

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

**Charakterisierung der vasoprotektiven Effekte von anorganischem Nitrit in isolierten
Aortenringen unter oxidativen Bedingungen und Untersuchungen zur Rolle des Mikrobioms
für die Bioaktivierung von Nitrit in keimfreien Mäusen**

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

Vorgelegt von
Alexander Czarnowski
aus Idar Oberstein

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: xxx

2. Gutachter: xxx

Tag der Promotion: 11.12.2024

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Reaktive Sauerstoff Spezies und Oxidativer Stress	3
2.1.1 Superoxid-Anion ($\bullet\text{O}_2^-$).....	4
2.1.2 Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$).....	5
2.1.3 Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$).....	5
2.1.4 Wasserstoffperoxid (H_2O_2).....	6
2.1.5 Hypochlorige Säure (HOCl)	7
2.1.6 Peroxynitrit (ONOO^-).....	8
2.1.7 Redox-basierte Signalübertragung und Eustress	9
2.1.8 Oxidativer Stress.....	12
2.1.9 Das Endothel und die endotheliale Dysfunktion.....	25
2.2 Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie	30
2.3 Anorganisches Nitrit (NO_2^-).....	32
2.3.1 Der Nitrat-Nitrit-Stickstoffmonoxid Weg.....	33
2.4 Das Mikrobiom	37
3 Material und Methoden	39
3.1 Material.....	39
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	39
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	41
3.1.3 Antikörper	43
3.1.4 Laborgeräte	44

3.1.5	Operationsbesteck	45
3.1.6	Puffer und Lösungen.....	46
3.1.7	Verwendete Software.....	50
3.2	Methoden	51
3.2.1	Tiermodell.....	51
3.2.2	Organentnahme	54
3.2.3	Aortenpräparation.....	55
3.2.4	Isometrische Tonusstudien im Organbad.....	55
3.2.5	Immunoblotting.....	58
3.2.6	Statistische Auswertung.....	66
4	Ergebnisse.....	68
4.1	Der Einfluss von Oxidantien und der arteriellen Hypertonie auf die ACh-induzierte, endothelabhängige und die Nitrit-abhängige Vasodilatation.....	68
4.1.1	Vaskuläre Funktion	68
4.1.2	Effekte von Sin-1 auf die Proteinexpression der Xanthin-Oxidoreduktase im Aortengewebe	74
4.2	Effekte von diätetischem Nitrit auf die Gefäßfunktion und die Rolle des Mikrobioms für die Bioaktivierung von Nitrit.....	75
4.2.1	Vaskuläre Funktion	76
4.2.2	Effekte von diätetischem Nitrit auf die S-Nitrosylierung von Plasmaproteinen und die Rolle des Mikrobioms.....	78
5	Diskussion	80
5.1	Einfluss von Oxidantien auf die Endothelfunktion.....	82
5.1.1	Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂).....	83
5.1.2	Hypochlorige Säure (HOCl)	84
5.1.3	Peroxyinitrit (ONOO ⁻).....	85
5.2	Einfluss von Oxidantien auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation.....	86
5.2.1	Vergleich der Nitrit-abhängigen Vasodilatation mit der endothelunabhängigen Dilatation anderer Studien.....	88

5.3	Einfluss einer AT-II induzierten Hypertonie auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation	90
5.4	Einfluss des Peroxynitrit-Donators Sin-1 auf die XOR	94
5.4.1	Die potenzielle Rolle der XOR bei kardiovaskulären Erkrankungen	96
5.5	Akute Effekte einer Nitrit Supplementierung auf die Gefäßfunktion und der Einfluss des Mikrobioms auf die Bioaktivierung.....	98
5.6	Klinische Abwägungen	101
5.7	Einschränkungen	103
6	Zusammenfassung.....	105
7	Literaturverzeichnis.....	V
8	Danksagung	XXII
9	Curriculum vitae	XXIII
	Publikationen und Veröffentlichungen	XXIV
	Tagungsabstracts	XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Schematische Darstellung wichtiger RONS.....	9
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung wichtiger RONS Quellen.....	13
Abbildung 2-3: Isoformen der NADPH Oxidase.....	15
Abbildung 2-4: Aktivierungsschema der NADPH Oxidase 2.....	16
Abbildung 2-5: Redox-basierte Modifikation der eNOS und Darstellung der Röntgenstruktur der humanen eNOS.....	21
Abbildung 2-6: Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und NOX.	23
Abbildung 2-7: Röntgenstruktur der XOR.	24
Abbildung 2-8: Endotheliale Dysfunktion durch oxidativen Stress.....	29
Abbildung 2-9: Vaskuläre Veränderungen durch oxidativen Stress.....	32
Abbildung 2-10: Der entero-saliväre Kreislauf.	34
Abbildung 2-11: Wechselwirkungen zwischen der Mikrobiota und anderen Organsystemen.....	38
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Tiermodelle.	53
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Organbads.....	57
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.	58
Abbildung 3-4: SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	64
Abbildung 4-1: Effekte von H ₂ O ₂ auf die endothelabhängige Vasodilatation.	69
Abbildung 4-2: Effekte von Sin-1 auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	70
Abbildung 4-3: Effekte von HOCl auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	71
Abbildung 4-4: Effekte von AT-II auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	71
Abbildung 4-5: Effekte von H ₂ O ₂ (A) und Sin-1 (B) auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation.....	72
Abbildung 4-6: Effekte von HOCl auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation.....	73
Abbildung 4-7: Effekte von AT-II auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation.....	73
Abbildung 4-8: Effekte von Sin-1 auf die Expression der Xanthin-Dehydrogenase (XDH) und Xanthin-Oxydase (XO) im Aortengewebe von Ratten.	75
Abbildung 4-9: Effekte einer in vivo Behandlung mit anorganischem Nitrit (vs. NaCl) in Gegenwart und Abwesenheit des Mikrobioms (GF-NaCl, GF-NO ₂ ⁻) auf die endothelabhängige Vasodilatation.	77

Abbildung 4-10 Effekte einer in vivo Behandlung mit anorganischen Nitrit in Gegenwart (NaCl, NO ₂ ⁻) und Abwesenheit des Mikrobioms (GF-NaCl, GF-NO ₂ ⁻) auf die endothel-unabhängige Vasodilatation.....	78
Abbildung 4-11 Effekte einer in vivo Behandlung mit anorganischen Nitrit auf die S-Nitrosylierung der Plasmaproteine (repräsentiert durch DMPO positive Proteine). ...	79
Abbildung 5-1: medizinische Versorgung der arteriellen Hypertonie.....	81
Abbildung 5-2: Einfluss der RONS auf die Endothelfunktion.	86
Abbildung 5-3: Einfluss von Nitrit auf die Endothelfunktion.....	90
Abbildung 5-4: Vaskuläre Effekte von Angiotensin II.....	94

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Chemikalien und Reagenzien	39
Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien	41
Tabelle 3-3: Primäre Antikörper	43
Tabelle 3-4: Sekundäre Antikörper.....	43
Tabelle 3-5: Laborgeräte	44
Tabelle 3-6: Operationsbesteck	45
Tabelle 3-7: verwendete Software.....	50
Tabelle 3-8: Behandlungen der Versuchstiere	53

Abkürzungsverzeichnis

•HO	Hydroxy-Radikal
•O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Aldehyddehydrogenase
AT II	Angiotensin II
ATP	Adenosintri-phosphat
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CVD	cardiovascular disease
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMPO	5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DuOX 1	dual oxidase
ED	endotheliale Dysfunktion
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FMN	Flavinmononucleotid
GTN	Glyceroltrinitrat
GTP	Guanosintri-phosphat
GTPCH	Guanosin Triphosphat Zylohydrolase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	hypochlorige Säure
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IRAG	IP ₃ R-associated cGMP kinase substrate
KCl	Kaliumchlorid
KHK	koronare Herzerkrankung
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	icotinamidadenindinukleotidphosphat
NaNO ₂	Natriumnitrit

nNOS.....	<i>neuronale Stickstoffmonoxid Synthase</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NO ₂ ⁻	<i>Nitrit</i>
NO ₃ ⁻	<i>Nitrat</i>
NOS.....	<i>Stickstoffmonoxid Synthase</i>
NOX.....	<i>NADPH Oxidase</i>
NTG.....	<i>Nitroglycerin</i>
ONOO ⁻	<i>Peroxynitrit</i>
PETN.....	<i>Pentaerythryltetranitrat</i>
PGF _{2α}	<i>Prostaglandin F 2 alpha</i>
PHE	<i>Phenylephrin</i>
PKC	<i>Proteinkinase C</i>
PKG.....	<i>Proteinkinase G</i>
RAAS.....	<i>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</i>
RNS.....	<i>reactive nitrogen species</i>
RONS	<i>reaktive Sauer- und Stickstoffspezies</i>
ROS.....	<i>reactive oxygen species</i>
RSS	<i>reactive sulfur species</i>
SCFA.....	<i>short chain fatty acids</i>
SDS	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SDS PAGE.....	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
sGC	<i>lösliche Guanylatzyklase</i>
SIN-1	<i>3-Morpholinomorpholinomine</i>
SOD.....	<i>Superoxid Dismutase</i>
XDH.....	<i>Xanthin Dehydrogenase</i>
XO	<i>Xanthin Oxidase</i>
XOR.....	<i>Xanthin Oxidoreduktase, Xanthin-Oxidoreduktase</i>

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Kardiovaskuläre Erkrankungen gehören zu den weltweit führenden Todesursachen. Im Jahr 2019 waren nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) 17,9 Millionen Todesfälle auf diese Krankheitsentität zurückzuführen (1). Zahlreiche Risikofaktoren, wie Nikotinkonsum, Bewegungsmangel, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder Dyslipoproteinämie sind gemeinhin bekannt (1). Die arterielle Hypertonie ist dabei von herausragender Bedeutung, da sie als der wichtigste Risikofaktor für ein vorzeitiges Versterben identifiziert werden konnte. Zudem ist die arterielle Hypertonie ein globales Phänomen – mehr als 1,22 Milliarden Menschen sind von dieser Erkrankung betroffen. Verschärfend kommt hinzu, dass lediglich 42% der Betroffenen diagnostiziert und therapiert werden (2). Obwohl neben Modifikation des Lebensstils zahlreiche evidenzbasierte pharmakologische Therapieoptionen wie ACE-Hemmer, Kalziumantagonisten und Thiazide zur Verfügung stehen (3), wird eine adäquate Therapie und Kontrolle der arteriellen Hypertonie aktuell nur bei 21% Prozent der Erwachsenen erreicht (4).

Zahlreiche Faktoren wie ein mangelnder Zugang zum Gesundheitssystem, hohe Kosten oder auch eine mangelnde Therapieadhärenz tragen zur schlechten Bilanz der medizinischen Versorgung der arteriellen Hypertonie bei. Die Adhärenz tritt in dieser Konstellation als Problematik zunehmend ins Bewusstsein der Behandelnden. Angst vor Nebenwirkungen oder der Abhängigkeit von den Medikamenten sind wichtige Gründe, die zur schlechten Therapieadhärenz führen (5).

Unter diesem Aspekt gewinnen Therapiemodalitäten wie Lebensstiländerungen oder auch diätische Maßnahmen an Attraktivität. In jüngster Zeit ist anorganisches Nitrat und Nitrit ins Interesse der Wissenschaft getreten. Früher galten diese Stickstoffverbindungen als inaktive Produkte des Stickstoffmonoxid-Metabolismus ohne Relevanz für das kardiovaskuläre System. Heutzutage wird man sich ihrer Bedeutung als wichtige alternative Stickstoffmonoxid Quelle bewusst, zudem scheinen sie auch antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften im Gefäßsystem zu besitzen (6, 7). Vor diesem Hintergrund stellen anorganisches Nitrat und Nitrit interessante und attraktive Therapieoption in der Behandlung der arteriellen Hypertonie dar, denn sie können auch durch Nahrung oder Trinkwasser supplementiert werden, sodass das tägliche Einnehmen einer „Pille“ entfällt. So könnte die Therapieadhärenz möglicherweise verbessert werden.

In diesem Zusammenhang haben Stamm et al. in der AG Daiber/Münzel die vasoprotektiven Effekte einer anorganischen Nitrat und Nitrit Supplementation in Mäusen mit Angiotensin II induzierter arterieller Hypertonie untersucht. In diesem Hypertonie-Modell spielen in der Pathogenese reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine zentrale Rolle und es stellte sich heraus, dass die Therapie mit anorganischem Nitrit der Therapie mit Nitrat deutlich überlegen ist (7).

Zahlreiche Effekte von Nitrat und Nitrit werden erst durch die Bioaktivierung zu Stickstoffmonoxid vermittelt. Diese Reduktion erfolgt insbesondere durch die Xanthin-Oxidoreduktase. Das homodimere Enzym (abhängig vom Redox-Status der Umgebung) weist zwei verschiedene Aktivitäten auf – eine Dehydrogenase und eine Oxidase Aktivität. Inwieweit die jeweilige Aktivität die Bioaktivierung von Nitrit beeinflusst, ist noch unzureichend verstanden.

Auch das Mikrobiom tritt zunehmend in den Fokus der kardiovaskulären Forschung. Studien zeigen, dass durch die gastro-intestinale Flora sowohl protektive als auch schädliche Effekte auf das kardiovaskuläre System vermittelt werden. So wird eine Störung oder Dysbalance des Mikrobioms auch beispielsweise mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie assoziiert (8). Ferner ist das Mikrobiom für die Bioaktivierung von anorganischem Nitrat von größter Bedeutung, da Nitrat erst durch bakterielle Nitratreduktasen zu Nitrit reduziert werden kann (6). Untersuchungen zeigen, dass eine Störung der bakteriellen Flora eine Abschwächung der protektiven Effekte von Nitrat zur Folge hat (9). Demgegenüber ist die Relevanz des Mikrobioms für die Nitrit-evozierten Effekte weit weniger gut untersucht.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich folgende Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit:

- Es soll die gefäßregulatorische Charakteristik von anorganischem Nitrit untersucht werden. Zudem soll der Einfluss verschiedener Oxidantien auf die Acetylcholin induzierte, endothelabhängige mit der Nitrit induzierten Vasodilatation verglichen werden.
- Es soll der Einfluss der Xanthin-Oxidoreduktase auf die Bioaktivierung von Nitrit untersucht werden. Dabei soll die Bedeutung der oben erwähnten zwei Aktivitäten des Enzyms berücksichtigt werden.
- Zuletzt soll der Einfluss des Mikrobioms auf die Bioaktivierung von Nitrit und dessen evozierten Effekte untersucht werden.

2 Literaturdiskussion

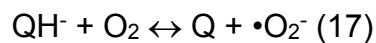
2.1 Reaktive Sauerstoff Spezies und Oxidativer Stress

Der Sammelbegriff reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species „ROS“) beschreibt chemische Spezies, die durch eine unvollständige Reduktion oder eine Elektron-Anregung von molekularem Sauerstoff entstehen. Der Begriff umfasst dabei u.a. das Superoxid-Anion ($\bullet\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{HO}$) (10, 11). Neben den ROS sind im Organismus auch reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species „RNS“) und reaktive Schwefelspezies (reactive sulfur species „RSS“), die jeweils nach der Art des reaktiven Atoms benannt werden, von Bedeutung. In dieser Arbeit soll der Oberbegriff „RONS“ die reaktiven Stickstoff- und Sulfurspezies miteinschließen. Weiterhin werden die RONS in freie Radikale und nicht-Radikale unterschieden. Freie Radikale besitzen ein ungepaartes Elektron in der äußersten Elektronenschale. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$), Superoxid-Anion ($\bullet\text{O}_2^-$) und das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{HO}$). Diese Moleküle sind aufgrund des ungepaarten Elektrons reaktiver und instabiler als die Vertreter der nicht-Radikale. Nicht-Radikale besitzen kein freies Elektron; zu dieser Gruppe werden u.a. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit (ONOO^-) und Hypochlorige Säure (HOCl) gezählt. Die Reaktivität der nicht-Radikale kann mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung verglichen werden. Freie Radikale können anhand ihres Redoxpotentials (E^0) in ihrem Reaktionsvermögen verglichen werden (12, 13). Die Reaktivität der verschiedenen ROS unterscheidet sich stark voneinander; je nach Bindungspartner können die Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung um bis zu 11 Größenordnungen in ihrer Reaktivität variieren (11, 14-16). Analog dazu differieren die reaktiven Spezies bezüglich ihrer Lebenszeit (10^{-9} – 1 s) und Diffusionsstrecke (10^{-12} – 10 m) sehr voneinander (12, 13).

2.1.1 Superoxid-Anion ($\bullet\text{O}_2^-$)

Aufgrund ihrer intrinsischen Reaktionsfreudigkeit können die ROS schnell in die verschiedenen Spezies übergehen. Häufig steht das Superoxid-Anion am Anfang der Reaktion, welches durch die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff entsteht.

Die Ein-Elektron-Reduktion des Sauerstoffs findet insbesondere durch einen Elektronen-Leak der mitochondrialen Atmungskette, im speziellen von Ubisemichinon (QH^-), statt (17):



Die NADPH-Oxidase stellt eine weitere wichtige $\bullet\text{O}_2^-$ Quelle dar:

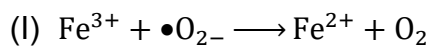


Das Superoxid-Anion wird den schwachen Radikalen zugeordnet. Ein Grund dafür ist die negative Ladung, die durch elektrostatische Wechselwirkungen die Annäherung des Anions an elektronenreiche Zentren behindert. Zudem ist infolge der negativen Ladung die Diffusionsstrecke kurz (320 nm) und der Transfer über Membranen stark behindert. Weiterhin zeigt das Radikal auch eine recht kurze Lebenszeit (50 ms), da es entweder spontan (ca. 10^4 bis $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ je nach Konzentration) oder katalysiert durch die Superoxiddismutase (SOD) schnell dismutiert ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (13, 18). Dies zeigt sich in einer sehr niedrigen Gleichgewichtskonzentration des Anions von 10^{-11} M (14). Aufgrund hoher elektrostatischer Anziehungskräfte reagiert $\bullet\text{O}_2^-$ bevorzugt mit Übergangsmetallen, insbesondere mit Eisen-Schwefel Clustern, was zur Freisetzung von freiem Eisen (Fe^{2+}) führt. Das Superoxid-Anion reagiert zudem rasch mit anderen Radikalen, vor allem mit Stickstoffmonoxid, wobei Peroxynitrit entsteht. Allerdings findet diese Reaktion hauptsächlich am Entstehungsort von $\bullet\text{O}_2^-$ statt, da das Superoxid-Anion im Vergleich zu $\bullet\text{NO}$ eine kürzere Lebensdauer und Diffusionsstrecke aufweist (11, 13). Die Reaktivität und auch die Membran-Diffusion von $\bullet\text{O}_2^-$ wird durch Protonierung zu $\bullet\text{OOH}$ deutlich gesteigert und kann so signifikant zur Lipidperoxidation beitragen (19-21)

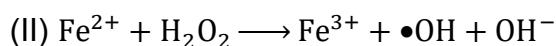
2.1.2 Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$)

Das Hydroxyl-Radikal ist das reaktivste aller Radikale, es reagiert in hoher Geschwindigkeit mit beinahe allen Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydraten und Lipiden. Die Reaktivität spiegelt sich auch in der sehr kurzen Lebenszeit (ca. 10^{-9} s) und geringen Diffusionsstrecke (ca. 4,5 nm) wider. Demzufolge finden die Reaktionen am Bildungsort des Radikals statt, sodass der Aktions- bzw. Schädigungsradius dieses Radikals recht limitiert ist (13). Unter anderem reagiert $\bullet\text{OH}$ mit Lipiden in einer radikalischen Kettenreaktion, der sogenannten Lipidperoxidation. Dabei werden die Lipide oxidiert, die entstehenden Lipid-Radikale können mit verschiedenen Zellstrukturen reagieren und beispielsweise die Zellmembran schädigen (17). Quellen des Hydroxyl-Radikals sind der Haber-Weiss-Zyklus (III) im Rahmen der Fenton-Reaktion (II), zudem entsteht es durch die Homolyse von Peroxynitrit (22-25).

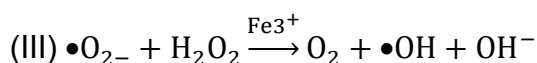
Für den Haber-Weiss-Zyklus wird in einem ersten Schritt Eisen (III) durch Superoxidanionen unter Sauerstoffbildung zu Eisen (II) umgewandelt:



Während der Fenton-Reaktion werden Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid in Anwesenheit eines reduzierten Übergangsmetallkations (z.B. Eisen (Fe^{2+}) oder Kupfer (Cu^+)) gebildet.



Die Gesamtreaktion ergibt sich dann zu:



2.1.3 Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$)

Die reaktive Stickstoffspezies Stickstoffmonoxid, lange nur als endothelium derived relaxing factor (EDRF) bekannt, wurde von Furchgott et al. bzw. Murad et al. bzw. Ignarro et al. identifiziert und 1992 vom Science Magazine zum Molekül des Jahres

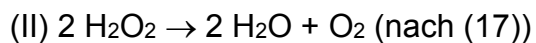
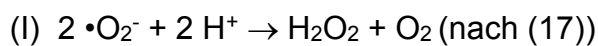
gekürt (26-28). Für diese Entdeckung erhielten die drei Wissenschaftler 1998 den Nobelpreis für Medizin. Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert •NO aus L-Arginin, NADPH mit Hilfe der Kofaktoren FAD und FMN und Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Calmodulin/Calcium (26) •NO ist ein relativ stabiles Radikal und ein sehr schwaches Oxidans. Es besitzt unter allen ROS die längste Lebensdauer (ca. 1 s) und Diffusionsstrecke (10 m) und kann zudem frei über Membranen diffundieren. Gegenüber vielen Biomolekülen zeigt es eine geringe Reaktivität. Vorzugweise interagiert •NO mit freien Radikalen und Metallen, wobei die biologischen Auswirkungen, je nachdem, welches Radikal beteiligt ist, verschieden sind. So zeigt sich bei Reaktion mit Lipid-Radikalen eine protektive Wirkung, da infolge der Reaktion von zwei Radikalen die Lipidperoxidation terminiert wird. Konträr dazu wirkt sich die Reaktion von •NO mit •O₂⁻ durch die Peroxynitrit Bildung schädigend auf die Zellen aus. Mit Metallen reagiert •NO unter anderem zu Metall-Nitrosyl-Komplexen, wichtiges Beispiel ist die Bildung eines Häm-Nitrosylkomplexes innerhalb der löslichen Guanylat-Zyklase (sGC). Infolge dieser Modifikation wird das Enzym aktiviert und eine Vasodilatation initiiert (13). Zusammenfassend zeigt Stickstoffmonoxid abhängig von dessen Konzentration und Redox-Umgebung eine protektive oder eine schädliche Wirkung im Organismus. Unter physiologischen Bedingungen fungiert •NO als Signalmolekül, reguliert die Gefäßweite, hemmt die Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion und wirkt antioxidativ (z.B. bei der Lipidperoxidation). Dem gegenüber zeigt es unter pathologischen Bedingungen, überwiegend vermittelt durch Derivate von •NO wie •NO₂ Radikale, auch toxische Effekte über Schädigung der DNA, Hemmung von Enzymen oder Unterhaltung von oxidativen Prozessen (26). Dies ist überwiegend unter Entzündungsbedingungen zu beobachten, wenn die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) große Mengen •NO bildet (29).

