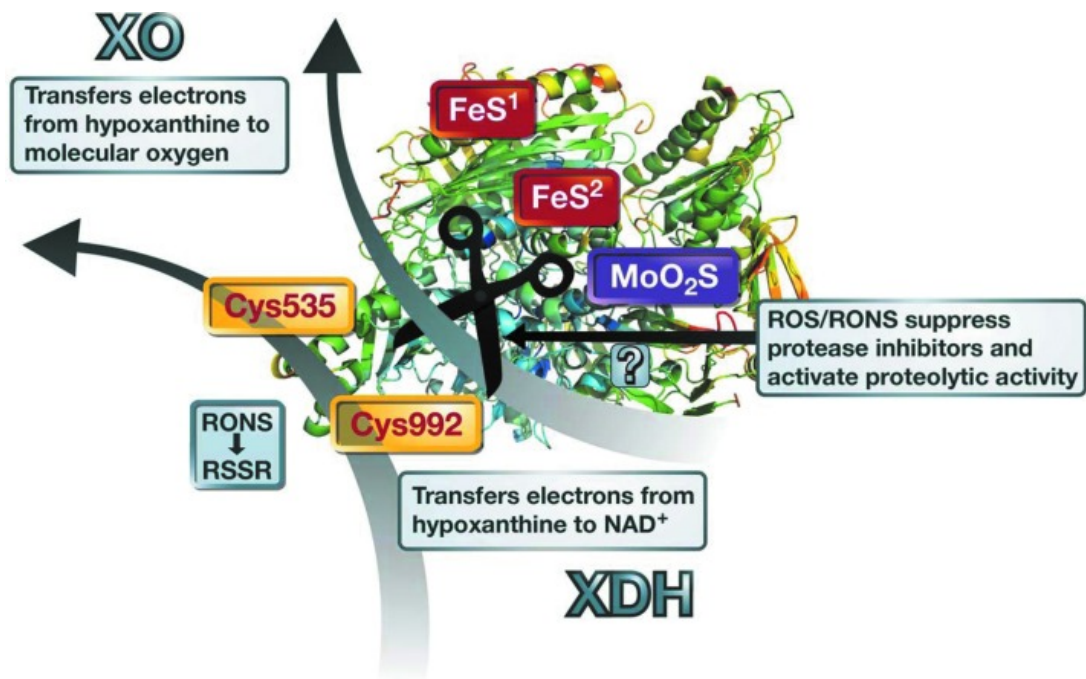


Abbildung 6: Xanthinoxidoreduktase

Reversible Umwandlung: ROS und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) aus anderen Quellen induzieren die Disulfidbildung zwischen den Cysteinresten 535 und 992, was zu einer Konformationsänderung der Proteinstruktur mit veränderter Affinität für den Cofaktor NAD⁺ führt. Die Elektronen werden von dem Flavin-Cofaktor FADH₂ nun auf molekularen Sauerstoff transportiert. Irreversible Umwandlung: Erhöhte proteolytische Aktivität (ROS und RONS können dazu beitragen) führt zur Spaltung und Konformationsänderung der Proteinstruktur mit veränderter Affinität für den Cofaktor NAD⁺. Dies begünstigt ebenfalls den Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff. FeS: Eisen-Schwefel-Cluster, MoO₂S: Molybdooxy-Thio-Komplex, RSSR: Disulfidbrücke, XDH: Xanthindehydrogenase, XO: Xanthinoxidase.

Abbildung und Text aus (30)

2.2 Endotheliale Dysfunktion

2.2.1 Das Endothel und seine Funktion

Die Wand der Blutgefäße ist von außen nach innen aus drei wichtigen Zellschichten aufgebaut: Tunica Adventitia, Tunica Media und Tunica Intima. Die Tunica Intima ist von einem sogenannten Endothel ausgekleidet. Das Endothel ist eine zum Gefäßlumen hingerrichtete einlagige Zellschicht, die aus spindelförmigen, flachen Endothelzellen mit ihrer zugehörigen Basalmembran besteht (105). In den letzten Jahrzehnten hat die Forschung ein außergewöhnliches Spektrum an Funktionen des Endothels gezeigt, sodass es als eigenständiges Organ aufgefasst werden konnte (106; 107). Das Endothel hat eine sehr wichtige Funktion, indem es eine Barriere und Austauschfläche zwischen dem interstitiellen Raum des Gefäßes und dem Blut im Gefäßlumen bildet (33; 108). Es vermittelt auch viele wichtige Regulationsvorgänge wie zum Beispiel: Steuerung der Blutgerinnung und des Gefäßwachstums sowie Regulation des Gefäßtonus und damit des Blutdrucks durch Produktion von vasoaktiven Substanzen wie Stickstoffmonoxid und andere wichtige Mediatoren wie z.B. Prostazyklin oder z.B. Endothelin-1 (109). Hier kann man zwischen zwei Formen von vasoaktiven Substanzen, die den Gefäßtonus regulieren, unterscheiden: die Vasokonstriktoren und die Vasodilatoren (siehe Abbildung 7).

Die Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, Adrenalin, Angiotensin-II, Endothelin-1 und Vasopressin (ADH) vermitteln eine Vasokonstriktion in den Glatten Muskelzellen der Blutgefäße, indem diese an spezifischen Rezeptoren binden und die Myosin Leichtkettenkinase (MLKK) aktivieren. Diese Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und aktivieren die Phospholipase C (PLC). Die PLC bildet aus Phosphatidylinositol(bis)phosphat (PIP₂) einen sogenannten second messenger Inositoltriphosphat (IP₃), was wiederum die Calciumkanäle des endoplasmatischen Retikulums (ER) aktiviert. Nun wird Calcium vermehrt aus dem ER in das Zytosol freigesetzt. Dieser Ausstrom erhöht den Calciumspiegel im Zytosol der Zelle und dadurch wird die MLKK aktiviert, was zur Erhöhung der Kontraktilität der Aktin-Myosin-Filamente führt (2).

Zu den Vasodilatoren gehören viele Mediatoren wie zum Beispiel: Dopamin und Prostaglandine. Durch die Bindung dieser Substanzen an G-Protein gekoppelte Rezeptoren wird die Adenylatzyklase aktiviert und damit ATP in cAMP umgewandelt,

was zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. Nun phosphoryliert die PKA die MLKK und damit wird die MLKK inaktiviert. Durch diese Phosphorylierung kommt es dann zur Verringerung der Kontraktilität der Aktin-Myosin-Filamente (110)(2).

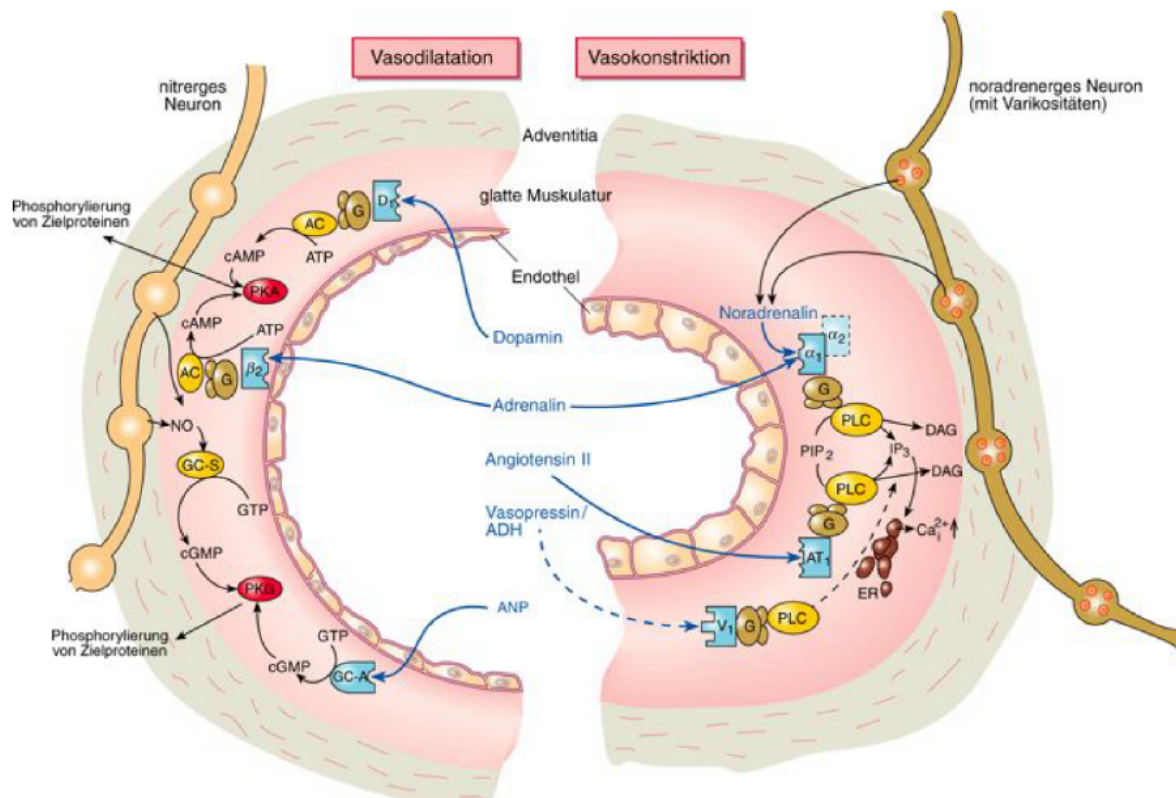


Abbildung 7: Vorgänge bei der Vasodilatation und der Vasokonstriktion

Abbildung aus (111)

2.2.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid ist eine kurzlebige, endogen gebildete, vasoaktive Substanz, die nach der Entdeckung der vasodilatierenden Eigenschaften durch FURCHGOTT und Mitarbeiter als „Endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF) bezeichnet wurde und erst später als NO durch MURAD und IGNARRO identifiziert wurde (70; 112). Die

Biosynthese von Stickstoffmonoxid im gesunden Gefäßendothel wird aus L-Arginin durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) vermittelt (113; 114). Wenn dieses Enzym aktiviert wird, wird durch Elektronentransfer, der durch Calmodulin (CAM) gesteuert wird (115), vom Cofaktor NADPH auf das zentrale Häm-Eisen in der eNOS, ein aktivierter Oxy-Fe Komplex gebildet. Das intermediär gebildete Eisen (IV) oxidiert das Substrat L-Arginin zu Hydroxy-L-Arginin, das dann in einem zweiten Schritt zu Citrullin oxidiert wird, wodurch (NO) entsteht (siehe Abbildung 8). Die eNOS ist außerdem stark Kalzium-reguliert, da das Kalzium-bindende Calmodulin für die Regulierung des Elektronentransfers von wichtiger Bedeutung ist (65; 116).

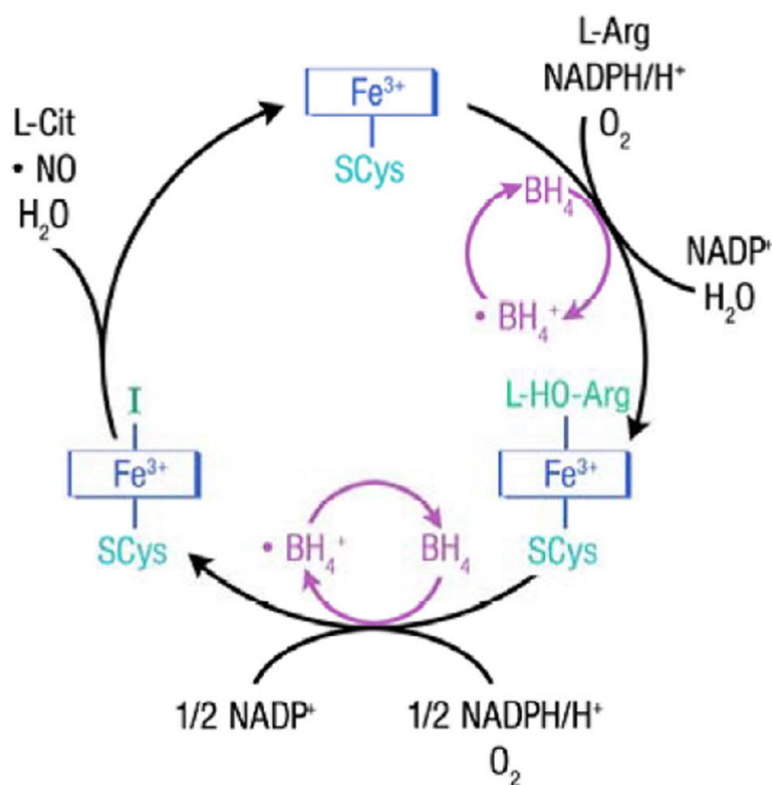


Abbildung 8: Stickstoffmonoxid (NO) Biosynthese

Abbildung aus (65)

Stickstoffmonoxid gehört zu den wichtigsten Vasodilatoren im Gefäßsystem, indem es den cGMP-Signalweg aktiviert (117). Stickstoffmonoxid bewirkt über die lösliche Guanylatzyklase eine Steigerung von cGMP (118). Dies führt dann zur Aktivierung der Proteinkinase G (PKG, cGMP-abhängige Kinase). PKG phosphoryliert den IP3-

Stickstoffmonoxid spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Hämostase und Angiogenese (121), indem es die Thrombozytenaggregation, Expression von Adhäsionsmolekülen und die Adhäsion von Leukozyten an die Oberfläche der Endothelzellen hemmt (122). Dadurch schützt Stickstoffmonoxid das Gefäß vor der Entstehung der Arteriosklerose und hat auch eine antithrombotische Wirkung (70; 123; 124).

2.2.3 Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion definiert sich als ein frühes Risikozeichen für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (125; 126). Es tritt bei vielen entzündlichen Erkrankungen auf und erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Mortalität (34). Endotheliale Dysfunktion bedeutet auch, die Unfähigkeit des Endothels eine ausreichende Menge an Stickstoffmonoxid zur Verfügung zu stellen (verminderten Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit) und sie wird auch als gestörte Vasodilatation definiert (127). Es umfasst damit alle krankhaften Ereignisse, die zu einem unter anderem Ungleichgewicht innerhalb vieler Regulationsbereiche wie Homöostase und Angiogenese führen können. So wird die endotheliale Dysfunktion auch als Vorstufe oder erste Manifestation der Atherosklerose beschrieben, indem die endotheliale Dysfunktion durch mehrere Störpunkte ausgezeichnet wird, wie Störung der Bildung von vasodilatativen Substanzen, verminderte Regenerationsfähigkeit der Endothelzellen (126; 128-130). Die Ursachen hierzu sind vielfältig, eine wichtige Ursache ist der oxidative Stress (70). Durch den oxidativen Stress wird das Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit umgewandelt (siehe Abbildung 10). Dies erfolgt durch die Reaktion zwischen den Superoxidradikalen und Stickstoffmonoxid (131-134). Inaktivierung von Stickstoffmonoxid durch die freien Sauerstoffradikale, verminderte Stickstoffmonoxid-Produktion durch die Entkopplung der Stickstoffmonoxid-Synthase oder Wirkungsabschwächung aufgrund der oxidativen Schädigung der löslichen Guanylatzyklase können eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation verursachen (134; 135). Die verminderte

Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit begünstigt aber auch die Entstehung und Progression der Atherosklerose sowie thrombotische Ereignisse und Infiltration von Immunzellen in die Gefäßwand (134).

Peroxynitrit, das aus der Reaktion zwischen Stickstoffmonoxid und Superoxidradikale gebildet wurde, kann zur Entkopplung der eNOS führen, indem es den Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH₄) (siehe Abbildung 10) (136) und den Zink-Thiolatkomplex oxidiert und dadurch dessen Aktivität und Bioverfügbarkeit reduziert (137; 138). Peroxynitrit hemmt zusätzlich die Prostazyklinsynthese durch Tyrosin-Nitrierung in der Prostazyklinsynthese (139; 140). Außerdem hat Peroxynitrit eine wichtige Bedeutung, wegen seiner Beteiligung an der Entstehung kardiovaskulärer und neurodegenerativer Krankheiten (141-144).

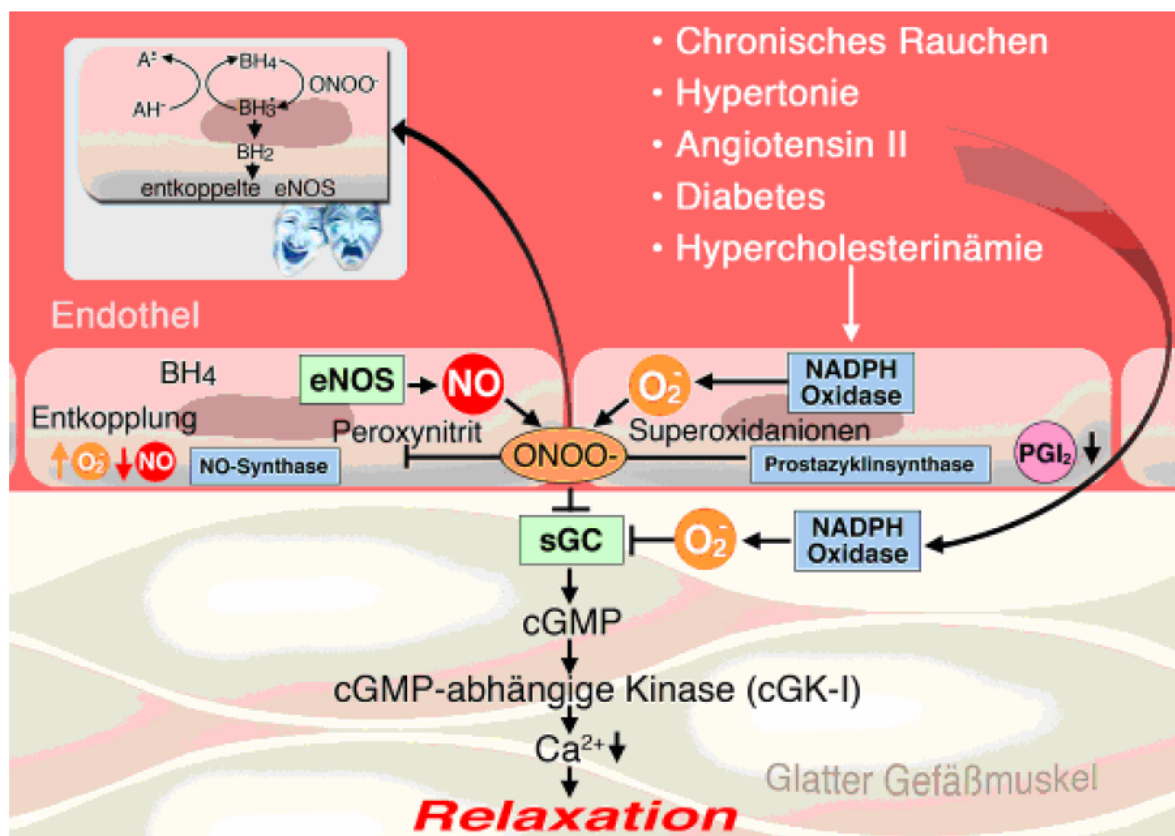


Abbildung 10: Endotheldysfunktion und oxidativer Stress

Abbildung verändert nach (23)

2.3 Arteriosklerose

Arteriosklerose ist ein multifaktorieller, chronisch entzündlicher Prozess (145), was Infolge einer Endothelläsion bzw. einer endothelialen Dysfunktion, oxidativem Stress oder einer Entzündung zustande kommt. Endothelzellen, Monozyten und die glatten Muskelzellen der Intima in der Arterienwand sind die Hauptbestandteile bei der Entwicklung dieser Krankheit (146). Im Rahmen vieler epidemiologischer Studien konnten eine ganze Reihe von Risikofaktoren für die Arteriosklerose wie arterielle Hypertonie (147), Diabetes mellitus (148), Hyperlipidämie (149; 150), ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel (151), psychosoziale Faktoren, obstruktive Schlafapnoe, Adipositas sowie das Rauchen nachgewiesen werden (152-154). Außerdem zeigt eine große Anzahl von Studien, dass die chronische Belastung mit Verkehrslärm das Risiko für Hypercholesterinämie und Entstehung einer Arteriosklerose erhöhen kann (155). Durch diese kardiovaskulären Risikofaktoren werden vaskuläre ROS-Quellen wie NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und entkoppelte eNOS aktiviert, die alle zu einer endothelialen Dysfunktion und zum Fortschreiten der Arteriosklerose beitragen (35). Beim oxidativen Stress wird LDL vermehrt oxidiert, wird dann von den aus Monozyten entstandenen Makrophagen aufgenommen und letztendlich im Subendothelialraum in der Arterienwand eingelagert (156). Dieser Vorgang löst eine Entzündungsreaktion aus, die anfänglich zur Entwicklung der Fettstreifen und sogenannten Schaumzellen führt (157). Im weiteren Verlauf kommt es zur Entwicklung von komplexen arteriosklerotischen Läsionen oder sogenannte Plaques, wodurch die mechanische Eigenschaften der Arterienwand so verändert werden, dass die Intima nicht mehr in der Lage ist, ihre wichtige vasodilatatorische Funktion auszuüben (158),(146). Durch die chronische Oxidation der Lipoproteine kommt es zur Aktivierung der Gerinnung und zur Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (VCAM-1, E-Selectin, MCP-1, Interleukine und TNF-alpha), was zu einer vermehrten Einwanderung der Leukozyten in die Intima führt (siehe Abbildung 11) (159). Dadurch entsteht eine sogenannte atheromatöse Plaque. Man kann bei dieser Plaque zwei Formen unterscheiden: ein stabiler Plaque mit dicker Deckplatte und schmalem Lipidkern oder ein instabiler Plaque der durch einen großen Lipidkern und eine dünne faserige Kappe gekennzeichnet ist, die wenige glatte Muskelzellen und viele Makrophagen enthält (160). Die instabile Form der Plaques ist gefährlicher, da

das Risiko dass die Kappe reißt höher ist. Dies passiert dann entweder wegen einer Schwachstelle in der Plaque selbst oder durch einen äußeren mechanischen Reiz.

Die atherosklerotische Plaque kann zur Gefäßstenose oder sogar Verschlüssen führen. Dadurch verliert die Gefäßwand ihre Elastizität. Die Verengung oder der Verschluss des Gefäßes führt dazu, dass zum Beispiel die Herzmuskelzellen mit Blut und dadurch mit weniger Sauerstoff versorgt werden. Die Komplikationen der Arteriosklerose sind die häufigsten Todesursachen in westlichen Gesellschaften(158; 161). Es können als Folge viele verschiedene Komplikationen auftreten wie z.B. KHK, Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Apoplex oder pAVK (160; 162; 163).

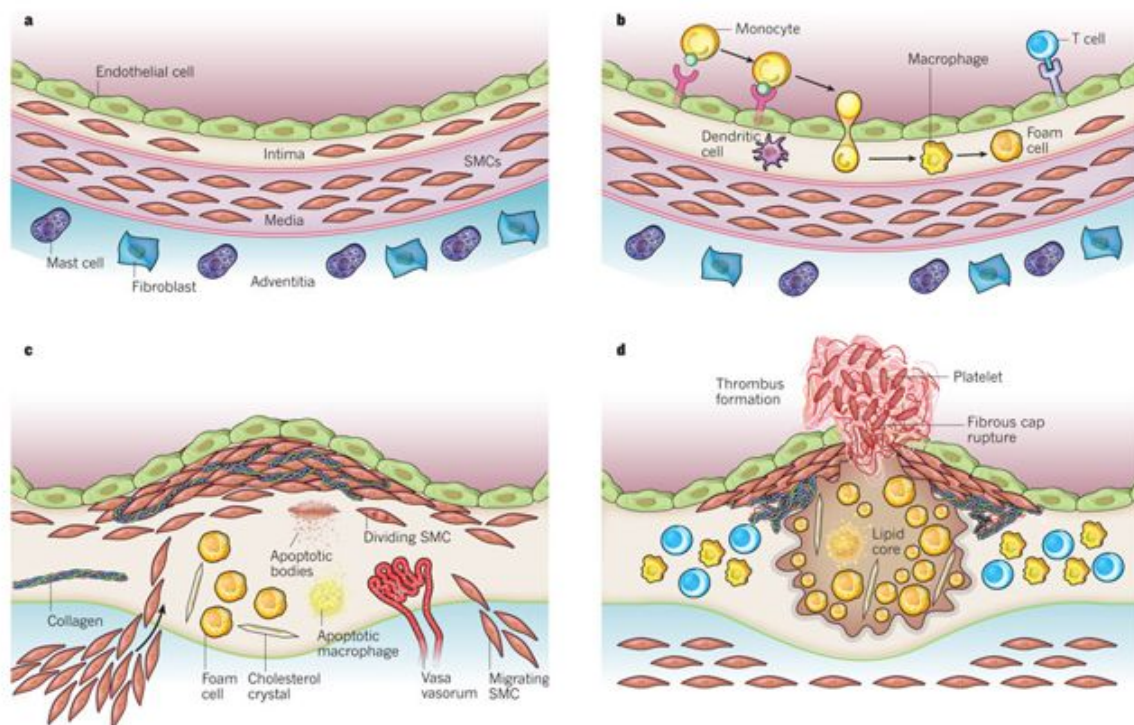


Abbildung 11: Entstehung der Arteriosklerose

Die Abbildung zeigt die Einzelschritte der Entstehung vom arteriosklerotischen Plaque. (a) zeigt eine normale Gefäßwand. (b) stellt den Start der Arteriosklerose dar und zwar die Adhäsion der Leukozyten an der Endothelzellschicht und ihre Einwanderung in die Intima Zellschicht. (c) glatte Muskelzellen, Kollagen und die apoptotischen Makrophagen und Endothelzellen bilden alle zusammen sogenannte Schaumzellen. (d) hier wird eine Komplikation gezeigt, Ruptur eines Plaques, was zur Bildung eines Thrombus führen kann.