2.1.4 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Wasserstoffperoxid ist ein schwaches nicht-Radikal und zeichnet sich durch eine recht lange Lebenszeit (ca. 1 ms) und große Diffusionsstrecke (ca. 1,5 mm) aus (13), sodass es als relativ stabile ROS angesehen werden kann. Als unpolares Molekül kann es zudem Membranen passieren, zusätzlich wird der Membrantransport durch

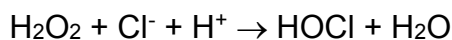
Aquaporine erleichtert (30). Mit freien Eisen-Schwefel-Clustern, Glutathion, und freien Cystein- und Methionin-Resten (von Aminosäuren) reagiert es sehr langsam. In Bezug auf Reaktionen mit Cystein-Resten ist die Reaktionsgeschwindigkeit allerdings vom Ionisierungs-Grad des Cysteins abhängig. Zudem wird die Geschwindigkeit auch vom Protein selbst, dessen Struktur und Umgebung bestimmt. So kann die Reaktionsgeschwindigkeit bei spezifischen Proteinen bis zu $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ betragen, dem 10^6 -fachen gegenüber Cystein-Resten in anderen Proteinen. Dies stellt eine wichtige Basis für die Selektivität und Spezifität von H_2O_2 dar, die eine wichtige Rolle in der Redox-basierten Signalübertragung spielt (11, 13).

Zu den H_2O_2 Quellen zählen als direkte Quellen die NADPH Oxidase (NOX4, DuOX 1 und 2) oder Superoxidquellen in Verbindung mit der SOD (ca. 40% der Zellproduktion) (Vgl. Reaktion I) und die mitochondriale Atmungskette (45% der Zellproduktion) (11, 31). Der Abbau erfolgt überwiegend enzymatisch mit Hilfe von über 15 verschiedenen Enzymen, u.a. durch die Katalase (Vgl. Reaktion II) (17).



2.1.5 Hypochlorige Säure (HOCl)

Die reaktive Spezies hypochlorige Säure (HOCl) wird hauptsächlich durch die Myeloperoxidase aus Wasserstoffperoxid, Chlorid-Ionen und einem Proton in Lysosomen von neutrophilen Granulozyten gebildet (13, 17, 32), wie in der nachfolgenden Reaktion gezeigt.

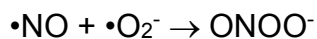


Die HOCl weist eine moderate Reaktivität auf, ist aber dennoch für Zellen toxisch und wird von neutrophilen Granulozyten zur Pathogenabwehr eingesetzt. Unter pathologischen Bedingungen ist diese ROS maßgeblich an Gewebeschäden beteiligt, die mit Phagozyten-vermittelter Entzündung assoziiert werden. HOCl kann mit Thiol- und Aminogruppen von Proteinen reagieren. Dies führt zur Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen, resultierend in einer veränderten Tertiärstruktur bis hin zur Aggregation von Proteinen. Durch Reaktion mit ungesättigten Fettsäuren und

Cholesterin kann zudem die Permeabilität von Membranen verändert werden (13, 17).

2.1.6 Peroxynitrit (ONOO⁻)

Das nicht-Radikal Peroxynitrit (ONOO⁻) zählt zu den reaktiven Stickstoffspezies und hat infolge seiner hohen Reaktivität eine kurze Lebensdauer von etwa 10 bis 20 ms (13). ONOO⁻ geht aus der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit dem Superoxid-Anion hervor:



Diese Reaktion verläuft spontan, ist diffusionskontrolliert und bedarf keiner Katalyse. Aufgrund der geringen Lebensdauer und Diffusionsstrecke des Superoxid-Anions findet diese Reaktion an der Bildungsquelle des $\bullet\text{O}_2^-$ statt (26). Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit ($1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vs. Dismutation von $\bullet\text{O}_2^-$ durch SOD: $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) hat zur Folge, dass die Reaktion zum starken Umsatz von Stickstoffmonoxid führen kann und konsekutiv dessen Bioaktivität verringert. In Verbindung mit einem hohen $\bullet\text{O}_2^-$ Angebot, kann das die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion fördern (vgl. 2.1.9.1) (18, 26). Als starkes Oxidans vermag ONOO⁻ zudem mit verschiedenen Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren in Ein-Elektron- (z.B. mit Übergangsmetallen) oder Zwei-Elektronen-Übertragungsreaktion (z.B. Thiole) zu reagieren (26). Über radikalische Derivate $\bullet\text{CO}_3^-$, $\bullet\text{NO}_2$ und $\bullet\text{OH}$, die aus der Reaktion von Peroxynitrit mit Kohlenstoffdioxid hervorgehen, oxidiert ONOO⁻ am häufigsten Zielstrukturen (13).



Eine wichtige Peroxynitrit assoziierte posttranslationale Proteinmodifikation ist die Nitrierung von Tyrosin-Resten. Diese kann erhebliche Veränderungen in der Proteinstruktur verursachen und die Proteinfunktion beeinflussen. Zudem können dadurch auch Phosphorylierungskaskaden verändert werden, was zu veränderten Signalwegen in der Zelle führt (26, 33). Physiologisch sind RNS an der Pathogen-Abwehr beteiligt und werden u.a. von Phagozyten synthetisiert (34). Pathologisch

erhöhte Konzentrationen von Peroxynitrit werden mit vielen Krankheiten, insbesondere mit kardiovaskulären und neurologischen Pathologien assoziiert (33).

Die Abbildung 2-1 stellt die wichtigsten Bildungsmechanismen der RONS schematisch dar.

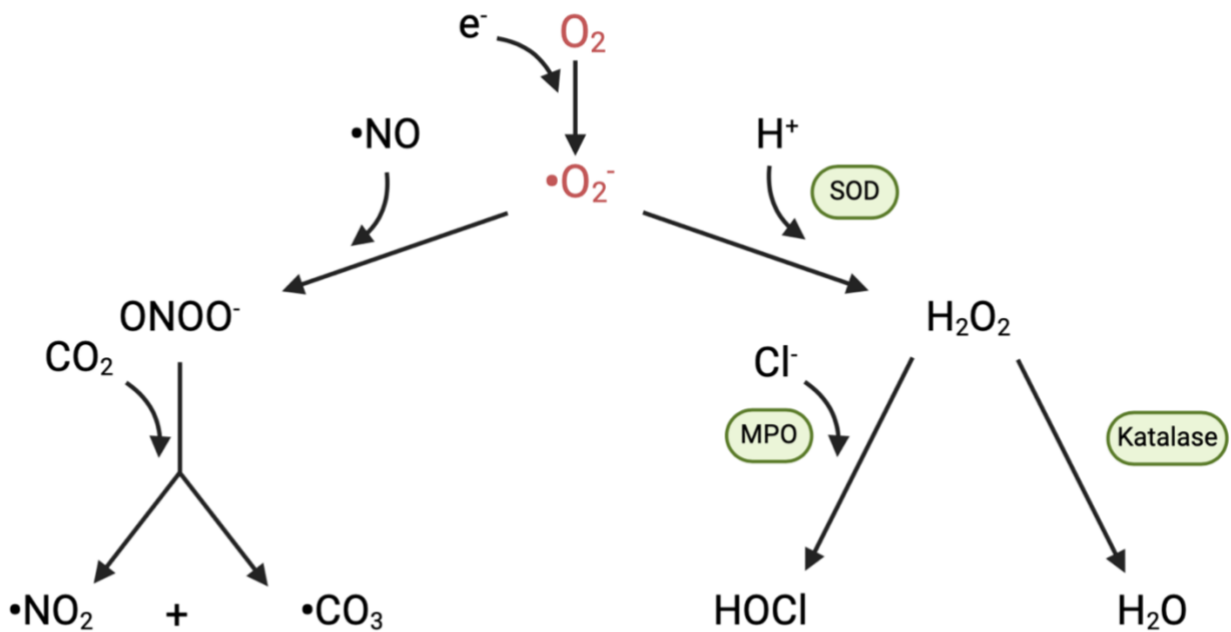


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung wichtiger RONS. Superoxiddismutase (SOD), Myeloperoxidase (MPO). Modifiziert nach (35). Erstellt mit BioRender.com.

2.1.7 Redox-basierte Signalübertragung und Eustress

Aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit reagieren RONS in anhaltend hoher Konzentration mit vielen verschiedenen Stoffen, wie etwa Nukleinsäuren, Aminosäuren und Proteinen, sowie Kohlenhydraten und Lipiden. Dabei können sie die Funktion der Substanzen reversibel oder irreversibel verändern oder diese gar zerstören. Infolgedessen wurden RONS in der Vergangenheit als überwiegend schädlich angesehen und mit Krankheiten und Pathologien assoziiert (10, 36). Neue Erkenntnisse in der Redox-Forschung zeigen indes, dass RONS in der Physiologie eine fundamentale Bedeutung für viele verschiedene Zellfunktionen haben (11).

Streng reguliert sind sie etwa an der Pathogenabwehr, zellulären Homöostase und Signalübertragung beteiligt.

Als Redox-basierte Signalübertragung (*engl. redox signaling*) wird die Übertragung von Signalen im biologischen System durch Elektronen-Übertragungs-Reaktionen (Redox-Reaktionen) bezeichnet. Die Reaktion der Zelle auf Oxidations- oder Reduktionsmittel sowie Veränderungen im zellulären Redox-Status löst eine Reihe von nachfolgenden Effekten aus, welche entweder direkt oder durch sogenannte Redox-Relais (d.h. über Zwischenschritte) vermittelt werden können (11).

Aufgrund seiner Eigenschaften ist Wasserstoffperoxid das wichtigste Signalmolekül in der Redox-Signalübertragung. Ähnlich wie Calcium hat es eine vielfältige Wirkung und beeinflusst verschiedene biologische Eigenschaften und Prozesse. Analog wird dessen Konzentration streng kontrolliert und auf einem niedrigen Niveau gehalten (1 – 100 nM), sodass sich ein Gleichgewichtszustand (*steady state*) einstellt. In diesem physiologischen Gleichgewichtszustand werden spezifisch Proteine oder andere Makromoleküle durch H₂O₂ oxidiert und in ihrer Struktur, Aktivität, Funktion und Lokalisation modifiziert. Dieser Erhalt des Gleichgewichtszustandes der Konzentrationen und der damit einhergehenden physiologischen Funktionen wird auch als oxidativer Eustress bezeichnet (11) und ist Voraussetzung für eine physiologische Redox-Signalübertragung. Die Thiol-basierte Modifizierung der Zielproteine ist dabei der Hauptmechanismus, durch den die ROS ihre biologischen Effekte in der Redox-Regulation ausüben. Auf Systemebene spielt die Redox-Signalübertragung eine wichtige Rolle und ist unter anderem an der Regulation des Blutdrucks und des Immunsystems beteiligt und wirkt sich zudem auf die Angiogenese und kognitive Funktion aus (10, 11, 13, 36, 37). Daneben tragen niedrige ROS Spiegel zur Präkonditionierung bei, indem Schutzsysteme unterschwellig aktiviert werden und so nachfolgenden schweren Stresssituationen besser entgegenwirken können (38-40).

2.1.7.1 S-Nitros(yl)ierung

Die S-Nitros(yl)ierung ist neben der Phosphorylierung einer der wichtigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen und beschreibt die oxidative Modifikation

von Proteinen durch Stickstoffmonoxid. Durch kovalente Bindung einer Nitroso-Gruppe an die Thiol-Gruppen von Cystein-Resten werden S-Nitrosothiole gebildet, wodurch die Proteinstruktur und Elektronenübertragungen während der Katalyse signifikant beeinflusst und dadurch die Stabilität, Aktivität, Lokalisation und Funktion der Proteine reguliert wird (41). Über diese Redox-basierte Signalgebung werden zahlreiche Effekte des Stickstoffmonoxids, unabhängig von cGMP, vermittelt (42). Mit Blick auf das kardiovaskuläre System werden nahezu alle Aspekte durch diese Proteinmodifikation beeinflusst, wobei diese mit protektiven, aber auch schädlichen Effekten assoziiert werden (43-48).

Ungleich der Phosphorylierung erfolgt die kovalente Bindung der Nitroso-Gruppe nicht-enzymatisch. Zudem werden die funktionellen Gruppen der Cystein-Reste nicht ubiquitär modifiziert, stattdessen erfolgt die Nitros(yl)ierung an spezifischen Thiol-Gruppen. Ermöglicht wird diese Spezifität durch die Reaktionsfreudigkeit des Thiols, welche durch zahlreiche elektrostatischen Wechselwirkungen beeinflusst wird (49).

•NO selbst reagiert als schwaches Radikal kaum mit Thiol-Resten. Vielmehr scheint •NO mit O₂ unter Bildung von reaktiven Stickstoffoxiden (•NO₂, N₂O₃, N₂O₅, ONOO⁻) zu reagieren, die bevorzugt Nitroso-Verbindungen oder Nitrierungen erzeugen (50-52). Distickstofftrioxid (N₂O₃), eines der bedeutendsten nitrosierenden Substanzen, entsteht durch die Autooxidation von •NO bzw. Reaktion mit •NO₂. Diese Autooxidation, eine Reaktion zweiter Ordnung, verläuft bevorzugt in einer hydrophoben Umgebung, in der sich die hydrophoben Gase •NO und O₂ anreichern und so die Reaktionsgeschwindigkeit um ein Vielfaches steigern (53). Allerdings ist die Reaktion unter niedrigen physiologischen •NO und O₂ Konzentrationen sehr langsam, da zwei •NO Moleküle in die Reaktion einfließen. Daneben stellt der Zerfall von Peroxynitrit im neutralen bis alkalischen pH Bereich eine signifikante Quelle für N₂O₃ dar. Nitrit stellt neben •NO eine weitere N₂O₃ Quelle dar. Unter den starken aziden Bedingungen im Magen kann N₂O₃ aus Nitrit über die Bildung von salpetriger Säure entstehen. Die S-Nitros(yl)ierung entsteht aus der Reaktion eines Nitrosonium-Kation (NO⁺) mit der Thiolgruppe, das als starkes Elektrophil das nukleophile Schwefelatom angreift und eine Nitrosyl-Gruppe ausbildet. N₂O₃ dissoziiert teilweise zu NO⁺ und NO₂⁻ und fungiert hier als stabiler NO⁺ Donor, da das Kation in hydrophiler Umgebung umgehend mit Wasser zu NO₂⁻ reagiert (Vgl. Reaktion I – IV) (54, 55).

- I. $\bullet\text{NO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \bullet\text{NO}_2$
- II. $\bullet\text{NO}_2 + \bullet\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}_3$
- III. $\text{N}_2\text{O}_3 \leftrightarrow \text{NO}^+ \dots \text{NO}_2^-$
- IV. $\text{NO}^+ + \text{R-SH} \rightarrow \text{R-SNO} + \text{H}^+$

2.1.8 Oxidativer Stress

In den Anfängen wurde der Begriff oxidativer Stress als eine Störung des Gleichgewichts zwischen dem prooxidativen und antioxidativen System zu Gunsten der prooxidativen Komponente definiert (56). In Hinblick auf die Einführung des Konzepts der redox-basierten Signalübertragung, die den RONS eine fundamentale Rolle in der Physiologie als Signalträger zuschreibt, musste die Definition weiterentwickelt werden. Gemäß der aktuellen Definition wird oxidativer Stress als ein Missverhältnis zwischen Oxidationsmitteln und Antioxidantien bezeichnet, dass die Redox-Signalübertragung und -kontrolle beeinträchtigt und/oder zu molekularen Schäden führt (16).

Oxidativer Stress ist durch eine Überproduktion von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (oder einem verringerten Abbau durch antioxidative Systeme) und einem veränderten Redox-Zustand gekennzeichnet. Oxidativer Stress tritt auch auf, wenn die zellulären Reparatursysteme die oxidativen Schäden in wichtigen Biomolekülen wie Proteine oder RNA/DNA nicht mehr ausreichend beseitigen können. Er führt über die unkontrollierte Oxidation von Proteinen und gestörte Signalübertragung zu Entzündungsreaktionen, Fibrose, und Apoptose. Diese Veränderungen sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie etwa Atherosklerose, arterielle Hypertonie, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung, Alzheimer und Krebs assoziiert (17, 57, 58). Die wichtigsten mit dem kardiovaskulären System assoziierten RONS Entitäten sind das Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid, Stickstoffmonoxid und Peroxynitrit (57).

Im kardiovaskulären System sind verschiedene RONS-Quellen von Bedeutung. Zu den wichtigsten zählen die NADPH Oxidase, die mitochondriale Atmungskette, das endoplasmatische Retikulum, die Xanthinoxidase und die (entkoppelte) $\bullet\text{NO}$ Synthase (s. Abbildung **2-2**). Von diesen nimmt die NADPH Oxidase eine zentrale

Stellung ein, da sie eine primäre enzymatische (ROS) Quelle darstellt und damit die Aktivität von anderen redox-sensitiven Enzymen stimuliert. Dies weist darauf hin, dass es eine signifikante Kommunikation zwischen diesen verschiedenen Systemen gibt (59-63). Auch die mitochondriale Atmungskette ist eine Quelle der permanenten ROS Bildung, da ein geringer Prozentsatz der transportierten Elektronen für die ATP Synthese (bis zu 2%) auf molekularen Sauerstoff fehlgeleitet werden und so Superoxidanionen bilden (64-67). Nachfolgend werden die Quellen detailliert dargestellt (s. Abbildung 2-2).

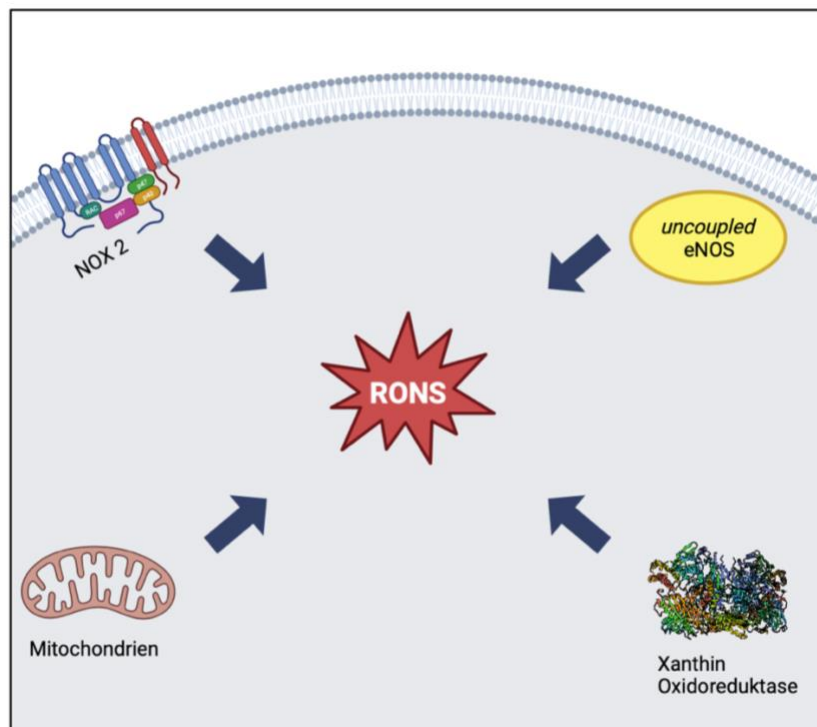


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung wichtiger RONS Quellen. NADPH Oxidase 2 (NOX 2), endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS). Modifiziert nach (68). Erstellt mit BioRender.com.

2.1.8.1 NADPH Oxidase (NOX)

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (genauer $\cdot\text{O}_2^-$) ist die Hauptfunktion der NADPH Oxidase, was sie von den anderen enzymatischen Systemen unterscheidet (61). NOX katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxid-Anion ($\text{NADPH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + 2 \cdot\text{O}_2^-$) welches anschließend durch die SOD zu Wasserstoffperoxid dismutiert werden kann. Die NOX zählt zu den Haupterzeugern von Superoxid-Anionen, die in physiologischer Konzentration für

zahlreiche Vorgänge wie Signalübertragung, Zellwachstum, -differenzierung und -migration sowie Infektionsabwehr unerlässlich sind (69). Dem gegenüber ist eine unregulierte und übermäßige Produktion von ROS ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen (70-72). Diese NOX-generierten ROS können nachfolgend weitere oxidative Systeme stimulieren und/oder zur Entstehung sekundärer reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies beitragen. Zum Beispiel durch die Bildung von Peroxynitrit aus Reaktion von $\bullet\text{O}_2^-$ mit $\bullet\text{NO}$, durch die Peroxidase-katalysierte Erzeugung von Hypochlorsäure oder durch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen in der von Eisen-Ionen katalysierten Fenton-Reaktion (62, 63). Aufgrund dieser Interaktion NOX-generierter ROS wird die NADPH Oxidase, insbesondere im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, neben den Mitochondrien als primäres Oxidase System respektive primäre ROS-Quelle betrachtet (59, 60, 70, 71).

Insgesamt sind bis heute sieben Isoformen der NADPH-Oxidase identifiziert worden (NOX1-NOX5, DuOX 1 (dual oxidase) und duox 2), die sich hinsichtlich ihrer Struktur und ihrem gewebespezifischen Expressionsmuster unterscheiden. NOX1, NOX2, NOX4 und NOX5 werden von Endothelzellen exprimiert, während glatte Gefäßmuskelzellen NOX 1, NOX4 und NOX5 exprimieren (61). Allen NOX ist gemein, dass sie aus einem katalytischen Zentrum, mehreren Transmembrandomänen (NOX1-5 sechs Transmembrandomänen, duox1-2 sieben Transmembrandomänen) und regulatorischen Untereinheiten ($\text{p}22^{\text{phox}}$, $\text{p}47^{\text{phox}}$, $\text{p}67^{\text{phox}}$, $\text{p}40^{\text{phox}}$) bestehen. Diese Transmembrandomänen setzen sich unter anderem aus einer Häm-bindenden Region und FAD- bzw. NADPH-bindenden Domänen zusammen (73). Durch sequenziellen Elektronen-Transfer von NADPH zu FAD und anschließenden von Häm-Gruppen auf molekularen Sauerstoff wird das Superoxid-Anion erzeugt (61, 74). $\text{p}22^{\text{phox}}$ ist die einzige membrangebundene Untereinheit und wird für die Aktivierung der Enzyme NOX1-4 benötigt. Unabhängig von $\text{p}22^{\text{phox}}$ erfolgt die Aktivierung von NOX5, welche interessanterweise nicht in Nagetieren exprimiert wird (63). Die Abbildung **2-3** stellt den Aufbau bzw. die einzelnen Komponenten sowie die gewebespezifische Expression der für das kardiovaskuläre System wichtigsten NOX-Isoformen zusammenfassend dar.

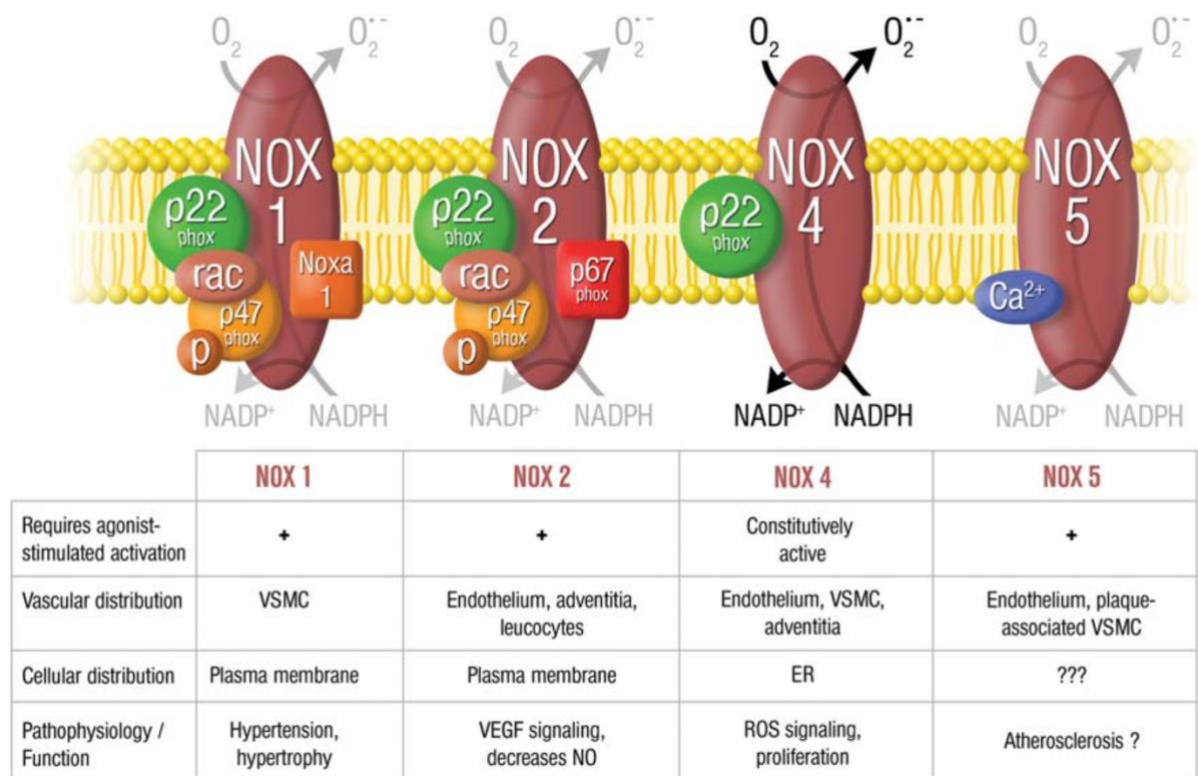


Abbildung 2-3: Isoformen der NADPH Oxidase. Übersicht der in den Gefäßen exprimierten NADPH Oxidase Isoformen. p22^{phox} ist mit den Oxidasen NOX 1, 2 und 4 assoziiert und wird für deren Aktivierung benötigt. Die Aktivierung von NOX 5 erfolgt unabhängig von p22^{phox} durch Kalzium [Abbildung aus (75)].

Die Aktivierung der jeweiligen Oxidasen verläuft unterschiedlich, nachfolgend soll exemplarisch die Aktivierung der NOX2 dargestellt werden. NOX2 ist die erste isolierte Isoform und wird hauptsächlich in Phagozyten exprimiert. Die synthetisierten ROS werden zur Pathogenabwehr eingesetzt. Weiterhin ist sie aber auch im geringeren Umfang im Herzen, in Gefäßen, in den Nieren und im Gehirn zu finden (63, 76). Im inaktiven Zustand ist die NOX zusammen mit ihrer Untereinheit p22^{phox} an der Membran gebunden, während die weiteren Untereinheiten p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} im Zytosol lokalisiert sind. Eine weitere essenzielle Komponente ist die kleine GTPase p21-RAC1. Unter Aktivierung des NADPH-Oxidase Systems bindet die GTPase an den NOX2-p22^{phox} Komplex, die p47^{phox} Untereinheit wird durch die Proteinkinase C phosphoryliert und zusammen mit den anderen zytosolischen Untereinheiten an die Membran rekrutiert (61, 77). Dabei ermöglicht die Phosphorylierung der p47^{phox}-Untereinheit die Interaktion mit der p22^{phox} Untereinheit. Die Rekrutierung und Bindung der zytosolischen Komponenten führt zur Aktivierung der NOX2 (61, 78, 79) (s. Abbildung 2-4). Diese Aktivierung wird im weiteren Verlauf intensiviert, da die erzeugten ROS die Tyrosin-Kinase Src aktivieren, die wiederum über zusätzliche Signale die GTPase RAC1/2 stimuliert (61, 80). Die NOX1 wird

ähnlich wie die NOX2 reguliert, allerdings tritt anstelle des p47^{phox} die regulierende Untereinheit NOXO1 (für Nox organizing protein 1) und anstelle des p67^{phox} die regulierende Untereinheit NOXA1 (für Nox activating protein 1) (81-83).

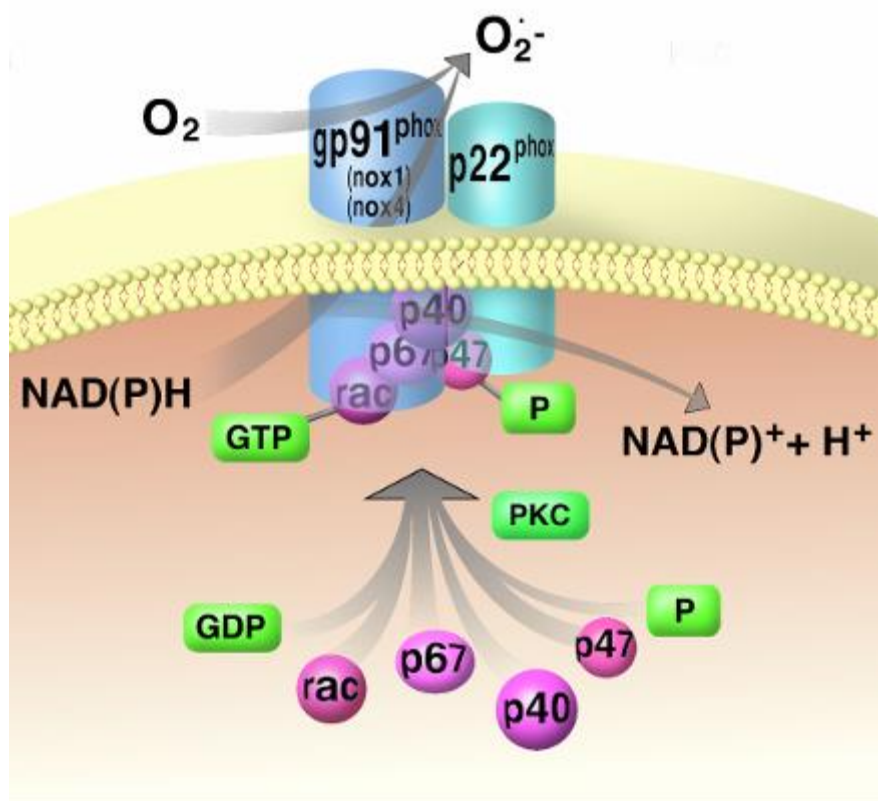


Abbildung 2-4: Aktivierungsschema der NADPH Oxidase 2. Schematische Darstellung der Aktivierung der NOX2 (gp91^{phox}). Für die Aktivität der NOX2 ist die membrangebundene Untereinheit p22^{phox} notwendig. Zudem ist die Rekrutierung zahlreicher Komponenten aus dem Zytosol erforderlich. Der Ablauf der Aktivierung wird im Kapitel 2.1.8.1. ausführlich beschreiben. Die intrinsische Verstärkung Aktivierung durch die Tyrosin-Kinase Src ist in dieser Abbildung nicht dargestellt. [Abbildung aus (79)].

Die NOX4 wird überwiegend über ihr Expressionslevel reguliert und für deren Aktivierung wird lediglich die p22^{phox} Untereinheit benötigt (61). Eine weitere Besonderheit ist, dass NOX4 konstitutiv aktiv ist und neben Superoxid-Anionen auch Wasserstoffperoxid produziert. Unter anderem wird die Oxidase in Kardiomyozyten, Endothelzellen und in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert (63). Im Mausmodell ist sie sowohl mit kardioprotektiven als auch schädlichen Eigenschaften assoziiert (63, 84, 85). Ungleich der NOX1 und NOX2 scheint sie bei der Atherosklerose protektiv zu wirken, was insbesondere mit dem gebildeten Wasserstoffperoxid in Verbindung gebracht wird. So reagiert H₂O₂ nicht mit •NO zu

Peroxynitrit. Je nach Konzentration und Gewebe bzw. Zelltyp reguliert es die Proliferation von Zellen, vaskuläre Entzündungen sowie Umbauprozesse in protektiver oder schädlicher Richtung (62, 86-89). Eine protektive Wirkung, die H₂O₂ zugeschrieben wird, ist die Vasodilatation als Teil der sogenannten *endothelium-derived hyperpolarizing factors* (EDHFs) (90-92). Indessen wird die NOX4 auch mit Pathologien wie ischämischer Schlaganfall, Hypertrophie des Herzens und diabetischer Kardiomyopathie assoziiert (62).

NOX5 ist die zuletzt charakterisierte Oxidase und weist neben dem Fehlen im murinen Genom als weitere Besonderheit eine gänzlich unabhängige Aktivität von der p22^{phox} Untereinheit bzw. anderen zytosolischen Komponenten auf (61). Vielmehr wird deren Aktivität über Kalzium (Ca²⁺) reguliert. Dafür besitzt sie am N-terminalen Ende eine Calmodulin-Domäne als Bindungsstelle für Ca²⁺. Eine erhöhte Kalziumkonzentration führt zur Konformationsänderung am N-terminalen Ende, welche eine Interaktion mit dem C-terminalen Ende ermöglicht und konsekutiv zur Aktivierung der NOX5 führt (93, 94). Zudem kann die Aktivität durch eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C, Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II und Mitogen-aktivierte Kinase positiv beeinflusst werden (63, 95-97). Im menschlichen Gewebe wird NOX5 ubiquitär exprimiert und ist im kardiovaskulären System eine maßgebliche ROS-Quelle. Sie wird durch verschiedene vasoaktive Substanzen (AT-II), Wachstumsfaktoren (*platelet derived growth factor*) und Entzündungsmediatoren (Zytokine) aktiviert (63). Eine hochregulierte Expression dieser NOX Isoform konnte in atherosklerotischen Läsionen, bei Patienten mit arterieller Hypertonie und diabetischer Nephropathie festgestellt werden (62).

Als weitere NOX Isoformen finden sich noch die NOX1, NOX3 sowie DuOX1 und DUOX2. NOX1 ist ein wichtiger Treiber der kardiovaskulären Inflammation und Fibrose und wird mit Atherosklerose und arterieller Hypertonie assoziiert (62, 63). NOX3 wird beinahe ausschließlich im Innenohr exprimiert und ist für den Gleichgewichtssinn und Bildung von Otokonien (Otolithen) (98), aber auch Hörverlust durch Lärm verantwortlich (99, 100). DUOX1 und 2 weisen beide eine ähnliche Struktur wie NOX5 auf und werden ebenfalls durch Kalzium aktiviert. Sie spielen insbesondere in der Schilddrüse eine wichtige Rolle bei der Thyroidhormon Synthese (36, 61).

2.1.8.2 Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS)

Stickstoffmonoxid, der wichtige Mediator des vaskulären Systems und kleinstes bekanntes Signalmolekül, wird durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert. Bisher sind drei verschiedene Isoformen charakterisiert worden, die endotheliale (eNOS), induzierbare (iNOS) und neuronale NO-Synthase (nNOS). Im Hinblick auf das kardiovaskuläre System spielt die eNOS eine zentrale Rolle (101).

Die eNOS ist ein homodimeres Enzym, welches an ihrem N-terminalen Ende eine Oxygenase und am C-terminalen Ende eine Reduktase Domäne aufweist. Durch Dimerisierung wird ein Elektronen-Transfer von der Reduktase-Domäne des einen Monomers zur Oxidase-Domäne des anderen Monomers ermöglicht. Die Dimer-Struktur wird durch Häm-Bindung und durch einen Zink-Schwefel-Komplex an der Dimer-Schnittstelle stabilisiert (102-104). Weiterhin können die Reduktase-Domänen das Kalzium bindende Protein Calmodulin binden. Für die •NO Synthese dient die Aminosäure L-Arginin als Substrat. Molekularer Sauerstoff sowie reduziertes NADPH werden als Kosubstrat verwendet. Zudem sind für die Synthese die Kofaktoren Flavin Adenin Dinukleotid (FAD), Flavin Mononucleotid und (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH₄) notwendig. Unter physiologischen Bedingungen katalysiert die eNOS den Elektronen-Transfer vom am C-terminalen Ende gebundenen NADPH über FAD und FMN des einen Monomers zum Häm-haltigen N-terminalen Ende der Oxygenase Domäne des anderen Monomers. Durch die Reduktion von Häm wird die Bindung und Reduktion von molekularem Sauerstoff ermöglicht. BH₄ liefert dabei ein weiteres Elektron, wodurch der Sauerstoff aktiviert und nachfolgend die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und •NO ermöglicht. Der inter-Domänen Elektronen-Transfer wird durch Calmodulin gefördert (105-109). Zudem stellt Calmodulin einen wichtigen Regulationsmechanismus der NOS dar (103). Die Bindung von Calmodulin ist dabei von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängig; bei vermehrten Kalzium bindet Calmodulin an die NOS und stimuliert deren Aktivität (110). Weiterhin wird die Aktivität über Phosphorylierung, Acetylierung, S-Nitros(yl)ierung, S-Glutathionierung und Protein-Protein Interaktionen (e.g. Caveolin und *heat shock proteins*) reguliert (106, 111, 112).

Gemäß des „Zündelnden-Radikal-Konzepts“ (engl. *kindling radikal hypothesis*) im Kontext von oxidativem Stress führt die anfängliche Bildung von RONS über

verschiedene Entkopplungsmechanismen zur weiteren oxidativen Schädigung von Schlüsselenzymen (insbesondere der eNOS) und konsekutiv zur vermehrten RONS Produktion (113, 114). Die Änderung der enzymatischen Aktivität bzw. Entkopplung der NOS wird über sog. Redox-Schalter (engl. *redox-switches*) vermittelt (115). Diese eNOS-Entkopplung ist durch eine Produktion von Superoxid-Anionen statt Stickstoffmonoxid gekennzeichnet. Infolge ist nicht nur die Produktion des protektiven Stickstoffmonoxids vermindert, vielmehr werden durch die entkoppelte eNOS Superoxid-Anionen generiert und der oxidative Stress aggraviert. In der Konsequenz wird die biologische Umgebung (des Endothels) von einem anti-atherosklerotischen und protektiven Phänotyp in einen pro-atherosklerotischen Phänotyp umgewandelt (106, 115, 116). Die Entkopplung der eNOS zählt zu den zentralen Pathomechanismen, die zur endothelialen Dysfunktion führen (Vgl. 2.1.9.1). Diese Dysfunktion stellt ein prägnantes Merkmal für kardiovaskuläre Erkrankungen und zugehörige Risikofaktoren dar (106).

Die wichtigsten redox-basierten Modifikation der eNOS werden in der Abbildung **2-5** zusammengefasst. Einen von den oben erwähnten Redox-Schaltern stellt die oxidative Depletion von BH₄ dar und ist der am besten untersuchte Mechanismus, der zur Entkopplung der eNOS führen kann. BH₄ ist dabei aus mehreren Gründen für die Funktion der Synthase wichtig. Zum einen wirkt es als redox-sensitiver Kofaktor und stellt selbst ein Elektron für die katalytische Reaktion zur Verfügung. Zudem verschiebt es das Häm-Eisen in einen high-spin Zustand und erleichtert dadurch die Bindung von Arginin. Weiterhin ist es an der Stabilisierung des Homodimers beteiligt (117). Die Produktion von BH₄ erfolgt in der Zelle entweder durch *de novo* Synthese mit Hilfe der Guanosin Triphosphate Zyklohydrolase I (GTPCH) oder über den Salvage Pathway, in dem BH₄ katalysiert durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus BH₂ regeneriert wird. Unter oxidativem Stress wird BH₄ vom Superoxid-Anion und von Peroxynitrit (mit sehr hoher Reaktionsgeschwindigkeit) zu BH₂ oxidiert, sodass der eNOS der wichtige Kofaktor BH₄ fehlt (118). Zusätzlich wird das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der BH₄ Synthese (GTPCH) durch das durch •O₂⁻ und ONOO⁻ aktivierte 26S Proteasom abgebaut (119, 120). Zusammenfassend beeinflusst der Redox-Status der Zelle die Verfügbarkeit negativ in zweierlei Weise, einerseits über direkte Depletion des Kofaktors und andererseits über den Abbau der Synthese-Enzyme.

Ein weiterer redox-sensitiver Signalweg, der die Funktion der eNOS beeinflusst, ist die oxidative Störung des Zink-Schwefel-Komplexes an der Dimer-Schnittstelle. Die Oxidation des Komplexes, insbesondere durch Peroxynitrit, führt zur Destabilisierung der Dimerstruktur und in der Folge zur eNOS Entkopplung (115).

Ferner wird die eNOS durch Phosphorylierung von Threonin⁴⁹⁵ bzw. Tyrosin⁶⁵⁷ mittels Proteinkinase C resp. Proteintyrosinkinase 2 sowie durch S-Glutathionylierung der Reduktasedomäne in ihrer Funktion modifiziert. Während die S-Glutathionylierung an einem bestimmten Cystein-Thiol-Rest eindeutig eine Entkopplung bewirkt, ist dies für die beiden Phosphorylierungen noch nicht belegt – diese wurden bislang lediglich als inhibierend für die eNOS beschrieben. Zudem kommt eine durch ROS getriggerte Akkumulation des natürlichen eNOS-Inhibitors asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA) und L-Arginin Substratmangel in Betracht (106, 115).

Ergänzend bleibt festzuhalten, dass alle genannten Mechanismen gleichzeitig ablaufen können und sich nicht gegenseitig ausschließen. Weiterhin können auch die nachgeschalteten Signalwege, z.B. •NO/cGMP Signalweg, durch ROS verändert oder gar inaktiviert werden (115). Die Abbildung **2-5** fasst die redox-basierten Modifikationen der eNOS zusammen.

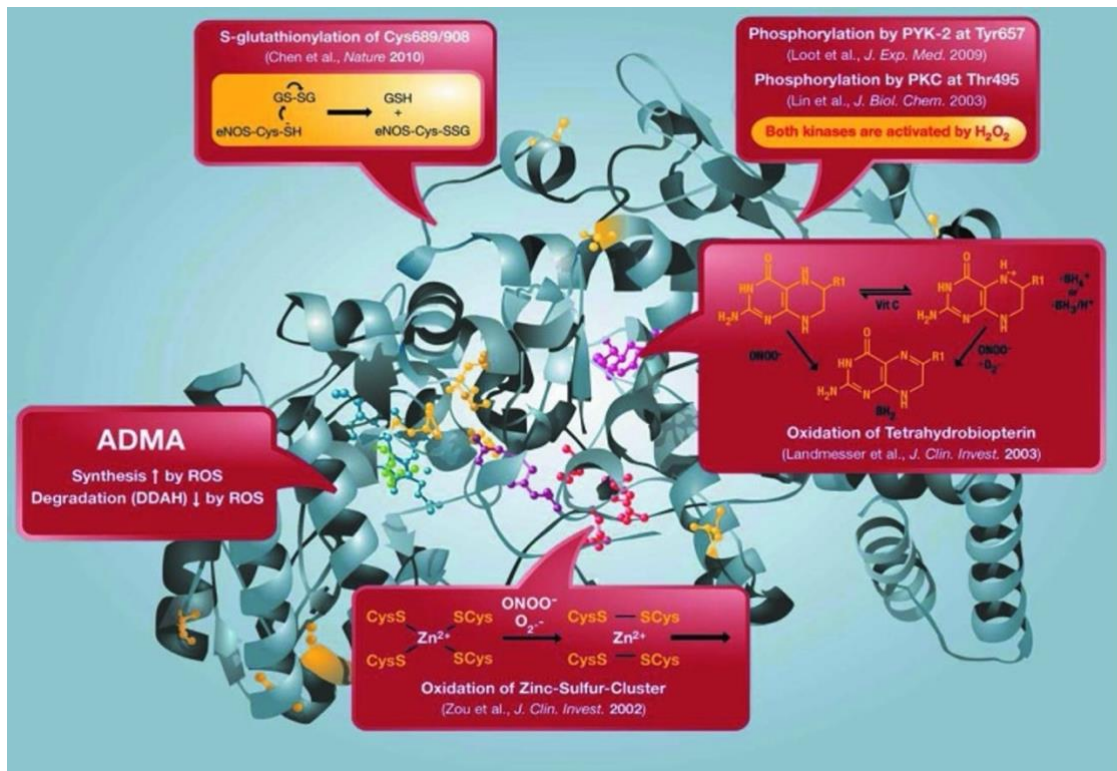


Abbildung 2-5: Redox-basierte Modifikation der eNOS und Darstellung der Röntgenstruktur der humanen eNOS. RONS können bei oxidativem Stress über sog. Redox-Schalter (engl. redox switches) zur Entkopplung der eNOS führen. Infolge werden durch das Enzym statt Stickstoffmonoxid Superoxid-Radikale produziert. Die wichtigsten biochemischen Modifikationen sind in den roten Kästen dargestellt. Die Mechanismen werden ausführlich im Kap. 2.1.8.2 beschrieben. [Abbildung aus (66)].

2.1.8.3 Die mitochondriale Atmungskette

Mitochondrien, die Kraftwerke der Zelle, sind multifunktionale und durch eine Lipiddoppelmembran abgegrenzte kleine Organellen, deren Hauptaufgabe es ist durch die oxidative Phosphorylierung den Universalenergieträger ATP herzustellen. Dieser Prozess basiert auf der Erzeugung eines elektrochemischen Protonengradienten, welcher durch die mitochondriale Elektronentransportkette aufgebaut wird. Diese Elektronentransportkette besteht aus fünf hintereinander geschalteten Multienzymkomplexen (I, II, III, IV und V). Bei der Übertragung der Elektronen (bereitgestellt von Elektronendonatoren wie NADH oder Succinat aus dem Citratzyklus) entlang dieser Kette auf molekularen Sauerstoff wird Energie freigesetzt. Diese Energie wird dazu verwendet Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum zu pumpen. Der erzeugte Protonengradient treibt durch elektrochemische Kopplung das Enzym ATPase an, welche konsekutiv ATP aus

ADP synthetisiert. Normalerweise ist dieser Elektronentransport effizient, und der Elektronenverlust (engl. *electron leak*) ist gering (121, 122). Der Elektronenverlust ist dadurch charakterisiert, dass die Elektronen vor der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser am Komplex IV der Atmungskette, bereits an Komplex I, II und III austreten und stattdessen durch eine Ein-Elektronen Reduktion von molekularem Sauerstoff Superoxid-Anionen bilden (64).

Unter physiologischen Bedingungen werden die natürlich anfallenden $\bullet\text{O}_2^-$ Radikale durch die Superoxiddismutase 2 zu Wasserstoffperoxid dismutiert und weiter mittels der Glutathionperoxidase 1 zu Wasser umgesetzt, sodass der mitochondriale ROS Beitrag zum Zell-Redox-Status gering bleibt (63).

Bei oxidativem Stress wirken zytosolische ROS (hauptsächlich durch die NOX produziert) auf die Mitochondrien ein, fördern den Elektronenverlust an der Elektronentransportkette und führen zu mitochondrialem oxidativem Stress und Dysfunktion (63). Ein grundlegender Mechanismus scheint die Aktivierung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ Kanals durch die redox-sensitive PKC zu sein. Infolge des erhöhten Kalium-Influx wird die ROS Produktion durch die mitochondriale Atmungskette gefördert (61, 65, 123, 124). Durch die vermehrt anfallenden ROS werden die antioxidativen Mechanismen der Mitochondrien erschöpft, sodass die reaktiven Spezies über Poren in der Membran (permeability transition pore, mtPTP) ins Zytosol gelangen und den globalen oxidativen Stress verstärken (125). Ferner spielt auch die oxidative Schädigung der Mitochondrien-DNA eine wichtige Rolle (126).

Auch für Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass wichtige Wechselwirkungen (engl. *cross-talks*) zwischen den Organellen und den NOXs bestehen (s. Abbildung **2-6**). Einerseits fördern NOX generierte reaktive Spezies mitochondrialen oxidativen Stress, sodass Mitochondrien einen wesentlichen Beitrag zur ROS Produktion leisten und die Zellorganellen als zentrales Amplifikationssystem angesehen werden können (63). Andererseits zeigen neue Erkenntnisse, dass mitochondriale ROS ($\bullet\text{O}_2^-$ und H_2O_2) eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NADPH Oxdasen innehaben und deren Aktivität stimulieren (127).