Abbildung aus (164)

2.4 Lärm, KHK und Gefäßdysfunktion

Es gibt einen stetigen Trend für eine wachsende Bedeutung weg von übertragbaren Infektionskrankheiten hin zu nichtübertragbaren Alters- und Lebensstilkrankheiten, zu denen Herz-Kreislauf-Erkrankungen aller Art gehören. Entsprechend wird auch der Bedeutung der Umweltfaktoren zunehmend mehr Aufmerksamkeit geschenkt und infolgedessen wurde Verkehrslärm als Risikofaktor für kardiometabolische Erkrankungen in Betracht gezogen (10; 165; 166). Die Lärmforschung konzentrierte sich bisher auf die auditiven Auswirkungen der Lärmbelastung, wie bei direkten Cochlea-Schäden im Rahmen des Hörverlusts (1). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass die Lärmbelastung durch Verkehrsbedingte Quellen, insbesondere die nächtliche Lärmbelastung (14), einen Risikofaktor für Bluthochdruck, ischämische Erkrankungen, Diabetes und Atherosklerose darstellen könnte (20). Nach Angaben der europäischen Umweltagentur verursacht die Lärmbelastung geschätzt ca. 12.000 vorzeitige Todesfälle und 48.000 neue Fälle ischämischer Herzerkrankung in Europa (Europäische Umweltagentur, 2020). Die Agentur gibt auch an, dass wahrscheinlich bis zu 22 Millionen Menschen unter chronisch hoher Lärmbelastung und 6 Millionen unter chronischen Schlafstörungen leiden, zwei Faktoren, die mit Lärmbelastung in Verbindung stehen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen potenziell verschlimmern könnten (Europäische Umweltagentur, 2020). Aus diesem Grund ist die Verlagerung der Lärmforschung in Richtung der kardiovaskulären Auswirkungen von Lärm sehr zeitgemäß, da jeder Faktor, der potenziell eine dieser Krankheiten modulieren könnte, ein enormes Potenzial für die Auswirkung auf die globale Krankheitslast hat. In den letzten zehn Jahren wurden zunehmend bevölkerungsbezogene Studien zu den Auswirkungen von Lärm veröffentlicht, die 2018 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) beurteilt und bewertet wurden. Dieses Expertengremium bewertete die Beweise für einen Zusammenhang zwischen Straßenverkehrslärm und ischämischer Herzkrankheit als hochwertig, während Assoziationen zwischen Lärm und anderen Herz-Kreislauf-Erkrankungen von niedrigerem Standard waren (167), was einen Bedarf an Studien mit besserer Qualität und standardisierter Forschung auf diesem Gebiet aufzeigt.

Einen Überblick über einige wegweisende Studien und Initiativen zu den durch Verkehrslärm verursachten gesundheitlichen Auswirkungen gibt die Abbildung 12 (168). Der erste epidemiologische Beweis, dass Verkehrslärmbelastung und

ischämische Herzerkrankung im Zusammenhang stehen kam 1988 aus einer Kohortenstudie. Diese Studie fand keine signifikanten Assoziationen mit ischämischer Herzkrankheit, aber Assoziationen zwischen systolischem Blutdruck, Östradiol, Gesamtcholesterin, Plasmaphosphatidylcholin, Antithrombin III, Cortisol und Blutplättchenzahl mit Verkehrslärmbelastung bei 2.512 Männern im Alter von 45 bis 59 Jahren (169). Dieselben Autoren publizierten jedoch später einen Bericht über einen geringfügigen Anstieg des ischämischen Risikos im Zusammenhang mit Lärm (170).

Nach diesen Berichten, die 1988 und 1993 veröffentlicht wurden, schien es eine lange Lücke in der qualitativ hochwertigen Forschung zu den kardiovaskulären Auswirkungen von Lärm zu geben.

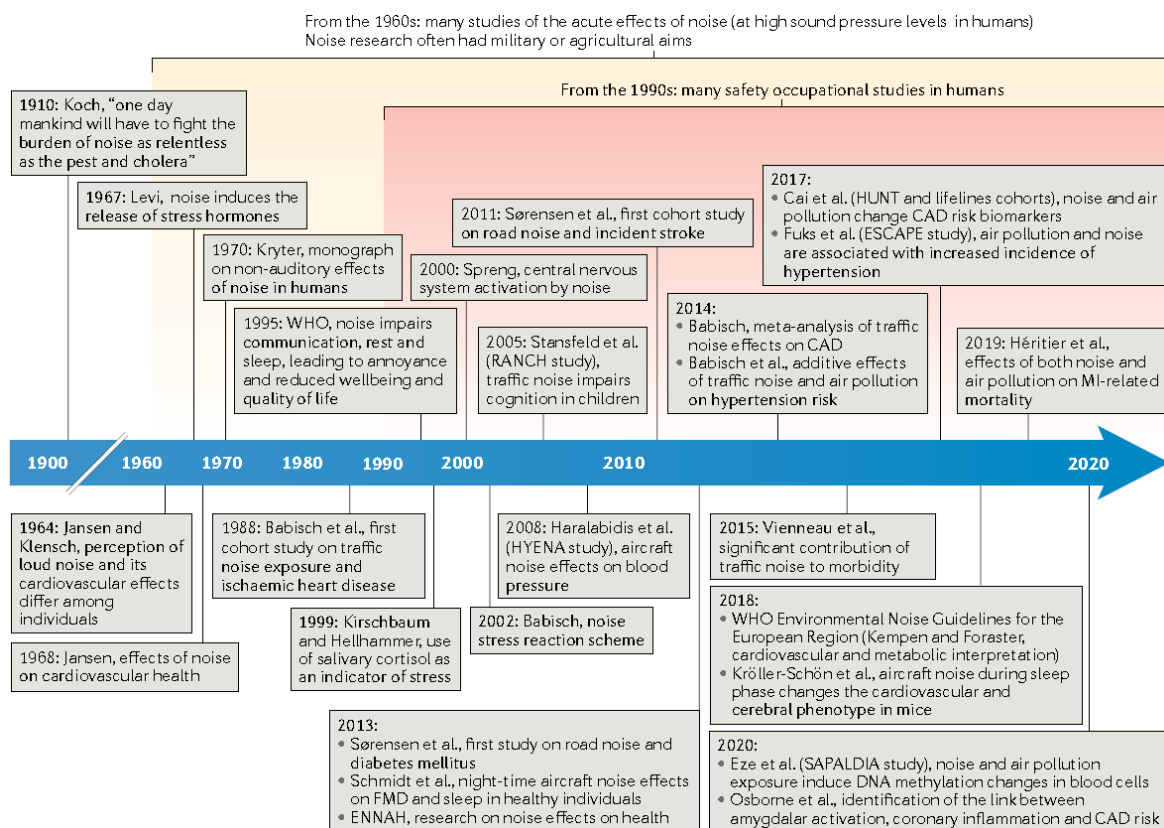


Abbildung 12: Zeitverlauf der Forschung zu gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Lärm

Historischer Überblick über die Forschung zu den gesundheitsschädlichen Auswirkungen von Lärm, wobei wichtige Konzepte, Studien und Berichte hervorgehoben werden mit besonderer Fokus auf Verkehrslärm. Die Auswahl der Studien basiert auf der persönlichen Meinung der Autoren in der Lärmforschung. CAD: coronary artery disease, ENNAH: European Network on Noise and Health, FMD: flow-mediated Dilatation, MI: Myocardial Infarction

Abbildung aus (168)

Die nächste Kohortenstudie fand 2009 statt und stellte fest, dass die Verkehrsintensität mit kardiovaskulärer Sterblichkeit assoziiert war und das höchste relative Risiko für ischämische Herzerkrankungen bestand, begleitet von zerebrovaskulärer und Herzinsuffizienz Sterblichkeit (171). Während dieser Bericht den früher veröffentlichten Studien etwas widersprechen mag, könnte die lange Verzögerung zwischen den Studien ein Grund für diese Diskrepanz sein: verbesserte Methoden, größere Studie (120.852 Probanden über zwei Jahre) und Einbeziehung der Umweltverschmutzung haben möglicherweise die Sensitivität der Analyse erhöht. Nach diesem Bericht aus 2009 beschleunigte sich die Forschung im Lärmbereich.

Eine Studie mit 4,6 Millionen Menschen und verschiedenen Kategorien von Lärmpegeln zeigte, dass die Sterblichkeit durch einen Herzinfarkt mit Höhe und Dauer der Belastung mit Fluglärm steigt. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Adjustierung für Luftverschmutzung (PM10-Werte) bestehen (172). Eine andere Kohortenstudie, die eine Schätzung des Straßenverkehrslärms basierend auf der Wohnadresse verwendete, fand ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle (IRR von 1,14) pro 10dB Zunahme des Straßenverkehrslärms. Das Alter schien in dieser Studie ein wichtiger Faktor zu sein, mit signifikanten Korrelationen zwischen Lärm und Schlaganfall bei Patienten über 64,5 Jahre aber nicht bei den jüngeren Probanden (173). Die Korrelation der Schlaganfallinzidenz wurde auch in einer weiteren Studie in London berichtet, die zeigte, dass das Risiko tagsüber und nachts unterschiedlich sein kann, wobei der nächtliche Lärm die stärkeren Gesundheitseffekte bewirkte (174). Stoffwechseleffekte von Lärm wurden in einer prospektiven Kohortenstudie berichtet, was darauf hindeutet, dass ein Zusammenhang zwischen Lärmbelastung und Diabetes und Taillenumfang bestehen könnte (175). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu negativen Auswirkungen von Lärm auf ischämische Herzerkrankungen ist in (Abbildung 13) dargestellt.

Bluthochdruck wurde in mehreren Studien mit Lärmbelastung in Verbindung gebracht, obwohl die Weltgesundheitsorganisation die Qualität dieser Evidenz aufgrund der Heterogenität der Methoden sowie der Abhängigkeit von Selbstauskünften (mittels Fragebögen) als sehr niedrig einstuft (167). Dieser Bericht

bewertete 40 Studien, die sich mit dem Zusammenhang zwischen Bluthochdruck als kardiovaskulärer Risikofaktor und der Lärmbelastung beschäftigt haben. Für Fluglärm wurden Studien zur Prävalenz und Inzidenz mit einem relativen Risiko von 1,05 (0,95-1,17) pro 10 dB bei 60.121 Teilnehmern bzw. 1,00 (0,77-1,30) bei 4.721 Teilnehmern als von niedriger Qualität bewertet. Insgesamt umfassten die Studien 154.398 Personen und zeigten ein relatives Risiko von 1,05 (95%-KI: 1,02-1,08) für den Zusammenhang zwischen Straßenverkehrslärm und der Prävalenz von Bluthochdruck sowie 0,97 (0,90-1,05) für die Inzidenz von Bluthochdruck bei 32.635 Personen. Diese Evidenz ist gering, aber im Allgemeinen zeigte sich über alle Studien ein positiver Zusammenhang trotz der mangelnden Übereinstimmung zwischen den einzelnen Studien (167). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu negativen Auswirkungen von Lärm auf Bluthochdruck ist in (Abbildung 13) dargestellt.

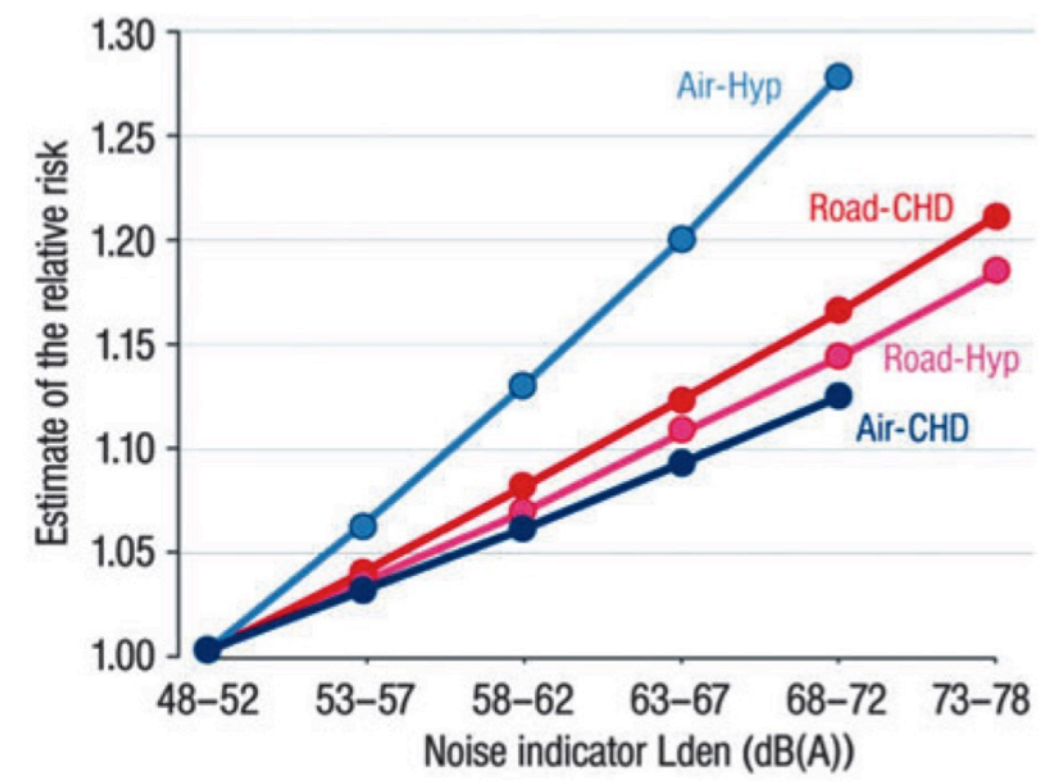


Abbildung 13: Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Auswirkungen vom Lärm auf ischämische Herzerkrankungen und Bluthochdruck

Air: Fluglärm, Road: Straßenverkehrslärm, Hyp.: Hypertension, CHD: ischämische Herzkrankheit.

Abbildung aus (10)

Eine kurze Zusammenfassung der Studien zu den Auswirkungen von Lärm auf Bluthochdruck findet sich in Abbildung 14. Diese Studien deuten auf eine eher schwache Beziehung zwischen Bluthochdruck und Lärm hin. Während die Beweise für einen Zusammenhang zwischen Bluthochdruck und Lärm schwach bleiben, ist es wichtig zu beachten, dass es Schwächen im Studiendesign gibt: Daten nur auf die Verschreibungen von Bluthochdruckmedikamenten zu beziehen, könnte das tatsächliche Ausmaß der Lärm-induzierten Bluthochdruckfälle stark unterschätzen, da zum einen nicht alle Lärm-geschädigten Probanden mit Bluthochdruck direkt beim Arzt vorstellig werden und zum anderen einige der Studien wiederum auf der Selbstauskunft der Probanden mittels Fragebögen beruhen. Bluthochdruck ist jedoch ein Risikofaktor für ischämische Herzkrankheiten, die schon als qualitativ hochwertige Evidenz für einen Zusammenhang mit Lärm eingestuft wurden. Darüber hinaus ist Bluthochdruck stark mit Stress und Schlafstörungen assoziiert, die wichtige Faktoren für die kardiovaskuläre Gesundheit darstellen. Aus diesen Gründen ist die Arbeit dieser Dissertation besonders notwendig, um die Mechanismen zu beschreiben, durch die Lärm Bluthochdruck verursachen kann, durch eine Steigerung der Stressreaktionen und Störung des Schlafes, was zu endothelialer Dysfunktion, Entzündung und oxidativem Stress führt.

Noise Studies on Hypertension in Humans since 2018				
	Authors	Year	Type	Odds Ratio/ Hazard Ratio
1	Dimakopoulou et al. (Dimakopoulou, 2017)	2017	Cohort Greece n=71	OR 1.18 (95% CI 0.92–1.52) per 10dB(A) LAeq
2	Pyko et al. (Pyko, 2018)	2018	Cohort Sweden n=1386	HR 0.93 (95% CI 0.86–1.01)
3	Zeeb et al. (Zeeb, 2017)	2017	Case-control Germany n=137,577	OR 1.00 (95% CI 0.99–1.01)
4	Carey et al. (Carey, 2016)	2018	Cohort UK n=17,785	HR 1.01 (95% CI 0.94–1.08) for 55–60dB(A) and 0.99 (95% CI 0.88–1.05) for >60dB(A) Lnight (reference <55dB(A))
5	Fuks et al. (Fuks, 2017)	2017	Cohort (mixed European) n=6,206 self reported, n=3,549 measured	RR 1.03 (0.99–1.07) for self-reported hypertension, RR 0.99 (0.94–1.04) for measured hypertension
6	Thacher et al. (Thacher, 2020)	2020	Cohort Denmark n=21,241	HR 1.00 (95% CI 0.98–1.02)

Abbildung 14: Zusammenfassung der Studien zu den Auswirkungen von Lärm auf Bluthochdruck

Die Evidenz für einen Zusammenhang zwischen Verkehrslärm und Bluthochdruck wurde vom WHO-Expertengremium bislang mit niedriger Qualität bewertet.

Abbildung aus (176)

Mit unseren laufenden Studien zu lärminduzierten gesundheitsschädlichen Auswirkungen bei Mäusen haben wir gezeigt, dass oxidativer Stress ein zentraler Pathomechanismus in der Reaktion auf Lärmbelastung ist, was auch durch die genetische Deletion von Nox2 unterstützt wird, wodurch schädliche Lärmwirkungen vollständig verhindert werden können (9). Wir haben auch additive Effekte von Lärm auf oxidativen Stress in einem Mausmodell der Angiotensin II-getriggerten arteriellen Hypertonie belegen können, wobei dieses Bluthochdruckmodell für seine ausgeprägte Aktivierung der Nox2-Isoform bekannt ist (177).

Unser Labor hat auch den molekularen Beweis erbracht, dass die phagozytische Nox2 in Lysozym M (LysM)-positiven Entzündungszellen für die negativen kardiovaskulären Wirkungen von Lärm verantwortlich ist, da die genetische Ablation dieser LysM-positiven Zellen (durch Diphtherie-Toxin-Behandlung von Mäusen mit transgener LysM-spezifischer Diphtherie-Toxin-Rezeptor-Expression) den lärminduzierten oxidativen Stress, Entzündung, endotheliale Dysfunktion und Blutdruckanstieg verhindern konnte (178). Ein Pro-oxidativer Phänotyp wurde auch durch RNA-Sequenzierungsdaten entdeckt, der auf eine Herunterregulierung von Genen hindeutet, die antioxidative Abwehrproteine wie Superoxiddismutase 1 und Glutathionperoxidase 1 sowie antioxidative Transkriptionsfaktoren wie Forkhead-Box-Proteine O (FOXO) kodieren (10).

Eine nicht-zielgerichtete Plasmaproteomanalyse deutete auf einen pro-inflammatorischen Phänotyp bei lärmexponierten Mäusen hin, der mit einer pro-oxidativen Verschiebung des Verhältnisses von ungesättigten zu gesättigten Fettsäuren, einer verstärkten Wechselwirkung von Leukozyten mit dem Endothel und einer mikrovaskulären Dysfunktion assoziiert war, die alle durch eine genetische Deletion von Nox2 korrigiert werden konnten (179). Das direkte Abfangen von Stickstoffmonoxid durch die Reaktion mit Superoxid stellt ebenfalls einen Redoxschalter dar und unterstützt eine antagonistische Wirkung von Superoxid auf die Stickstoffmonoxid-Signalgebung. Endotheliale Dysfunktion nach Lärmbelastung wurde bei gesunden Probanden (Abbildung 15) (18) und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (180) dokumentiert, wobei die Verbesserung der Endothelfunktion durch die Gabe von Vitamin C in der Lärmgruppe auf eine zentrale Rolle reaktiver Sauerstoffspezies durch Lärm hindeutete.

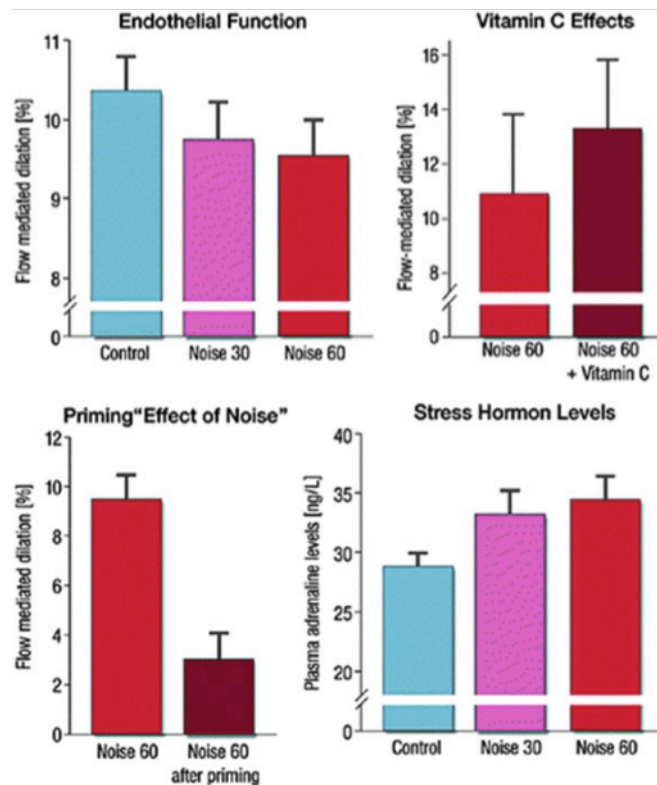


Abbildung 15: Auswirkung von Fluglärm auf die Endothelfunktion und Stresshormonspiegel bei gesunden Probanden

Die Endothelfunktion wurde mittels Fluss-abhängiger Dilatation (FMD) gemessen. Die Verabreichung von Vitamin C war mit einer verbesserten Endothelfunktion assoziiert, was auf eine Rolle von oxidativem Stress durch Fluglärm hindeutet. Wiederholte Beschallung führte zu einer dramatischen Verschlechterung der FMD (priming Effekt). Die Sympathikusaktivierung wurde anhand der Adrenalin-Spiegel gemessen.