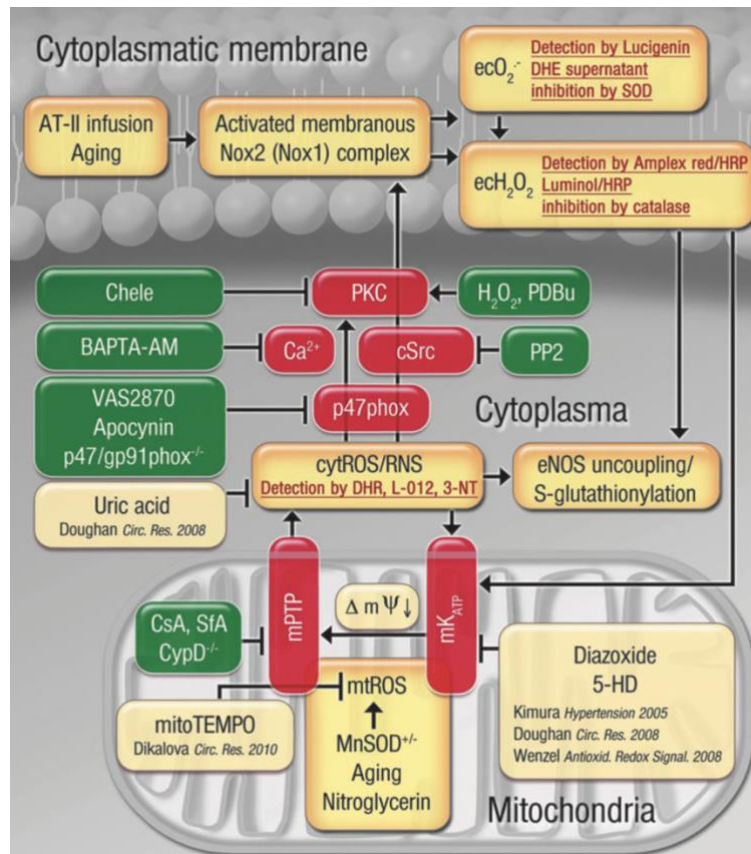


Abbildung 2-6: Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien und NOX. Die Stimulierung der NOX (u.a. durch Angiotensin II) führt zur vermehrten $\bullet\text{O}_2^-$ Radikal Produktion. Die ROS können u.a. durch Aktivierung des mitochondrialen, ATP-sensitiven Kalium Kanals (mK_{ATP}) zur Störung des mitochondrialen Membranpotentials mit konsekutiv gesteigerter mitochondrialer ROS (mtROS) Produktion führen. Mitochondrialer oxidativer Stress erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit der „permeability transition pore“ (mPTP), wodurch die mtROS ins Zytosol gelangen können. Diese mtROS können wiederum die Aktivität der NOX triggern. [Abbildung aus (127)].

2.1.8.4 Die Xanthin-Oxidoreduktase (XOR)

Die Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) gehört zu den Molybdo-Flavoenzymen und ist ein Homodimer (≈ 150 kDa), welches drei verschiedene Domänen mit jeweils unterschiedlichen Kofaktoren bzw. funktionellen Gruppen aufweist (Eisen-Schwefel-Cluster, FAD und Molybdän-Kofaktor (MoCo)). Es spielt eine Schlüsselrolle im Harnsäuremetabolismus, indem es die Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin und weiter Xanthin zu Harnsäure katalysiert. Daneben ist das Enzym aufgrund seiner geringen Substratspezifität an zahlreichen weiteren Reaktionen beteiligt, insbesondere ist es auch in der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies involviert (128) (s. Abbildung 2-7).

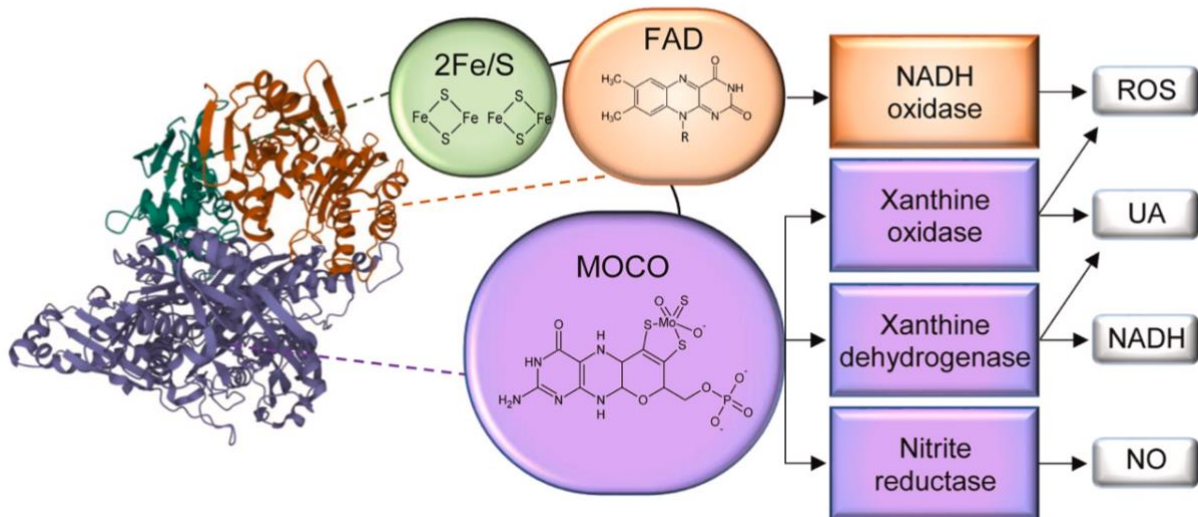


Abbildung 2-7: Röntgenstruktur der XOR. Darstellung der Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) mit ihren drei verschiedenen Domänen und jeweiligen Kofaktoren. Die größte (85 kDa), C-terminale Domäne (violett) enthält den Molybdän-Kofaktor (MoCo) und besitzt drei verschiedene Enzym-Aktivitäten. An der Xanthin Oxidase bzw. Dehydrogenase Aktivität werden reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid (NADH), Harnsäure (UA) oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet. Weiterhin erfolgt an der Nitrit Reduktase Aktivität die Reduktion von Nitrit zu •NO. Daneben besitzt intermediäre Domäne (rot) den Flavin-Adenin-Dinukleotid Kofaktor. Dort entstehen an der NADH Oxidase Aktivität ebenfalls ROS. [Abbildung aus (128)].

Die Xanthin-Oxidoreduktase kommt in Säugetieren in zwei Isoformen vor. Einerseits als Xanthin-Dehydrogenase (XDH, ~150 kDa) welche Elektronen auf NAD^+ überträgt. Andererseits als Xanthin-Oxidase (XO, ~130 kDa), die molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor bevorzugt, wodurch die reaktiven Spezies $\cdot\text{O}_2^-$ und H_2O_2 entstehen. Unter physiologischen Bedingungen wird die XOR überwiegend als XDH exprimiert. Die Konversion zur XO erfolgt via post-translationaler Modifikation, entweder reversibel über die Oxidation von Sulfhydryl-Resten und Ausbildung von Disulfidbrücken oder irreversibel durch limitierte Proteolyse bestimmter regulatorischer Peptidketten im Protein. Hypoxie bzw. Ischämie, Infektionen sowie weitere pathologische Bedingungen fördern die Umwandlung zur Oxidase-Form und folglich die ROS Produktion. Hauptsächlich wird das Flavoenzym in Leber, Darm und in der laktierenden Brust gebildet. Allerdings findet sich zudem hohe XOR Aktivität im Plasma und in Endothelzellen. Dort kann die Xanthin-Oxidase durch $\cdot\text{O}_2^-$ und H_2O_2 Bildung wesentlich zum oxidativen Stress beitragen (129-131). Tatsächlich wurde in mehreren Studien nachgewiesen, dass erhöhte XOR-Plasmaspiegel die endotheliale Dysfunktion aggravieren kann (132, 133). Zudem ist die XO eine wesentliche Quelle der Superoxid-Anion Produktion, die im Kausalzusammenhang mit einer Erhöhung des arteriellen Drucks bzw. Ausbildung einer arteriellen Hypertonie steht (134). Auch

Furuhashi et al zeigten in ihrer Studie, dass die XOR Aktivität mit der arteriellen Hypertonie assoziiert ist (135). Weiterhin konnte eine erhöhte XOR Aktivität mit der Pathogenese der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden (136-139). Passend dazu zeigte die Hemmung der XOR mittels Allopurinol oder Febuxostat eine Abnahme des oxidativen Stresses (140), eine Verbesserung der Endothelfunktion bzw. Atherosklerose (133, 136) und eine Reduzierung des kardiovaskulären Risikos resp. Mortalität (141-143).

Neben der Dehydrogenase- und Oxidase-Aktivität besitzt das dimere Enzym zusätzlich eine NADH-Aktivität (ROS Produktion) und Nitritreduktase-Aktivität (\bullet NO Produktion) (s. Abbildung 2-7). Letztere reduziert insbesondere unter hypoxischen Bedingungen Nitrit zu \bullet NO (Vgl. 2.3.1.2), sodass die XOR als weitere \bullet NO-Quelle auch mit einer kardioprotektive Wirkung assoziiert wird (144). Tatsächlich zählt die Xanthin-Oxidoreduktase zu den bedeutendsten Enzymen, dass die Reduktion von Nitrit (NO_2^-) zu Stickstoffmonoxid (\bullet NO) katalysiert. Dies ist auch klinisch relevant, da in Verbindung mit einer diätetischen Nitrit Supplementation eine protektive Wirkung der XOR bei der arteriellen Hypertonie nachgewiesen werden konnte (145-147).

Analog zu den anderen ROS Quellen konnten auch bei der Xanthin-Oxidase Wechselwirkungen zwischen den ROS generierenden Enzymen festgestellt werden. So führte die Inhibition der NOX zur einer verminderten XO Aktivität und konsekutiv zur verminderten Superoxid Produktion (148).

2.1.9 Das Endothel und die endotheliale Dysfunktion

Endothelzellen kleiden das Innere aller Blut- und Lymphgefäße des Körpers aus und bilden als einschichtiges Endothel eine Barriere zwischen dem Blut bzw. Lymphe und der weiteren Gefäßwand. Schätzungsweise befinden sich mehr als 10^{12} Endothelzellen im Körper und wiegen zusammen ca. 100 g (149). Durch den direkten Kontakt mit dem Lumen ist es in der Lage chemische und physikalische Änderungen wahrzunehmen und entsprechend darauf zu reagieren. Mit der Produktion von zahlreichen Faktoren reguliert es die Zelladhäsion, Thrombozytenaggregation, Proliferation der Gefäßmuskelzellen, Entzündungsreaktionen, Angiogenese und den Gefäßtonus. Letzteres erfolgt über die Bildung und Freisetzung von vasoaktiven

Substanzen sowie Modifikation und Reaktion auf zirkulierende vasoaktive Botenstoffe. Die Erhöhung des Gefäßtonus erfolgt über Bildung und Freisetzung von Endothelin-1 und Prostanoiden. Weiterhin wird am Endothel Angiotensin I zu Angiotensin II umgesetzt. Durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid oder Prostazyklin wird die Gefäßspannung hingegen gesenkt. (149-151). Für die adäquate Einstellung des systemischen Gefäßtonus ist dabei ein balanciertes Zusammenspiel mit systemischen vasoaktiven Agenzien wie (Nor-)Adrenalin und Angiotensin wichtig (152).

Eine herausragende Bedeutung bei der Regulation des Tonus der Gefäßmuskulatur und damit des arteriellen Blutdrucks kommt dabei dem Botenstoff Stickstoffmonoxid zu. Wie bereits dargestellt handelt es sich dabei um das kleinste bekannte Signalmolekül, das als Radikal zu den reaktiven Stickstoffspezies zugeordnet wird. Es ist nicht nur die wichtigste vasodilatierende Substanz, sondern reguliert die Gefäßpermeabilität, hemmt zudem die Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion, sowie die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (153-157). Die Synthese erfolgt im Endothel mit Hilfe der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (150). Einer der Schlüsselreize für die Stimulierung der eNOS Aktivität ist dabei der aufs Gefäß einwirkende Scherstress, wodurch die Organperfusion auf Veränderungen des Herzzeitvolumens adaptiert werden kann (158).

Das kleine lipophile Molekül kann dabei ungehindert zur Gefäßmuskulatur diffundieren und dort an die prosthetische Häm-Gruppe der sGC binden und aktivieren (159). Die aktivierte sGC katalysiert die Dephosphorylierung von GTP zu cGMP. cGMP aktiviert dann als Second Messenger die Proteinkinase G (PKG) (160). Infolge phosphoryliert die PKG den IP₃-Rezeptor und das IP₃-Rezeptor assoziierte Protein (IRAG), wodurch die intrazelluläre Kalziumkonzentration gesenkt wird (161). Weiterhin werden auch Kalium-Kanäle aktiviert; durch den Kalium-Efflux wird die Zelle hyperpolarisiert und der Kalziueinstrom vermindert (162). Die verminderte Kalziumkonzentration führt in Verbindung mit der Phosphorylierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase durch die PKG zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (163, 164).

Die vielfältigen Funktionen des Endothels zeigen, dass dessen Intaktheit essenziell für die Gefäßhomöostase und adäquate Regulation des Gefäßtonus resp. Blutdrucks

ist. Dabei spielt •NO mit seinen besonderen Eigenschaften (anti-entzündlich, -thrombotisch und -proliferativ) eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des physiologischen Gefäßzustands (150, 165).

2.1.9.1 Die endotheliale Dysfunktion

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die führende Todesursache und waren im Jahr 2019 für ein Drittel aller Todesfälle verantwortlich (1). Den meisten Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie etwa der koronaren Herzerkrankung (KHK), liegt eine Atherosklerose zu Grunde. Das erste klinische Korrelat der Atherosklerose stellt dabei die endotheliale Dysfunktion (ED) dar (152, 166, 167). Tatsächlich konnte in mehreren Studien eine gestörte Endothelfunktion als Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen herausgearbeitet werden (168-170).

Die endotheliale Dysfunktion wird biochemisch als eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation, die auf eine verminderte Verfügbarkeit von bioaktivem Stickstoffmonoxid zurückzuführen ist, definiert. In einem weiter gefassten Kontext umfasst die endotheliale Dysfunktion die Umwandlung von einem inaktiven, ruhenden Phänotyp des Endothels zu einem aktivierten, pathologischen Zustand, der prothrombotische und proinflammatorische Eigenschaften aufweist. Diese Veränderungen gehen mit einem Gefäßumbau, einer gestörten Regulation des Gefäßwachstums und einem eingeschränkten Regulationsvermögens der Perfusion bzw. des Gefäßtonus einher (150, 152, 171). Viele bekannte kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und arteriellen Hypertonie werden mit der endothelialen Dysfunktion assoziiert (172, 173).

Die Ätiopathogenese ist multifaktoriell, jedoch spielen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies bzw. oxidativer Stress bei den eben genannten Entitäten eine wesentliche Rolle (152). Diese führen zu einer Imbalance der endothelialen Botenstoffe und in Folge zum atherogenen Phänotypen des Endothels (167, 174). Die Abbildung **2-8** fasst die wesentlichen Prozesse zusammen, welche nachfolgend ausführlich dargestellt werden.

So kommt es aufgrund einer Aktivierung der NADPH Oxidase (NOX) zur vermehrten Superoxid- und H₂O₂ Produktion in den Endothelzellen. Diese reaktiven Spezies

führen zu einem über verschiedene Wechselwirkungen zur Stimulierung weiterer oxidativer Systeme (wie Mitochondrien und Xanthin-Oxidase) und infolge zu einem sich selbst verstärkenden System mit vermehrter ROS Produktion. Weiterhin reagiert das Superoxid-Anion mit dem wichtigsten anti-atherosklerotischen Biomolekül Stickstoffmonoxid. Diese Reaktion läuft um ein Vielfaches schneller ab als die Dismutation von $\cdot\text{O}_2^-$ durch die Superoxid Dismutase und läuft daher bei oxidativem Stress bevorzugt ab. Dadurch wird nicht nur das protektive $\cdot\text{NO}$ depletiert, sondern zusätzlich die reaktive Stickstoffspezies ONOO^- generiert. Insbesondere Peroxynitrit, aber auch die anderen ROS führen zu oxidativen Veränderungen an Proteinen (und weiteren Makromolekülen), welche in einer Modifikation der Enzymfunktion resultieren können (152, 175).

Die Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) ist dabei von besonderer Bedeutung. Die eNOS trägt durch die Produktion von $\cdot\text{NO}$ wesentlich zum physiologischen, antithrombotischen Phänotypen des Endothels bei (150). Durch die verschiedenen Mechanismen wird der protektive Phänotyp des Enzyms in einen prothrombotischen verändert. Weitere wichtige ROS induzierte Modifikationen von Enzymen sind die Inaktivierung der Prostazyklin-Synthase und Mangan-Superoxiddismutase, sowie die oxidative Aktivierung des Endothelin-1 Systems (152).

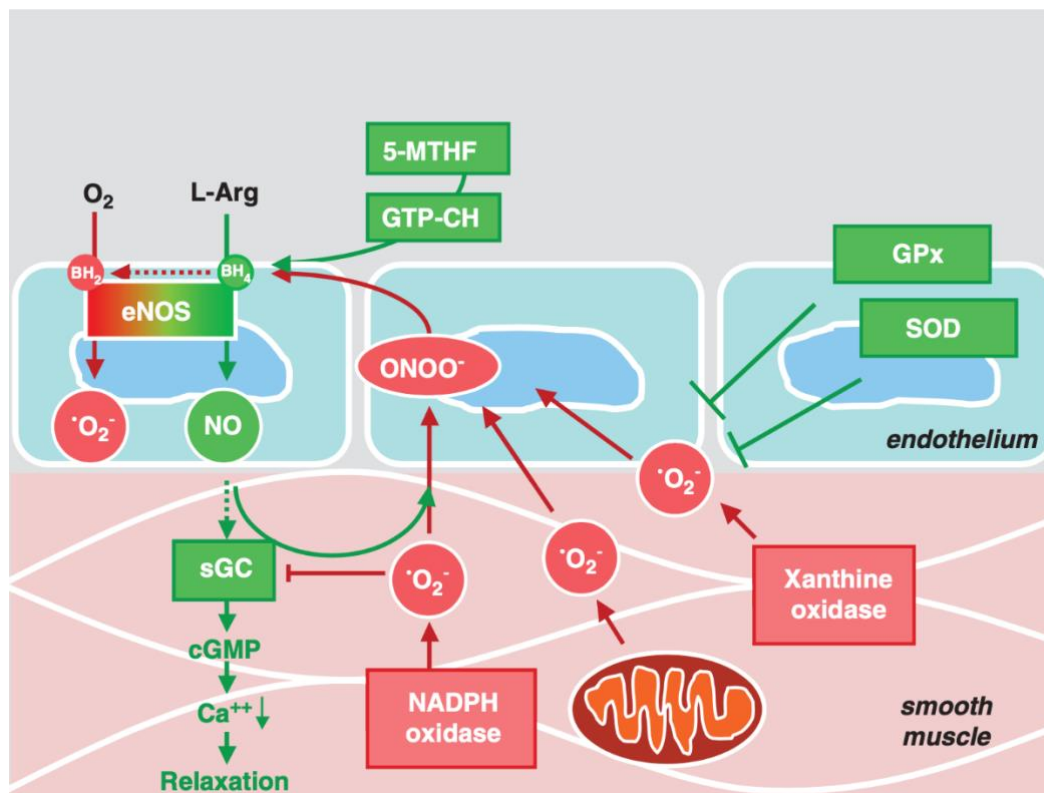


Abbildung 2-8: Endotheliale Dysfunktion durch oxidativen Stress. Der Botenstoff Stickstoffmonoxid (\bullet NO) ist für die physiologische Endothelfunktion essenziell. Durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) und Erhöhung der cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) Konzentration induziert \bullet NO über Senkung der intrazellulären Kalzium-Konzentration die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. RONS führen bei oxidativem Stress zur Depletion dieses wichtigen Transmitters. Wichtige ROS Quellen sind die aktivierte NADPH Oxidase und Xanthin-Oxidoreduktase sowie die mitochondriale Atmungskette. Die vermehrt anfallenden ROS, insbesondere das Superoxid-Radikal (\bullet O₂⁻) können einerseits direkt mit \bullet NO zu Peroxynitrit (ONOO⁻) reagieren und dadurch die Bioverfügbarkeit von \bullet NO verringern. Andererseits führen sie zur Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS). Zudem könne sie die sGC direkt hemmen und dadurch den NO/cGMP/cGK Signalweg stören. [Abbildung aus (176)].

2.1.9.2 Untersuchung der Endothelfunktion mithilfe isometrischer Tonusstudien

Anhand isometrischer Tonusstudien im Organbad lässt sich u.a. die Endothelfunktion der Gefäße untersuchen. Das Prinzip der Methode ist das Aufzeichnen von Tonusänderungen nach Exposition von intakten Aortenringsegmenten mit verschiedenen, vasokonstriktiv und -dilativ wirkenden Neurotransmittern. Grundlegend für die Methode ist die Beobachtung, dass geschädigtes und dysfunktionales Endothel inadäquat auf endothelabhängige Vasodilatoren reagiert. Diese verminderte Relaxation ist ein Merkmal der endothelialen Dysfunktion. (166, 177-179). Die Intaktheit des Endothels lässt sich anhand des Acetylcholin-Tests

überprüfen. Dieser beruht auf den Erkenntnissen von Robert Furchgott, der beobachtet hatte, dass isolierte Aorten, nachdem das Endothel entfernt worden ist, in vitro paradoxerweise auf Acetylcholin (ACh) mit einer Vasokonstriktion reagieren (180). ACh wirkt einerseits direkt am Endothel und führt über muskarinerge Rezeptoren-vermittelte Erhöhung der zytosolischen Kalzium Spiegel, zur Stimulierung der endothelialen NO-Synthase (Calmodulin-abhängig). Dadurch wird die Bildung des vasodilatativ wirkendem •NO gesteigert. Andererseits führt ACh, vermittelt über muskarinerge Rezeptoren in den glatten Gefäßmuskelzellen, durch Erhöhung der zytosolischen Kalzium Spiegel zur Kontraktion. In intaktem Endothel überwiegt die vasodilatative Wirkung des •NO. Im geschädigten Gefäß dominiert indes der Einfluss auf die glatte Muskulatur, da das dysfunktionale Endothel nur unzureichend •NO produziert. Konsekutiv kann eine Vasokonstriktion beobachtet werden, die auch als paradoxe Vasokonstriktion bezeichnet wird (181). Zusammenfassend lässt sich aus dem Relaxationsvermögen der Gefäße nach Inkubation mit ACh auf die Integrität des Endothels schließen.

Einen weiteren Aspekt der Organbad-Methode stellt die Prüfung der Funktionsfähigkeit der Gefäßmuskulatur dar. Nach Exposition der Aortenringsegmente mit Glyceroltrinitrat (Nitroglycerin, GTN), Nitrit, Pentaerythryltetranitrat (PETN), Natriumnitroprussid oder Spermin NONOat, wird das Ausmaß der Gefäßrelaxation aufgezeichnet. Nach Bioaktivierung der Nitrate durch die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2), bewirken diese Substanzen über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase eine endothelunabhängige Vasodilatation.

2.2 Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie

Die Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie ist multifaktoriell und komplex. Zahlreiche Organsysteme wie Herz, Gefäße, Niere und das Immunsystem sind in der Entwicklung des krankhaften erhöhten Blutdrucks involviert. Nach der Mosaiktheorie von Irvin Page spielen bei dieser Krankheitsentität neben Umwelt und Genetik, auch anatomische, adaptive, humorale, neuronale und hämodynamische Faktoren eine zentrale Rolle (182). Die Weiterentwicklung der Mosaiktheorie durch David Harrison

postuliert oxidativen Stress und Inflammation als Schlüsselemente in der Entstehung von erhöhtem Blutdruck (57).

Eine Verbindung zwischen RONS Produktion resp. oxidativen Stress und arterieller Hypertonie zeigt sich exemplarisch beim Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Dieses stellt eines der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme im Organismus dar und ist ein bedeutender Ansatzpunkt in der Behandlung der arteriellen Hypertonie. Interessanterweise induziert Angiotensin II, welches als vasoaktiver Neurotransmitter am Ende des RAAS steht, selbst die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und kann dadurch zur Entwicklung vom oxidativen Stress beitragen (183). AT-II induziert die ROS Bildung indem über die AT1-Rezeptor Aktivierung eine nachgeschaltete Phospholipase aktiviert und Diacylglycerol gebildet wird. Diacylglycerol ist ein potenter endogener PKC Aktivator und die PKC aktiviert die NOX2 wie oben beschrieben (184).