Abbildung aus (18)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Adhesive OP-Abdecktuch	Mölnicke Health Care, Schweden
Applied Biosystems Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Axiocam MRm	Zeiss, Göttingen
Aqua ad iniectabilia Braun	B.Braun, Melsungen
BioRad Power Pac Basic	BioRAD Laboratories, München
BioRad Glasscheiben	BioRAD Laboratories, München
Blotting-Anlage	BioRAD Laboratories, München
Centro chemiluminescence plate reader	Berthold Technologies
ChemiLux Imager CsX-1400 M	Intas, Göttingen
Cryostat Leica	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Durchlichtmikroskop MZ 5400	Krüss, Hamburg
DUROGRIP Nadelhalter	Stoss Medika, Wiesbaden
DUROGRIP Fadenschere	Stoss Medika, Wiesbaden
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon 50 ml	Greiner GmbH
Falcon 15 ml	Greiner GmbH
Federscheren Vannas-Stil	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern GmbH, Balingen
Feinwaage LE225D	Sartorius, Göttingengemeiner Laborgebrauch
Feinwaage KB800-2	Kern GmbH, Balingen
Filter 10 kDa + 30 kDa	Millipore, Billierica, MA, USA
Fluoreszenzmikroskop 40CFL	Zeiss, Göttingen
Heizplatte HL1220	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Heizrührer MR 3001	Heidolph
Hitachi Sorvall Discovery Ultrazentrifuge	Thermo Scientific GmbH, Langenselbold

Homogenisator RW16 Basic	IKA Werk Laboratory Equipment
Inversmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss GmbH, Göttingen
Isometrische Transducer	Kent, Torrington, CO, USA
Isometrische Transducer	Radnoti, Monrovia, CA, USA
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz
Kamera: AxioCam MRm	Zeiss, Göttingen
Kühlplatte Leica EG 1150C	Leica Microsystems GmbH, Nussloch
Laborrührwerk RW 16 basic	KA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Microplate reader MRX 2	Magellan Biosciences
Mikroskopkamera Colourview II	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Mikropräparierschere + Pinzette	Fine Science Tools
Mikropinzette	Stoss Medika, Wiesbaden
Minifold 96-Well System	Whatman GmbH, Dassel
MiniShaker M52	Laboratory Equipment
Mini Protean III	BioRAD Laboratories, München
Mini Spin Plus Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Mini Trans-Blot® System	BioRAD Laboratories, München
Multipipetten	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Nadeldose	Stoss Medika, Wiesbaden
Nitrozellulose Blotting Membran Protran	AmershamLife sciences
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co, Lauda- königshofen
Organbad	Kent, Torrington, CO, USA
Organbad	Radnoti, Monrovia, CA, USA
Paraffinspender Leica EG1120	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
PCR-Gerät StepOnePlus™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetten: Pipetman	Gilson
Pipette Eppendorf 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf 0,5 – 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf 10 – 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten: steril, 10 ml	Greiner Bio-One International GmbH

Pipettenspitzen weiß, 20 µL	TipOne, Starlabgroup
Pipettenspitzen gelb, 200 µL	Sarstedt AG & CO, D-51588 Nümbrecht
Pipettenspitzen blau, 1000 µL	Sarstedt AG & CO, D-51588 Nümbrecht
Quanti-Tect Probe RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
RührerMR 1000	Heidolph
Spritze 2 ml	B.Braun AG Melsungen, Melsungen
Spritze 5 ml	B.Braun AG Melsungen, Melsungen
Spritze 10 ml	B.Braun AG Melsungen, Melsungen
Test Tube	Thermostat TCR 100 Roth
Thermomixer comfort MTP 5355	Eppendorf AG, Hamburg
Thermo Scientific 96-well Platte	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Tissue Lyser	Qiagen
Transferpipette 200 µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, NY, USA
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellcounter KX-21N	Sysmex Corporation, Japan

3.1.2 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-Propanol	AppliChem, Darmstadt
ABC-Reagenz	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Acrylamid/Bis Lösung 40% 29:1 (3,3% C)	BioRad Laboratories GmbH, München
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Hamburg
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bench Mark Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Bench Mark TM Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München
Braunol® (Providon-Iod)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka & Riedel, Seelze
cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
DAB-Reagenz	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Dihydroethidium (DHE)	Fluka & Riedel, Seelze
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka & Riedel, Seelze
Ethanol 70% und 100%	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis (aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
Heparin-Natrium 2500	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes (N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) heminatiumsalz)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-012 (Luminol Analog)	Wako Chemical Industries (Osaka, Japan)
Leupeptin-HCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium-Fluorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium-Hepes (Na-Hepes)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natrium-Vanadate	Sigma-Aldrich, Hamburg
Nitrolingual (Nitroglyzerin, GTN)	G.Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phosphate buffered saline (PBS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Perbio Science, Erembodegem, Belgien
Precision Plus Protein TM Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg
Roti [®] -Quant für lösliche Proteine (Bradford)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TaqMan [®] Gen Expression Assay	Applied Biosystems, Darmstadt
Tissue Tek [®]	Sakura, Staufen, Deutschland
Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethan) - base	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris(Tris(hydroxymethyl)aminomethan) - Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka & Riedel, Seelze
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.1.3 Antikörper und Primer

Antikörper	Verdünnung	Verwendung	Bestell-Nr.	Firma
3-Nitrotyrosin	1:1000	DotBlot, IHC	05-233	Upstate, Biotechnology, MA, USA
Beta-Aktin	1:250	WesternBlot	A-5060	Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
ET-1	1:200	WesternBlot, IHC	Sc517436	SantaCruz Biotechnology, USA
MDA	1:1000	DotBlot	442730	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Nox2	1:500	WesternBlot	611415	BD Biosciences, USA
Nox2	1:200	IHC	LS-B12365	LSBio, Seattle, WA, USA
Anti-Maus IgG (GAM-POX)	1:10 000	WestrnBlot, Dotblot	PI-2000	Vector Lab., Burlingame, CA, USA
Anti-Kaninchen IgG (GAR-POX)	1:10 000	WesternBlot, DotBlot	PI-1000	Vector Lab., Burlingame, CA, USA

TaqMan Primersets für quantitative real-time PCR

Gen Symbol	Name	Primer-ID
nNOS	Neuronal nitric oxide synthase	Mm 01208059_m1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1	Mm00449197_m1
FOXO-3	Forkhead box protein O3	Mm 01185722_m1
Tbp	TATA box binding protein	Mm00446973_m1

3.1.4 Puffer und Lösungen

Homogenisierungspuffer (Hg-Puffer):

20 mM Tris-HCL

250 mM Saccharose

20 mM EDTA

3 mM EGTA

pH 7,4

Homogenisierungslösung (Hg-Lösung):

100 µl Protease Inhibitor Cocktail

10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail

50 µl PMSF (0,1 M in Methanol)

100 µl Triton X-100

50 µl Natrium-Vanadat (0,1 M in Wasser)

100 µl Natrium-Fluorid (0,5 M in Methanol)

auf 10 ml Hg-Puffer

Laufpuffer der Elektrophorese (SDS-PAGE):

25 mM Tris-base

192 mM Glycin

3,5 mM SDS

pH nicht adjustiert

Transferpuffer der SDS-PAGE:

25 mM Tris-base

192 mM Glycin

Auf 800 ml dest. Wasser + 200 ml Methanol

Sammelgel-Puffer der SDS-PAGE:

0,5 M Tris-HCL

pH 6,8

Trenngel-Puffer der SDS-PAGE:

1,5 M Tris-HCL

pH 6,8

Ammoniumpersulfat (APS):

10 g APS

Auf 100 ml dest. Wasser

Organbad-Puffer (auf 37 Grad erwärmen):

118,3 mM Natriumchlorid (NaCl)

4,69 mM Kaliumchlorid (KCl)

2,5 mM Calciumchlorid (CaCl₂)

1,2 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄)

25,0 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

1,03 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)

11,1 mM Glukose

pH 7,4

Inhibitoren-Puffer:

100 µl Aprotinin (1,2 mg/ml)

40 µl Pepstatin (2,5 mg/ml)

10 µl Leupeptin (5 mg/ml)

auf 10 ml Krebs-Hepes-Puffer

PCR Ansatz qRT-PCR:

12,5 µl 2xQuantiTect Probe RT-PCR Master Mix

8,5 µl RNase-free H₂O

1,25 µl Primer

2,5 µl Template RNA

Krebs-Hepes-Puffer (KH-Puffer):

99,01 mM Natriumchlorid (NaCl)

4,69 mM Kaliumchlorid (KCl)

2,5 mM Calciumchlorid (CaCl₂)

25 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)

1,2 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄)

1,03 mM Di-Kaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄)

11,1 mM D-Glukose

20 mM Na-Hepes

pH 7,4

3x Laemmli-Puffer:

1880µl Tris-HCl (1M, pH 6,8)

20% SDS

17% Glyzerin

1% Bromphenolblau

5% 2-Mercaptoethanol

320µl dest. Wasser

Sammelgel 4%:

3,2 ml H₂O bidest.

0,5 M Tris-HCl (pH 6,6)
1 ml Acrylamid (40 %)
50 µl SDS (10 %)
50 µl APS (10 %)
5 µl TEMED

Trenngel 10%:

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

Strippingpuffer:

24,76 mM Tris-HCl
34,62 mM SDS
700 µl 2-Mercaptoethanol
200 ml H₂O bidest

Waschpuffer Phosphate buffered saline (PBS):

1,5 M NaCl
200 mM Na₂HPO₄
40 mM NaH₂PO₄

Waschpuffer PBS/T:

Waschlösung PBS

1% (v/v) Tween-20

Waschpuffer Tris buffered saline (TBS):

200 mM Tris base

1,4 M NaCl

pH 7,6

Waschpuffer TBS/T:

Waschlösung TBS

1% (v/v) Tween-20

3.1.5 Software-Programme

Adobe Photoshop CS2, Version 9.0

Adobe Acrobat Reader DC

Axiovision 4.3

ChromPass 1.8.6.1

Endnote X9

Excel

Fast Real Time System

Gel-Pro Analyzer™ Version 6.0

GraphPad Prism 7

iCycler iQ™

Adobe Systems GmbH, München

Adobe Systems, CA, USA

Carl Zeiss GmbH, Aalen

Jasco, Großumstadt

Thomson Reuters, NY, USA

Microsoft, USA

Applied Biosystems, Darmstadt

Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA

GraphPad Software Inc, La Jolla, CA,
USA

Multi- Color qRT- PCR Detection

Lab Chart
Organbad, Chart 5
Revelation 4.25
SigmaStat Statistical for Windows
Version 3.5
Software ABI7900HT

System
ADInstruments, Sydney, Australien
ADInstuments GmbH, Spechbach
ilf bioserve, Langenau
Systat Software GmbH, Erkrath

Qiagen

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodell und Behandlung

Alle Tiere wurden in Übereinstimmung mit den Leitlinien für den experimentellen Umgang, die Pflege und Verwendung von Labortieren behandelt. Diese Behandlungen wurden von der Ethikkommission der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz genehmigt und vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Koblenz, Deutschland; Genehmigungsnummer: 23 177-07/G 15-1-094) bewilligt und zugelassen.

Männliche C57BL/6J-Mäuse wurden von Janvier gekauft und zwei Wochen vor den Behandlungen in unserem Tierstall zur Akklimatisierung gehalten. Die Tiere erhielten in vier Gruppen eine Fluglärmexposition mit einer mittleren Lautstärke von 72 dB(A) (maximal 85 dB(A)) für 4, 7, 14 oder 28 Tagen (1; 9; 10). Eine fünfte Gruppe fungierte als Kontroll-Gruppe, die mit keinem Lärm behandelt wurde. Die Tiere wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten in die Lärmexpositions-kammer gesetzt, so dass alle Gruppen gleichzeitig am selben Tag getötet und untersucht werden konnten. Um den Effekt zu überprüfen, wurden einige Mäuse mit dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-Inhibitor Captopril (50 mg/kg/Tag) im Trinkwasser 3 Tage vor der Lärmexposition für 7 Tage behandelt (8 Mäuse ohne Lärm, 6 Lärm, 9 Lärm+Captopril). Nach der angegebenen Dauer der Lärmbelastung wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose durch Durchtrennung des Zwerchfells und Entfernung des Herzens, der Aorta und anderer Organe getötet. Die Beschallungen als auch Tötungen wurden unter Aufsicht und in Zusammenarbeit mit den naturwissenschaftlichen Doktorandinnen (Frau Katie Frenis) und Postdoktorandinnen (Dr. Swenja Kröller-Schön, Frau Dr. Miroslava Kvandova) durchgeführt.

3.2.2 Auditory brainstem response (ABR)-Audiometrie

Die Bewertung der Hörschwellen wurde vor und nach Lärmexposition mittels klickabhängiger auditory brainstem response (ABR) Audiometrie durchgeführt (181-

183). Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit den Kollegen aus der HNO Klinik in Mainz durchgeführt (Dr. Ernst, Dr. Eckrich, Prof. Strieth). Die Hörprüfung wurde in einer Schallschutzkammer (IAC 400-a, Industrieakustik-Gesellschaft, Niederkrüchten, Deutschland) durchgeführt. Ein speziell angefertigter Lautsprecher sowie ein Kalibriermikrofon wurden ca. 2,5 cm von der Ohrmuschel entfernt platziert, während das kontralaterale Ohr mit weichem Ohrenschmalz (Ohropax, Werheim, Deutschland) verschlossen wurde. ABRs wurden unter Verwendung eines maßgeschneiderten Setups mit einer Multifunktions-I/O-Karte (National Instruments Corp., Austin, TX, USA) abgeleitet, die mit AudiologyLab 3.8 (Otoconsult, Frankfurt am Main, Deutschland) ausgestattet war. Die Hörschwellen durch Registrierung von ABRs wurden unter Verwendung von Klicks (100 μ s Dauer) in Schritten von 3 dBs (128 Wiederholungen pro Schritt) bestimmt. Der Bandpassfilter wurde zwischen 200 Hz und 5000 Hz eingestellt.

3.2.3 Nicht-invasive Blutdruckmessung (Tail-Cuff-Methode)

Die Blutdruck-Messungen wurden an den wachen Mäusen mithilfe der Tail-Cuff-Methode an den Tagen 0, 4, 7, 14 und 28 nach der Lärmexposition (CODA 2, Kent Scientific, Torrington, USA) nicht-invasiv durchgeführt. Vor der Grundlinienmessung am Tag 0 wurden die Tiere dreimal für Blutdruckmessungen trainiert, um Stressreaktionen zu verhindern und möglichst eine genaue Messung durchführen zu können. Die Tiere traten freiwillig in die Fixierröhrchen (Kunststoffröhre) ein, dann auf eine vorgewärmte Platte (32 °C) gelegt und 20 Minuten zum Akklimatisieren liegen gelassen. Jede Messsitzung umfasste 15 aufeinanderfolgende Blutdruckmessungen, von denen die ersten 5 als Akklimatisierungszyklen verworfen wurden. Datenpunkte repräsentieren dabei den Mittelwert von zehn Messungen pro Tier am gegebenen Behandlungstag. Mithilfe einer oszillatorischen Technik und mittels einer Blutdruckmanschette am Schwanz der Maus konnten die Blutdruckwerte mit zugehöriger Software (CODA Data Acquisition Software) erfasst werden. Der Blutdruck wurde danach graphisch ermittelt (184). Die Blutdruckmessungen wurden unter Aufsicht und in Zusammenarbeit mit den naturwissenschaftlichen Doktorandinnen (Frau Katie Frenis und Frau Maria Teresa Bayo Jimenez) durchgeführt.

3.2.4 Organentnahme und Aortenpräparation

Die Mäuse wurden vor der Tötung durch die Inhalation von Isofluran tief narkotisiert. Das Abdomen und der Thorax wurden mithilfe einer Präparationsschere eröffnet. Nach der kompletten Eröffnung des Brustkorbs (Schneiden der Rippen und des Brustbeins, Eröffnen des Perikardes) wurde mit einer Injektionsnadel 200 µl verdünntes Heparin in das noch schlagende Herz (in den linken Ventrikel) injiziert, um die postmortalen Blutgerinnung zu vermeiden. Dadurch konnte so viel Blut wie möglich komplikationslos entnommen werden. Das Blut wurde in eisgekühlte Serum-Gel-Monovetten und in Zitrat-monovetten zur Messung der NADPH-Oxidase-Aktivität und spätere Experimente aufgeteilt. Als nächstes wurde das Herz von den großen herznahen Gefäßen (Aorta ascendens, truncus pulmonalis und vena cava superior) abgesetzt und in ein eisgekühltes Probengefäß mit Krebs-Hepes-puffer (KH-Puffer) eingetaucht. Es erfolgte dann die Absetzung der Aorten an den großen Abgängen mit den Nieren und den anderen Bauchorganen. Die Aortenentnahme wurde sehr sorgfältig und ohne Zugkräfte, Dehnungen oder Verletzungen durchgeführt und in eisgekühltes Probengefäß mit Krebs-Hepes-puffer eingebracht. Die Tötung und Organentnahme wurde unter Aufsicht und in Zusammenarbeit mit den naturwissenschaftlichen Doktorandinnen (Frau Katie Frenis und Frau Maria Teresa Bayo Jimenez) und Postdotorandinnen (Dr. Swenja Kröller-Schön, Frau Dr. Miroslava Kvandova) durchgeführt.

Unter dem Lichtmikroskop und in einer Petrischale wurde die in Krebs-Hepes-puffer eisgekühlt gelagerte Aorta mithilfe einer chirurgischen Pinzette und einer Federschere von Fettgewebe und perivaskulären Bindegewebe freipräpariert. Die Aorten wurden hier auch mit großer Sorgfältigkeit und ohne jegliche mechanische Störung oder Verletzung präpariert, um das einschichtige Endothel der Aorta vollständig zu erhalten. Anschließend erfolgte die Abtrennung von jeweils 4 mm langen Ringen. Ein Teil der Aortenringe wurde direkt im Organbad verwendet und der Rest wurde bei -80 °C gelagert, um dann verschiedene Untersuchungen durchzuführen z.B. Dot Blot und Western Blot. Für die Herstellung von Cryo-Schnitten wurden Teile der Aorten in ein Spezialharz (TissueTek) eingebettet und bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Gefäßfunktionsuntersuchung mittels Isometrischer Tonusstudien (Organbad)

Die Organbadmethode ist eine isometrische Spannungsmessung an einem Aortenring unter festgelegten Bedingungen. Da sich die Reaktion des Endothels auf verschiedene endogene und exogene Reize in Abhängigkeit von seiner Exposition gegenüber oxidativem Stress ändert, können in Organkammern durchgeführte Messungen einen Überblick über Endothelfunktion und die Relaxationsfähigkeit der Gefäße bei Tieren geben. Alle Schritte wurden wie von meiner Arbeitsgruppe früher publiziert durchgeführt (185; 186). Dafür wurden die freipräparierten, 4 mm langen Aortenringe zwischen zwei Drahtdreiecke aus Edelstahl montiert. Dabei ist ein Dreieck mit einem Kraftwandler (Transducer) verbunden und das andere mit einem feststehenden Haken als Gegenhalt. Das ganze Gebilde befindet sich dann stabil und freihängend in einem doppelwandigen Glasgefäß (siehe Abbildung 16, unteres Panel). Die Anlage wurde von einem auf 37°C temperierten Wasserbad durchflossen. Der auf 37°C vortemperierte Krebs-Hepes-Puffer wurde eingefüllt (je Gefäß 25 ml, d.h. bis auf Höhe der inneren Doppelwandung) und mit Carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) begast. So wurde eine physiologische Umgebung wie in einem lebenden Organismus gewährleistet.

Danach wurde manuell eine Vorspannung (ohne das Gefäßgewebe zu dehnen) am Aortenring vorgenommen, um für den Start der Messung eine festgelegte Nulllinie (Basallinie) zu haben. Die Spannung wurde schrittweise alle 7 min von 0,2 g, 0,4 g, 0,6 g, über 0,8 g, auf 1,1 g erhöht. Zunächst beginnt der Funktionstest der Aorten mit Kaliumchlorid (KCl). Es wurde zunächst 1ml KCl (2 mM) gegeben, um zu sehen, ob es eine Kontraktion gibt. Durch die Steigerung der KCl-Konzentrationen (5, 10, 20, 40, 80 mM) wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Nach Wiederholung des Vorgangs wurde das KCl ausgewaschen. Die Signale der Kontraktion oder der isometrischen Spannungen wurden durch den Transducer aufgenommen und auf den Computer übertragen. Die erhaltenen Messungen wurden elektronisch verarbeitet und graphisch dargestellt. Nun, um die Endothel-abhängige und Endothel-unabhängige Vasodilatation der Aorta untersuchen zu können, wurden die Aortenringe durch vasoaktive Substanzen vorkontrahiert. Die Vorkontraktion der Aortenringe wurde mit Prostaglandin F_{2a} (finale Konzentration von 3 µM) auf ca.

80% des maximalen KCl-Tonus eingestellt. Die Gefäßfunktionsmessungen wurden in Zusammenarbeit mit unserem technischen Personal (Herr Schreiner und Frau Rosenberger) durchgeführt.

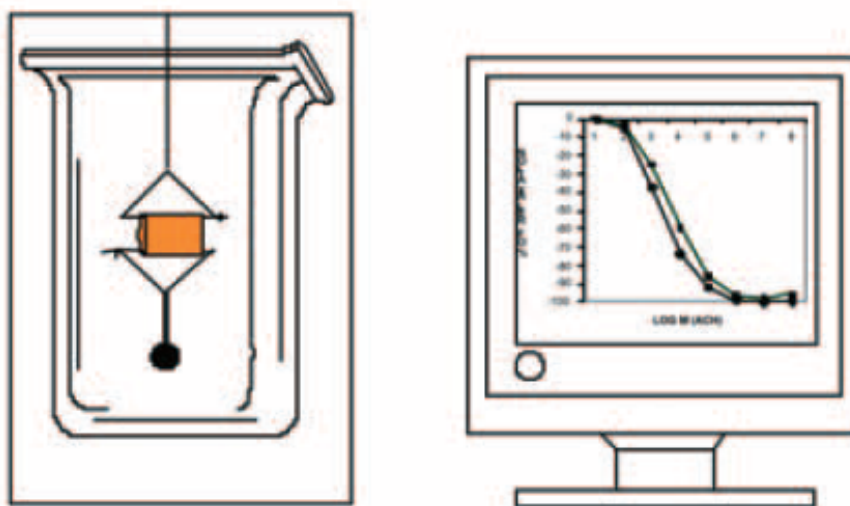
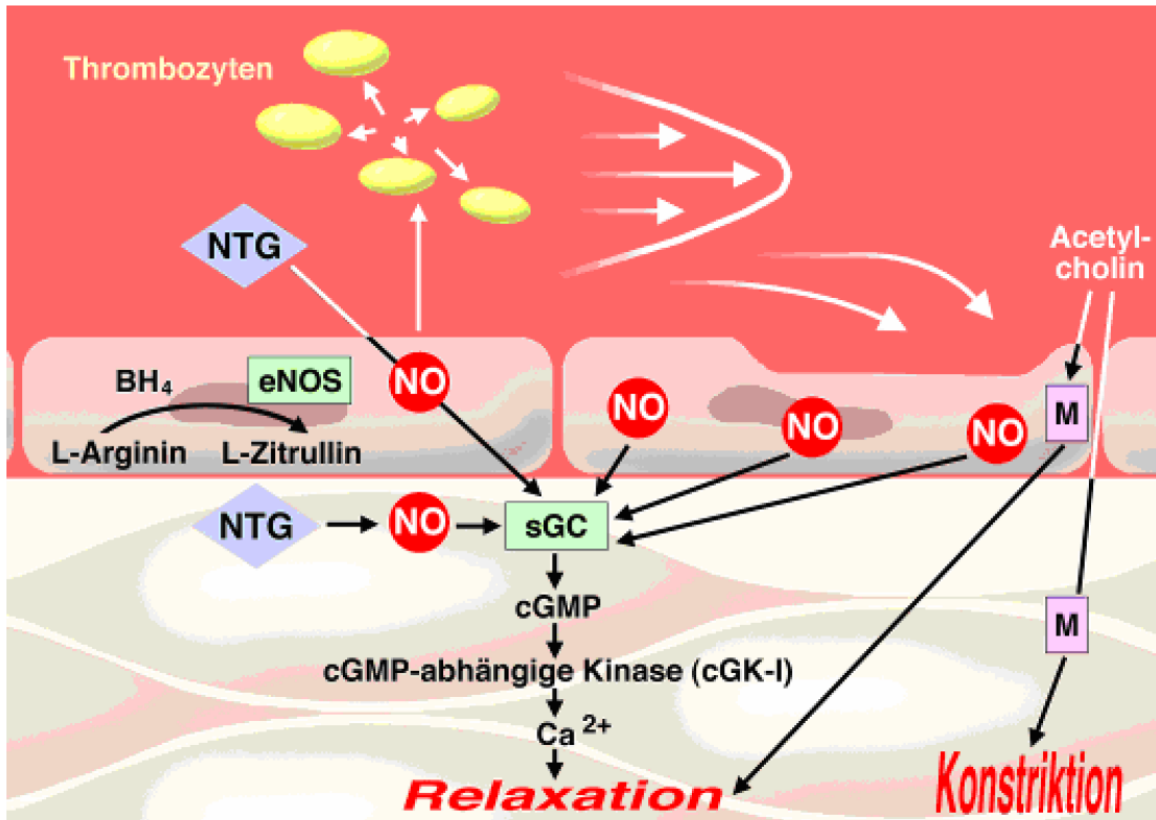


Abbildung 16: Die Wirkung von Acetylcholin und Stickstoffmonoxid auf das Endothel und auf den glatten Gefäßmuskel

Physiologisch bewirkt Acetylcholin eine Vasodilatation auf das Endothel und eine Vasokonstriktion auf den glatten Gefäßmuskel. Mit einem intakten Endothel wirkt Acetylcholin vasodilatierend auf das Gefäß, indem es die Stickstoffmonoxid-Produktion erhöht. Das geht durch die Aktivierung von

endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Bei der Endotheldysfunktion herrscht die Vasokonstriktion vom glatten Gefäßmuskel auf das gesamte Gefäß. Unteres Panel: Anordnung des isolierten Gefäßsegments in einem Organbad für isometrische Tonusmessungen.

Abbildung verändert nach (187)

Die Untersuchung der endothelabhängigen Vasodilatation selbst erfolgt durch aufsteigende Mengen an Acetylcholin-Gaben (Acetylcholin-Test). Die finale Konzentration hier wurde von 10^{-9} über $10^{-8,5}$, 10^{-8} , $10^{-7,5}$, 10^{-7} , $10^{-6,5}$, 10^{-6} auf $10^{-5,5}$ M erhöht. Das gesunde Gefäß wird durch ACh dilatiert, indem ACh die endotheliale NO-Synthase (eNOS) aktiviert und damit eine NO-Freisetzung aus den Endothelzellen erzeugt. Bei einem krankhaften Endothel wirkt ACh auf das gesamte Gefäß über die muskarinergen ACh-Rezeptoren in glatten Muskelzellen kontrahierend, weil die beschädigten Endothelzellen nicht mehr in der Lage sind, genug Stickstoffmonoxid freizusetzen.

Die Untersuchung der endothelunabhängigen Vasodilatation wurde analog zu der Untersuchung der Endothelabhängigen Vasodilatation durchgeführt. Hier wurde als Endothelunabhängiger Vasodilatator Nitroglycerin (GTN) statt Acetylcholin eingesetzt und durch die Steigerung der Konzentration (finale Konzentration $30 \mu\text{M}$) ließ sich eine Dosiswirkungskurve für den endothelunabhängigen Stimulus erstellen.

3.2.6 Detektion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS)

3.2.6.1 Oxidativer Burst im Vollblut

Hier soll nur die Methode kurz erläutert werden, da die Daten nicht Teil meiner Dissertationsarbeit sind. Die Ergebnisse werden dann in der Diskussion vorgestellt und im Kontext der anderen Daten diskutiert.

Das Vorhandensein von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (Superoxid und Peroxynitrit) im Vollblut wurde über den Chemilumineszenz-Farbstoff L-012 gemessen (41; 188). L-012 ist ein Luminol-Analog (8-Amino-5-Chloro-7-

Phenylpyrido[3,4-d]pyridazin-1,4-(2H,3H)Dion), das aufgrund seiner Fähigkeit, verschiedene freie Radikale nachzuweisen, für die Detektion des oxidativen Stresses eingesetzt wurde (siehe Abbildung 17) (189; 190). Durch die Reaktionen zwischen diesen Farbstoffen und den Superoxidradikalen kommt es zur Lichtemission, was durch einen Platereader registriert werden kann. Nachdem das frische Vollblut in Citrat-Monovetten von Eppendorf überführt wurde, wurde es in einem Verhältnis von 1:50 mit PBS und $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ versetzt, um eine physiologische Umgebung für die Blutzellen zu gewährleisten. Diese Lösung wurde dann mit dem Farbstoff L-012 (100 μM) verstärkt (191). Der oxidative Burst, also die Aktivierung der NADPH-Oxidase im Vollblut, wurde durch zwei Stimuli ausgelöst, einmal durch den Proteinkinase C-Aktivator PDBu (Phorbol 12,13-Dibutyrat, 10 μM), der durch Hyperphosphorylierung von p47phox zur NADPH-Oxidase Aktivierung führt und einmal durch den Pilzmembranbestandteil Zymosan A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich, Hamburg) der die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch den Toll-like Rezeptor bewirkt. Das Signal wurde dann alle 5 min über 50 min (das Maximum war bei 20 min für Phorbol ester und 50 min für Zymosan A) durch einen Chemilumineszenz-Platereader gemessen (192). Die oxidativen Burst Messungen wurden von Frau Sanela Kalinovic durchgeführt und in ihrer kumulativen Dissertation verwendet.

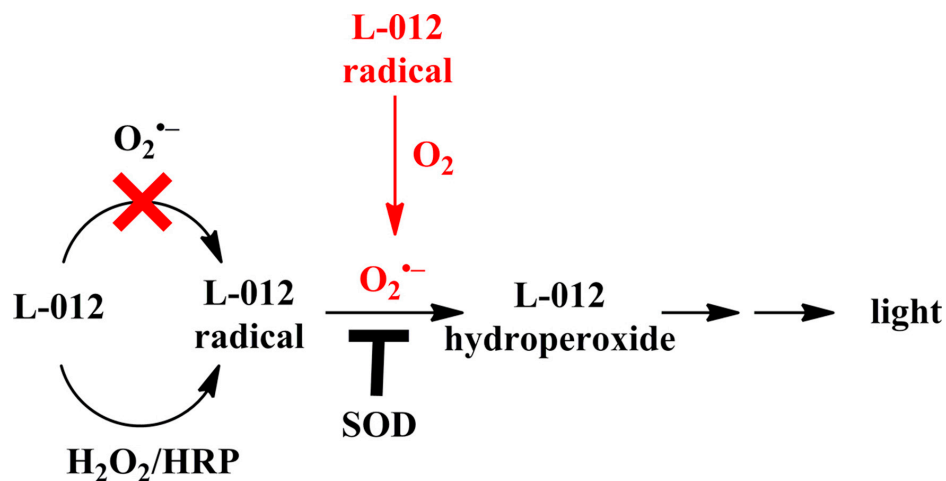


Abbildung 17: Reaktion zwischen L-012 und ROS

Abbildung aus (193)

3.2.6.2 DHE-Fluoreszenz in Aorta

Dihydroethidium (DHE) ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, der für den Nachweis von Superoxidradikalen und anderen reaktiven Sauerstoffspezies in verschiedenen Gewebearten verwendet wird (194). DHE ist in der Lage, jede Schicht der Gefäßwand zu durchdringen und wird beim Vorhandensein von Superoxidanionen spezifisch zu 2-Hydroxyethidium (2-HE) oxidiert (195). Die Aorta wurde in kleine Ringe mit einer Länge von 3-4 mm geschnitten, in das Spezialharz Tissue-Tek eingebettet und mithilfe von flüssigem Stickstoff langsam eingefroren. Bei ca. -25°C wurden mit einem Cryostaten (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) 6-8 µm dicke Schnitte von den eingefrorenen Aorten-Blöcken angefertigt und auf einen Objektträger überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Objektträger auf Eis oder bei -80°C gelagert. Die Färbung der Cryoschnitte wurde wie folgt durchgeführt: Der Objektträger wurde mit DHE-Lösung (1µM DHE in PBS) bei 37°C unter Lichtausschluss für 30 min auf einem Heizblock inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und ein Deckglas auf dem Objektträger aufgelegt. Mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 40 CFL von Zeiss) konnten die Bilder von den Aortenringen aufgenommen werden und die rote Fluoreszenz der DHE Oxidationsprodukte zeigten dabei die örtliche Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies an (Excitation: 510-520 nm, Emission: 580-610 nm). Diese Bilder wurden dann mittels (Image ProPlus 7.0 Software (Media Cybernetics, Rockville, MD)) densitometrisch ausgewertet.

3.2.7 Western Blot

Durch die Western Blot Methode werden die Proteine der Größe nach aufgetrennt und detektiert. Die Bestimmung erfolgt durch eine Reaktion zwischen Antigen, antigenspezifischem primärem Antikörper und enzymgekoppeltem sekundären Antikörper (200). Alle Schritte wurden wie von meiner Arbeitsgruppe früher publiziert durchgeführt (186; 201; 202).

Nachdem die Aorten von dem umgebenden Fett- und Bindegewebe freipräpariert wurden, wurden sie auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die tiefgefrorenen Aorten wurden mithilfe eines Mörsers homogenisiert. Der Mörser ist mit flüssigem Stickstoff vorgekühlt und mit Ethanol gereinigt. Es erfolgte dann die Gabe des Homogenisierungspuffers (Hg-Puffer) zu den Proben im Volumen-Verhältnis 1:1. Der Abbau der Proteine durch körpereigene Enzyme konnte durch eine einstündige Inkubation der Proben mit einem Inhibitoren-Mix aus Protease- und Phosphatase-Inhibitoren im Hg-Puffer, wie im Kapitel 3.1.4 beschrieben, verhindert werden. Hg-Puffer dient zur Auflösung der Zellmembran. Anschließend wurden die Proben auf Eis bei 4°C für eine Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Vortexen wurden die Proben bei 10,000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Probengefäße überführt und auf Eis gelagert, der Rest wurde verworfen.

Nun erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford.

Der Bradford-Assay ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen bis zu Konzentrationen im Bereich mg/mL oder g/l. Die Proben wurden für die Messung mit destilliertem Wasser 1:200 (Aorten) bis 1:1000 (Herz, Hirn) verdünnt. Der Farbstoff, Coomassie brilliant blue-G250 (Roti-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), der erstmals von Marion Bradford in 1976 zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen beschrieben wurde, bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Bei dieser Komplexbildung von Coomassie brilliant blue an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Die ungebundene (kationische) Form hat im Absorptionsspektrum ein Maximum bei 465 nm und daher rot. Durch die Komplexbildung wird der Farbstoff in seiner blauen (anionischen) Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 595 nm (203; 204). Der dazwischen gelegene Bereich ist als neutral und grün ausgezeichnet und das Absorptionsmaximum in diesem Bereich ist 650 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. Das Maß der Farbreaktion ist allerdings vom Protein abhängig, deshalb ist zur Konzentrationsbestimmung eines bestimmten Proteins eine Kalibrierung notwendig. Soll die Konzentration eines

Proteingemisches bestimmt werden, wird z.B. BSA (Bovine Serum Albumin) als Standardprotein genutzt. Die BSA-Standards wurden in fünf verschiedene Konzentrationen 1, 5, 10, 20, 30 ng/µl. erstellt. Es wurden von den vorverdünnten Proben und den Standards jeweils 80 µl vierfach in eine 96-well-Platte aufgetragen und dann 200 µl des verdünnten Farbstoffs (Roti-Quant) zugegeben. Dieser Farbstoff wird als Bradford Reagenz verwendet und mit destilliertem Wasser im Volumen-Verhältnis 1:5 verdünnt eingesetzt. Die photometrische Messung der Proteinkonzentrationen der Proben und Standards wurde durch ein Platerreader bei 595 nm ausgelesen und mit Hilfe des Programms Revelation ausgewertet.

Der nächste Schritt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine. Das erfolgte über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die dafür benötigten Trenngele (10%, siehe 3.1.4) wurden in der Länge von 5 cm angefertigt und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min und erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und die Oberkante der Trenngele kurz mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde mit Sammelgel (4%, siehe 3.1.4) überschichtet und dann die Taschenbreiten von 2-5 mm mit Hilfe eines Kammes eingebaut.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben im Volumen-Verhältnis 2:1 mit dreifach-Lämmli Puffer versetzt und bei 95°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 1µg/µl mit einfach Lämmli Puffer eingestellt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Das Lämmli Puffer enthält β-Mercaptoethanol, was der Zerstörung der Quartärstruktur der Proteine durch Reduktion dient (205; 206). Danach wurden die Proteinproben mit Proteinstandards (Protein ladder) auf die Gele aufgetragen. Die Proteinstandards dienten dazu, die gewünschte Proteinauftrennung sichtbar zu machen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese mit 50 Volt für ca. 15 min bis die Proteinproben das Trenngel erreicht haben. Danach wurde der Strom auf 200 Volt für 1,5-2 Stunden erhöht. Somit konnten die Proteine nach ihrer Größe separiert werden.

Nun folgte der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-membran (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland). Dazu wurden die Membran, Schwämme und Filterpapiere in Transferpuffer eingetaucht, und wie folgt in eine Transferkassette (BioRad Mini-Trans Blot) eingesetzt: Schwamm, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm. Die Anlage wurde in eine Transferkammer auf Eis bei konstanter Stromstärke von 250 mA für 2,5 Stunden eingesetzt. Nach

abgeschlossenem Transfer wurde eine Ponceau-Färbung durchgeführt, um die Proteine auf die Membran sichtbar zu machen. Anhand des Molekulargewichtsstandards wurden aus der Membran entsprechend der kDa-Größe der zu untersuchenden Antigene Streifen geschnitten. Das Ziel der Western Blot-Methode war es, verschiedene Proteine durch verschiedene Antikörper immunologisch auf Membranen nachzuweisen.

Nach Entfernung des Ponceau-Farbstoffes durch kurzes waschen mit Waschpuffer (TBS-T oder PBS-T) wurden proteinfreie Bereiche der Membranstreifen mit einem Blockmedium, wie z.B 3%BSA oder 5%Milchpulver in Waschpuffer für eine Stunde abgesättigt. Danach wurden die in dem entsprechenden Blockmedium gelösten primären Antikörper über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranstreifen mit Waschpuffer mehrmals gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranstreifen für zwei Stunden mit den entsprechenden peroxidase konjugierten, sekundären Antikörpern. Danach wurden die Streifen erneut mit demselben Waschpuffer viermal gewaschen. Nach einer einminütigen Inkubation mit ECL-Reagenz (Luminol/ Peroxid) (Thermo Fischer, Millipore, 1:750), wurden die Streifen mit Klarsichtfolie bedeckt, das Chemilumineszenzsignal durch einen Chemilumineszenz-Detektor (CsX-1400 M, Intas) dokumentiert und mit Hilfe der GelProAnalyzer Software densitometrisch ausgewertet.

3.2.8 Dot Blot

Bei der Dot Blot-Methode handelt es sich um eine vereinfachte Auflage der Western Blot-Methode. Genauso wie bei der Western Blot-Methode, aber ohne dass eine Auftrennung nach Ladung oder Größe durchgeführt wurde, und ohne Lämmli-Puffer, wurden die Proben vorbereitet und die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt. Mithilfe eines Dot Blot-Systems (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) wurden die Proben auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Das Dot Blot-System besteht aus einer 96-Well-Platte, einer Filter-Auflageplatte, einer Metallspannleiste um das ganze System zusammenzuhalten sowie einer Vakuumkammer, die dann an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen

das erforderliche Durchsaugen der Proben erzeugt. Die Membran wurde einmal vor und zweimal nach dem Auftragen der Proben mit PBS gewaschen, um die Proben komplett durch die Membran durchsetzen zu lassen. Anschließend wurde die Anlage auseinandergelegt und die Membran zur Fixierung der aufgesaugten Proteine bei 60°C für eine Stunde getrocknet. Nach dem Trocknen und Blocken proteinfreier Bindungsstellen, wurden die Membranen mit primären Antikörpern gegen Malondialdehyd (MDA)-positive Proteine, (Lipidperoxidation) und 3-Nitrotyrosin (3-NT)-positive Proteine inkubiert. Als nächstes erfolgte die Inkubation mit Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörpern. Die Durchführung der weiteren Schritte und die densitometrische Auswertung entsprach genau der Western Blot-Methode. Alle Schritte wurden wie von meiner Arbeitsgruppe früher publiziert durchgeführt (10; 207; 208).

3.2.9 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qrt-PCR)

Die qrt-PCR spielt sehr große Rolle bei vielen Untersuchungen wie z.B. Erkennung von Erbkrankheiten, Bestimmung der Viruslast und Quantifizierung von Genexpressionen (192). Das Prinzip der qrt-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (siehe Abbildung 18) und liegt in der Amplifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren. In der qrt-PCR wird die Quantifizierung in Echtzeit (Real Time) durchgeführt, das heißt während oder am Ende eines PCR-Zyklus. Der erste Schritt des PCR-Zyklus ist die thermische Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei einer Temperatur von 95 °C, wodurch die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgetrennt werden und dann als Vorlage für die qrt-PCR dienen. An jedem Einzelstrang erfolgt als nächstes die Anlagerung von Primern (oligonukleotide), die als Startpunkte für die spätere DNA-Polymerase dienen. Anschließend erfolgt die Polymerisierung durch DNA-Polymerase. Als Ergebnis jedes Zyklus erhält man zwei neue DNA-Doppelstränge, die wiederum als Vorlagen für einen neuen Zyklus dienen.

Die Fluoreszenzmessung der neugebildeten DNA-Stränge wird durch spezielle Sonden (TaqMan[®]-Sonde) durchgeführt. Die TaqMan[®]-Sonde ist ein DNA-Sequenz und enthält zwei Farbstoffe; an einem Ende einen Reporter (R) und am anderen Ende einen Quencher (Q) (siehe Abbildung 19). Am Anfang des PCR-

Zyklus wird das Signal des Reporters durch den Quencher, und somit das Fluoreszenzsignal, gehemmt. Erst während der Polymerisierungsphase werden die Sonden durch die DNA-Polymerase abgebaut und somit Reporter und Quencher getrennt. Nun steigt das Fluoreszenzsignal des Reporters an und kann detektiert werden. Das Signal wird stärker, je mehr DNA Produkte gebildet werden (209; 210).

Gesamt-mRNA aus dem Hirngewebe wurde mithilfe der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Methode isoliert (211). 125ng der Gesamt-RNA wurden für die qrt-PCR-Analyse mit dem QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen) verwendet (212). Primer-Proben (von Biosystems, Foster City, CA) wurden verwendet, um die mRNA-Expressionsmuster von nNOS, VCAM-1 und FOXO-3 zu analysieren. Alle Proben wurden auf das TATA-box-Bindungsprotein als interne Kontrolle normalisiert. Die Expression des Zielgenes in jeder Probe wurde als Prozentsatz des Wildtyps generiert. Die RT-PCR Messungen wurden in Zusammenarbeit mit unserem technischen Personal (Frau Rosenberger) durchgeführt.

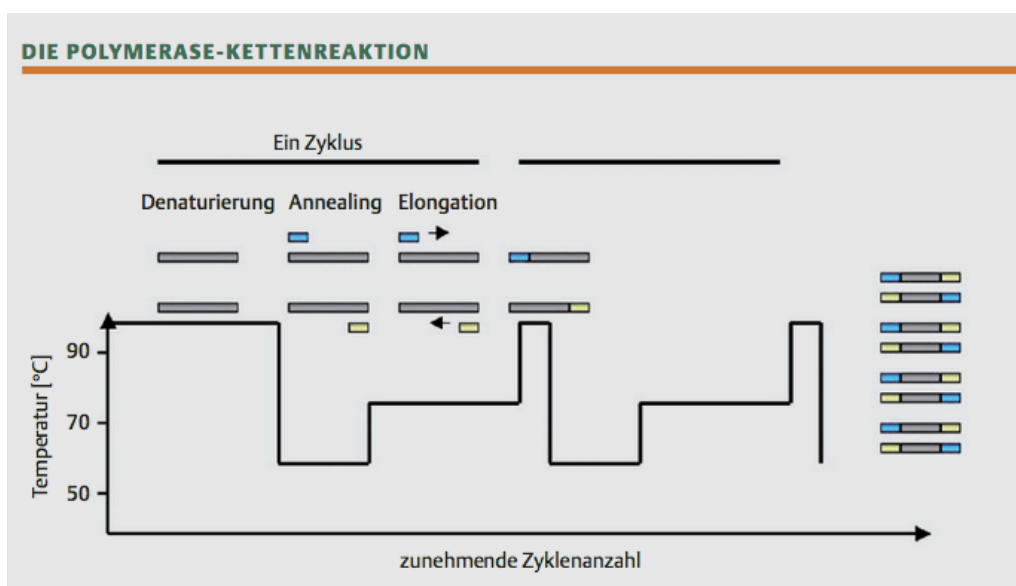


Abbildung 18: Die Polymerase-Kettenreaktion

Annealing: Primeranlagerung, Elongation: Verlängerung durch DNA-Polymerase

Abbildung aus (210)

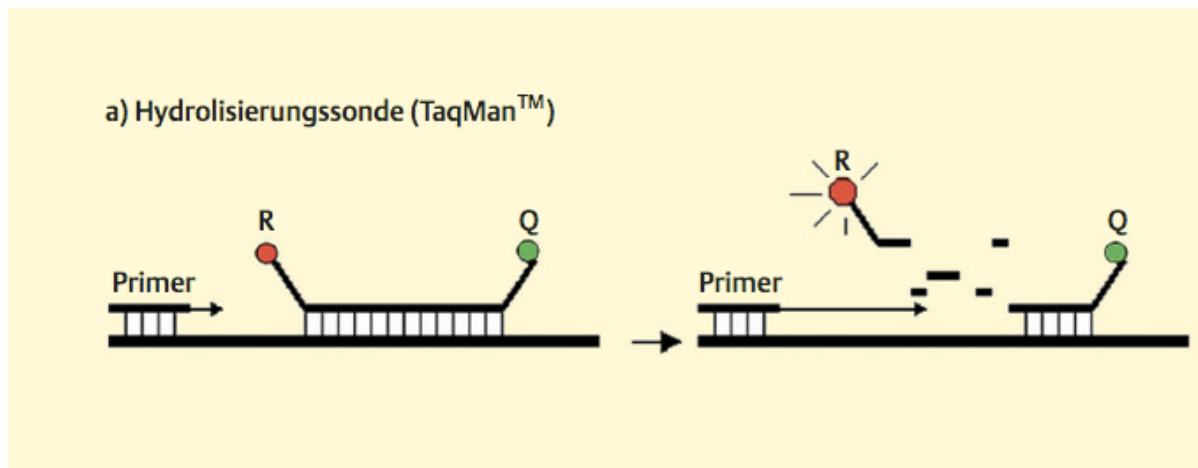


Abbildung 19: Fluoreszenzmessung bei qrt-PCR

R: Reporter, Q: Quencher

Abbildung aus (210)

3.2.10 Immunhistochemie

Durch die Immunhistochemie werden Gewebe mit an Antikörper-gekoppelten Farbstoffen bzw. durch Farbstoffreaktionen untersucht. Der Ablauf soll hier kurz beschrieben werden: Die entnommenen Aorten wurden zunächst zur Fixierung in Paraformaldehyd (4%) überführt und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica) wurden von den Aorten Schnitte in einer Dicke von ca. 5 µm abgetrennt, auf Objektträger überführt und anschließend entparaffiniert. Um die Antigenbindungsstellen zu demaskieren, erfolgte eine Behandlung der angefertigten Schnitte mit einem Dampfgerar bei pH 9. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper (3-Nitrotyrosin (3-NT) (1:200, Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) gefärbt (213). Die Färbungen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen ET-1 (10) und NOX-2 (214) durchgeführt. Anschließend wurden die sekundären Antikörper (anti-mouse: Vector Lab., Burlingame, CA; anti-rabbit: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) laut den Standardanweisungen des Herstellers eingesetzt. Für den immunhistochemischen Nachweis wurden die Reagenzien ABC (Vector Laboratories) und DAB (Peroxidase Substrat Kit, Vector)

als Substrate verwendet. Die Quantifizierung wurde mithilfe der Software Image ProPlus 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD) durchgeführt. Die IHC Messungen wurden in Zusammenarbeit mit unserem technischen Personal (Frau Karpi und Frau Glas) durchgeführt.

3.2.11 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM) angegeben. Für die Audiometrie wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test verwendet. Für DHE-Färbung, Blutdruckmessung, Western Blot und Dot Blot Analysen, Immunhistochemie und rt-PCR-mRNA-Messungen wurde eine OneWay-ANOVA Analyse mit Korrektur für multiple Zusammenhänge nach Tukey verwendet. Für die isometrischen Spannungsstudien und die Blutdruckmessungen im Zeitverlauf wurde eine TwoWay-ANOVA Analyse mit Tukey-Korrektur verwendet. Alle Auswertungen erfolgten in Prism für Windows, Version 9.01, GraphPad Software Inc. Das Testen auf gleiche Varianz und Normalverteilung wurde mit derselben Software durchgeführt. p-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Fluglärm erhöht den Blutdruck und die Erhöhung bleibt auch bei chronischer Beschallung erhalten

Während der gesamten Expositionsdauer wurden wöchentlich Blutdruckmessungen bei allen Tieren durchgeführt. Vor der Lärmbelastung betrug der mittlere systolische Blutdruck 124 mmHg. Die Messungen ergaben bei der zweiten Messung zu jedem Zeitpunkt eine deutliche Blutdruckerhöhung unter Lärmbelastung. Diese wurde bei allen lärmexponierten Gruppen beobachtet und war nach 28 Tage Lärmbelastung am höchsten. Die systolischen Drücke stiegen in der Lärmgruppe auf maximal 178 mmHg und im Mittel auf 153 mmHg, was auf eine massive, aber variable hypertensive Reaktion unter Lärmexposition hindeutet (Abbildung 20). Wichtig ist dabei zu erwähnen, dass die Therapie mit dem ACE-Hemmer Captopril den Lärmbedingten Blutdruckanstieg nach 4 Tagen Lärmexposition verhindern konnte (Abbildung 20D).