Mechanistisch gesehen führen RONS unter oxidativem Stress in den Gefäßen zur unkontrollierten Proteinoxidation und gestörtem Redox-Signaling, was in Folge zur Apoptose und Entzündung mit der Einwanderung von inflammatorischen Zellen führt. Darüber hinaus induzieren sie Zellproliferation und -migration sowie den Umbau der extrazellulären Matrix. Diese Prozesse führen letztlich zur Veränderung der Gefäßstruktur und vaskulärer Hypertrophie. Weiterhin trägt der oxidative Stress auch zur Depletion von Stickstoffmonoxid mit konsekutiver Entwicklung eine endothelialen Dysfunktion bei (176). Insgesamt führen all diese Prozesse zur Störung der vaskulären, kardialen und renalen Funktion sowie zur Aktivierung von Immunzellen und der Stimulation des sympathischen Nervensystems. Dies kann schließlich die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie evozieren (57) (s. Abbildung **2-9**).

Studien, die etwa mithilfe der pharmakologischen Behandlung des Bluthochdrucks eine Verringerung des vaskulären oxidativen Stresses nachweisen konnten, stützen den Zusammenhang zwischen ROS und arterieller Hypertonie (176, 185). Tierexperimentelle Studien haben zudem auf molekularer Ebene bewiesen, dass bestimmte Entzündungszellen die treibende Kraft für die Entwicklung eines Bluthochdrucks im AT-II Mausmodell darstellen, da die gentechnische Abladierung dieser Immunzell-Untergruppen die arterielle Hypertonie komplett verhindern konnte (186, 187).

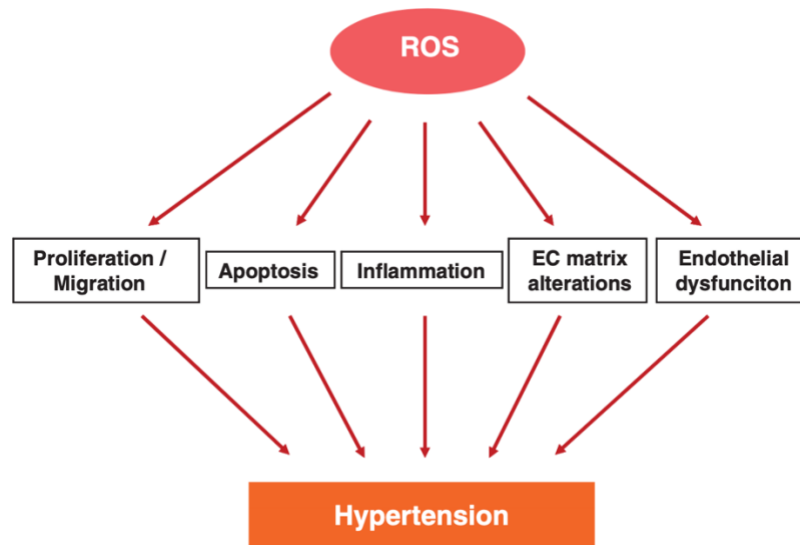


Abbildung 2-9: Vaskuläre Veränderungen durch oxidativen Stress. ROS führen bei oxidativem Stress zu zahlreichen Veränderungen der Endothel- und Gefäßmuskelzellen sowie der extrazellulären Matrix. Diese stehen im wesentlichen Zusammenhang mit der Pathogenese der arteriellen Hypertonie. [Abbildung aus (176)].

2.3 Anorganisches Nitrit (NO_2^-)

Lange Zeit wurden anorganisches Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) als inerte Endprodukte des Stickstoffmonoxid Stoffwechsels angesehen und zudem potenzielle karzinogene Effekte zugesprochen (6, 188). Forschungen aus jüngerer Vergangenheit zeigen indes, dass Nitrit vielmehr als physiologischer Stickstoffmonoxid Speicher fungiert und insbesondere unter hypoxischen Bedingungen zu $\bullet\text{NO}$ bzw. bioaktiven Stickstoffoxiden reduziert wird, wodurch vielfältige physiologische Wirkungen entstehen. Demnach kann NO_2^- , neben dem L-Arginin-NOS-Weg, als weitere wichtige $\bullet\text{NO}$ Quelle bzw. $\bullet\text{NO}$ Speicher im Organismus angesehen werden. Weiterhin scheint Nitrit selbst (unabhängig von $\bullet\text{NO}$) biologische Wirkungen zu entfalten und protektiv im kardiovaskulären System zu wirken (6, 189). So ist es nicht verwunderlich, dass zahlreiche Studien eine vorteilhafte Wirkung nach Nitrit Einnahme gezeigt haben, wie blutdrucksenkende Effekte oder eine protektive Wirkung nach kardioischämischen Ereignissen (7, 190-195).

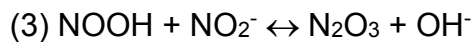
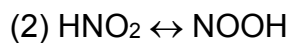
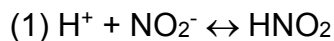
2.3.1 Der Nitrat-Nitrit-Stickstoffmonoxid Weg

Endogen entstehen anorganisches NO_2^- und NO_3^- durch Oxidation von $\bullet\text{NO}$ bzw. durch Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Oxyhämoglobin (160). Nitrat wird exogen vorwiegend (zu 85 %) durch den Verzehr von grünem Gemüse wie Spinat oder Rucola aufgenommen, wobei auch Rote Beete eine bedeutende Quelle für NO_3^- darstellt. Die Zufuhr von Nitrit erfolgt insbesondere durch den Konsum von geräuchertem Fleisch/Wurst oder mineralischem Trinkwasser (196). Die Plasmaspiegel von Nitrat sind mit 20 – 40 μM wesentlich höher als von Nitrit (50 – 300 nM).

2.3.1.1 Die entero-saliväre Zirkulation und die Rolle des Mikrobioms

Generell verfügen Säugetiere nicht über ausreichend Enzyme mit einer Nitrat-Reduktase Aktivität, sodass sie isoliert betrachtet nicht in der Lage sind Nitrat in seine bioaktive Form umzusetzen. Lediglich für die XOR konnte eine relevante Reduktase Aktivität festgestellt werden (197). Kommensale Bakterien können hingegen sehr effizient Nitrat reduzieren, da sie bei Sauerstoffmangel in der Zellatmung Nitrat statt Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden können. Daher kommt dem oralen Mikrobiom eine fundamentale Rolle im Nitrat-Nitrit-NO-Weg zu. Das zugeführte Nitrat resp. Nitrit wird rasch im oberen Gastrointestinaltrakt resorbiert und bis zu 85 % werden über die Niere wieder ausgeschieden. Die verbliebenen 25 % werden aktiv von den Speicheldrüsen aufgenommen und dort bis zum 20-fachen der Plasmakonzentration im Speichel konzentriert. Nach Freisetzung des mit Nitrat angereicherten Speichels in der Mundhöhle wird das NO_3^- durch verschiedene fakultativ anaerobe Bakterien der oralen Mundflora mittels deren Nitrat-Reduktase-Enzyme zu Nitrit reduziert. Die Mundhöhle (beim Menschen) ist mit bis zu 100 Milliarden Bakterien 700 verschiedener Spezies besiedelt. Darunter konnten fünf Bakteriengattungen (Actinomyces, Veillonella, Rothia, Propionibakterium und Staphylococcus) identifiziert werden, die besonders relevant für die Nitrat Bioaktivierung sind (198). Infolge steigt die Nitrit-Konzentration im Speichel bis auf das 1000-fache der Plasmakonzentration. Die Notwendigkeit der kommensalen

Bakterien für die Nitrat-Reduktion konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. So wurde nach oraler Gabe von NO_3^- in keimfreien Mäusen oder in einer klinischen Studie nach antiseptischer Mundspülung kein adäquater Anstieg der NO_2^- Plasmakonzentration beobachtet (9, 199). Gelangt dieser Nitrit-reiche Speichel in den Magen, wird ein großer Teil des NO_2^- durch die saure Umgebung zur Salpetrigen Säure (HNO_2) protoniert, welche anschließend spontan zu $\bullet\text{NO}$ zerfällt. Das restliche Nitrit wird im Verlauf über den Gastrointestinaltrakt ins Blut aufgenommen (6, 196). Neben $\bullet\text{NO}$ kann im sauren Milieu des Magens auch Distickstofftrioxid (N_2O_3) entstehen (Vgl. 1 – 3), welches als starkes nitrosierendes Agens zur Bildung von S-Nitrosothiolen führen kann (47, 200).



Es wird postuliert, dass Nitrosothiol-Verbindung blutdrucksenkende Effekte evozieren (47). Die Abbildung **2-10** fasst den Kreislauf von Nitrat bzw. Nitrit schematisch zusammen.

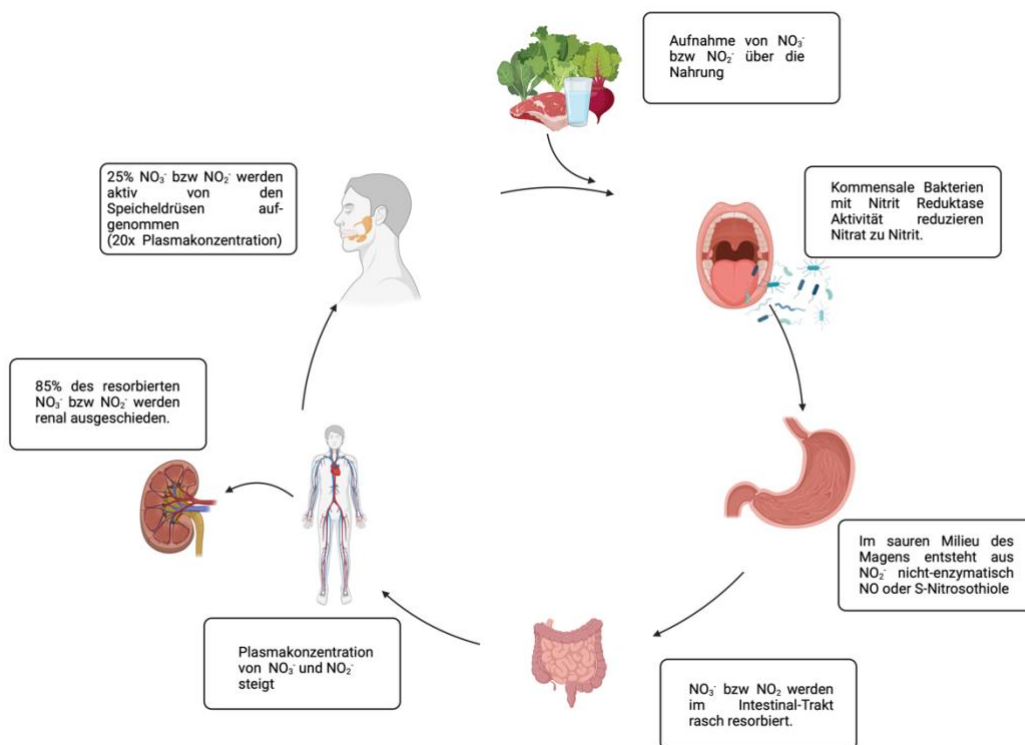


Abbildung 2-10: Der entero-saliväre Kreislauf. Schematische Darstellung des entero-salivären Kreislaufs von Nitrat und Nitrit nach (6). Erstellt mit BioRender.com.

2.3.1.2 Mechanismen der Nitrit Bioaktivierung

Im Blut kann NO_2^- entweder nicht-enzymatisch oder enzymatisch zum bioaktiven Stickstoffmonoxid reduziert werden. Die nicht-enzymatische Umwandlung erfolgt bei ausgeprägten sauren und hypoxischen Bedingungen durch spontane Disproportionierung. Unter physiologischeren Bedingungen wird NO_2^- durch verschiedene Enzyme zu $\bullet\text{NO}$ konvertiert. Aber auch hier wird die Nitrit-Reduktion durch eine geringe Sauerstoffverfügbarkeit und sauren pH maßgeblich beschleunigt, sodass der NO_3^- - NO_2^- - $\bullet\text{NO}$ -Weg als alternative physiologische $\bullet\text{NO}$ Quelle unter anhaltenden hypoxischen Bedingungen betrachtet wird. Denn die $\bullet\text{NO}$ -Bereitstellung durch die NOS ist von einer adäquaten Sauerstoffbereitstellung abhängig (189, 196, 201).

Die Xanthin Oxidoreduktase ist wie bereits dargestellt nicht nur in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen als wichtige ROS Quelle eingebunden, sondern auch ein bedeutendes Enzym mit einer Nitrit-Reduktase-Aktivität. Die XOR katalysiert die Reduktion von NO_2^- zu $\bullet\text{NO}$ an ihrer Molybdän-bindenden Domäne. Webb et al. zeigten in ihrer Studie, dass die XOR insbesondere unter hypoxischen Bedingungen eine relevante $\bullet\text{NO}$ Quelle in Erythrozyten und Endothelzellen ist (147). Eine weitere von Webb et al. publizierte Studie zeigte, dass bei myokardialer Ischämie, die sauerstoffarme und azide Umgebung die Umsetzung von NO_2^- zum $\bullet\text{NO}$ durch die XOR fördert und folglich das Enzym bei Myokardischämie eine kardioprotektive Rolle übernimmt (195). Bei der Ein-Elektron-Reduktion von Nitrit werden Elektronen von NADH an der FAD-Domäne über die Eisen-Schwefel-Cluster zur Molybdän-Domäne transportiert, wo schließlich NO_2^- zu $\bullet\text{NO}$ reduziert wird. Neben der $\bullet\text{NO}$ Produktion hat dieser Weg der Elektronenübertragung den weiteren Effekt, dass dadurch weniger Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (erfolgt ebenfalls an der FAD-Domäne) und infolge weniger ROS entstehen. So kann die XOR bei einem Überangebot von NADPH und Nitrit von einem ROS-produzierenden Enzym zum protektiven $\bullet\text{NO}$ generierenden Enzym wechseln (202). Bei hohem Sauerstoffangebot konkurriert jedoch der Sauerstoff an der FAD-Domäne mit dem Nitrit an der Molybdän-Domäne um die Elektronen, wodurch die Nitrit-Reduktase Aktivität vermindert wird. Dies erklärt zumindest zum Teil, weshalb der $\bullet\text{NO}$ Umsatz unter hypoxischen Bedingungen am höchsten ist und bei steigendem Sauerstoffangebot sukzessiv

abnimmt (203). Trotz der generellen Annahme, dass die XOR vermittelte •NO Produktion überwiegend in einer hypoxischen Umgebung stattfindet, gibt es Hinweise, dass auch unter physiologischen Bedingungen (Normoxie, pH 7,4) die XOR eine relevante •NO Quelle darstellt. Exemplarisch zeigten Gosh et al. eine Senkung des Blutdrucks von spontan hypertensiven Ratten nach Bolusgabe von NaNO₂ (unter normoxischen Bedingungen). Ein Effekt der durch die Gabe von Allopurinol wieder aufgehoben werden konnte (146). Weiterhin vermag das Molybdän-Enzym auch NO₃⁻ zu NO₂⁻ zu reduzieren (204).

Weitere relevante Enzyme mit einer Nitrit-Reduktase Aktivität sind zahlreiche Häm-Globuline (z.B. Häm-, Myo- und Neuroglobulin), die Aldehyddehydrogenase, die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, Carbonanhydrase und diverse Proteine der Atmungskette (z.B. Komplex III, IV und Cytochrom C) (200).

Die vorteilhafte Wirkung einer Nitrat/Nitrit Supplementation konnte bereits in mehreren tierexperimentellen als auch humanen Studien gezeigt werden. In einer doppelt verblindeten, randomisiert kontrollierten Studie senkte eine tägliche Einnahme von Nitrat den systolischen Blutdruck bei hypertensiven Patienten um 7 mmHg ohne Hinweis auf eine Tachyphylaxie nach vier Wochen (205). Dabei scheint Nitrit nicht nur über die Bereitstellung von Stickstoffmonoxid zu wirken, sondern auch selbst antioxidative Eigenschaften zu besitzen bzw. die Bildung von ROS zu vermindern. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass NO₂⁻ die Peroxynitrit- und HOCl-Produktion von neutrophilen Granulozyten senkt und dadurch den durch Immunzellen induzierten oxidativen Stress mindert (206). In Mäusen mit Angiotensin II induzierter Hypertonie verbesserte sich unter Nitrit-Gabe die Endothelfunktion durch Minderung der ROS Produktion (207). Stamm et al. von der Arbeitsgruppe Prof. Daiber/Münzel konnte ebenfalls eine Verbesserung der Endothelfunktion, eine Reduzierung der vaskulären Inflammation und eine Senkung des Blutdrucks bei AT-II hypertensiven Mäusen zeigen (7).

2.4 Das Mikrobiom

Mikroorganismen, insbesondere Bakterien, sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet und stellen nach Pflanzen den zweithäufigsten Biomasseanteil auf der Erde dar (208). Sämtliche höheren Lebensformen, einschließlich des Menschen, sind von zahlreichen Mikroorganismen bewohnt, wobei Bakterien die dominierende Gruppe darstellen. Tatsächlich besteht der Mensch annäherungsweise aus genauso vielen Zellen, wie er von Bakterien besiedelt ist (209). Die Gesamtheit aller Mikroorganismen, die im oder auf einem Wirt leben, wird als Mikrobiota definiert. Der größte Anteil findet sich dabei im Gastrointestinaltrakt und wird als intestinale Mikrobiota bezeichnet. Das intestinale Mikrobiom stellt das Genom der gesamten intestinalen Mikrobiota dar und kann mithilfe von Sequenzierung identifiziert werden (210).

Im gesunden Magen-Darm-Trakt gibt es 500 bis 1000 verschiedene Arten von Bakterien. Dabei wird der Darm hauptsächlich von anaeroben Bakterien besiedelt, wobei Firmicutes und Bacteroidetes die vorherrschenden Stämme sind (211). Die Mikroorganismen und der Wirt stehen in einer symbiontischen Beziehung zueinander und spielen bei einer Vielzahl von physiologischen Funktionen eine wichtige Rolle. Die Entwicklung und Regulation des Immunsystems wird beispielsweise von der Mikrobiota entscheidend beeinflusst. Auch werden essenzielle Vitamine wie Vitamin K durch Darmbakterien synthetisiert und unverdauliche Nahrungsmittel weiter verarbeitet (212). Weiterhin werden zahlreiche bioaktive Metabolite durch die Darmbakterien produziert, welche entweder lokal oder auch in fernen Organsystemen Effekte auf physiologische Prozesse erzielen (213).

Aufgrund dieser starken Interaktion mit dem Wirt, wird die (kardiovaskuläre) Gesundheit durch die Mikrobiota maßgeblich mit beeinflusst. Zahlreiche Studien konnten etwa einen Zusammenhang von Atherosklerose, arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz mit dem Mikrobiom zeigen (214-219). Mit Hinblick auf die arterielle Hypertonie scheint es eine Assoziation zwischen einer reduzierten mikrobiellen Vielfalt und Hypertonikern zu geben. Insbesondere ist die enterale Besiedlung der Stämme Firmicutes und Bacteroidetes vermindert (220). Mechanistisch wird u.a. vermutet, dass infolge der geringeren Diversität weniger kurzkettige Fettsäuren

(SCFA, engl. short chain fatty acids) durch die Darmbakterien produziert werden. Dabei handelt es sich um Nebenprodukte der bakteriellen Fermentierung von Kohlenhydraten, welche nicht durch den menschlichen Organismus verdaut resp. verwertet werden können (210). Diese SCFA (insbesondere Acetat, Butyrat und Propionat) werden resorbiert und weisen im systemischen Kreislauf blutdrucksenkende Eigenschaften auf (221, 222). Daneben ist auch das orale Mikrobiom an der Regulation des Blutdrucks beteiligt. Wie bereits dargestellt (Vgl. 2.3.1.1) ist das orale Mikrobiom ein essenzieller Bestandteil des Nitrat-Nitrit-•NO-Wegs, an dessen Ende die Bildung des blutdrucksenkenden Stickstoffmonoxids steht. Abbildung 2-11 stellt die wichtigsten Interaktionen zwischen der Mikrobiota und der Organsysteme zusammenfassend dar.

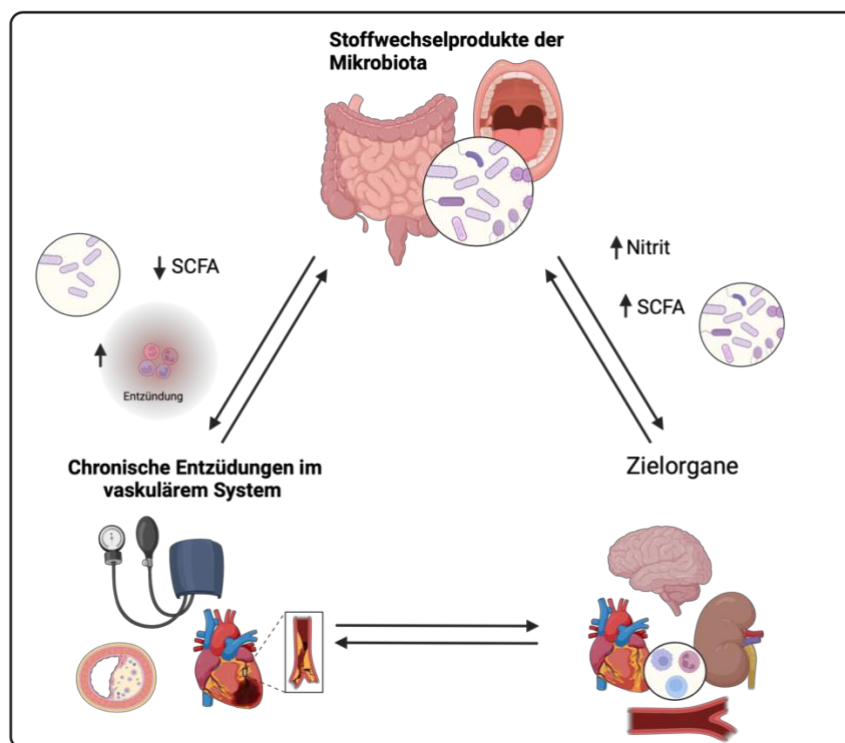


Abbildung 2-11: Wechselwirkungen zwischen der Mikrobiota und anderen Organsystemen. Für die kardiovaskuläre Gesundheit ist die Diversität des enteralen Mikrobioms entscheidend. So bilden die Stämme *Fermitutes* und *Bacteroides* Stoffwechsel-Nebenprodukte, wie die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA), die sich positiv auf das kardiovaskuläre System auswirken, indem sie einen blutdrucksenkenden Effekt vermitteln. Auch Nitrit, welches überwiegend durch die orale Mikrobiota aus Nitrat gebildet wird, evokiert zahlreiche förderliche Wirkungen. Eine verminderte Diversität hat eine Abnahme dieser vorteilhaften Nebenprodukte zur Folge. Daneben ist das gastrointestinale System auch das größte Reservoir für Immunzellen. Eine mikrobielle Imbalance kann immunvermittelt chronische Entzündungen im vaskulären System induzieren (223). Abbildung modifiziert nach (223). Erstellt mit BioRender.com.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3-1: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller, Firmensitz
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg
2-Propanol (Isopropanol)	Aug. Hedinger GmbH, Karlsruhe
3-morpholinossidonimine (SN-1)	Cayman Chemicals, Ann Arbor
5,5-dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
10 kDa BenchMark™ Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Acrylamide-bis solution 40% (3,3% C)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Acetylcholinchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Agarose Elektrophorese Grad	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Hamburg
Aqua dest. Braun	B. Braun AG, Melsungen
Braunol® (Providon-Iod)	B. Braun AG, Melsungen
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Fluka & Riedel, Seelze
D-Mannitol	Fluka & Riedel, Seelze
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid 99,5% (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethanol 70% / 100%	VWR International GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA)	Sigma Aldrich, Hamburg
Glyceroltrinitrat (GTN), 1mg/ml	G. Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt

GTN in Ethanol Lösung (100 g/l)	Novasep, Leverkusen
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glyzerin (wasserfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Heparin-Natrium 2 500	Ratiopharm GmbH, Ulm
Hepes(N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)heminatriumsalz	Sigma-Aldrich, Hamburg
Hypochlorige Säure (HOCl)/NaHOCl	VWR International GmbH, Darmstadt
Indometacin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Posterisan (Lidocain 50 mg/g)	Dr. Kade Pharma, Berlin
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
Natriumorthovanadat (0,5 M)	Sigma-Aldrich, Hamburg
isotone Kochsalzlösung 0,9% NaCl	B. Braun AG, Melsungen
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Octylphenol Ethoxylate (Triton X-100)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Pan-Ophtal Gel (Dexpantheol 50 mg/g)	Dr. Winzer Pharma GmbH, Berlin
Phenylephrin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Phenylmethansulfonyl-fluorid (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 BVBA, Erembodegem (Belgien)
Ponceau S (0,1% in 5%-igem Eisessig)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Precision Plus Protein Standard – Dual	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Color	
Prostaglandin F _{2α}	Cayman Chemicals, Ann Arbor
Protease Inhibitor Cocktail	Hofmann-La Roche AG, Basel (Schweiz)
Roti®-Quant (Bradford)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-base (Tris-base)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCL (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Hamburg

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-Well Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Mikro-osmotische Pumpe Model 2001 (1 µl/h)	Alzet, Cupertino (Californien)
BD Microlance™ 3 (0,9x40mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Cellstar® PP-Test tubes, 15/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Einwegskalpell Nr. 10	Feather Safety Razor, Osaka (Japan)
Eppendorf-Pipettenspitzen 0,1-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf Safe Lock tubes 0,5 – 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Filterpapier (Mini Trans- Blot®)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gazin® Tupfer aus Verbandmull	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Gel Blotting Papier GB 002	Whatman GmbH, Dassel
Medium 199, liquid, GIBCO	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Microplatte, 96 Well, Polystyrol, F-Boden, transparent	Greiner, Frickenhausen
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman GmbH, Dassel
Petri-Schale, steril	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10-1000µl	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Blutentnahmesystem (7,5ml Z-Gel) S-Monovette® Li-Heparin	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht
Sterican® Injektionskanüle Gr.18 (0,45x25mm)	B. Braun AG, Melsungen
Sterile Flieskompressen	Fink & Walter GmbH, Merchweiler
Wundklammer Michel (7,5x1,75mm)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen

3.1.3 Antikörper

3.1.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3-3: Primäre Antikörper

Antigen	Größe [kDa]	Puffer	Blockmedium	Host	Verdünnung	Hersteller
Alpha-Actinin	100	TBS-T	BSA (5%)	Maus	1:10000	Sigma
Xanthine Oxido-Reduktase (XOR)	XDH: [146], XO: [130]	PBS-T	Milch (0,5%)	Kaninchen	1:1000	Rockland Immunochemicals
DMPO	-/-	TBS-T	Milch (5%)	Maus	1:1000	Stress Marq Biosciences

3.1.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3-4: Sekundäre Antikörper

Antigen	Größe	Puffer	Blockmedium	Host	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG (HRP)	-/-	Entsprechend Primär-Antikörper	Entsprechend Primär-Antikörper	Ziege	1:10000	Vector Laboratories
Anti-Maus IgG (HRP)	-/-	Entsprechend Primär-Antikörper	Entsprechend Primär-Antikörper	Pferd	1:2000	Cell Signaling

3.1.4 Laborgeräte

Tabelle 3-5: Laborgeräte

Produkt	Hersteller
Bridge Bioamplifier ETH 255	C.B.Sciences Inc., Dover (USA)
Chemilux Imager	CsX-1400M, Göttingen, Germany
Expression 1680 Pro	Epson, Japan
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Feinwaage LE225D	Sartorius AG, Göttingen
Innova® CO2 Incubator Brutschrank	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Langhaarrasierer	Philipps N.V., Amsterdam (Niederlande)
Magnetrührer MR	Heidolph Instruments, Schwabach
Minifold I vacuum dot blot system	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Mini Spin Plus 5435	Eppendorf AG, Hamburg
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Blotting Apparat)	BioRad laboratories, Hercules, California
Mini Protean™ System 3 Cell (Elektrophorese Apparat)	BioRad laboratories, Hercules, California
Mikro 22R gekühlte Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
MRXII plate reader	Dynex Technologies, Berlin, Germany
Octal Bridge Amp ML228	ADInstruments, Sydney (Australien)
Organbäder	Kent Scientific Corp., Torrington (USA)
Organbäder	Radnoti LLC, Monrovia (USA)
Pipette Eppendorf Research 0,1 -2,5 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 0,5 -10 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 20-200µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 2-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten: Pipetman	Gilson Inc., Middleton (USA)

pH-Meter GPHR1400A	GHM Messtechnik GmbH, Greisinger
PowerPac™ Basic Elektrophoresenetztteil	BioRad laboratories, Hercules, California
Powerlab 8/30 ML870	ADInstruments, Sydney (Australien)
Powerlab 8sp	ADInstruments, Sydney (Australien)
Rotofix 32A Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Sonopuls HD/GM 2070	Bandelin electronic GmbH & CO. KG, Berlin
Sonoplus Ultraschallnadel UW 2070	Bandelin electronic GmbH & CO. KG, Berlin
Stereomikroskop MSZ 5400	A. Krüss Optronic GmbH, Hamburg
Thermomixer Comfort MTP-5355	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat 2761	Eppendorf AG, Hamburg
Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Transferpipette Eppendorf 200 µl	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim
Vortex-Genie (G560E) 2, 230V, 50Hz 0.5 amps	Scientific Industries, New York USA
Wasserstrahlpumpe	VWR International GmbH, Darmstadt
Wärmeplatte	Kent, Scientific corp., USA
Western Blot Imager, CHEMICAM HR 16	Intas - Science Imaging Instruments,

3.1.5 Operationsbesteck

Tabelle 3-6: Operationsbesteck

Produkt	Hersteller, Firmensitz
Federschere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mikropinzette	Stoss Medika, Wiesbaden
Präzisionsscheren	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

3.1.6 Puffer und Lösungen

Ammoniumpersulfat (APS)

APS	10 g
ad ddH ₂ O	100 ml

Homogenisierungs-Puffer (Hg-Puffer)

Tris-HCl	20 mM/l
Sucrose	250 mM/l
EGTA	3 mM/l
EDTA	20 mM/l
pH	7,5

Homogenisierungs-Lösung (Hg-Lösung)

Natriumorthovanadat (0,5 M)	100 µl
Phosphataseinhibitorcocktail	100 µl
PMSF (0,1 M)	50 µl
Proteaseinhibitorcocktail	100 µl
10%iges Triton-X	1 ml
ad Hg Puffer	10 ml

Indometacin

Indometacin	18 mg
NaOH (1 mol/l)	5 Trpf.
ad ddH ₂ O	15 ml

Krebs-Hepes-Puffer

CaCl ₂	2,5 mM/l
D-Glucose	11,1 mM/l
KCl	4,69 mM/l
K ₂ HPO ₄	1,03 mM/l
NaCl	99,01 mM/l
Na-Hepes	20 mM/l
MgSO ₄	1,2 mM/l
NaHCO ₃	25 mM/l
pH	7,35

Laemmli-Puffer (3-fach)

Bromphenolblau	0,01% w/v
Glycerin	30% v/v
2-Mercaptoethanol	1,5%
SDS	60 mM w/v
Tris-HCl	188 mM

2-Mercaptoethanol erst kurz vor Gebrauch hinzufügen

Laemmli (1-fach)

3-fach Laemmli (inkl. 2-Mercaptoethanol)	1000 µl
Hg-Lösung	2000 µl

Organbadpuffer

CaCl ₂	1,835 g
Glucose	11,0 g
Indometacin	15 ml
KCl	1,75 g

K ₂ HPO ₄	0,7 g
MgSO ₄	1,48 g
NaCl	28,91 g
NaHCO ₃	10,5 g
pH	7,35
ad ddH ₂ O	5000 ml

Phosphate Buffered Saline (PBS) (10-fach)

KCl	0,1 M
KH ₂ PO ₄	0,0176 M
NaCl	1,37 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
pH	7,4

PBS-T

PBS (10-fach)	100 ml
Tween-20	1 ml
ad ddH ₂ O	1000 ml

SDS-Page Puffer (10-fach)

Glycin	144,0 g (1,92 M)
SDS	10,0 g (35 mM)
TRIS-Base	30,3 g (250 mM)
ad ddH ₂ O	1000 ml

Sammelgel Puffer

Tris-HCl	0,5 M
pH	6,8

Sammelgel (V= 5 ml)

Acrylamid 40%	0,5 ml
APS (10%)	50 µl
SDS (10%)	50 µl
TEMED	5 µl
Sammelgel Puffer	1,2 ml
ddH ₂ O	3,2 ml

Tris Buffered Saline (TBS) (10-fach)

NaCl	1,507 M
Tris-HCL	0,198 M
pH	7,6

TBS-T

TBS (10-fach)	100 ml
Tween-20	1 ml
ad ddH ₂ O	1000 ml

Transfer-Puffer (1-fach)

Glycin	14,4 g (192 mM)
Methanol	250 ml (25%)
TRIS-Base	3,03 g (25 mM)
ad ddH ₂ O	1000 ml

Immer frisch zubereiten

Trenngel Puffer

Tris-HCl	1,5 M
pH	8,8

10% Trenngel (V= 10 ml)

Acrylamid 40%	2,5 ml
APS (10%)	100 µl
SDS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl
Trenngel Puffer	2,5 ml
ddH ₂ O	4,8 ml

3.1.7 Verwendete Software*Tabelle 3-7: verwendete Software*

Produkt	Hersteller, Firma
Revelation 4.25	iLF bioserve, Langenau
Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München
Gel-Pro Analyser™ 6.0	Media Cybernetics, Rockville (USA)
Lab Chart Version 8.0	ADInstruments, Oxford (UK)
Prism Version 9.0	GraphPad Software Inc., CA, USA
BioRender	BioRender, Ontario
Microsoft Office (Excel, Word)	Microsoft Corporation, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Tiermodell

Alle tierexperimentellen Studien wurden in Übereinkunft mit der Leitlinie des U.S. Institutes of Health „Guide for Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt. Zudem wurden alle Tierexperimente von dem Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz und der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Mainz überprüft und genehmigt (Koblenz, Zulassungsnummer: 23 177-07/G15-1-063 plus Erweiterung E1 und G18-1-001).

Für die Herausarbeitung des Einflusses verschiedener Oxidantien sowie einer arteriellen Hypertonie auf die ACh-induzierte, endothelabhängige und die Nitrit-abhängige Vasodilatation, dienten Ratten als Tiermodell. Insgesamt wurden 48 männliche Wistar Ratten im Alter von sechs Wochen für die Versuche verwendet. Eine arterielle Hypertonie wurde durch Implantation einer osmotischen Pumpe (Alzet, model 2001) mit dem Vasokonstriktor Angiotensin II (AT II) herbeigeführt. Die Mini-Pumpe wurde für sieben Tage mit einer Infusionsrate von 1 mg AT II pro kg Körpergewicht pro Tag (1mg/kg/d) in den Tieren belassen. Die Kontrollgruppe erhielt analog isotonische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) statt AT II (s. Abbildung **3-1 A**). Alle Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und verabreicht.

Die subkutane Pumpenimplantation erfolgte unter Inhalationsnarkose mit Isofluran. In Narkose wurde die untere Rückenpartie mit einem elektrischen Langhaarrasierer rasiert und anschließend mit dem Desinfektionsmittel Braunol desinfiziert. Nach adäquater Einwirkzeit und Sicherstellung einer ausreichend tiefen Anästhesie, erfolgte ein quer verlaufender Hautschnitt. Sodann schloss sich die subkutane Taschenpräparation mittels einer stumpfen Schere und das Einbringen der Pumpe an. Um den Belastungsgrad für die Tiere so minimal wie möglich zu halten wurde der Implantationsort zuvor lokal mit Lidocain (50 mg/g) betäubt. Abschließend wurde die Wunde mit einer Klammernaht verschlossen und desinfiziert. Um ein Austrocknen der Augen und Unterkühlen der Tiere während des Eingriffs zu vermeiden, wurden sie mit Augensalbe und Wärmeplatte versorgt. Die betäubten Tiere wurden bis zum

vollständigen Wiedererwachen beobachtet und dann in den Käfig zurückgesetzt. Präparation und Implantation fanden unter sterilen Kautelen statt.

Zur Untersuchung der protektiven Effekte von diätetischem Nitrit und der Rolle des Mikrobioms für dessen Bioaktivierung, wurden Maus-Modelle verwendet. Insgesamt wurden 46 Mäuse im Alter zwischen acht und zehn Wochen von der Arbeitsgruppe von Prof. Christoph Reinhardt (CTH Mainz) in einer Kooperation zur Verfügung gestellt. 32 Tiere wuchsen in offener Käfighaltung auf, während 14 Versuchstiere unter speziellen keimfreien Bedingungen, die nach einem bereits etablierten (224) und angepassten (225) Protokoll, aufwuchsen. Ziel war es die Entwicklung eines enteralen Mikrobioms zu verhindern. Die Mäuse erhielten autoklavierte Nahrung und Wasser. Die Keimfreiheit der Mäuse wurde wöchentlich mithilfe von Polymerase Kettenreaktion mit der Detektion von bakterieller 16S rDNA und mikrobiologischer Untersuchungsmethoden (Bakterienkultur) überprüft.

Zwei Stunden vor Euthanasie und Gewebeentnahme wurde den Tieren 7,5 mg/kg Natriumnitrit (NaNO_2) (Interventionsgruppe) oder 0,9% isotonischer Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) *per os* verabreicht (s. Abbildung **3-1 B**). Diese Zeitspanne ermöglichte eine adäquate Aufnahme und Verteilung des Nitrits im gesamten Organismus (analog zu humanen Studien (226, 227)), sowie eine suffiziente Umwandlung in Stickstoffmonoxid. Die Applikation erfolgte mittels oraler Gavage, um die exakte Menge an Wirkstoff bzw. Placebo zu gewährleisten. Hierfür wurden die Tiere mit Daumen und Mittelfinger an der Haut über den Schultern festgehalten. Dies führte zur Fixierung des Kopfes und zur Streckung der Vorderbeine und verhinderte so eine Abwehrreaktion des Tieres. Zur weiteren Bewegungseinschränkung wurde der Schwanz zwischen kleinem Finger und Handballen festgehalten. Durch eine leichte Überstreckung des Kopfes wurden Mundraum und Ösophagus in eine Ebene gebracht. Anschließend erfolgte entlang des harten Gaumens das vorsichtige Einführen der Gavage-Nadel in die Speiseröhre. Bei korrekter Lage löste der Schluckreflex aus. Nach Sicherstellung der richtigen Position wurde die NaNO_2 bzw. NaCl Lösung vorsichtig und unter Vermeidung einer Aspiration verabreicht. Zusammenfassend sind alle Tiermodelle in der Tabelle 3-7 dargestellt.

Tabelle 3-8: Behandlungen der Versuchstiere

Versuchsgruppe	Spezies	keimfreie- Aufzucht	AT-II	Nitrat
Wistar Kontrolle	Ratte	Nein	Nein	Nein
Wistar art. Hypertonie	Ratte	Nein	1 mg/kg/d über 7 Tage	Nein
C57BL/6 Kontrolle	Maus	Nein	Nein	Nein
C57BL/6 + NO ₂ ⁻	Maus	Nein	Nein	7,5 mg/kg einmalig
C57BL/6 keimfrei Kontrolle	Maus	Ja	Nein	Nein
C57BL/6 keimfrei + NO ₂ ⁻	Maus	Ja	Nein	7,5 mg/kg einmalig

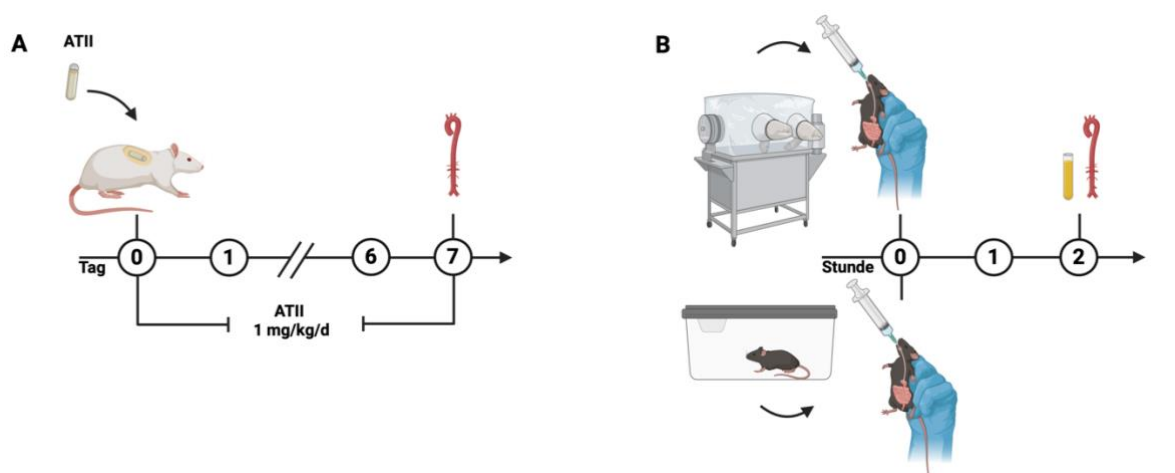


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Tiermodelle. Für die Erzeugung einer arteriellen Hypertonie wurden Wistar Ratten für sieben Tage eine osmotische Pumpe mit einer hoch konzentrierten AT-II Lösung (1 mg/kg/Tag) implantiert (A). Um die akuten Effekte einer Nitrit-Supplementation zu untersuchen, wurde C57BL/6 Mäusen (normale Haltung oder keimfreie Haltung *germ-free*) zwei Stunden vor Euthanasie anorganisches Nitrit (7,5 mg/kg) per oraler Gavage verabreicht (B). Anschließend erfolgte in beiden Fällen die Organentnahme. Erstellt mit BioRender.com.

3.2.2 Organentnahme

Nach Beendigung der oben unter 3.2.1 beschriebenen Behandlungsphasen wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis Isofluran in eine tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde das Abdomen von der Bauch- bis zur Brustregion mit einer spitzen Schere eröffnet. Durch Anheben des Sternums stellte sich das Diaphragma dar, welches entlang des Rippenbogens durchtrennt wurde und dadurch den Zugang zum Thorax eröffnete. Dabei starben die Tiere schmerzfrei in Tiefnarkose ohne Wiedererwachen. Um eine durch Stase bedingte Koagulation des Blutes zu verhindern, wurde der linke Ventrikel am schlagenden Herzen mit einer Kanüle punktiert und 200 µl Heparin (200 I.E.) appliziert. Für weitere Studien wurde eine Blutprobe aus dem rechten Ventrikel entnommen, in Serum-Gel-Monovetten überführt und anschließend zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur Durchführung weiterer Untersuchungen bei -80°C gelagert. Um einen besseren Überblick über die Thoraxorgane zu erhalten, wurden die Rippen dorsal durchtrennt und der knöcherne Thorax aufgeklappt. Die im nächsten Schritt folgende Umlagerung der Abdominalorgane bewirkte die Aufspannung des dorsalen Diaphragmas. Die sich anschließende Inzision des Zwerchfells gab den Blick auf die Lungenflügel frei. Nach Anheben des linken Lungenflügels stellten sich die proximalen Anteile der Aorta und der Vena cava dar, die über bindegewebige Strukturen miteinander verbunden waren. Nach Lösung des Bindegewebes zwischen Aorta und Vena cava erfolgte die hilumnahe Absetzung der Gefäße am Herzen. Das Herz wurde unmittelbar nach Entnahme aus der Brusthöhle in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer zwischengelagert.

Das Endothel der Aorta reagiert empfindlich auf Zug- und Scherkräfte, sodass die Präparation größte Sorgfalt und Vorsicht erforderte. Hierfür wurden zunächst die supraaortalen Äste durchtrennt und die Aortenbifurkation freipräpariert. Anschließend wurden alle Organe, ausgenommen der Nieren, entnommen. Nach Durchtrennung der Arteriae renalis erfolgte die Entnahme der Nieren. Zuletzt wurde die Aorta, von der Aortenbifurkation ausgehend, mithilfe einer Rundschere aus dem Retroperitoneum befreit und in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer überführt.

Im Anschluss wurden die Organe mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, das Blut mit Hilfe von Zellstoff aufgesaugt und zuletzt zügig in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -80°C zwischengelagert.

3.2.3 Aortenpräparation

Für die isometrischen Tonusstudien im Organbad musste die Hauptschlagader von perivaskulären Binde- und Fettgewebe befreit und im thorakalen Abschnitt in ca. drei bis vier Millimeter große Ringsegmente geschnitten werden. Wie bereits oben angeführt war es, um die Intaktheit des Aortenendothels zu wahren, unabdingbar, dass die Präparation der Ringsegmente behutsam und unter Vermeidung jeglicher Zug- und Scherkräfte erfolgte. Hierzu wurden die Aorten in auf 4°C eisgekühlte, mit etwas Krebs-Hepes-Puffer befüllte Petrischalen transferiert. Die Feinpräparation erfolgte unter Verwendung von Dumont-Mini Pinzetten und Federscheren unter einem binokularen Lichtmikroskop. Aufgrund der Annahme, dass die Absetzungsränder am proximalen und distalen Ende der Aorta bei der Entnahme gequetscht worden sind und folglich das Endothel beschädigt worden sein könnte, wurden diese nicht für Tonusstudien verwendet. Das Absetzen der Enden und das Schneiden der drei bis vier Millimeter großen Aortenringe erfolgte mittels eines scharfen Skalpells und unter Anwendung einer atraumatischen Abrolltechnik. Anschließend wurden die Ringsegmente in 4°C kalten Krebs-Hepes-Puffer zwischengelagert.

3.2.4 Isometrische Tonusstudien im Organbad

Die Durchführung der isometrischen Tonusstudien erfolgte analog der Beschreibung bereits publizierter Studien der Arbeitsgruppe Prof. Münzel und Prof. Daiber (228, 229).

Die vom perivaskulären Fett- und Bindegewebe befreiten Aorten-Ringsegmente wurden auf zwei Drahtdreiecke aufgespannt. Es wurde jeweils ein Schenkel eines Dreiecks vorsichtig, ohne das Endothel zu beschädigen, in den Gefäßring eingefädelt. Dabei war ein Drahtdreieck mit einem Transducer (linearer

Kraftumwandler) verbunden. Dieser registrierte die durch Veränderung der Gefäßlumenweite ausgelöste feine Tonusänderungen und übermittelte diese als digitales Signal an einen angeschlossenen Computer mit entsprechender EDV. Das andere Dreieck war mit einem feststehenden Haken verbunden und diente als Gegenhalt. Pro Organbadkammer wurde jeweils ein Aortenring eingespannt. Das Konstrukt aus Drahtdreiecken und Aortenring befand sich in einer doppelwandigen, freihängenden Organbadkammer. Für die Erzeugung eines physiologischen Milieus wurden die Kammern mit auf 37°C vortemperierten Organbadpuffer befüllt und mit einem Carbogen-haltigen Gasgemisch (95% CO₂, 5% O₂) begast. Ein auf 37°C temperiertes Wasserbad, welches stets die doppelwandigen Kammern umspülte, gewährleistete eine konstante Temperatur während des gesamten Versuches (siehe auch Abb. 3-2). Die Hinzugabe von Indometacin verhinderte die Synthese von vasoaktiven Prostaglandinen als mögliche Confounder.

Für die Erstellung einer Nulllinie erfolgte im ersten Schritt die manuelle Vorspannung der Aortenringe. Die Maus-Aortenringe wurden zu Beginn mit einem Zug von 0,2 g vorgespannt. Im Verlauf wurde die Vordehnung alle sieben Minuten erhöht (0,2 g → 0,4 g → 0,6 g → 0,8 g), bis ein maximaler Zug von 1,1 g erreicht worden ist. Analog wurde mit den Ratten-Aorten verfahren, allerdings mit einer Anfangsvorspannung von 0,4 g, welche sukzessive (0,4 g → 1,0 g → 1,6 g → 2,3 g) auf 3,0 g gesteigert wurde. In früheren Studien ist als optimale Vordehnung ein Zug von 1,1 g (Maus) respektive 3,0 g (Ratte) ermittelt worden.

Weiterhin fand eine Funktionsprüfung der Aorten statt, die die Kontraktionsfähigkeit der Gefäße sicherstellte. Hierzu erfolgte im Abstand von zwei Minuten eine zweimalige Bolusgabe von Kaliumchlorid (2 M, 1 ml) und anschließend die Aufzeichnung der isometrischen Kontraktion. Durch die Hinzugabe von steigenden Dosen KCl (5, 10, 20, 40, 80 mmol) wurde im nächsten Schritt eine KCl-Dosiswirkungskurve erstellt. Im Anschluss wurde das KCl ausgewaschen, sodass sich eine Nulllinie einstellte.

Für die Gefäßrelaxationsmessungen war eine Gefäßvorkontraktion erforderlich. Diese erfolgte durch die Gabe von Prostaglandin (PGF_{2 α}) (Maus Aorten) bzw. Phenylephrin (PHE) (Ratten Aorten). Die Vorkontraktion wurde so eingestellt, dass sie 70-80% des KCl evozierten Maximaltonus erreichte. Zwecks Prüfung der Funktionsfähigkeit des Endothels und der Gefäßmuskulatur wurden im Anschluss

Dosis-Wirkungs-Kurven mit Acetylcholin (ACh) und Glyceroltrinitrat (GTN) erstellt. Die jeweilige Substanz wurde in halblogarithmischen Schritten kumulativ in steigender Konzentration verabreicht. Es wurden dabei für ACh Konzentrationen von 10^{-9} bis $10^{-5,5}$ M und für GTN 10^{-9} bis $10^{-4,5}$ M eingesetzt. Für die Untersuchung der Nitrit-induzierten Vasodilatation wurde analog mit Nitrit verfahren und eine zusätzliche Dosis-Wirkungs-Kurve im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-3} M erstellt. Zwischen den jeweiligen Messungen fand eine Spülung des Organbads und eine erneuerte Vorkontraktion mit $\text{PGF}_2\alpha$ bzw. PHE statt.

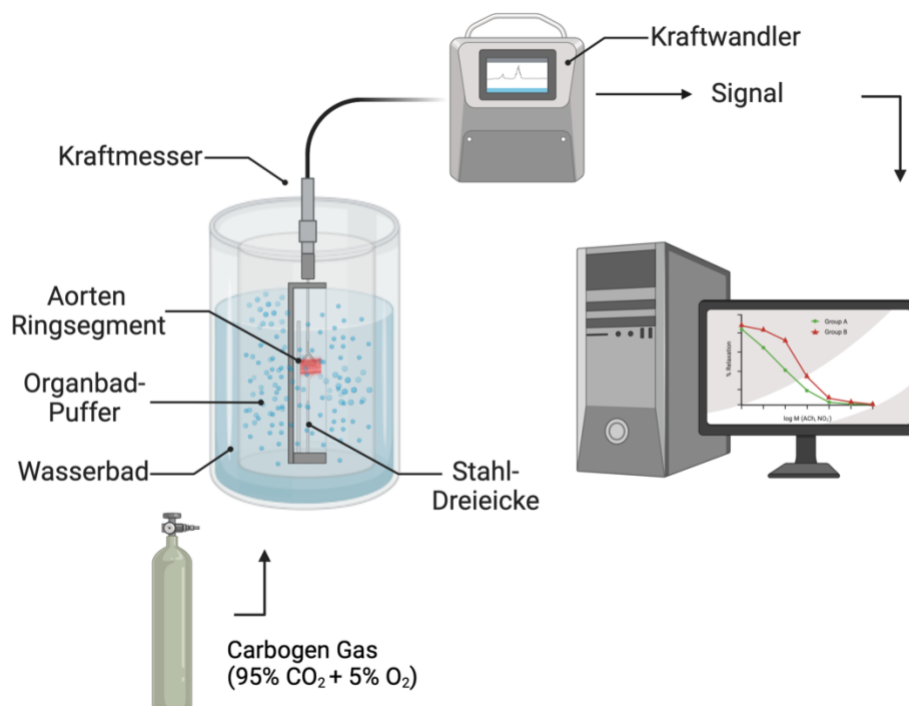


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des Organbads. Die Aorten Ringsegmente werden in einer doppelwandigen Kammer auf zwei Stahl-Dreiecke aufgespannt. In der Kammer befindet sich der Organbad-Puffer. In der Zwischenkammer sorgt das 37°C warme Wasserbad für eine physiologische Temperatur. Durch Hinzugabe der vasoaktiven Substanzen zum Organbad-Puffer werden Reaktionen des Aorten Ringsegments evoziert und durch den Kraftmesser bzw. Kraftwandler aufgezeichnet. Das Signal wird an einen Computer mit entsprechender Software weitergeleitet. Erstellt mit BioRender.com

Des Weiteren wurden Aortenringe mit verschiedenen Oxidantien vor-exponiert, um den Einfluss von oxidativem Stress auf die ACh-induzierte, endothel-abhängige respektive Nitrit-induzierte Vasodilatation herauszuarbeiten und gegenüberzustellen (Abb. 3-3). In einem Kalium-Phosphat-Puffer (100 mM) wurden die aus den Ratten gewonnenen Aorten-Ringsegmente für 90 min unter stetigem Mischen mit 3-Morpholino-sydnonimin (Sin-1) zur Peroxynitrit-Generierung, Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder hypochloriger Säure unterschiedlicher Konzentration (10 μM, 100 μM,

1mM) inkubiert. Die sich anschließende Gefäßrelaxationsmessung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Die hier dargestellten Untersuchungen im Organbad wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn J. Schreiner (MTA) und Frau Alexandra Rosenberger (TA) durchgeführt.

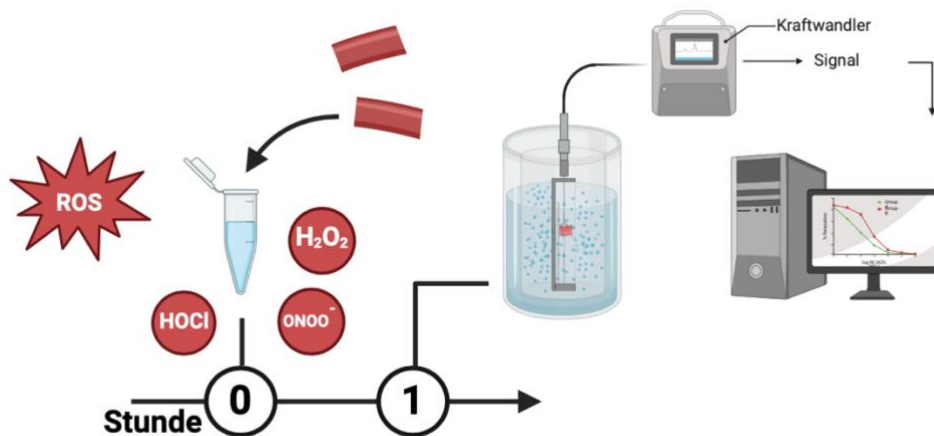


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach der Präparation wurden die Aorten Ringsegmente für 90 Minuten mit verschiedenen Oxidantien (HOCl, H₂O₂, Sin-1) unterschiedlicher Konzentration (10 µM, 100 µM, 1mM) inkubiert. Anschließend erfolgten die Tonusstudien im Organbad. Erstellt mit BioRender.com.

3.2.5 Immunoblotting

3.2.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Das gewonnene auf -80°C gelagerte Gewebe wurde in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Nach zügigem Transfer in ein ebenfalls gekühltes Eppendorf-Gefäß wurde dem Gewebepulver eiskalte Homogenisierungs-Lösung (Hg-Lösung) zugefügt (300 µl pro 100 mg Probe). Durch vorsichtiges Vortexen wurde das Pulver in Lösung gebracht und langsam aufgetaut. Anschließend wurde die Probe für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert und dabei regelmäßig alle 5-10 Minuten gevortext. Das in der Hg-Lösung zugefügte Triton X-100 gewährleistete dabei durch Lyse der Zellmembranen das Herauslösen der Proteine aus den Membranen bzw. Kompartimenten. Die

Inhibitoren verhinderten eine Degradation von Proteinen durch zelleigene Proteasen. Zuletzt erfolgte eine Zentrifugation bei 10 000x g für 10 Minuten. Die Proteine blieben dabei in Lösung, wohingegen sich der Zelldebris als Sediment absetzte. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und für die weitere Analytik verwendet.

3.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration der Proteine in den lysierten Proben erfolgte mit Hilfe des Bradford Assays. Diese photometrische Methode ist bis zu Konzentrationen im Bereich von Mikrogramm pro Milliliter sensitiv. Der Assay verwendet zur Bestimmung den Farbstoff Coomassie brilliant blue G250 und nutzt dessen besondere Eigenschaften. Der Farbstoff existiert pH-abhängig in drei verschiedene Formen (kationisch, neutral und anionisch) und besitzt entsprechend drei unterschiedliche Absorptionsmaxima. Im sauren Milieu dominiert die kationische Form, bei der das Absorptionsmaximum bei 470 nm liegt. Durch Proteinbindung an kationische und hydrophobe Seitenketten wird der Farbstoff in seiner anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum in den langwelligeren Bereich von 595 nm verschoben (230). Nach Erstellung einer Kalibrierungsgerade mit definierten Standard-Proteinkonzentrationen und Messung der Absorption kann die Konzentration einer unbekannt Probe quantifiziert werden (231).

Im ersten Schritt wurden für die Erstellung der Kalibrierungsgerade fünf Standards hergestellt. Als Referenzprotein diente dabei bovines Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 1, 5, 10, 20 und 30 ng/µl. Zusätzlich wurde für die Leerprobe destilliertes Wasser ohne BSA verwendet. Die Verdünnung der zu bestimmenden Protein-Lysate (Aorta: 1:100, Plasma aus entnommenen Blut: 1:1000) gewährleistete, dass die Proteinkonzentration der Proben im Messbereich der vorbereiteten Standards lag. Anschließend wurden die Standards und die Proben für eine Vierfach-Bestimmung in eine 96-well Plate transferiert; pro Well wurden jeweils 80 µl Standard resp. Probe pipettiert. Für die Absorptionsmessung schloss sich im nächsten Schritt die Zugabe von 200 µl des Roti-Quant Reagenz in einer Verdünnung (mit Aqua bidest.) von 1:5 an. Nach Messung der Absorption bei 595 nm

konnte mit Hilfe der Software „Relevation“ unter Verwendung der erhaltenen Werte und der Eichkurve des Referenzproteins die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.2.5.3 Quantifizierung der S-Nitros(yl)ierung – Probeaufbereitung

Die S-Nitrosylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen. Sie entsteht durch die kovalente Bindung einer Stickstoffmonoxid-Gruppe an die Thiolgruppe der Aminosäure Cystein. Sie übt einen wesentlichen Einfluss auf verschiedene biochemische Prozesse aus, unter anderem auch auf die Regulation der Gefäßlumenweite und Plättchenaggregation. Dadurch gerät die S-Nitros(yl)ierung seit ihrer Entdeckung zunehmend in den Fokus der kardiovaskulären Forschung (43). Zur Prüfung der Hypothese, ob diätetisches Nitrit Einfluss auf die S-Nitros(yl)ierung der Plasmaproteine hat, wurde der immunologische Nachweis via Dot Blot Analyse verwendet. Der direkte Nachweis von S-Nitrosyl-Proteinen ist auf Grund ihrer ähnlichen Reaktivität mit zellulären Thiolen schwierig und erschwert deren Analyse. Methoden wie der Biotin-Switch Assay haben ihre Grenzen und können zu falsch positiven Ergebnissen führen. Auf Grund dessen erfolgte der quantitative Nachweis mit Hilfe der *Immuno-spin-trapping* Methode und einer sich anschließenden Dot Blot Analyse (232). Die *Spin trapping* Technik dient zum Nachweis von freien Radikalen, die aufgrund ihres ungepaarten Valenzelektrons sehr reaktiv sowie kurzlebig sind und folglich schwierig nachzuweisen sind. Dabei bedient sich die Methode sogenannten Spinmarkern (*engl. spin traps*). Das sind Moleküle, die mit den freien Radikalen stabile Radikal-Addukte bilden. Diese längerlebigen Verbindungen können mit Hilfe von spektroskopischen Methoden, wie der Elektronenspinresonanz (ESR) oder Kernspinresonanz (NMR) Spektroskopie nachgewiesen werden. Häufig verwendete Spinmarker sind N-tert. -Butyl- α -phenylnitron (PBN) und 5,5-dimethyl-1-pyrrolin N-oxid (DMPO). Die Spinmarker werden für den Nachweis so gewählt werden, dass sie spezifisch mit den zu bestimmenden Arten von freien Radikalen (z.B. Stickstoffmonoxid) reagieren (233-235).

Die *Immuno-spin-trapping* Methode zur Analyse von S-nitros(yl)ierten Proteinen wurde von Sengupta et al entwickelt und beschrieben (232). Für den Nachweis wird der spin trap 5,5-dimethyl-1-pyrrolin N-oxid (DMPO) verwendet. Unter Einwirkung von sichtbarem Licht zerfallen die S-Nitrosothiole (z.B. S-Nitrosoglutathion) durch photolytische Homolyse in Stickstoffmonoxid und Thiyl-Radikale. DMPO reagiert mit

den Thiyl-Radikalen unter Bildung von Thioethern. Sengupta et al konnten zeigen, dass DMPO spezifisch mit der Nitrosothiol-Gruppe ein Addukt bildet und nicht etwa mit der Thiolgruppe von Glutathion reagiert. Durch Verwendung eines DMPO-spezifischen Antikörpers ermöglicht diese selektive Reaktion die quantitativen Nachweis von S-nitros(yl)ierten Proteinen (232).

Das bei der Organentnahme asservierte Plasma wurde für 30 min mit sichtbarem Licht (> 420 nm) beleuchtet. Die dabei entstandenen DMPO-Protein Addukte repräsentierten die S-Nitros(yl)ierung der Protein-Cystein-Gruppen. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung eines DMPO-spezifischen Antikörpers mit Hilfe der Dot Blot Analyse (siehe unten 3.2.5.4).

3.2.5.4 Dot Blot Analyse

Die Dot Blot Analyse ist eine molekularbiologische Methode, die dem Nachweis und der Quantifizierung von Proteinen dient. Im Unterschied zur Western Blot Analyse findet keine Auftrennung der Proteine durch eine Elektrophorese statt (siehe unten, 3.2.5.5). Die Proben werden stattdessen direkt auf die Membran aufgetragen. Folglich ist anhand dieser Methode die Bestimmung der Proteingröße nicht möglich. Dadurch sind falsch positive Signale möglich, sofern ein nicht ausreichend spezifischer Antikörper verwendet wird. Zudem wird aufgrund eines erhöhten Hintergrundrauschens die Detektion des gesuchten Proteins erschwert. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zur Western Blot Analyse ist, dass zur Normalisierung der Daten kein spezifisches Housekeeping Protein (z.B. β -Aktin oder GPDH) verwendet wird. Stattdessen werden mit der Ponceau-Färbung alle Proteine angefärbt und anschließend in der densitometrischen Auswertung zur Normalisierung herangezogen. Der deutlich höhere Probenumsatz (bis zu 96 Proben pro Versuch), der kürzere Versuchsablauf (keine Elektrophorese) und die geringeren Kosten stellen im Vergleich zur Western Blot Analyse wesentlichen Vorteile da. Zudem findet hier keine Denaturierung der Proteine statt, sodass die Tertiärstruktur erhalten bleibt. Damit lassen sich auch Proteine mit primären Antikörpern erfassen, die z.T. auch an natives Protein binden (z.B. 3 Nitrotyrosin).

Die Dot Blot Methode wurde erstmals von Hawkes et al beschrieben (236) und ist in mehreren Studien der AG Prof. Münzel und AG Prof. Daiber publiziert und beschrieben worden (237).

Die Gewebeproben wurden wie zuvor dargestellt vorbereitet. Durch Verdünnung der Protein-Lysate mit einer 0,01%igen SDS-Lösung (in PBS) wurde bei allen Proben eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/µl eingestellt. Das Auftragen der Lysate auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte mit Hilfe des Minifold-I-Systems (Fa. Whatman – Schleicher & Schuell). Dieses aus vier Basiskomponenten (Proben-Wellplatte, Filterstützplatte, Vakuumkammer, Metallklemmplatte) bestehende System, wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, die ein Vakuum erzeugte. Dieses Vakuum ermöglichte eine gleichmäßige Probenauftragung und verbesserte die Aufnahme der Proteine auf die Nitrozellulosemembran.

Ein in PBS getränktes Filterpapier (Whatman Filterpapier) und eine Nitrozellulosemembran wurde zwischen der Proben-Well Platte und der Filterstützplatte eingelegt. Nachdem alle Wells/Probenvertiefungen zweimal mit 1-fach PBS vorgespült worden sind, schloss sich das Pipettieren der Proben an. Es wurde jeweils 25 µg Protein (10 µl) aufgetragen. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass das pipettierte Volumen vollständig von der Membran aufgenommen worden ist und kein Rest-Volumen in den Wells verblieben war. Nach zweimaligem Nachspülen mit 200 µl 1-fach PBS wurde die Nitrozellulosemembran vorsichtig entnommen und für eine Stunde bei 62°C in einem Inkubator getrocknet. Dies stabilisierte die Bindung der Proteine an die Membran. Für eine spätere Normierung des Datensatzes wurde die Membran mit einer Ponceau Lösung eingefärbt und hochauflösend gescannt. Mit PBS-T wurde die Ponceau-Färbung anschließend ausgewaschen. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte wie unten im Kapitel 3.2.5.7 dargestellt.

3.2.5.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter Verwendung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE). Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergens, dass auf Grund seiner

chemischen Eigenschaften in der Lage ist die Tertiärstruktur von Proteinen zu destabilisieren, was zur Ausbildung einer linearen Proteinstruktur führt. Zudem bindet das stark negativ geladene SDS mit hoher Affinität und Konzentration an die Proteine, wodurch alle denaturierten Proteine weitgehend dieselbe negative Netto-Ladung besitzen. In der Folge ist die Protein Wanderung in der Gelelektrophorese unabhängig von Tertiärstruktur respektive Eigenladung und wird einzig von der Molekülgröße bestimmt (238, 239).

Die Proben wurden wie zuvor dargestellt vorbereitet. Anschließend wurden die Protein-Lysate mit dem 3-fach Laemmli-Puffer im Verhältnis 2:1 verdünnt und auf eine Konzentration von jeweils 1 µg/µl eingestellt. Durch das Erhitzen der Proben auf 95°C für 10 Minuten und das im Puffer enthaltene SDS bzw. β-Mercaptoethanol, wurden Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur aufgelöst, die Proteine somit denaturiert und die entstandenen Aminosäureketten mit dem negativ geladenen SDS ummantelt, sodass sie sich im elektrischen Feld während einer Gelelektrophorese abhängig von ihrer Größe trennen lassen (238).

Für die Gelelektrophorese wurde das System Mini Protean III (Biorad) verwendet. Die zu analysierende Xanthinoxidoreduktase weist ein Molekulargewicht von etwa 120 bis 160 kDa auf. Für eine bestmögliche Trennschärfe wurde daher ein 10%iges Polyacrylamid-Gel verwendet. Dazu wurde das Gel nach der im Kapitel 3.1.6 dargestellten Rezeptur hergestellt und in das Elektrophorese System gegossen. Ein einheitlicher Spiegel und die Vermeidung einer Luftblasenbildung wurde durch das Auftragen von Isopropanol erreicht. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde der Alkohol vorsichtig entfernt und ein 4%iges Sammelgel aufgegossen. Ein eingesetzter Kamm diente zur Bildung der Geltaschen für die spätere Proteinbeladung. Nach Zusammenbau des SDS-PAGE Apparatur und Befüllung der Kammer mit dem SDS-Laufpuffer wurde in die Geltaschen jeweils 20 µl Probevolumen (20 µg Protein) pipettiert. Neben den Proben wurden auf dem Gel als Proteinstandard ein 10 kDa Molekulargewichts-Marker (10 kDa BenchMark™) und ein bereits im Gel sichtbarer Protein-Marker (Precision Plus Protein Standard) verwendet.

Zu Beginn erfolgte die Elektrophorese mit einer Spannung von 60 Volt, bis die Proben gleichmäßig vom Sammelgel aufgenommen wurden und sich eine einheitliche Lauffront ausgebildet hatte. Nachfolgend wurde die Spannung auf 140

Volt erhöht und der Verlauf der Elektrophorese regelmäßig anhand des eingefärbten Proteinstandards kontrolliert, bis die gewünschte Auftrennung erreicht worden ist.

Zur Vermeidung einer zu starken Hitzeentwicklung, wurde die Elektrophorese im Eisbad durchgeführt.

In Abbildung 3-4 wird die Gel-Elektrophorese schematisch dargestellt.

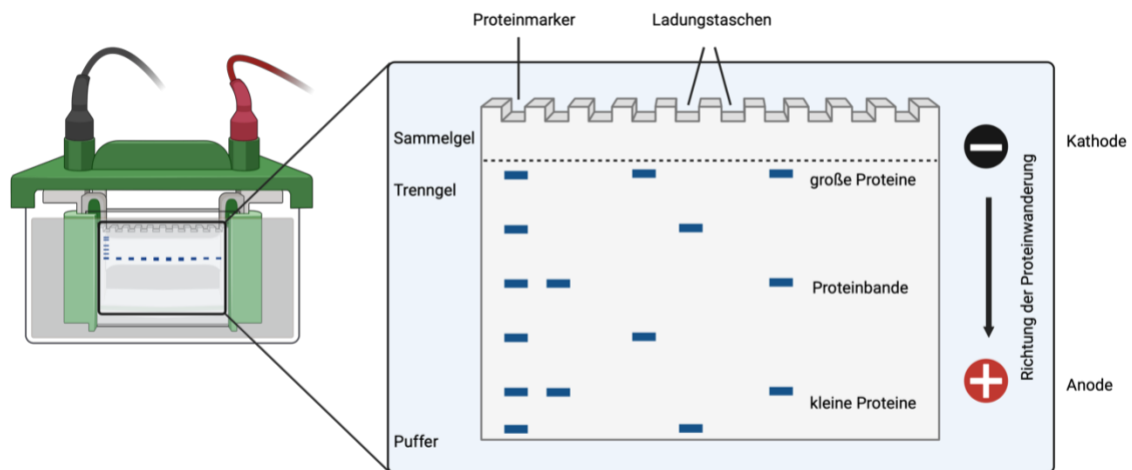


Abbildung 3-4: SDS Polyacrylamid Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Durch das Anlegen einer Spannung wandern die durch SDS negativ geladenen Proteine im Gel in Richtung Anode. Dabei werden sie nach ihrer Proteingröße aufgetrennt. Anhand der Proteinmarker kann die Molekülgröße abgeschätzt werden. Erstellt mit BioRender.