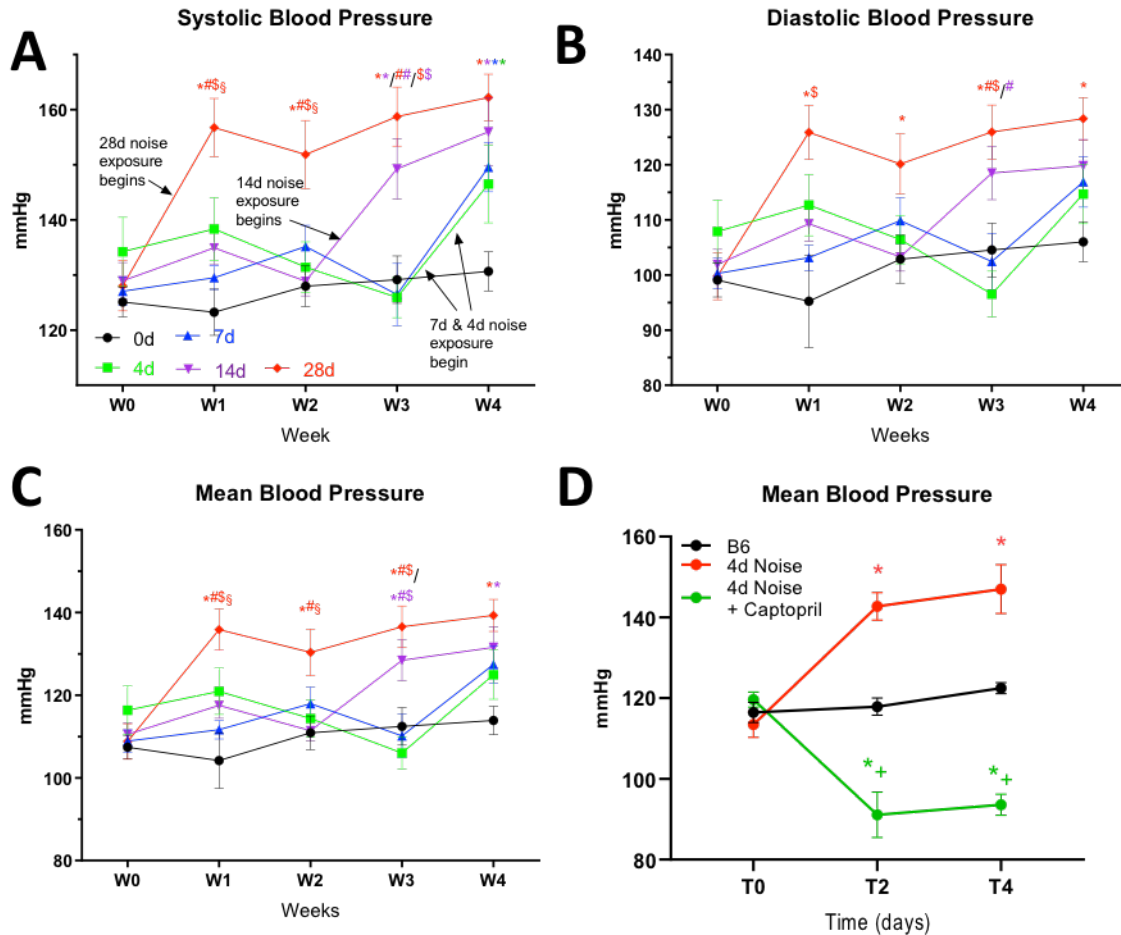


Abbildung 20: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf den Blutdruck

Der Blutdruck wurde über die gesamte Expositionsdauer wöchentlich (bzw. bei kurzzeitiger Beschallung nach 4 Tagen) gemessen. Erhöhte Werte waren in jeder Gruppe im Anschluss der initialen Lärmexposition sowohl bei systolischem, diastolischem und mittlerem Blutdruck deutlich erkennbar (A, B, C). (D) Die Therapie mit dem ACE-Hemmer Captopril verhinderte den Lärmbedingten Blutdruckanstieg nach 2 und 4 Tagen. Die Abbildung zeigt Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM. Statistische Analyse mit TwoWay-ANOVA mit Tukeys Korrektur für multiple Zusammenhänge. Punkte stellen den Mittelwert der Gruppe dar aus $n=6-9$ unabhängigen Messungen in verschiedenen Mäusen. (A-C) $P < 0,05$: * vs. 0d, # vs. 4d, \$ vs. 7d, § vs. 14d und + vs. 28d; (D) $P < 0,05$: * vs. 0d, + vs. Lärmgruppe.

4.2 Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf die Endothelfunktion und vaskulären oxidativen Stress

4.2.1 Untersuchung der Endothelfunktion mittels isometrischer Tonusstudien (Organbad)

Im Organbad wurde die Endothelfunktion an den schon isolierten 4mm langen Aortenringen untersucht. Die isometrischen Spannungsmessungen ergaben in allen Lärm-Gruppen eine deutliche Verminderung der endothelabhängigen Relaxation um ca. 15% (Abbildung 21A), während im Verlauf der Lärmexposition keine wesentliche Änderung der endothelunabhängigen Relaxation festgestellt werden konnte (Abbildung 21B).

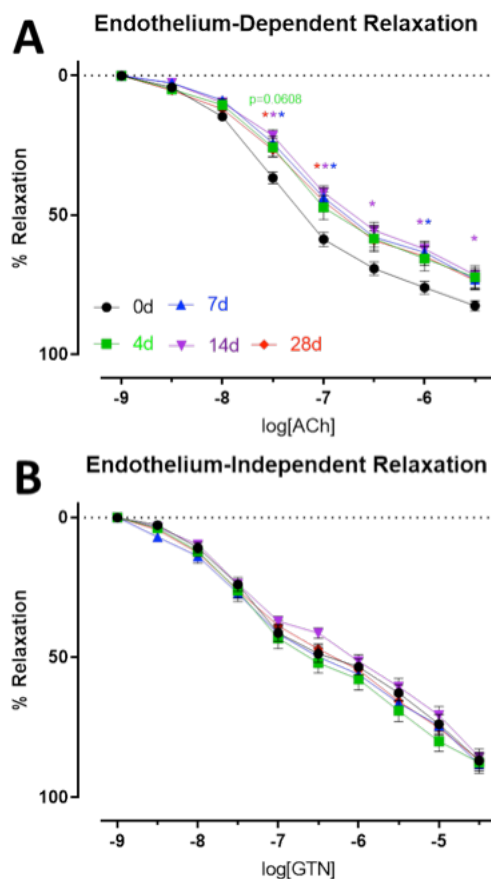


Abbildung 21: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die endotheliale und glattmuskuläre Funktion

Durch die Relaxation mit Acetylcholin lässt sich die endothelabhängige Vasodilatation testen, die bei allen zeitlichen Behandlungen mit Lärmbelastung verschlechtert war. Der Schweregrad dieser Verschlechterung schien bei allen Tiergruppen nach Lärmbelastung gleich zu sein (A). Die endothelunabhängige Relaxation wurde durch die isometrische Spannungsmessung und Relaxation

auf Nitroglycerin (GTN) untersucht. Diese blieb im Verlauf der Expositionsdauer bei allen Tiergruppen ohne deutliche Verschlechterung durch Lärm (B). Die Abbildung zeigt Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM. n=16-20. Statistische Analyse mit TwoWay-ANOVA mit Tukey-Korrektur. P < 0,05: * vs. 0d, # vs. 4d, \$ vs. 7d, § vs. 14d und + vs. 28d.

4.2.2 ROS-Detektion in Aorten-Kryoschnitten mittels DHE-Färbung

In der Aorta zeigte die Färbung mit DHE eine deutliche Erhöhung der ROS-Bildung zusammen mit zunehmender Dauer der Lärmbelastung, wobei der stärkste Anstieg der ROS-Bildung nach 28 Tagen Lärmbelastung beobachtet werden konnte (Abbildung 22).

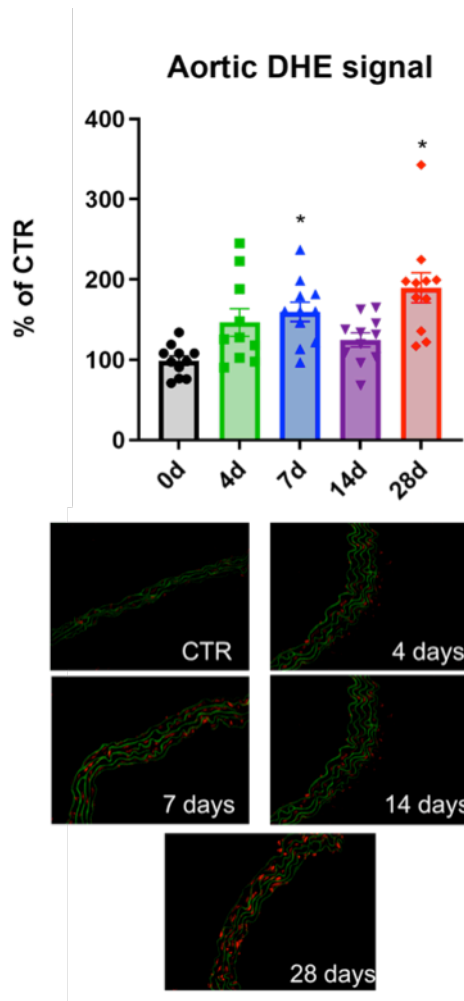


Abbildung 22: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die ROS-Bildung in der Aorta

Durch die Färbung mit DHE und mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte das ROS-Signal in den Kryoschnitten der Aorta detektiert werden. Das Diagramm zeigt die quantitative densitometrische Auswertung der ROS-Bildung in der Aorta. Darunter sind repräsentative DHE-Färbungen für alle Gruppen gezeigt. Die rote Fluoreszenz zeigt die ROS-Bildung und die grüne Fluoreszenz zeigt die Autofluoreszenz der Basallamina der Aorta. Dargestellt sind Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM von 2-4 Färbungen pro Tier pro Gruppe. Statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur. $P < 0,05$; * vs. 0d.

4.2.3 Immunhistochemie der Aorta

In der Aorta zeigte die Färbung mittels Immunhistochemie einen deutlichen Trend für eine erhöhte Expression des Peptidhormons Endothelin-1 (ET-1) (Abbildung 23), ein sehr potenter endogener Vasokonstriktor. Außerdem zeigte sich nach langfristiger Exposition gegenüber Fluglärm ein Trend für erhöhte Expression der oxidativen Stress Marker NOX-2 und 3-NT (Abbildung 23). Die NOX-2 ist eine wichtige Quelle für oxidativen Stress und 3-NT ein Marker für das Vorhandensein von Peroxynitrit.

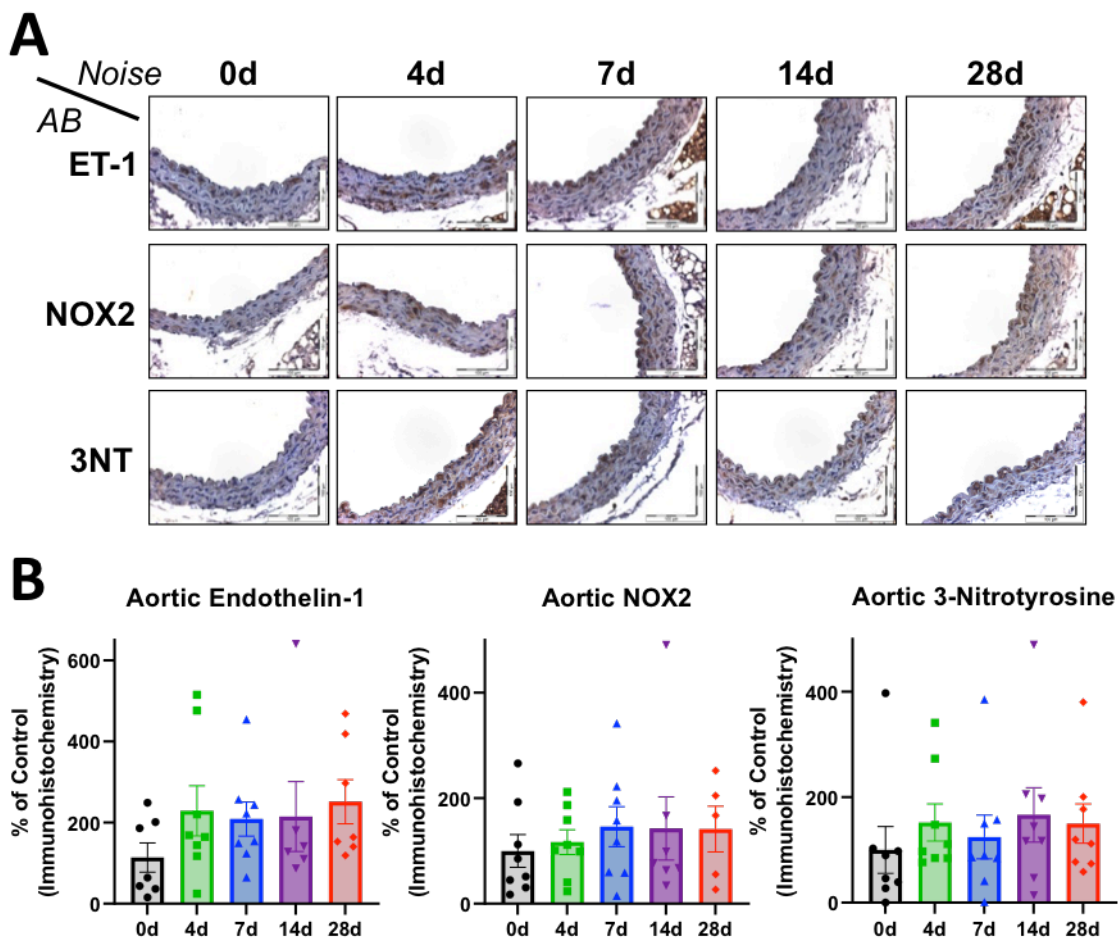
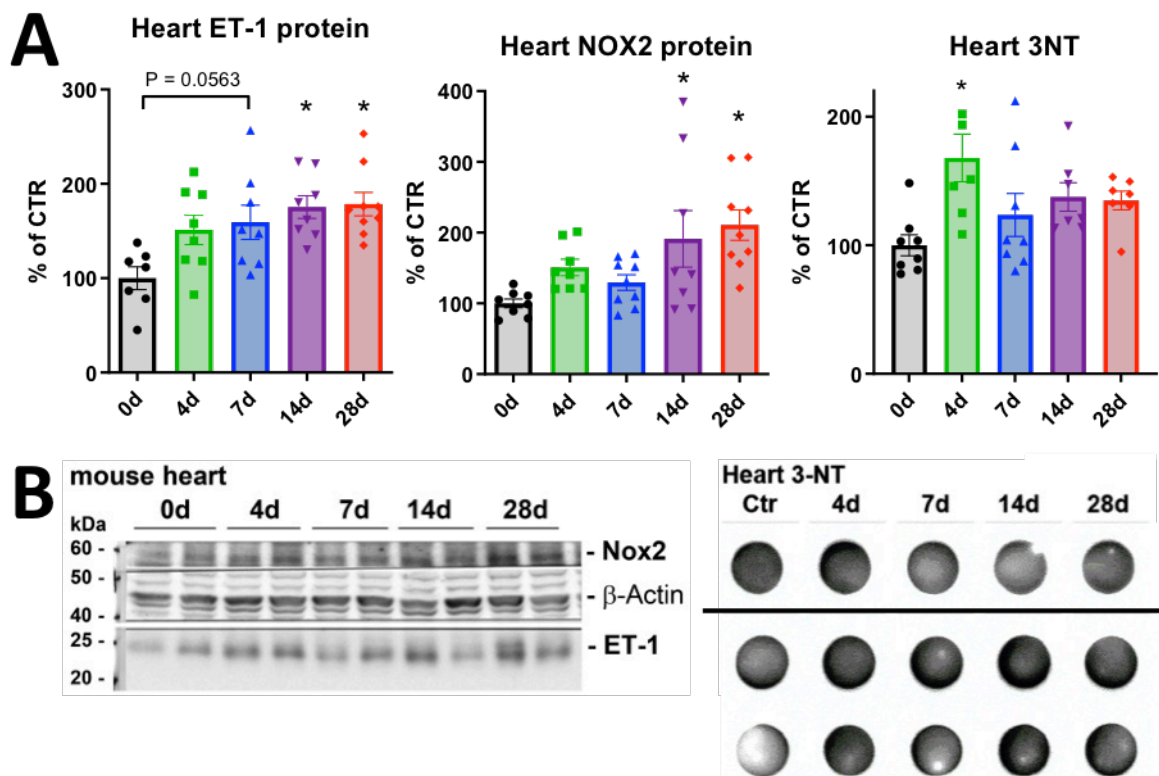


Abbildung 23: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die aortale Expression von Endothelin-1, NOX-2 und die Spiegel von 3-NT-positiven Proteinen mittels Immunhistochemie

(A): repräsentative immunhistochemische Färbungen der Aorta gegen Endothelin-1 (ET-1), NOX-2 und 3-NT (20-fache Vergrößerung). (B): densitometrische Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Aorta für ET-1, NOX-2 und 3-NT. Dargestellt sind Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM für $n=5-8$ Mäuse. Die statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.3 Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf den kardialen oxidativen Stress

Kardiale Proteinexpressionen wurden durch Western Blot und Dot Blot Analyse erfasst und zeigten nach einer langfristigen Exposition gegenüber Fluglärm einen deutlichen Anstieg des Vasokonstriktors Endothelin-1 sowie der Marker für oxidativen Stress (NOX-2 und 3-NT) im Herzgewebe (Abbildung 24 A,B). Außerdem ergab die Untersuchung der Lipidperoxidation mittels Dot Blot Analyse eine allmähliche Steigerung der MDA-positiven Proteine im Herzgewebe mit zunehmender Dauer der Lärmbelastung, was den anhaltenden Schaden des Lärms bestätigt (Abbildung 24C,D).



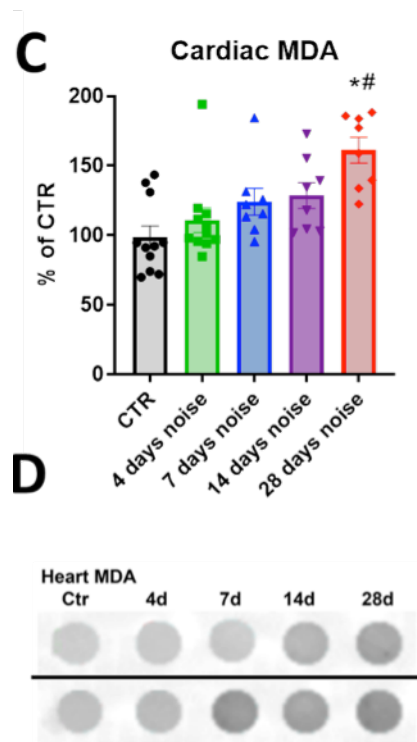


Abbildung 24: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf die kardiale Proteinexpression für ET-1 und NOX-2 sowie die Spiegel von 3-NT und MDA

(A): Proteinexpression der kardialen ET-1 und NOX-2 mittels Western Blot sowie Spiegel der kardialen 3-NT-positiven Proteine mittels Dot Blot. (B): repräsentative Aufnahmen der Original Blots, die für die densitometrische Quantifizierung verwendet wurden. (C): Die Lipidperoxidation wurde anhand der MDA-positiven Proteine im Herzen untersucht und zeigte einen deutlichen Anstieg mit zunehmender Dauer der Lärmbelastung. (D): repräsentative Dot Blot-Bilder für kardiale MDA-positive Proteine für alle Gruppen. Ergebnisse aus gemischten Herzproben, die 2-3 Tiere pro Probe (Datenpunkt) darstellen. Statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur. $P < 0,05$: * vs. 0d, # vs. 4d.

4.4 Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf den zerebralen oxidativen Stress und den neuroinflammatorischen Phänotyp

Lärm verursachte einen ziemlich linearen Anstieg der zerebralen ROS-Bildung im Verlauf der 28-tägigen Lärmexposition (siehe Diskussion, Abbildung 30). Die Genexpression der nNOS wurde durch Lärm bis zum Tag 7 und 14 herunterreguliert, jedoch normalisierte sich die Expression teilweise nach 28 Tagen der Lärmbelastung (Abbildung 25A). Im Gegensatz dazu zeigte die Genexpression von FOXO-3 eine zunehmende Verminderung im Laufe der Expositionsdauer (Abbildung 25B), wobei dies für die Zelle einen geringeren antioxidativen Schutz und Störung anderer wichtiger Signalwege bedeutet, da der Transkriptionsfaktor FOXO-3 eine Vielzahl protektiver biochemischer Signalwege reguliert. Die mRNA-Expression von VCAM-1 war ab Tag 4 der Lärmexposition erhöht und blieb in allen Lärm-Gruppen über die gesamte Expositionsdauer gesteigert (Abbildung 25C), wobei dies einen pro-inflammatorischen Phänotyp der Zelle reflektiert, da das Protein VCAM-1 die Adhäsion von Leukozyten fördert und die Entstehung sowie Progression der Atherosklerose begünstigt.

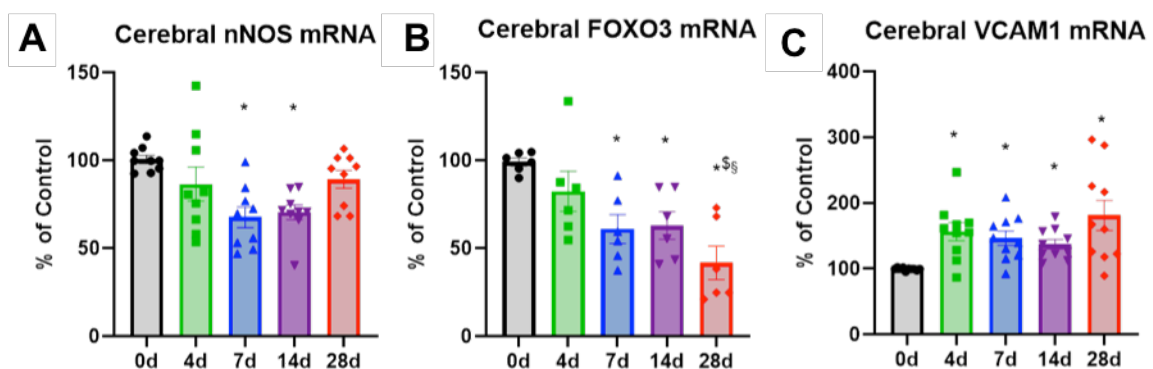


Abbildung 25: Auswirkung von kurz- und langfristigem Fluglärm auf das Gehirn

(A): Die mRNA-Expression der nNOS zeigte unter Lärm verminderte Spiegel im Vergleich zur Kontroll-Gruppe. (B): Die Genexpression von FOXO-3 bewies eine deutliche Verminderung des antioxidativen Transkriptionsfaktors durch Lärm. (C): VCAM-1 war in allen Lärm-Gruppen erhöht. Ergebnisse für (A, B, C) aus gemischten Gewebeprobe, die 2-3 Tiere pro Probe (Datenpunkt) darstellen. Statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur. $P < 0,05$: * vs. 0d, \$ vs. 7d, § vs. 14d und + vs. 28d.

4.5 Auswirkung von langfristigem Fluglärm auf die Hörschwelle

Um festzustellen, ob das Gehör der Mäuse durch die Lärmbelastung beeinträchtigt wurde, führten wir in Zusammenarbeit mit Kollegen aus der HNO Klinik Klick-abhängige ABR-Tests (auditory brainstem response) durch. Der ABR-Test misst die Aktivität im Gehirn beim Hören einer akustischen Stimulation bei verschiedenen Schalldruckpegeln (Abbildung 26A). Der Test wurde sowohl vor als auch nach der Lärmexposition durchgeführt, um zu untersuchen, ob Lärm eine Erhöhung der Schwelle der evozierten Reaktion, sprich einen partiellen Hörverlust verursachen würde. Die Werte der Basisschwelle waren in allen nicht beschallten Gruppen nahezu konsistent und lagen bei 43,5 dB bei 0d, 42,6 dB bei 4d, 40,7 dB bei 7d, 43,9 dB bei 14d und 44,6 dB bei 28d (Abbildung 26B). In den lärmexponierten Gruppen gab es eine Verschiebung der Hörschwelle von etwa 5 dB, die bereits nach 4 Tagen Lärmexposition sichtbar wurde. Diese Verschiebung verschlechterte sich während der immer längeren Lärmbelastung nicht maßgeblich, sondern die absolute Beeinträchtigung des Hörvermögens nahm im Verlauf der Lärmbelastung eher ab (Abbildung 26B). Die Schwellenänderungen betragen 5,2 dB, 4,8 dB, 4,9 dB und 3,8 dB, was möglicherweise auf eine Erholung dieser minimalen Hörschwelle während des Expositionsverlaufs hindeutet. Obwohl in allen Lärm-Gruppen eine signifikante Verschlechterung der minimalen Hörschwelle beobachtet wurde (auf ca. 50 dB), sind die absoluten Änderungen so klein, dass sie in unserem Versuchsaufbau nicht zum Tragen kommen, da wir mittlere Schalldruckpegel von 72 dB verwendet haben, sprich weit über dieser minimalen Hörschwelle.

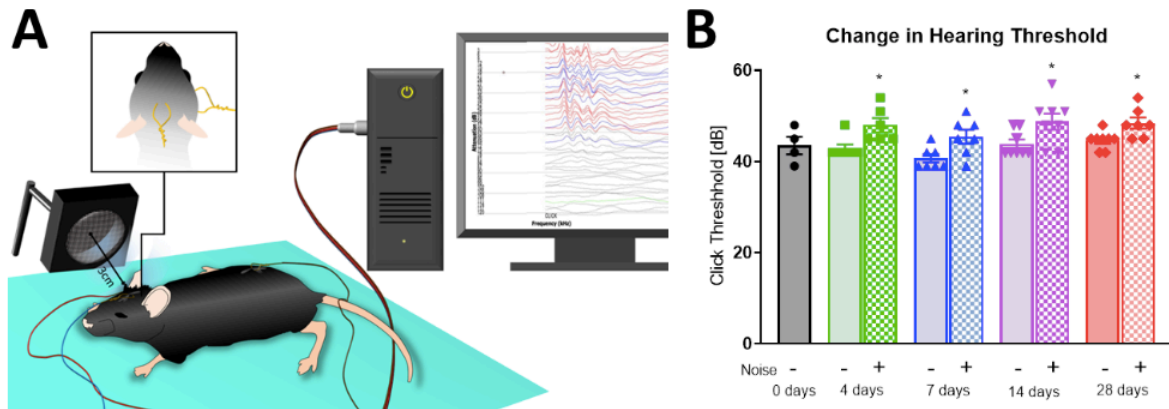


Abbildung 26: Lärm-induzierte Veränderungen der Hörschwelle

Mithilfe der ABR-Methode konnten die durch akuten bzw. chronischen Lärm-induzierten Hörschäden im Verlauf der Lärmbelastung bewertet werden. Die ABR-Methode misst die Hirnstammreaktion auf einen Hörreiz bei einem sedierten Tier (A). Die Basishörschwellen waren in allen nicht exponierten Gruppen nahezu konsistent, mit einem signifikanten Anstieg unter Lärm, der bereits nach 4 Tagen Lärmbelastung auftrat und im Verlauf einer längeren Lärmexposition im Schweregrad eher nachzulassen schien (B). Die Abbildung zeigt Ergebnisse als Mittelwerte \pm SEM. Statistische Analyse mittels gepaartem zweiseitigem t-Test zwischen unbeschallten und beschallten Mäusen für die jeweilige Beschallungsdauer. Punkte sind Messungen von jedem einzelnen Tier, $n=4-8$. $P < 0,05$; * vs. jeweils nicht mit Lärm behandelnde Gruppe zum gleichen Zeitpunkt. Diese Daten wurden in Zusammenarbeit mit den Kollegen aus der HNO Klinik erhoben (Dr. Ernst, Dr. Eckrich, Prof. Strieth).

5 Diskussion

Mit unserer vorliegenden Studie haben wir die Exposition mit Fluglärm über einen langfristigen Zeitraum von 4, 7, 14 und 28 Tage untersucht. Die Studie wurde durchgeführt, um herauszufinden, ob die schon bekannten gesundheitlichen Schäden durch Fluglärm nach 4 Tagen unter chronischer Lärmbelastung bestehen bleiben oder ob sich eine Anpassung oder Toleranz gegenüber den Lärm-induzierten Schäden entwickeln würde. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie, die die Auswirkungen von langfristiger Lärmbelastung auf das Gehirn und das Herz-Kreislauf-System in einem Mausmodell untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen deutlich, dass die langfristige Belastung mit Fluglärm manifeste arterielle Hypertonie, endotheliale Dysfunktion, vaskulärer oxidativer Stress, Inflammation und verschiedene zerebrale Nebenwirkungen wie Erhöhung der ROS-Bildung und verminderte Expression der nNOS und von FOXO-3 verursacht (Abbildung 27). Es gab einen akuten Effekt auf den Blutdruck innerhalb der ersten 4 Tage der Lärmexposition und einen weiteren Anstieg des Blutdruckes von mehr als 20 mmHg während der weitem 28 Tage der Lärmbelastung. Der Anstieg des Blutdruckes war mit einer systemischen endothelialen Dysfunktion, einer progressiven Abnahme der systemischen NO-Bioverfügbarkeit und einer Zunahme der vaskulären ROS-Bildung verbunden.

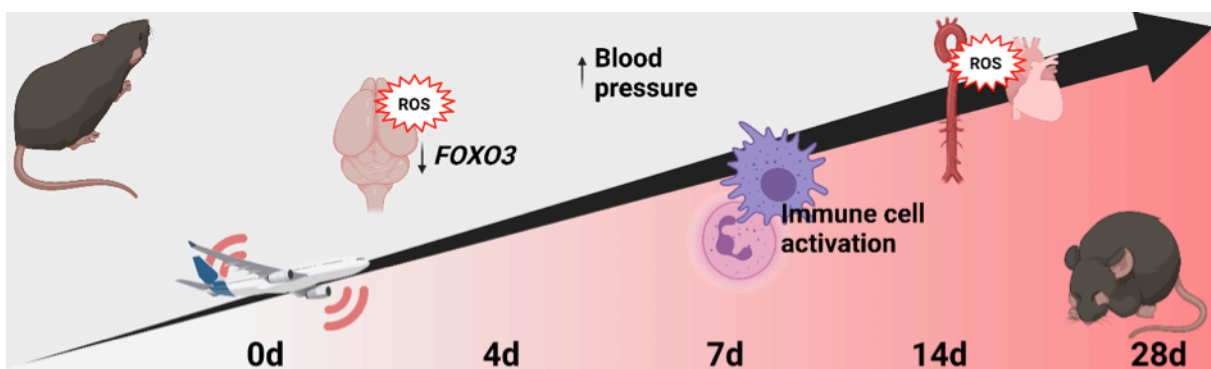


Abbildung 27: graphische Darstellung des Zeitverlaufs der Lärm-induzierten Schäden

Abbildung übernommen aus (215)

5.1 Folgen der akuten und chronischen Lärmbelastung auf Endothelfunktion, Blutdruck und oxidativen Stress

Im gesunden Endothel der Blutgefäße wird Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin durch das Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet. NO spielt eine wichtige Rolle bei der Hämostase, der Hemmung der Thrombozytenaggregation und besitzt positive antiinflammatorische Eigenschaften (123; 216). Wenn sich im Endothel nicht genug Stickstoffmonoxid (NO) befindet, verliert das Endothel seine wichtige Vasodilatationsfunktion. Die gestörte Vasodilatation des Endothels wird auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet, was als frühes Korrelat bzw. ein früher Risikomarker für viele Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems betrachtet wird. Endotheldysfunktion steht im engen Zusammenhang mit vielen Risikofaktoren für die Entstehung der Herz-Gefäß-Erkrankungen wie Atherosklerose, arterielle Hypertonie und Hyperlipidämie (179; 217). In unserer aktuellen Studie wurde die endothelabhängige Relaxation der Aorta im Organbad durch Acetylcholin (ACh) induziert, die nach 4 Tagen Lärmbelastung in allen Lärmgruppen signifikant beeinträchtigt war, aber sich im Verlauf der 28 Tage Expositionszeit nicht weiter verschlechterte. Diese pathologische Veränderung der Endothel-abhängigen Relaxation steht im engen Zusammenhang mit oxidativem Stress, wo vermehrt Superoxid-Radikale produziert wird. Diese Radikale sind in der Lage mit Stickstoffmonoxid sehr schnell zu reagieren und damit zu inaktivieren. Dadurch verliert das Endothel seine wichtige Vasodilatationseigenschaft, was dann zu einer Endotheldysfunktion führt (218).

Durch die Reaktion zwischen Superoxidanionen und NO wird ein zusätzliches Oxidanz und zwar Peroxynitrit gebildet. Peroxynitrit ist in der Lage sowohl antioxidative Faktoren zu inaktivieren als auch zusätzliche Superoxidradikale zu generieren, indem es die eNOS entkoppelt und andere ROS Quellen aktiviert. Unter oxidativem Stress und durch die Oxidation des Cofaktors BH₄ oder des Zink-Thiolat-Clusters wird das Enzym eNOS entkoppelt, was dann zur Verminderung der NO-Produktion führt. Außerdem, durch diese Oxidationsreaktion werden die Elektronen nicht mehr auf NADPH sondern auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei es zu einer vermehrten Superoxid-Bildung kommt. Also durch oxidativen Stress wird durch Entkoppelung der eNOS weniger NO produziert sowie vermehrt Superoxidradikale gebildet und gleichzeitig wird NO durch die Reaktion mit Superoxid inaktiviert (219-

221). Die eNOS kann auch durch eine S-Glutathionylierung in der Reduktase-Domäne entkoppelt werden oder durch Phosphorylierung bzw. ADMA inaktiviert werden – alles redoxregulierte Prozesse, die unter oxidativem Stress vermehrt ablaufen (30; 222).

Unser aktuelles Konzept zu den Fluglärm-induzierten kardiovaskulären Nebenwirkungen beinhaltet, dass die endotheliale Dysfunktion, die bereits nach einer Nacht Belastung mit Fluglärm festgestellt werden konnte, maßgeblich durch eine Ausschüttung von Stresshormonen und Vasokonstriktoren wie Noradrenalin, Adrenalin und Corticosteron und durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und der Endothelin-1 Signaltransduktion ausgelöst wird (9; 10). Die zentrale Rolle des RAAS bei den lärminduzierten kardiovaskulären Schäden wurde durch unsere Studie bestätigt, indem wir zeigten, dass der ACE-Hemmer Captopril den lärminduzierten Blutdruckanstieg verhindern konnte. Auch in Patienten bzw. gesunden Probanden bewirkte Lärm für eine Nacht bereits eine Verschlechterung der Endothelfunktion, die vor allem durch Schlafstörung und Stressreaktionen hervorgerufen wurde (18; 180). Endotheldysfunktion beeinflusst außerdem die Prognose von Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie koronare Herzerkrankung oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (187; 223).

Durch unsere vorliegenden Ergebnisse konnten wir neben dem anhaltenden Anstieg der Blutdruck-Werte in allen Lärmgruppen auch eine zunehmende ROS-Bildung in der Aorta und im Herzgewebe während der gesamten Expositionsdauer feststellen (Abbildung 28C,D), die sich zumindest als Trend auch in der Aktivität der phagozytären NADPH Oxidase (NOX-2) in Leukozyten in Vollblut anhand eines tendenziell gesteigerten oxidativen Bursts widerspiegelte (Abbildung 28A,B). Der vaskuläre und zerebrale oxidative Stress wird hauptsächlich durch die phagozytäre NADPH-Oxidase und durch die Entkoppelung von eNOS und nNOS induziert, was die Bildung des Endothelin-1 stimuliert - dadurch wird nicht nur die vaskuläre und zerebrale NO-Bioverfügbarkeit reduziert sondern gleichzeitig werden Mikrogefäße und große Leitungsgefäße kontrahiert, was zum Bluthochdruck führt (9). Chronischer Stress induziert die Freisetzung von verschiedenen Stresshormonen, die auf lange Dauer für den anhaltenden Anstieg des oxidativen Stresses durch die Aktivierung von NOX-2 verantwortlich sein können.

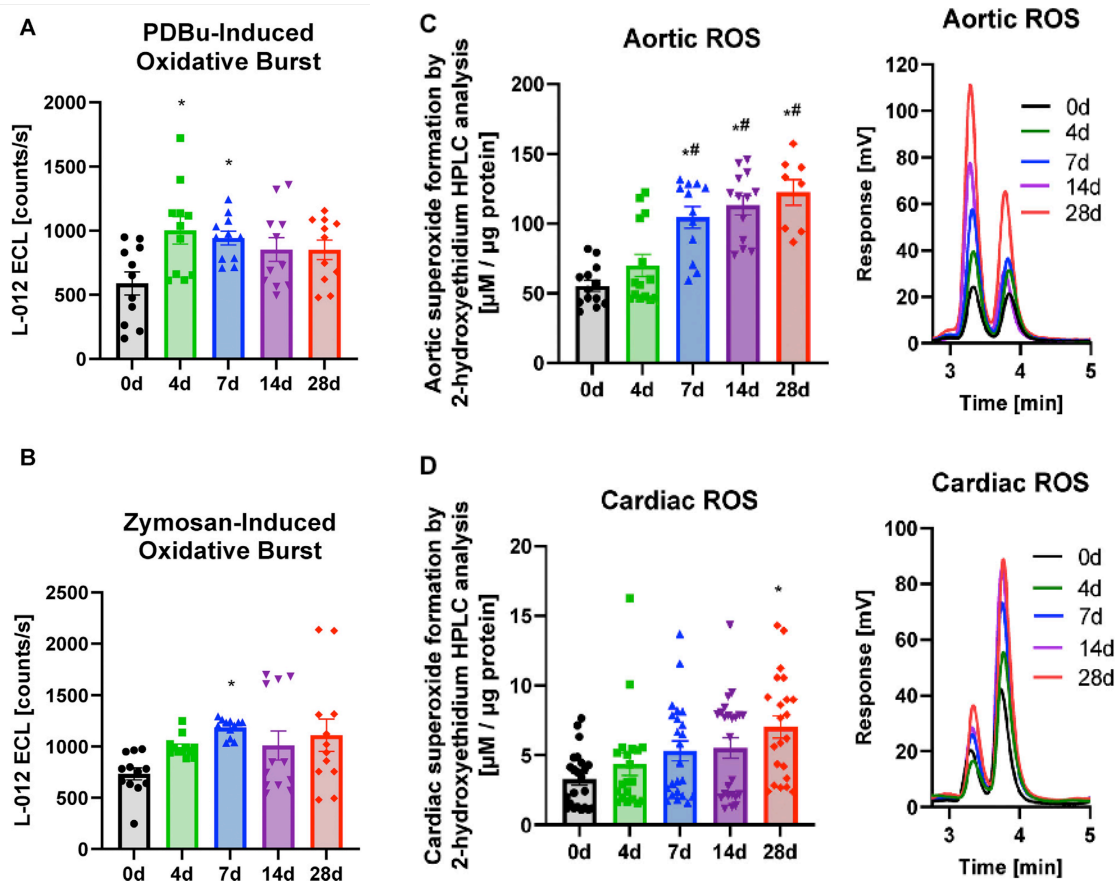


Abbildung 28: Auswirkung der kurz- und langfristigen Fluglärmbelastung auf den oxidativen Burst im Vollblut sowie die vaskuläre und kardiale ROS-Bildung

Die Stimulierung oxidativen Burst im Vollblut mit dem Phorbol ester (PDBu) (A) oder mit dem Pilzpyrogen (Zymosan A) (B) weist darauf hin, dass die Lärmbelastung eine verstärkte ROS-Bildung durch die NOX-2 in den Leukozyten induziert. Die Superoxidwerte (gemessen mit einer HPLC-basierten Dihydroethidium Methode) zeigten einen zunehmenden Anstieg über die gesamte Expositionsdauer sowohl in der Aorta (C) als auch im Herzen (D). Rechts neben den Quantifizierungen (C, D) sind die repräsentativen Chromatogramme für die HPLC-Messungen zu sehen. Ergebnisse für (A, B) sind Mittelwerte \pm SEM von 8 Wiederholungen vom gemischten Vollblut von 2-3 Mäusen und der angegebenen Anzahl (Datenpunkte) unabhängiger Proben pro Gruppe. Ergebnisse für (C, D) repräsentieren einzelne Tiere, $n=12-14$ (C), $n=22-24$ (D). Statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur. $P < 0,05$; * vs. 0d, # vs. 4d. Übernommen aus (215).

Das Fehlen einer weiteren Verschlechterung der Endothelfunktion im Verlauf der Expositionsdauer kann darauf hindeuten, dass es einen Mechanismus gibt, der verhindert, dass der nachgewiesene anhaltende Anstieg des oxidativen Stresses im Gefäßsystem in eine weitere Verschlechterung der endothelialen Funktion umgewandelt wird. Wir haben in einer vorherigen Studie bewiesen, dass der

Transkriptionsfaktor Nrf2 ein wichtiges Abwehrsystem zur Verhinderung der Lärm-induzierten kardiovaskulären Nebenwirkungen darstellt (9; 224). Durch dieselbe Studie konnten wir zeigen, dass durch die Lärmbelastung das durch Nrf2-induzierte Schutzenzym (Hämoxygenase-1) hochreguliert wird (224). Es ist wahrscheinlich, dass ein zusätzlicher antioxidativer Mechanismus existiert, der eine akkumulierende Verschlechterung durch einen Stressfaktor wie Lärm verhindert. Wie in unserer vorliegenden Studie gezeigt, war das Plasmanitrit am 14ten Tag nach der Lärmbelastung niedriger, wohingegen die NOX-2 in der Aorta und die kardialen 3-NT Spiegel am 14ten Tag nach der Lärmbelastung höher waren, was ein Zeichen dafür sein kann, dass dieser antioxidative Mechanismus (der Nrf2- bzw. HO-1-vermittelte Schutz) ab diesem Zeitpunkt effektiv wird. Da Nrf2 dafür bekannt ist, die Entzündungsreaktionen von Makrophagen hemmen zu können (225), kann es wahrscheinlich sein, dass die Nrf2-vermittelte Transkription innerhalb dieses Zeitraumes protektiv ist. Dieser protektive Mechanismus durch Nrf2 wurde auch in anderen Studien unserer Gruppe als entscheidend für das Ausmaß der Lärm-induzierten Schäden nachgewiesen (214). Dies würde auch mit den hier gezeigten reduzierten oxidativen Burst-Aktivitäten im Vollblut übereinstimmen, die gezeigt haben, dass die Lärm-induzierte Aktivierung von Entzündungszellen zwischen 7 und 14 Tage nach der Lärmexposition eine Art Maximum zeigte und danach eher geringer wurde. Das gleiche präsentiert sich auch in der maximalen NOX-2-Konzentration in der Aorta am Tag 7 der Lärmexposition, was höchstwahrscheinlich auf die infiltrierte Immunzellen zurück zu führen ist und sich auch in den abnehmenden Spiegeln der kardialen 3-NT-positiven Proteine ab Tag 7 der Lärmexposition wiederfindet.

Es bleibt aber die Frage zu beantworten, warum die ROS-Bildung in verschiedenen Organen weiter ansteigt, obwohl die Aktivierung von Immunzellen wahrscheinlich durch endogene antioxidative und entzündungshemmende Abwehrmechanismen wie Nrf2/HO-1 verhindert wird. Daher könnte man davon ausgehen, dass die initiale NOX-2-induzierte ROS-Bildung sekundäre ROS-Quellen wie Mitochondrien und Xanthin-oxidase über einen schon beschriebenen Redox-Cross-Talk aktiviert (30; 82; 92). Während wir Hinweise auf eine Stimulierung der Mitochondrien-induzierten ROS-Bildung ab dem 4. Tag der Lärmbelastung haben (9), kann die Rolle der Xanthinoxidase-induzierten ROS-Bildung aus der günstigen Wirkung des

Xanthinoxidase-Inhibitors Allopurinol auf Cochlea-Schaden und Hörverlust nach Lärmbelastung angenommen werden (226; 227).

Die vorliegende Studie hat gezeigt, dass die kardiovaskulären und zerebralen Nebenwirkungen nach einer Belastung mit langfristigem Fluglärm zeitabhängig auftreten und dass die lärminduzierten biochemischen Veränderungen einer komplexen Kinetik folgen. In einer Studie konnte man bei der Überwachung der Immunfunktion nach 1, 7, 21 Tage Lärmexposition eine zeitabhängige Modulation der Immunsuppression und Immunaktivierung im Rattenmodell feststellen (228). Die periphere Aktivität der Phagozyten war nach 1 Tag Lärmexposition vermindert, während der IgM-Spiegel im Blut erhöht war. Die Proliferation von Lymphozyten in der Milz war nach 7 Tagen Lärm unterdrückt und nach 21 Tagen erhöht, während die Aktivierung der Killerzellen nach 1 und 7 Tagen Lärm erhöht war aber nach 21 Tagen geringer wurde (228).

5.2 Akute und chronische Lärmexposition und das Gehirn

Die vorliegenden Ergebnisse ergänzen die schon bekannten Beweise, dass die Belastung mit Verkehrslärm für die Gehirnfunktion von wichtiger Bedeutung ist und das Risiko für die neurodegenerativen Erkrankungen wie kognitive Störung oder Demenz erhöhen kann (229-231). Es wurde schon gezeigt, dass die kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen stark mit einem erhöhten Risiko für eine kognitive Störung oder Demenzerkrankung zusammenhängen (und auch vice versa) (232; 233), was darauf hindeutet, dass die Lärmbelastung indirekt durch die Modulation der vaskulären Neuropathologie zu diesen Erkrankungen führen kann, ist die Rolle der Lärmbelastung als direkter Einflussfaktor nicht ausreichend untersucht worden (231). Osborne et al. Konnten vor kurzem nachweisen, dass die Lärmbelastung mit dem Risiko für die kardiovaskulären Erkrankungen über einen Mechanismus assoziiert ist, der mit einer erhöhten Stress-bedingten Amygdala-Aktivität beginnt und anschließend eine erhöhte vaskuläre Entzündung induziert (siehe Abbildung 29) (234). Dieser neurobiologische Mechanismus, der Lärm mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung bringt, könnte gezielt durch

Medikamente unterdrückt werden, um das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen im Zusammenhang mit Lärmbelastung zu reduzieren.

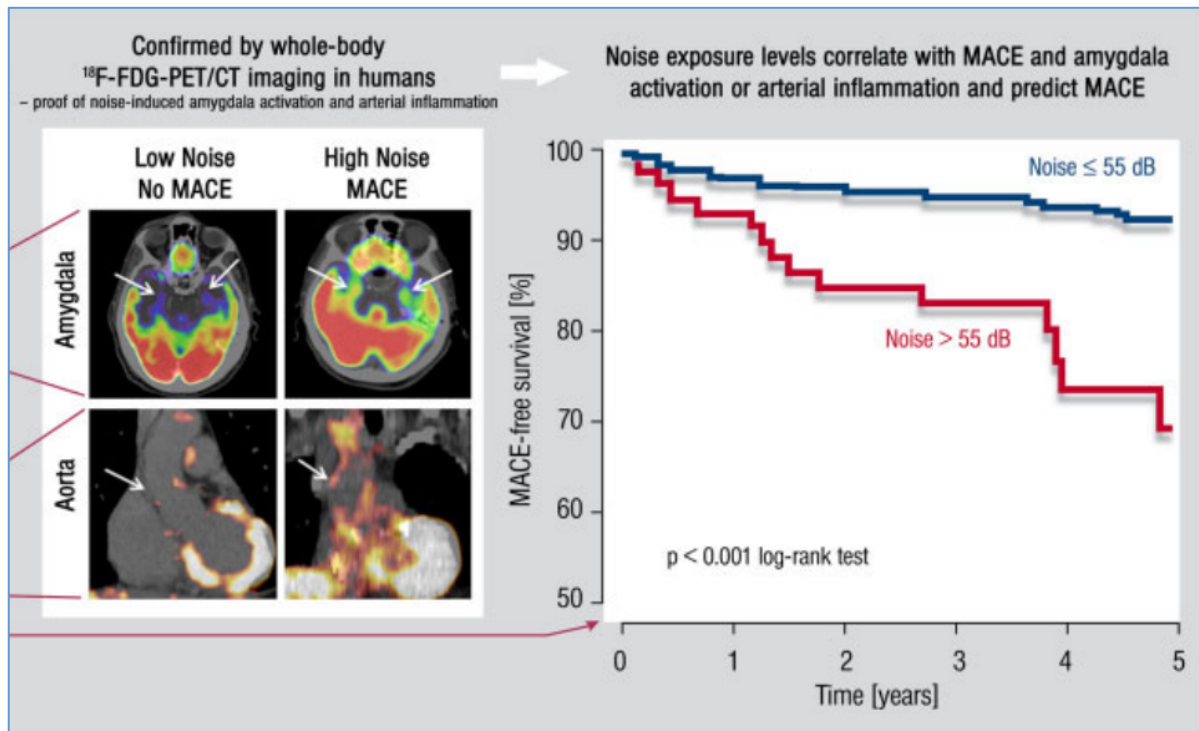


Abbildung 29: Der Zusammenhang zwischen Lärm, Amygdala-Aktivierung, koronarer Atherosklerose und dem Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse

Die Lärm-induzierte neuronale Aktivierung (Amygdala) und nachgeschaltete koronare Entzündung wurde mittels ¹⁸F-Fluordeoxyglukose (¹⁸F-FDG) PET/CT Scan nachgewiesen. Beide Lärm-induzierten Veränderungen korrelierten mit einer gesteigerten Inzidenz von schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen (MACE=major adverse cardiovascular events). Abbildung aus (234)

Eine Reihe von schon veröffentlichten Tierstudien, einschließlich unserer eigenen früheren Studien zeigten, dass die Fluglärmelastung mit einem erhöhten zerebralen oxidativen Stress verbunden ist (9), was einen wichtigen molekularen Weg darstellt. Über diesen Weg können Umweltrisikofaktoren wie Luftverschmutzung (235) und Lärmbelastung (236) zu funktionellen und strukturellen Schäden des Gehirns führen. Unerwünschte Redoxsignale von und durch die Immunzellen des Gehirns (Mikroglia), die mit Mikroglia-Dysregulation verbunden sind, spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener neurologischer Krankheitsphänotypen, die zu neuronalen Schäden und Amyloidablagerungen führen können (237; 238). Diese Redoxsignale können außerdem durch die NOX-2-Aktivierung und Entkopplung der nNOS zu einer

verminderten zerebralen NO-Bioverfügbarkeit führen, was eine zerebrale endotheliale Dysfunktion verursacht (239). In vielen Tierstudien wurde darauf hingedeutet, dass die langfristige Lärmexposition mit höheren Schalldruckpegeln mit einer anhaltenden Tau-Pathologie und einer beschleunigten Überproduktion von Beta-Amyloid assoziiert ist. Dies ist mit Veränderungen im Hippocampus und Kortex verbunden (237; 238; 240-242).

Epidemiologische Daten aus der deutschen Heinz Nixdorf Studie deuten darauf hin, dass die Belastung mit Verkehrslärm mit einem niedrigeren globalen kognitiven Score und einer leichten kognitiven Beeinträchtigung assoziiert sein kann (243). Diese Lärmbedingte kognitiven Nebenwirkungen waren bei sowohl ehemaligen als auch aktuellen Rauchern stärker ausgeprägt, was darauf hindeutet, dass Lifestyle-Risikofaktoren wie Rauchen die negativen Auswirkungen des Verkehrslärms auf das Gehirn verstärken können (244). Es wurde auch nachgewiesen, dass der Verkehrslärm mit einer beeinträchtigten kognitiven Funktion im Zusammenhang steht, die auch nach Korrektur für Luftverschmutzung erhalten blieb (245). Viele Studien haben Nachweise erbracht, dass Verkehrslärm das Risiko für Demenz und kognitive Defizite erhöhen kann (230). Zuletzt untersuchte eine Studie aus Dänemark, an der fast 2 Millionen Menschen im Alter bis zu 60 Jahren teilgenommen haben, den Zusammenhang zwischen langfristiger Exposition gegenüber Straßenverkehr- und Eisenbahnlärm und dem Risiko für die Entstehung einer Demenzerkrankung (246). Diese Studie zeigte, dass sowohl Straßenverkehrslärm als auch Eisenbahnlärm das Risiko für eine Demenzerkrankung erhöht. Außerdem zeigte die Studie, dass der Straßenverkehrslärm mit einem erhöhten Risiko für vaskuläre Demenz verbunden ist (246).

Die Lärminduzierte Störung der kognitiven Funktion und des Gedächtnisses wird auch durch die vorliegenden Ergebnisse gut unterstützt, die eine durch Lärm verminderte Expression der nNOS zeigten und damit den Verlust des wichtigen Neurotransmitters Stickstoffmonoxid, der für das Langzeitgedächtnis und die kognitive Funktion von großer Bedeutung ist (247). Wichtig zu wissen ist, dass an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung mehrere pathophysiologischen Mechanismen beteiligt sind, wobei auch oxidativer Stress eine wichtige Rolle im pathophysiologischen Prozess zu spielen scheint (229).

Durch eine erhöhte zerebrale ROS-Bildung und eine verminderte Konzentration des antioxidativen Transkriptionsfaktors (FOXO-3) konnten wir in unserer aktuellen Studie nachweisen, dass oxidativer Stress eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung der lärminduzierten neuronalen Komplikationen spielt. Obwohl es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich dem Zusammenhang zwischen der Belastung mit Verkehrslärm und dem Risiko für die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen vorliegen, gibt es aber einen klaren Pathomechanismus, der durch unsere Ergebnisse bestätigt werden konnte: die Lärmbelastung bewirkte einen langanhaltenden Anstieg der zerebralen ROS-Bildung (siehe Abbildung 30) und eine verminderte Genexpression des antioxidativen Transkriptionsfaktors (FOXO-3) über die gesamte Dauer der Lärmexposition. Dies kann wiederum die Störung des zirkadianen Rhythmus bewirken (wo FOXO-3 und Redoxregulation wichtige Rollen spielen) (248), was möglicherweise mitverantwortlich für die hier beobachteten erhöhten Blutdruck-Werte sein kann.

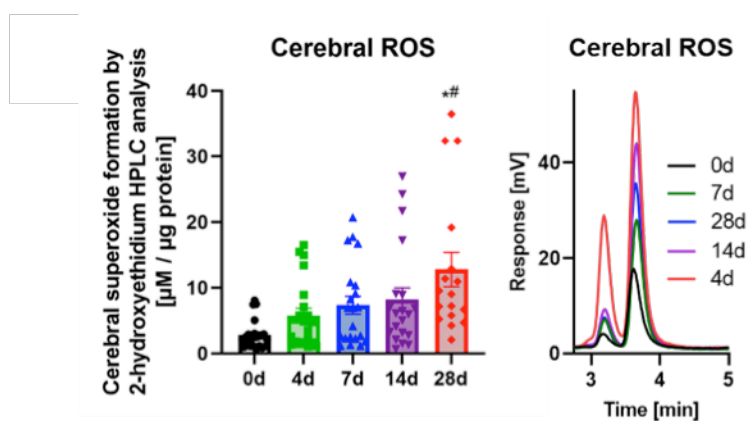


Abbildung 30: Auswirkung von akutem und chronischem Fluglärm auf die ROS-Bildung im Gehirn

Im Hirngewebe der Lärm-Gruppen zeigte sich durch die mittels HPLC-Methode gemessenen DHE Oxidationsprodukte ein progredienter Anstieg der Superoxidbildung mit längerer Lärmexposition. Rechts neben der Quantifizierung sind die repräsentativen Chromatogramme zu sehen. Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Ergebnisse stellen einzelne Tiere dar mit $n=22-23$ pro Gruppe. Statistische Analyse mit one-way ANOVA mit Tukey-Korrektur. $P < 0,05$: * vs. 0d, # vs. 4d. Übernommen aus (215).

5.3 Akute und chronische Lärmexposition und die Hörschwelle

Um die Frage zu beantworten, ob eine längere Fluglärmbelastung einen Hörverlust verursachen kann, haben wir zunächst untersucht, ob eine chronische Exposition mit Fluglärm mit den gewählten dB-Werten negative Auswirkungen auf das Hörvermögen unserer Versuchstiere hat. Dafür führten wir Klick-abhängige ABR-Tests vor und nach der Lärmexposition durch (siehe Kapitel 4.5). Die Ergebnisse zeigten einen nahezu sofortigen Anstieg der Hörschwelle bzw. der Klickschwelle in lärmexponierten Mäusen gegenüber unbeschallten Kontrollen, wobei dieser Unterschied während längeren Expositionsdauern wieder kleiner wurde. Dies bedeutet, dass unser Lärmexpositionsprotokoll einen kleinen (wenn auch signifikanten) Einfluss auf das Hörvermögen der Versuchstiere hat, aber die Steigerung der Hörschwelle von 42 auf 48 dB(A) liegt in unserem Modell noch weit unter dem verwendeten mittleren Schalldruckpegel von 72 dB(A).

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse unserer vorliegenden Studie zeigen deutliche lärmbedingte Auswirkungen auf das kardiovaskuläre und zerebrale System während der Exposition mit Fluglärm für bis zu 4 Wochen. Während die Konzentrationen der Entzündungsmarker nach 7-14 Tagen ihr Maximum erreichen, steigt der oxidative Stress weiter an, was auf eine Aktivierung verschiedener ROS-Quellen wie durch die Mitochondrien und die Xanthinoxidase hindeutet. Daher kann die endotheliale Dysfunktion und die beobachtete Erhöhung der Blutdruckwerte von verschiedenen regulatorischen Komponente abhängen wie eine erhöhte Ausschüttung der Stresshormone in der Anfangsphase, Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und eine erhöhte Endothelin-1-Expression während der Spätphase. Die anhaltenden neuronalen Veränderungen wie vermehrte zerebrale ROS-Bildung und Inaktivierung von nNOS und FOXO-3 sind besonders nachteilig, da diese Prozesse letztendlich zu einer Neurodegeneration und kognitiven Störung führen können. In unseren früheren Studien konnten wir nachweisen, dass eine genetische NOX-2-Defizienz und die pharmakologische FOXO-3-Aktivierung durch Bepridil die nachteiligen Lärmeffekte nahezu vollständig verhindern können, wie im zusammenfassenden Schema gezeigt (Abbildung 31).

Fazit ist, dass sich während einer langfristigen Exposition mit Fluglärm bis zu 4 Wochen keine Anpassung oder Toleranz gegenüber der lärmbedingten kardiovaskulären und zerebralen Nebenwirkungen entwickelt und dies zeigt, dass Lärm als kardiovaskulärer Risikofaktor auch weitere kardiometabolische Erkrankungen induzieren kann – vor allem bei chronischer Exposition.

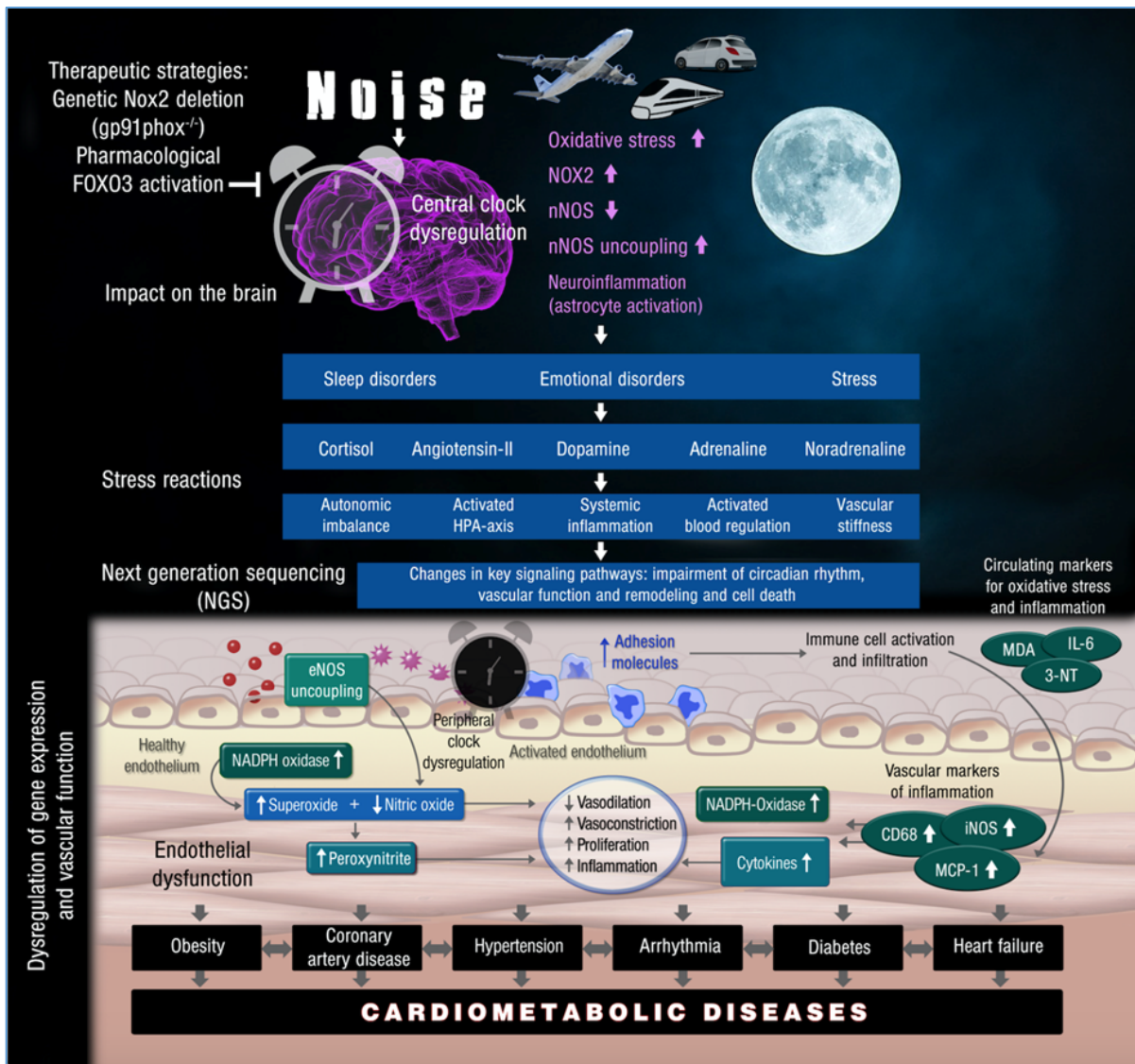


Abbildung 31: Pathophysiologie der lärminduzierten Herz-Kreislauf- und Gehirnerkrankungen

Genetische NOX-2-Defizienz und pharmakologische FOXO-3-Aktivierung verhindern die nachteiligen Lärmeffekte und stellen demnach zentrale Stellen bei Lärm-induzierten Stoffwechselwegen dar.

Abbildung aus (14)

Literaturverzeichnis

1. Munzel T, Sorensen M, Schmidt F, Schmidt E, Steven S, et al. 2018. The Adverse Effects of Environmental Noise Exposure on Oxidative Stress and Cardiovascular Risk. *Antioxid Redox Signal* 28:873-908
2. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, et al. 2012. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2224-60
3. Schmidt FP, Herzog J, Schnorbus B, Ostad MA, Lasetzki L, et al. 2020. The impact of aircraft noise on vascular and cardiac function in relation to noise event number - a randomized trial. *Cardiovasc Res*
4. Munzel T, Hahad O, Sorensen M, Lelieveld J, Duerr GD, et al. 2021. Environmental risk factors and cardiovascular diseases: a comprehensive review. *Cardiovasc Res*
5. Floud S, Blangiardo M, Clark C, de Hoogh K, Babisch W, et al. 2013. Exposure to aircraft and road traffic noise and associations with heart disease and stroke in six European countries: a cross-sectional study. *Environmental health : a global access science source* 12:89
6. Hahad O, Kroller-Schon S, Daiber A, Munzel T. 2019. The Cardiovascular Effects of Noise. *Deutsches Arzteblatt international* 116:245-50
7. Babisch W. 2011. Cardiovascular effects of noise. *Noise & health* 13:201-4
8. Munzel T, Gori T, Babisch W, Basner M. 2014. Cardiovascular effects of environmental noise exposure. *Eur Heart J* 35:829-36
9. Kroller-Schon S, Daiber A, Steven S, Oelze M, Frenis K, et al. 2018. Crucial role for Nox2 and sleep deprivation in aircraft noise-induced vascular and cerebral oxidative stress, inflammation, and gene regulation. *Eur Heart J* 39:3528-39
10. Munzel T, Daiber A, Steven S, Tran LP, Ullmann E, et al. 2017. Effects of noise on vascular function, oxidative stress, and inflammation: mechanistic insight from studies in mice. *Eur Heart J* 38:2838-49
11. Basner M, Muller U, Elmenhorst EM. 2011. Single and combined effects of air, road, and rail traffic noise on sleep and recuperation. *Sleep* 34:11-23
12. Griefahn B, Brode P, Marks A, Basner M. 2008. Autonomic arousals related to traffic noise during sleep. *Sleep* 31:569-77
13. Hahad O, Beutel ME, Gilan DA, Michal M, Daiber A, Munzel T. 2020. [Impact of environmental risk factors such as noise and air pollution on mental health: What do we know?]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 145:1701-7
14. Munzel T, Kroller-Schon S, Oelze M, Gori T, Schmidt FP, et al. 2020. Adverse Cardiovascular Effects of Traffic Noise with a Focus on Nighttime Noise and the New WHO Noise Guidelines. *Annu Rev Public Health* 41:309-28
15. Babisch W. 2003. Stress hormones in the research on cardiovascular effects of noise. *Noise & health* 5:1-11
16. Babisch W. 2006. Transportation noise and cardiovascular risk: updated review and synthesis of epidemiological studies indicate that the evidence has increased. *Noise & health* 8:1-29
17. Munzel T, Steven S, Hahad O, Daiber A. 2021. Noise and cardiovascular risk: nighttime aircraft noise acutely triggers cardiovascular death. *Eur Heart J* 42:844-6
18. Schmidt FP, Basner M, Kroger G, Weck S, Schnorbus B, et al. 2013. Effect of nighttime aircraft noise exposure on endothelial function and stress hormone release in healthy adults. *Eur Heart J* 34:3508-14a
19. Basner M, Babisch W, Davis A, Brink M, Clark C, et al. 2014. Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet* 383:1325-32
20. Munzel T, Schmidt FP, Steven S, Herzog J, Daiber A, Sorensen M. 2018. Environmental Noise and the Cardiovascular System. *J Am Coll Cardiol* 71:688-97

21. Hahad O, Wild PS, Prochaska JH, Schulz A, Lackner KJ, et al. 2021. Midregional pro atrial natriuretic peptide: a novel important biomarker for noise annoyance-induced cardiovascular morbidity and mortality? *Clin Res Cardiol* 110:29-39
22. Babisch W, Wolke G, Heinrich J, Straff W. 2014. Road traffic noise and hypertension--accounting for the location of rooms. *Environmental research* 133:380-7
23. Munzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. 2010. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J* 31:2741-8
24. Betteridge DJ. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism: clinical and experimental* 49:3-8
25. Sies H, Cadenas E. 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 311:617-31
26. Daiber A, Hahad O, Andreadou I, Steven S, Daub S, Munzel T. 2021. Redox-related biomarkers in human cardiovascular disease - classical footprints and beyond. *Redox biology* 42:101875
27. Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology* 82:291-5
28. Fridovich I. 1983. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology* 23:239-57
29. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, et al. 2012. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 123:73-91
30. Schulz E, Wenzel P, Munzel T, Daiber A. 2014. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 20:308-24
31. Gram TE. 1997. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol Rev* 49:297-341
32. Daiber A, Steven S, Vujacic-Mirski K, Kalinovic S, Oelze M, et al. 2020. Regulation of Vascular Function and Inflammation via Cross Talk of Reactive Oxygen and Nitrogen Species from Mitochondria or NADPH Oxidase-Implications for Diabetes Progression. *International journal of molecular sciences* 21
33. Schmidt RF, Thews G, Lang F. 2013. *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg
34. Steven S, Frenis K, Oelze M, Kalinovic S, Kuntic M, et al. 2019. Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019:7092151
35. Steven S, Munzel T, Daiber A. 2015. Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences* 16:18185-223
36. Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141:312-22
37. McDonald RJ, Pan LC, St George JA, Hyde DM, Ducore JM. 1993. Hydrogen peroxide induces DNA single strand breaks in respiratory epithelial cells. *Inflammation* 17:715-22
38. Mokhir A, Xu H, Schikora M, Sisa M, Daum S, et al. 2021. An endoplasmic reticulum - specific pro-amplifier of reactive oxygen species in cancer cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*
39. Thannickal VJ, Fanburg BL. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279:L1005-28
40. Joffre J, Hellman J. 2021. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation. *Antioxidants & redox signaling*
41. Daiber A, Oelze M, Steven S, Kroller-Schon S, Munzel T. 2017. Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. *Redox biology* 12:35-49
42. Griendling KK, FitzGerald GA. 2003. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-6
43. Pagano PJ, Cifuentes-Pagano E. 2021. The Enigmatic Vascular NOX: From Artifact to Double Agent of Change: Arthur C. Corcoran Memorial Lecture - 2019. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 77:275-83

44. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. 2010. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 49:687-706
45. Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208-26
46. Yu W, Li S, Wu H, Hu P, Chen L, et al. 2021. Endothelial Nox4 dysfunction aggravates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress and soluble epoxide hydrolase. *Free Radic Biol Med* 164:44-57
47. Brito R, Castillo G, Gonzalez J, Valls N, Rodrigo R. 2015. Oxidative stress in hypertension: mechanisms and therapeutic opportunities. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 123:325-35
48. Touyz RM, Anagnostopoulou A, Camargo LL, Rios FJ, Montezano AC. 2019. Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5-Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease. *Antioxidants & redox signaling* 30:1027-40
49. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. 2007. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology* 27:130-43
50. Matsuno K, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W, et al. 2012. NOX1/NADPH oxidase is involved in endotoxin-induced cardiomyocyte apoptosis. *Free Radic Biol Med* 53:1718-28
51. Drummond GR, Sobey CG. 2014. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 25:452-63
52. Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, Schmidt HH, Busse R, Brandes RP. 2004. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* 279:45935-41
53. Pagano PJ, Chanock SJ, Siwik DA, Colucci WS, Clark JK. 1998. Angiotensin II induces p67phox mRNA expression and NADPH oxidase superoxide generation in rabbit aortic adventitial fibroblasts. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 32:331-7
54. Lambeth JD. 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature reviews. Immunology* 4:181-9
55. Lassegue B, Griendling KK. 2010. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:653-61
56. Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. 2014. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76:208-26
57. Gray SP, Di Marco E, Kennedy K, Chew P, Okabe J, et al. 2016. Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36:295-307
58. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, et al. 2006. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 8:691-728
59. Camargo LL, Harvey AP, Rios FJ, Tsiropoulou S, Da Silva RNO, et al. 2018. Vascular Nox (NADPH Oxidase) Compartmentalization, Protein Hyperoxidation, and Endoplasmic Reticulum Stress Response in Hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 72:235-46
60. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615
61. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, et al. 1991. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10480-4
62. Forstermann U, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F. 1991. Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1788-92
63. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, et al. 1998. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9220-5

64. Li H, Witte K, August M, Brausch I, Godtel-Armbrust U, et al. 2006. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 47:2536-44
65. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. 2014. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des* 20:3579-94
66. Sydow K, Daiber A, Oelze M, Chen Z, August M, et al. 2004. Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 113:482-9
67. Daiber A, Kroller-Schon S, Oelze M, Hahad O, Li H, et al. 2020. Oxidative stress and inflammation contribute to traffic noise-induced vascular and cerebral dysfunction via uncoupling of nitric oxide synthases. *Redox biology* 34:101506
68. Forstermann U. 2006. Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biological chemistry* 387:1521-33
69. Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A. 2005. 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* 25:1551-7
70. Forstermann U, Munzel T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708-14
71. Forstermann U, Sessa WC. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal* 33:829-37, 37a-37d
72. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, et al. 2003. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-9
73. Alp NJ, Mussa S, Khoo J, Cai S, Guzik T, et al. 2003. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J Clin Invest* 112:725-35
74. Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, Cai S, Adlam D, et al. 2005. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ Res* 97:864-71
75. Bonnefont-Rousselot D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:561-8
76. Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A. 2006. Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 99:924-32
77. Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, Ozdemir AM, Kern TS, et al. 2005. Glycation of mitochondrial proteins from diabetic rat kidney is associated with excess superoxide formation. *American journal of physiology. Renal physiology* 289:F420-30
78. Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turrens J, Wilson G, et al. 2008. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *American journal of physiology. Cell physiology* 294:C413-22
79. Zeviani M, Di Donato S. 2004. Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153-72
80. Adam-Vizi V. 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling* 7:1140-9
81. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. 2005. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res* 97:618-28
82. Daiber A. 2010. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 1797:897-906
83. Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L. 2002. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33:1451-64

84. Kroller-Schon S, Steven S, Kossmann S, Scholz A, Daub S, et al. 2014. Molecular mechanisms of the crosstalk between mitochondria and NADPH oxidase through reactive oxygen species-studies in white blood cells and in animal models. *Antioxid Redox Signal* 20:247-66
85. Wenzel P, Mollnau H, Oelze M, Schulz E, Wickramanayake JM, et al. 2008. First evidence for a crosstalk between mitochondrial and NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in nitroglycerin-triggered vascular dysfunction. *Antioxid Redox Signal* 10:1435-47
86. Palmeira CM, Rolo AP, Berthiaume J, Bjork JA, Wallace KB. 2007. Hyperglycemia decreases mitochondrial function: the regulatory role of mitochondrial biogenesis. *Toxicology and applied pharmacology* 225:214-20
87. Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, et al. 2004. Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. *Biochemical Society symposium*:203-13
88. Drose S, Brandt U. 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 283:21649-54
89. Baschiera E, Sorrentino U, Calderan C, Desbats MA, Salviati L. 2021. The multiple roles of coenzyme Q in cellular homeostasis and their relevance for the pathogenesis of coenzyme Q deficiency. *Free Radic Biol Med*
90. Turrens JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology* 552:335-44
91. Kuhlbrandt W. 2015. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology* 13:89
92. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, et al. 2017. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol* 174:1670-89
93. Dikalov S. 2011. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 51:1289-301
94. Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *The Journal of biological chemistry* 244:3855-63
95. Hille R, Nishino T. 1995. Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9:995-1003
96. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. 2008. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Febs j* 275:3278-89
97. Hille R, Massey V. 1981. Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *The Journal of biological chemistry* 256:9090-5
98. Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* 48:493-8
99. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. 1985. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Advances in myocardiology* 5:183-9
100. Sanders SA, Eisenthal R, Harrison R. 1997. NADH oxidase activity of human xanthine oxidoreductase--generation of superoxide anion. *European journal of biochemistry* 245:541-8
101. Berry CE, Hare JM. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of physiology* 555:589-606
102. Butler R, Morris AD, Belch JJ, Hill A, Struthers AD. 2000. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension* 35:746-51
103. Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, et al. 2002. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 51:1118-24
104. Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. 2003. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 107:416-21

105. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M. 2007. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Springer Berlin Heidelberg
106. Celermajer DS. 1997. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 30:325-33
107. Pries AR, Kuebler WM. 2006. Normal Endothelium. In *The Vascular Endothelium I*, ed. S Moncada, A Higgs:1-40. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Number of 1-40 pp.
108. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. 2014. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *BioMed research international* 2014:801896
109. Pagan LU, Gomes MJ, Okoshi MP. 2018. Endothelial Function and Physical Exercise. *Arq Bras Cardiol* 111:540-1
110. Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Huang Y, Mollnau H, et al. 2003. Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin? *Circ Res* 93:e104-12
111. Aktories K, Forth W. 2005. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker ; mit 303 Tabellen*. Elsevier, Urban & Fischer
112. Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-6
113. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9265-9
114. Ong S, Bondonno NP, Downey LA, Scholey A, Smith MA, et al. 2021. Effects of Chewing Gum on Nitric Oxide Metabolism, Markers of Cardiovascular Health and Neurocognitive Performance after a Nitrate-Rich Meal. *Journal of the American College of Nutrition*:1-13
115. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. 1993. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10769-72
116. Gervaziev lu V, Sokolov NN. 1999. [Mechanisms of regulation by calmodulin of nitric oxide synthase]. *Voprosy meditsinskoj khimii* 45:187-99
117. Griffiths K, Lee JJ, Frenneaux MP, Feelisch M, Madhani M. 2021. Nitrite and myocardial ischaemia reperfusion injury. Where are we now? *Pharmacology & therapeutics* 223:107819
118. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3203-7
119. Schulz E, Tsilimingas N, Rinze R, Reiter B, Wendt M, et al. 2002. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys)function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment. *Circulation* 105:1170-5
120. Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. 1986. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320:454-6
121. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, et al. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101:2567-78
122. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-6
123. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. 1987. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet (London, England)* 2:1057-8
124. Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420:868-74
125. Becker L, Prado K, Foppa M, Martinelli N, Aguiar C, et al. 2012. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. *Journal of critical care* 27:316.e9-14
126. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, et al. 2017. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol* 174:1591-619
127. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, et al. 2019. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences* 20

128. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. 1991. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 83:391-401
129. Becher UM, Endtmann C, Tiyerili V, Nickenig G, Werner N. 2011. Endothelial damage and regeneration: the role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Current hypertension reports* 13:86-92
130. Poredos P, Visnovic Poredos A, Gregoric I. 2021. Endothelial Dysfunction and Its Clinical Implications. *Angiology*:3319720987752
131. Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. 1995. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95:187-94
132. Munzel T, Harrison DG. 1997. Evidence for a role of oxygen-derived free radicals and protein kinase C in nitrate tolerance. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 75:891-900
133. Mangge H, Becker K, Fuchs D, Gostner JM. 2014. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World journal of cardiology* 6:462-77
134. Daiber A, Chlopicki S. 2020. Revisiting pharmacology of oxidative stress and endothelial dysfunction in cardiovascular disease: Evidence for redox-based therapies. *Free Radic Biol Med* 157:15-37
135. Akhigbe R, Ajayi A. 2021. The impact of reactive oxygen species in the development of cardiometabolic disorders: a review. *Lipids in health and disease* 20:23
136. Milstien S, Katusic Z. 1999. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 263:681-4
137. Zou MH, Shi C, Cohen RA. 2002. Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 109:817-26
138. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. 2003. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278:22546-54
139. Zou MH, Ullrich V. 1996. Peroxynitrite formed by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide selectively inhibits bovine aortic prostacyclin synthase. *FEBS letters* 382:101-4
140. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, et al. 2003. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol* 42:1826-34
141. Ischiropoulos H. 1998. Living and dying with reactive species. Focus on "peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease". *The American journal of physiology* 274:C853-4
142. Greenacre SA, Ischiropoulos H. 2001. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-81
143. Ischiropoulos H, Beckman JS. 2003. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 111:163-9
144. Ischiropoulos H. 2003. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 305:776-83
145. Lusis AJ. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-41
146. Davies MJ. 2000. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart (British Cardiac Society)* 83:361-6
147. Libby P. 2000. Changing concepts of atherogenesis. *Journal of internal medicine* 247:349-58
148. Candido R, Srivastava P, Cooper ME, Burrell LM. 2003. Diabetes mellitus: a cardiovascular disease. *Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)* 4:1088-94
149. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. 1999. Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19:1819-24
150. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. 1993. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91:2546-51

151. Chasland LC, Naylor LH, Yeap BB, Maiorana AJ, Green DJ. 2021. Testosterone and Exercise in Middle-to-Older Aged Men: Combined and Independent Effects on Vascular Function. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979):Hypertension*12016411
152. Neaton JD, Wentworth D. 1992. Serum cholesterol, blood pressure, cigarette smoking, and death from coronary heart disease. Overall findings and differences by age for 316,099 white men. Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. *Archives of internal medicine* 152:56-64
153. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE, Jr. 1951. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *American journal of public health and the nation's health* 41:279-81
154. Lu XT, Liu YF, Zhao L, Li WJ, Yang RX, et al. 2013. Chronic psychological stress induces vascular inflammation in rabbits. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 16:87-98
155. Morakinyo AO, Samuel TA, Awobajo FO, Adekunbi DA, Olatunji IO, et al. 2019. Adverse effects of noise stress on glucose homeostasis and insulin resistance in Sprague-Dawley rats. *Heliyon* 5:e03004
156. Ng CY, Whitelock JM, Williams H, Kim HN, Medbury HJ, Lord MS. 2021. Macrophages bind LDL using heparan sulfate and the perlecan protein core. *The Journal of biological chemistry*:100520
157. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, et al. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488-96
158. Glass CK, Witztum JL. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-16
159. Ahmadi R, Fadaei R, Shokoohi Nahrkhalaji A, Panahi G, Fallah S. 2021. The impacts of C1q/TNF-related protein-15 and adiponectin on Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in primary macrophages of patients with coronary artery diseases. *Cytokine* 142:155470
160. Falk E. 2006. Pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 47:C7-12
161. Gebbers JO. 2007. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins--a critical review. *German medical science : GMS e-journal* 5:Doc04
162. G WvL, F LM, Borst GJ, de Kleijn DP, JP PMdV, Pasterkamp G. 2011. Atherosclerotic plaque biomarkers: beyond the horizon of the vulnerable plaque. *Current cardiology reviews* 7:22-7
163. Weber C, Noels H. 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine* 17:1410-22
164. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473:317-25
165. Munzel T, Sorensen M, Gori T, Schmidt FP, Rao X, et al. 2017. 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* 38:550-6
166. Munzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. 2017. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol* 70:212-29
167. Kempen EV, Casas M, Pershagen G, Foraster M. 2018. 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* 15
168. Munzel T, Sorensen M, Lelieveld J, Hahad O, Al-Kindi S, et al. 2021. Heart healthy cities: genetics loads the gun but the environment pulls the trigger. *Eur Heart J* 42:2422-38
169. Babisch W, Gallacher JE, Elwood PC, Ising H. 1988. Traffic noise and cardiovascular risk. The Caerphilly study, first phase. Outdoor noise levels and risk factors. *Arch Environ Health* 43:407-14
170. Babisch W, Ising H, Elwood PC, Sharp DS, Bainton D. 1993. Traffic noise and cardiovascular risk: the Caerphilly and Speedwell studies, second phase. Risk estimation, prevalence, and incidence of ischemic heart disease. *Arch Environ Health* 48:406-13
171. Beelen R, Hoek G, Houthuijs D, van den Brandt PA, Goldbohm RA, et al. 2009. The joint association of air pollution and noise from road traffic with cardiovascular mortality in a cohort study. *Occupational and environmental medicine* 66:243-50

172. Huss A, Spoerri A, Egger M, Rösli M. 2010. Aircraft noise, air pollution, and mortality from myocardial infarction. *Epidemiology* 21:829-36
173. Sorensen M, Hvidberg M, Andersen ZJ, Nordsborg RB, Lill Lund KG, et al. 2011. Road traffic noise and stroke: a prospective cohort study. *Eur Heart J* 32:737-44
174. Halonen JI, Hansell AL, Gulliver J, Morley D, Blangiardo M, et al. 2015. Road traffic noise is associated with increased cardiovascular morbidity and mortality and all-cause mortality in London. *Eur Heart J* 36:2653-61
175. Eriksson C, Hilding A, Pyko A, Bluhm G, Pershagen G, Ostenson CG. 2014. Long-term aircraft noise exposure and body mass index, waist circumference, and type 2 diabetes: a prospective study. *Environmental health perspectives* 122:687-94
176. Münzel T, Sørensen M, Daiber A. 2021. Transportation noise pollution and cardiovascular disease. *Nature reviews. Cardiology*
177. Steven S, Frenis K, Kalinovic S, Kvandova M, Oelze M, et al. 2020. Exacerbation of adverse cardiovascular effects of aircraft noise in an animal model of arterial hypertension. *Redox biology* 34:101515
178. Frenis K, Kuntic M, Hahad O, Bayo Jimenez MT, Oelze M, et al. 2021. Redox Switches in Noise-Induced Cardiovascular and Neuronal Dysregulation. *Front Mol Biosci* 8:784910
179. Eckrich J, Frenis K, Rodriguez-Blanco G, Ruan Y, Jiang S, et al. 2021. Aircraft noise exposure drives the activation of white blood cells and induces microvascular dysfunction in mice. *Redox biology* 46:102063
180. Schmidt F, Kolle K, Kreuder K, Schnorbus B, Wild P, et al. 2015. Nighttime aircraft noise impairs endothelial function and increases blood pressure in patients with or at high risk for coronary artery disease. *Clin Res Cardiol* 104:23-30
181. Arpornchayanon W, Canis M, Ihler F, Settevendemie C, Strieth S. 2013. TNF- α inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo. *International journal of audiology* 52:545-52
182. Land R, Burghard A, Kral A. 2016. The contribution of inferior colliculus activity to the auditory brainstem response (ABR) in mice. *Hear Res* 341:109-18
183. Arpornchayanon W, Canis M, Suckfuell M, Ihler F, Olzowy B, Strieth S. 2011. Modeling the measurements of cochlear microcirculation and hearing function after loud noise. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 145:463-9
184. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. 2008. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens* 21:1288-91
185. Oelze M, Knorr M, Kroller-Schon S, Kossmann S, Gottschlich A, et al. 2013. Chronic therapy with isosorbide-5-mononitrate causes endothelial dysfunction, oxidative stress, and a marked increase in vascular endothelin-1 expression. *Eur Heart J* 34:3206-16
186. Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Muller J, Schuhmacher S, et al. 2008. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 45:619-26
187. Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 40:180-96
188. Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, et al. 2004. Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic Res* 38:259-69
189. Nishinaka Y, Aramaki Y, Yoshida H, Masuya H, Sugawara T, Ichimori Y. 1993. A new sensitive chemiluminescence probe, L-012, for measuring the production of superoxide anion by cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193:554-9
190. Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, et al. 1999. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271:53-8
191. Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, et al. 2004. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med* 36:101-11

192. Jansen T, Kröller-Schön S, Schönfelder T, Foretz M, Viollet B, et al. 2018. α 1AMPK deletion in myelomonocytic cells induces a pro-inflammatory phenotype and enhances angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Cardiovascular research* 114:1883-93
193. Zielonka J, Lambeth JD, Kalyanaraman B. 2013. On the use of L-012, a luminol-based chemiluminescent probe, for detecting superoxide and identifying inhibitors of NADPH oxidase: a reevaluation. *Free Radic Biol Med* 65:1310-4
194. Halliwell B, Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-55
195. Michalski R, Michalowski B, Sikora A, Zielonka J, Kalyanaraman B. 2014. On the use of fluorescence lifetime imaging and dihydroethidium to detect superoxide in intact animals and ex vivo tissues: a reassessment. *Free Radic Biol Med* 67:278-84
196. Basson R, Lima C, Muhamadali H, Li W, Hollywood K, et al. 2021. Assessment of Transdermal Delivery of Topical Compounds in Skin Scarring Using a Novel Combined Approach of Raman Spectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography. *Advances in wound care* 10:1-12
197. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. 2007. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension* 49:717-27
198. Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. 2004. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C895-902
199. Kalinovic S, Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Vujacic-Mirski K, et al. 2019. Comparison of Mitochondrial Superoxide Detection Ex Vivo/In Vivo by mitoSOX HPLC Method with Classical Assays in Three Different Animal Models of Oxidative Stress. *Antioxidants* 8
200. Schagger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry* 166:368-79
201. Oelze M, Knorr M, Schuhmacher S, Heeren T, Otto C, et al. 2011. Vascular dysfunction in streptozotocin-induced experimental diabetes strictly depends on insulin deficiency. *J Vasc Res* 48:275-84
202. Oelze M, Daiber A, Brandes RP, Hortmann M, Wenzel P, et al. 2006. Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats. *Hypertension* 48:677-84
203. Compton SJ, Jones CG. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* 151:369-74
204. Pande SV, Murthy MS. 1994. A modified micro-Bradford procedure for elimination of interference from sodium dodecyl sulfate, other detergents, and lipids. *Analytical biochemistry* 220:424-6
205. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5
206. Schagger H, Aquila H, Von Jagow G. 1988. Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Analytical biochemistry* 173:201-5
207. Oelze M, Kroller-Schon S, Steven S, Lubos E, Doppler C, et al. 2014. Glutathione peroxidase-1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction in aging. *Hypertension* 63:390-6
208. Helmstadter J, Keppeler K, Aust F, Kuster L, Frenis K, et al. 2021. GLP-1 Analog Liraglutide Improves Vascular Function in Polymicrobial Sepsis by Reduction of Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* 10
209. Kanmogne GD. 2014. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Real-Time PCR. In *Current Laboratory Methods in Neuroscience Research*, ed. H Xiong, HE Gendelman:201-10. New York, NY: Springer New York. Number of 201-10 pp.

210. Holzapfel B, Wickert L. 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit* 37:120-6
211. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
212. Hausding M, Jurk K, Daub S, Kroller-Schon S, Stein J, et al. 2013. CD40L contributes to angiotensin II-induced pro-thrombotic state, vascular inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 108:386
213. Oelze M, Kroller-Schon S, Welschof P, Jansen T, Hausding M, et al. 2014. 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* 9:e112394
214. Frenis K, Helmstadter J, Ruan Y, Schramm E, Kalinovic S, et al. 2021. Ablation of lysozyme M-positive cells prevents aircraft noise-induced vascular damage without improving cerebral side effects. *Basic Res Cardiol* 116:31
215. Frenis K, Kalinovic S, Ernst BP, Kvandova M, Al Zuabi A, et al. 2022. Long-Term Effects of Aircraft Noise Exposure on Vascular Oxidative Stress, Endothelial Function and Blood Pressure: No Evidence for Adaptation or Tolerance Development. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8
216. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. 1987. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochemical and biophysical research communications* 148:1482-9
217. Eckrich J, Ruan Y, Jiang S, Frenis K, Rodriguez-Blanco G, et al. 2021. In vivo analysis of noise dependent activation of white blood cells and microvascular dysfunction in mice. *MethodsX* 8:101540
218. Ischiropoulos H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356:1-11
219. Guerby P, Tasta O, Swiader A, Pont F, Bujold E, et al. 2021. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. *Redox biology* 40:101861
220. Panday S, Kar S, Kavdia M. 2021. How does ascorbate improve endothelial dysfunction? - A computational analysis. *Free Radic Biol Med* 165:111-26
221. Shin N, Kim HG, Shin HJ, Kim S, Kwon HH, et al. 2019. Uncoupled Endothelial Nitric Oxide Synthase Enhances p-Tau in Chronic Traumatic Encephalopathy Mouse Model. *Antioxidants & redox signaling* 30:1601-20
222. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, et al. 2017. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British journal of pharmacology* 174:1591-619
223. Lopes AA, Maeda NY, Bydlowski SP. 1998. [Von Willebrand factor and pulmonary endothelial dysfunction. Prognostic implications]. *Arq Bras Cardiol* 70:141-5
224. Bayo Jimenez MT, Frenis K, Kroller-Schon S, Kuntic M, Stamm P, et al. 2021. Noise-Induced Vascular Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation Are Improved by Pharmacological Modulation of the NRF2/HO-1 Axis. *Antioxidants* 10
225. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, et al. 2016. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nature communications* 7:11624
226. Cassandro E, Sequino L, Mondola P, Attanasio G, Barbara M, Filipo R. 2003. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise-exposed guinea pigs-- electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol* 123:802-7
227. Seidman MD, Shivapuja BG, Quirk WS. 1993. The protective effects of allopurinol and superoxide dismutase on noise-induced cochlear damage. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 109:1052-6

228. Van Raaij MT, Oortgiesen M, Timmerman HH, Dobbe CJ, Van Loveren H. 1996. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiol Behav* 60:1527-33
229. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep* 4:519-22
230. Yu Y, Mayeda ER, Paul KC, Lee E, Jerrett M, et al. 2020. Traffic-related Noise Exposure and Late-life Dementia and Cognitive Impairment in Mexican-Americans. *Epidemiology* 31:771-8
231. Paul KC, Haan M, Mayeda ER, Ritz BR. 2019. Ambient Air Pollution, Noise, and Late-Life Cognitive Decline and Dementia Risk. *Annual review of public health* 40:203-20
232. Mohseni-Moghaddam P, Ghobadian R, Khaleghzadeh-Ahangar H. 2022. Dementia in diabetes mellitus and atherosclerosis: Two interrelated systemic diseases. *Brain Res Bull* 181:87-96
233. Wu H, Sun Q, Yuan S, Wang J, Li F, et al. 2022. AT1 Receptors: Their Actions from Hypertension to Cognitive Impairment. *Cardiovasc Toxicol* 22:311-25
234. Osborne MT, Radfar A, Hassan MZO, Abohashem S, Oberfeld B, et al. 2020. A neurobiological mechanism linking transportation noise to cardiovascular disease in humans. *Eur Heart J* 41:772-82
235. Hahad O, Lelieveld J, Birklein F, Lieb K, Daiber A, Munzel T. 2020. Ambient Air Pollution Increases the Risk of Cerebrovascular and Neuropsychiatric Disorders through Induction of Inflammation and Oxidative Stress. *International journal of molecular sciences* 21
236. Jafari Z, Kolb BE, Mohajerani MH. 2018. Chronic traffic noise stress accelerates brain impairment and cognitive decline in mice. *Exp Neurol* 308:1-12
237. Cui B, Zhu L, She X, Wu M, Ma Q, et al. 2012. Chronic noise exposure causes persistence of tau hyperphosphorylation and formation of NFT tau in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Exp Neurol* 238:122-9
238. Cui B, Wu M, She X, Liu H. 2012. Impulse noise exposure in rats causes cognitive deficits and changes in hippocampal neurotransmitter signaling and tau phosphorylation. *Brain Res* 1427:35-43
239. Hahad O, Frenis K, Kuntic M, Daiber A, Munzel T. 2021. Accelerated Aging and Age-Related Diseases (CVD and Neurological) Due to Air Pollution and Traffic Noise Exposure. *International journal of molecular sciences* 22
240. Cheng L, Wang SH, Chen QC, Liao XM. 2011. Moderate noise induced cognition impairment of mice and its underlying mechanisms. *Physiol Behav* 104:981-8
241. Cui B, Wu M, She X. 2009. Effects of chronic noise exposure on spatial learning and memory of rats in relation to neurotransmitters and NMDAR2B alteration in the hippocampus. *J Occup Health* 51:152-8
242. Manikandan S, Padma MK, Srikumar R, Jeya Parthasarathy N, Muthuvel A, Sheela Devi R. 2006. 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. *Neuroscience letters* 399:17-22
243. Tzivian L, Dlugaj M, Winkler A, Hennig F, Fuks K, et al. 2016. Long-term air pollution and traffic noise exposures and cognitive function:A cross-sectional analysis of the Heinz Nixdorf Recall study. *J Toxicol Environ Health A* 79:1057-69
244. Tzivian L, Dlugaj M, Winkler A, Weinmayr G, Hennig F, et al. 2016. Long-Term Air Pollution and Traffic Noise Exposures and Mild Cognitive Impairment in Older Adults: A Cross-Sectional Analysis of the Heinz Nixdorf Recall Study. *Environ Health Perspect* 124:1361-8
245. Fuks KB, Wigmann C, Altug H, Schikowski T. 2019. Road Traffic Noise at the Residence, Annoyance, and Cognitive Function in Elderly Women. *Int J Environ Res Public Health* 16
246. Cantuaria ML, Waldorff FB, Wermuth L, Pedersen ER, Poulsen AH, et al. 2021. Residential exposure to transportation noise in Denmark and incidence of dementia: national cohort study. *Bmj* 374:n1954
247. Paul V, Ekambaram P. 2011. Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res* 133:471-8

248. Li H, Kilgallen AB, Munzel T, Wolf E, Lecour S, et al. 2020. Influence of mental stress and environmental toxins on circadian clocks: Implications for redox regulation of the heart and cardioprotection. *Br J Pharmacol* 177:5393-412

Danksagung

Ich danke vor allen Direktor des Zentrums für Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz, für die Überlassung des Themas meiner Arbeit und seine Betreuung.

Ich danke auch ganz herzlich den Leiter des Labors für Molekulare Kardiologie, Zentrum für Kardiologie der Universitätsmedizin Mainz, für seine wertvolle und freundliche Betreuung und unbegrenzte Unterstützung. Danke für die Diskussionsbereitschaft, ausführlichen Antworten und tollen Vorschläge.

Besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Mainz, die mir sowohl die Gerätschaften als auch ihr tolles methodisches Wissen während meiner gesamten Laborarbeit zur Verfügung gestellt haben.

Publikationen

- 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), Marin Kuntic, Matthias Oelze, Sebastian Steven, Swenja Kröller-Schön, Paul Stamm, Sanela Kalinovic, Katie Frenis, Ksenija Vujacic-Mirski, Maria Teresa Bayo Jimenez, Miroslava Kvandova, Konstantina Filippou, **Ahmad Al Zuabi**, Vivienne Brückl, Omar Hahad, Steffen Daub, Franco Varveri, Tommaso Gori, Regina Huesmann, Thorsten Hoffmann, Frank P. Schmidt, John F. Keaney Jr, Andreas Daiber, Thomas Münzel. **European heart journal**, 2020, 41, 2472-2483
- Comparison of Mitochondrial Superoxide Detection Ex Vivo/In Vivo by mitoSOX HPLC Method with Classical Assays in Three Different Animal Models of Oxidative Stress Sanela Kalinovic, Matthias Oelze, Swenja Kröller-Schön, Sebastian Steven, Ksenija Vujacic-Mirski, Miroslava Kvandová, Isabella Schmal, **Ahmad Al Zuabi**, Thomas Münzel, Andreas Daiber. **Antioxidants**, 2019, 8, 514
- Long-Term Effects of Aircraft Noise Exposure on Vascular Oxidative Stress, Endothelial Function and Blood Pressure: No Evidence for Adaptation or Tolerance Development, Katie Frenis, Sanela Kalinovic, Benjamin P. Ernst, Miroslava Kvandova, **Ahmad Al Zuabi**, Marin Kuntic, Matthias Oelze, Paul Stamm, Maria Teresa Bayo Jimenez, Agnieszka Kij, Karin Keppeler, Veronique Klein, Lea Strohm, Henning Ubbens, Steffen Daub, Omar Hahad, Swenja Kröller-Schön, Michael J. Schmeisser, Stefan Chlopicki, Jonas Eckrich, Sebastian Strieth, Andreas Daiber, Sebastian Steven and Thomas Münzel. **Front. Mol. Biosci.**, 2022, 8:814921

Tagungsabstracts

- Role of Endothelin Receptor and FOXO-3 Transcription Factor in E-cigarette Induced Vascular and Cerebrovascular Damage, Marin Kuntic, Matthias Oelze, Sebastian Steven, Swenja Kröller-Schön, Paul Stamm, Sanela Kalinovic, Katie Frenis, Ksenija Vujacic-Mirski, Maria Teresa Bayo Jimenez, Miroslava Kvandova, Konstantina Filippou, **Ahmad Al Zuabi**, Vivienne Brückl, Omar Hahad, Steffen Daub, Franco Varveri, Tommaso Gori, Regina Huesmann, Thorsten Hoffmann, Frank P. Schmidt, John F. Keaney Jr, Andreas Daiber, Thomas Münzel. **Free Radical Biology and Medicine**, 2020
- New and classical methods to compare oxidative stress levels and parameters of vascular function in rat models of hypertension, diabetes and nitrate tolerance, Sanela Kalinovic, Matthias Oelze, Swenja Kröller-Schön, Sebastian Steven, Ksenija Vujacic-Mirski, Miroslava Kvandova, Isabella Schmal, **Ahmad Al Zuabi**, Thomas Münzel, Andreas Daiber. **The FASEB Journal**, 2020
- Time-dependent induction of vascular oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction and high blood pressure by aircraft noise exposure in mice, Sanela Kalinovic, Katie Frenis, **Ahmad Al Zuabi**, Matthias Oelze, Sebastian Steven, Miroslava Kvandova, Benjamin Ernst, Sebastian Strieth, Andreas Daiber, Swenja Kröller-Schön, Thomas Münzel. **The FASEB Journal**, 2020

Lebenslauf

➤ **Zu meiner Person:**

Name: Ahmad Al Zuabi

Geboren: 02.07.1991 in Dara

Email: ahmad.alzuabi@hotmail.com

Familienstand: ledig

➤ **Schule und Studium:**

07/2009 Allgemeine Hochschulreife in Syrien (Abitur)

2010-2011 Sprachschule in Hannover

04/2012-11/2019 Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

11/2018-10/2019 Praktisches Jahr, katholisches Klinikum Koblenz

05/2020 FIFA Diplom in Sport Medicine

11/2020 Certificate of Achievement, Anatomy, Harvard medical School

➤ **Klinische und berufliche Ausbildung:**

05/2015-08/2019 Studentische Aushilfskraft in der Pflege, katholisches Klinikum Mainz

seit 06/2020 Assistenzarzt, Klinik für Orthopädie, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Universitätsklinikum RWTH Aachen

seit 10/2021 ATLS Provider (Advanced Trauma Life Support)

➤ **Wissenschaftliche Tätigkeit:**

Seit 04/2018 Experimentelle Doktorarbeit, Labor für Molekulare Kardiologie, Universitätsmedizin Mainz

Seit 02/2021 Teilnahme an einem Polytrauma Schweine-Projekt, Universitätsklinikum RWTH Aachen

➤ **Stipendium:**

2019 Studenten-Stipendium der Landesstipendienstiftung des Landes
RLP

➤ **Sprachen:**

Arabisch, Deutsch und Englisch