3.2.5.6 Western Blotting

Die Übertragung der aufgetrennten Protein-Lysate auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mit der Western Blot Technik. Hierfür wurde die Apparatur „Mini Trans-Blot Cell“ der Firma Biorad verwendet. Das Gel wurde vorsichtig und luftblasenfrei in ein Gel-Transfer-Sandwich eingebettet und in die Blotting Kassette eingelegt. Das Sandwich baute sich aus in Transferpuffer getränkten Schwämmen, Filterpapier, Nitrozellulosemembran und Gel zusammen. Im Anschluss wurde die Blotting-Anlage zusammengebaut und mit gekühltem Transferpuffer (2 – 3 Stunden bei -20°C) befüllt. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Membran in Richtung der Anode ausgerichtet war. Der Transfervorgang wurde durch Anlegen eines Stromflusses von 200 mA gestartet. Der Blotting-Prozess dauerte etwa 2 – 3 Stunden, wobei sichergestellt wurde, dass die Anlage ausreichend durch ein Eisbad gekühlt wurde. Anschließend wurde der Proteintransfer durch das Anfärben der Membran mit dem

Bisazofarbstoff Ponceau S überprüft. Ponceau S bindet dabei reversibel an die Aminogruppen der Proteine. Zudem diente das Färben zur Darstellung der Molekulargewichts-Marker, sodass diese mit Kugelschreiber markiert und die Membran anhand dessen in entsprechende Größenabschnitte unterteilt werden konnte. Dadurch war es möglich unterschiedliche Antikörper für die jeweiligen Membranabschnitte zu verwenden. Die Ponceau Färbung wurde im Anschluss mit einem Waschpuffer (PBS-T bzw. TBS-T) wieder herausgewaschen (240-242).

3.2.5.7 Immundetektion

Nach dem Waschschritt erfolgte der Nachweis und die Quantifizierung der Proteine durch Immundetektion unter Verwendung von spezifischen Antikörpern. Zur Vermeidung einer unspezifischen Antikörperbindung und daraus resultierendem Hintergrundrauschen, wurden proteinfreie Membranbereiche im ersten Schritt geblockt. Das Blocken erfolgte mit an den jeweiligen Antikörper angepasstem Blockmedium (0,5-5%ige Milch, 3-5%iges BSA, jeweils in PBS-T oder TBS-T gelöst) für zwei Stunden auf einem Horizontalschaukler. Im nächsten Schritt schloss sich die Inkubation der Membranen mit dem primären, gegen das gesuchte Epitop gerichteten Antikörper an. Die Antikörper wurden in ihrem spezifischen Blockmedium entsprechend einer empirisch ermittelten Idealkonzentration verdünnt (siehe Tab. 3-3). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Horizontalschaukler.

Im Anschluss an die Inkubation wurde in mehreren Waschschritten ungebundener Antikörper herausgewaschen, um unspezifische Antikörperbindung zu reduzieren. Die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (Tab. 3-4) erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Dabei wurde ebenfalls ein Medium verwendet, das dem primären Antikörper angepasst war. Mit Hilfe des Waschpuffers wurde überschüssiger, ungebundener Antikörper entfernt.

Die Detektion der Banden (3.2.5.6) respektive Dots (3.2.5.4) erfolgte durch die verstärkte Chemolumineszenz (ECL), die sich durch eine hohe Sensitivität, hohen Dynamikbereich und ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis auszeichnet. Nach Applikation einer chemolumineszierenden Substanz (z.B. Luminol) und eines Oxidationsmittels (z.B. H₂O₂) wird die Reaktion durch die an den sekundären

Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) katalysiert und Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert. Für diese Detektion der gebundenen Antikörper wurde das Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat verwendet. Nach einer einminütigen Inkubationszeit erfolgte die Aufnahme der Bilder in einer Dunkelkammer mittels einer hochsensitiven Detektionskamera (Chemilux Imager CsX-1400). Durch die Anpassung der Belichtungszeit wurde sichergestellt, dass die Bilder die Proteinbanden und -dots optimal darstellen, um eine bestmögliche densitometrische Auswertung zu gewährleisten (243).

3.2.5.8 Densitometrische Auswertung

Die Software Gel-Pro Analyzer 6.0 wurde zur densitometrischen Auswertung der Banden bzw. Dots herangezogen. Die quantitative Bestimmung erfolgte dabei durch Messung und Vergleich der Graudichtewerte der einzelnen Banden bzw. Blots. Für die Ladungskontrolle und die Normierung des Datensatzes diente beim Western Blot die optische Dichte des konstitutiv exprimierten Proteins (housekeeping protein) α -Actinin respektive bei der Dot Blot Analyse die Ponceau gefärbte Aufnahme. Dadurch konnten auch Abweichungen bei der Proteinbeladung berücksichtigt werden.

3.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe der Software Prism Version 9 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz bei der Gegenüberstellung der Konzentrations-Relaxations-Kurven im Organbad zum Vergleich mehrerer Mittelwerte wurde eine Two-way ANOVA Methodik mit Bonferroni Korrektur verwendet. Die Signifikanz der Proteinexpression-Analyse für XO/XDH bzw. DMPO-Addukte wurde mit einer One-way ANOVA Methodik mit Bonferroni Korrektur berechnet. Die für den ANOVA notwendige Normalverteilung der Daten wurde anhand des D'Agostino-Pearson Test bzw. Shapiro-Wilk Test geprüft.

Kongruent mit dem wissenschaftlichen Konsens wurden alle Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle (Ratte versus Maus) bzw. des zweigeteilten Studienaufbaus werden die Resultate separat dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse des Studienschwerpunkts „Der Einfluss von Oxidantien und der arteriellen Hypertonie auf die ACh-induzierte, endothelabhängige vs. Nitrit-abhängiger Vasodilatation“, sowie „die Effekte von Sin-1 auf die Expression der Xanthin-Oxidoreduktase Expression“ dargestellt. Im Anschluss folgt die Ergebnisbeschreibung des Studienteils „die Rolle des Mikrobioms für die Bioaktivierung von Nitrit in keimfreien Mäusen“.

4.1 Der Einfluss von Oxidantien und der arteriellen Hypertonie auf die ACh-induzierte, endothelabhängige und die Nitrit-abhängige Vasodilatation

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Oxidantien auf die vaskuläre Funktion wurden die Aortenringe zuvor *ex vivo* für 90 Minuten mit Sin-1, H₂O₂, oder HOCl in unterschiedlicher Konzentration (10 µM, 100 µM, 1 mM) inkubiert. Durch die Gabe von AT-II via osmotische Pumpe (1 mg/kg/d für 7d) wurde eine arterielle Hypertonie erzeugt.

4.1.1 Vaskuläre Funktion

Die Untersuchung der Gefäßfunktion erfolgte anhand isometrischer Tonusstudien von Aortenringsegmenten im Organbad.

Die Relaxation der Gefäße wird als prozentuale Relaxation in Bezug auf die ACh- oder Nitrit-Gabe (im Zehnerlogarithmus skaliert) dargestellt.

4.1.1.1 Endothelabhängige Relaxation

In den Abbildungen 4-1 bis 4-3 wird der Einfluss verschiedener Oxidantien sowie des Modells der arteriellen Hypertonie (Abb. 4-4) auf die endothelabhängige Relaxation gegenüber ACh dargestellt.

Die Exposition mit dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid zeigte dabei keinen wesentlichen Einfluss auf die ACh induzierte Gefäßrelaxation. Bei Konzentrationen von 10 μM respektive 100 μM waren die Gefäßrelaxations-Kurven weitgehend identisch mit der unbehandelten Kontrollgruppe (CTR), sodass sich kein signifikanter Unterschied feststellen ließ. Lediglich die Inkubation mit der 1 mM H_2O_2 Lösung führte zu einer geringen Rechtsverschiebung der Relaxations-Kurve und damit zu einer Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation bzw. Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion. Die Relaxation war dabei allerdings auch nur bei einer sehr hohen ACh Konzentration ($\log M(\text{ACh}) = -5,5$) signifikant eingeschränkt. (s. Abbildung 4-1)

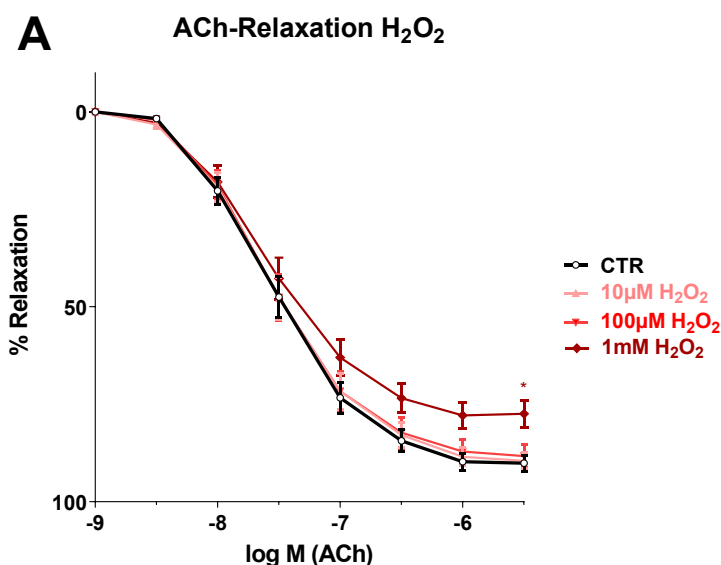


Abbildung 4-1: Effekte von H_2O_2 auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. $n = 14 - 16$, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. CTR

Die Behandlung der Aortenringsegmente mit dem Peroxynitrit-Donor SIN-1 wirkte sich hingegen schon bei niedrigeren Konzentrationen negativ auf die

Endothelfunktion aus. Bereits mit einer 10 μM Sin-1 Lösung zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine leichte Rechtsverschiebung der Kurve, auch wenn die Unterschiede nicht erheblich gewesen sind. Dennoch ließ sich bei der niedrigsten Konzentration bereits ein Trend beobachten. Isolierte Aortenringe die den höheren Konzentrationen (100 μM bzw. 1 mM) ausgesetzt waren, wiesen ein deutlich eingeschränktes Relaxationsvermögen auf; entsprechend divergierten die Konzentrations-Relaxations-Kurven gegenüber der Kontrollgruppe erheblich. (s. Abbildung 4-2)

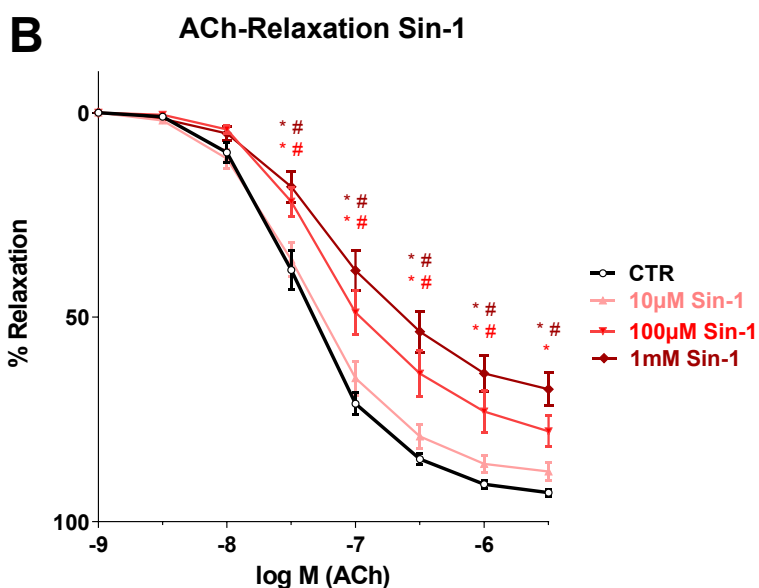


Abbildung 4-2: Effekte von Sin-1 auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. N = 14 – 16, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. CTR, # vs. 10 μM

Wie in der Abbildung 4-3 dargestellt, führte das Oxidans HOCl in der niedrigsten verwendeten Konzentration (10 μM) zu keiner Abweichung der Relaxationsfähigkeit. Nach Inkubation mit 100 μM resp. 1 mM HOCl ließ sich indessen eine eindeutige Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven für ACh beobachten. Die endotheliale Reagibilität wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe und 10 μM HOCl signifikant eingeschränkt.

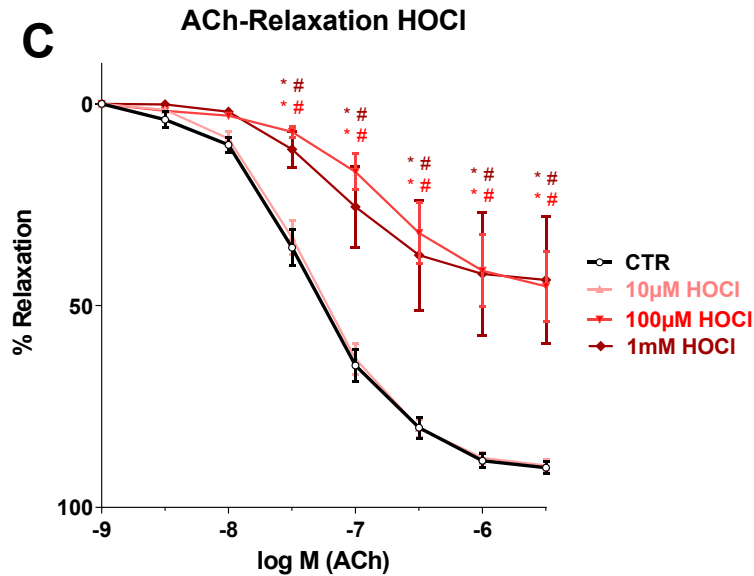


Abbildung 4-3: Effekte von HOCl auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. $n = 7 - 14$, prozentuale Relaxation infolge Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. CTR, # vs. $10 \mu\text{M}$

Isolierte Aortenringsegmente von mit AT-II behandelten Tieren wiesen bei der isometrischen Tonusstudie eine signifikant reduzierte endothelabhängige Gefäßrelaxation auf (Abb. 4-4).

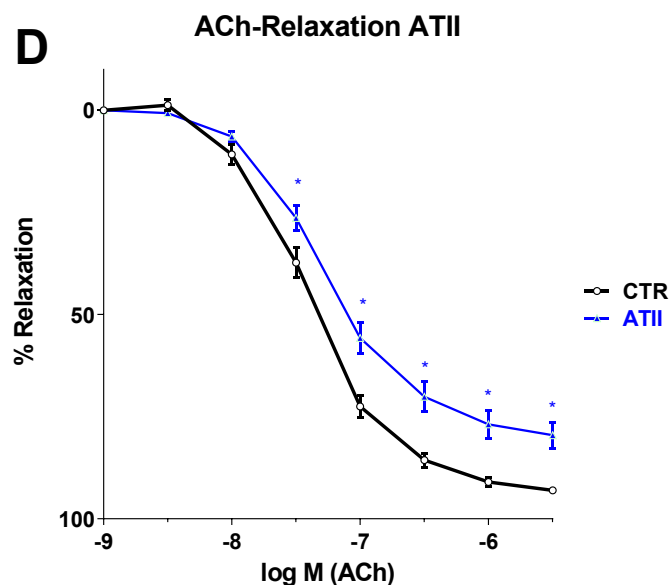


Abbildung 4-4: Effekte von AT-II auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. $n = 14 - 16$, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. CTR

4.1.1.2 Nitrit-abhängige Relaxation

Der Effekt der Oxidantien auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation wurde im Organbad untersucht, indem Nitrit anstelle des Vasodilatators ACh verwendet wurde.

Hier zeigte sich in Abbildung 4-5, dass sowohl die Exposition mit Wasserstoffperoxid (A) als auch mit Sin-1 (B) keinen negativen Effekt auf die Nitrit-abhängige Relaxation hatten. Auch bei der höchsten Konzentration (1 mM) konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikante Einschränkung der Vasodilatation beobachtet werden.

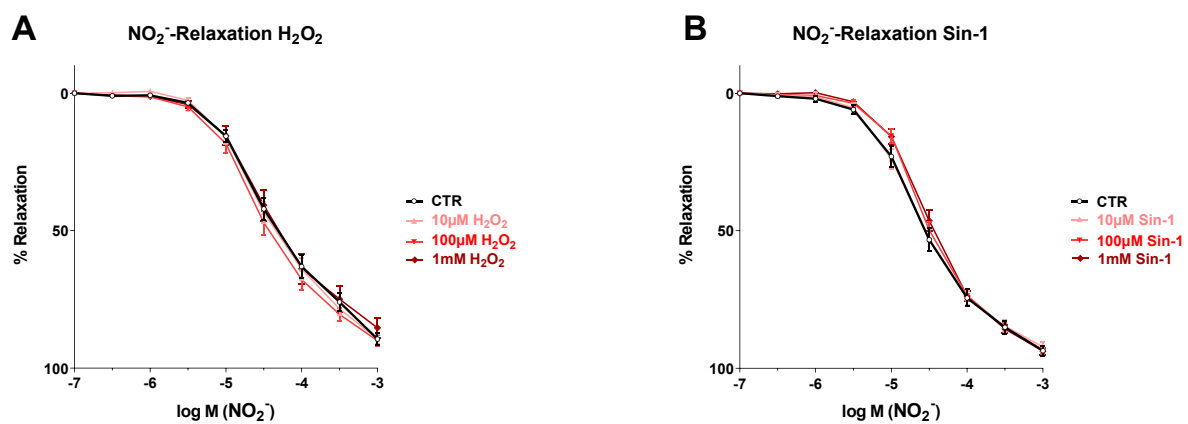


Abbildung 4-5: Effekte von H_2O_2 (A) und Sin-1 (B) auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. $n = 16$, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. CTR, # vs. $10\ \mu\text{M}$, + vs. $100\ \mu\text{M}$

Während nach der Inkubation mit $10\ \mu\text{M}$ bzw. $100\ \mu\text{M}$ hypochloriger Säure keine signifikanten Abweichungen der Nitrit-abhängigen Vasodilatation gemessen worden sind, wurde die Gefäßrelaxation durch $1\ \text{mM}$ HOCl beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde bei der endothelabhängigen Vasodilatation bereits ab einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ eine endotheliale Dysfunktion beobachtet (Vgl. Abbildung 4-3).

Die Konzentrations-Relaxations-Kurve ($1\ \text{mM}$ HOCl) zeigte eine deutliche Rechtsverschiebung; diese war ab einer Konzentration von $\log M(\text{NO}_2^-)$ 10^{-5} signifikant. Demzufolge induzierte eine Konzentration von $1\ \text{mM}$ HOCl eine Reduktion des Nitrit-abhängigen Relaxationsvermögens. (s. Abbildung 4-6)

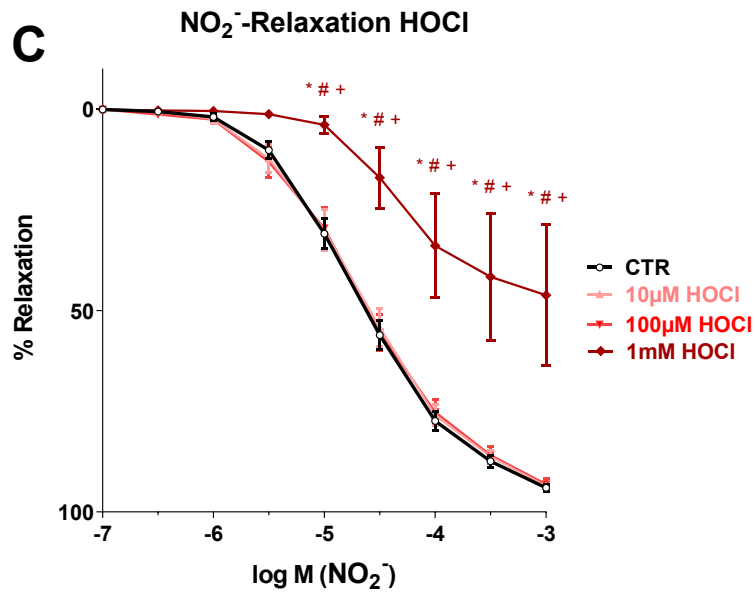


Abbildung 4-6: Effekte von HOCl auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. $n = 8 - 24$, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05\%$ * vs. CTR, # vs. 10 μM , + vs. 100 μM

Eine arterielle Hypertonie durch AT-II hatte analog zur ACh-induzierten Relaxation ebenfalls einen negativen Einfluss auf die vasodilatatorische Potenz von NO_2^- auf die Aortenringsegmente. Hier wurden signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe ab einer Konzentration von $\log M (\text{NO}_2^-)$ -4,5 beobachtet. (s. Abbildung 4-7)

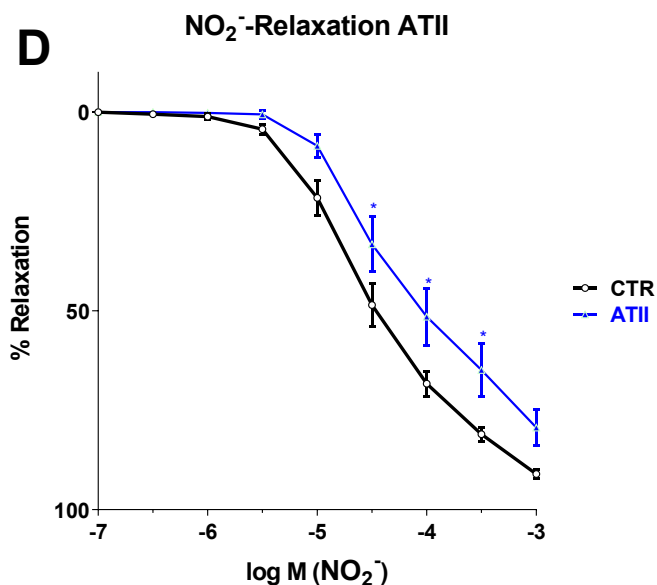


Abbildung 4-7: Effekte von AT-II auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Ratten-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im

Organbad. n = 15, prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe, Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, p < 0,05% * vs. CTR

Zusammenfassend wurde durch diese Methode gezeigt, dass die Exposition mit Oxidantien sich negativ auf die Endothelfunktion auswirkt. Diesbezüglich konnte auch gezeigt werden, dass die Nitrit-abhängige Relaxation durch Oxidantien in einem deutlich geringeren Maße eingeschränkt wird, was bei einer induzierten Hypertonie nicht der Fall zu sein scheint.

4.1.2 Effekte von Sin-1 auf die Proteinexpression der Xanthin-Oxidoreduktase im Aortengewebe

Die oben unter 4.1.1 beschriebenen isometrischen Tonusstudien deuteten darauf hin, dass im Vergleich zur endothelabhängigen Relaxation eine gesteigerte Toleranz gegenüber oxidativem Stress bei der Nitrit-bedingten Vasodilatation vorhanden ist.

Um den Einfluss der Xanthin-Oxidoreduktase (XOR), ein Enzym, welches die Reduktion von Nitrit (NO_2^-) zu Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) katalysiert, bei der o.g. Beobachtung zu klären, wurde eine Proteinexpressions-Analyse mit Hilfe des Western Blot Assays durchgeführt. Für den quantitativen Nachweis wurde ein spezifischer Xanthin-Dehydrogenase (XDH), bzw. Xanthin-Oxidase (XO) Antikörper verwendet (s 3.1.3.1). Dafür wurde das Aortengewebe verwendet, welches mit dem Peroxynitrit-Donor Sin-1 in unterschiedlicher Konzentration (10 μM , 100 μM , 1 mM) behandelt worden war, da hier eine stark konzentrationsabhängige Steigerung der Dysfunktion gegenüber einer endothelabhängigen Relaxation gemessen werden konnte (Abb. 4-2), die bei der NO_2^- -induzierten Relaxation nicht zu beobachten war (Abb. 4-5 B).

Wie in der Abbildung **4-8** zu sehen, zeigte die Inkubation der Aortenringe mit Sin-1 keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der Xanthin-Dehydrogenase (**A**). Tendenziell war die Expression marginal vermindert. Hinsichtlich der Xanthin-Oxidase ließ sich gegenüber der Kontrollgruppe ein ansteigender Trend mit zunehmender Konzentration des Oxidans korrelierend beobachten (**B**). Diese Ergebnisse waren indes ebenfalls nicht signifikant. Das XO/XDH-Verhältnis

betrachtend, konnten jedoch nach Inkubation mit Sin-1 signifikante Steigerungen der Verhältnisse, ergo eine vermehrte Konversion der XDH zur XO, gezeigt werden (C).

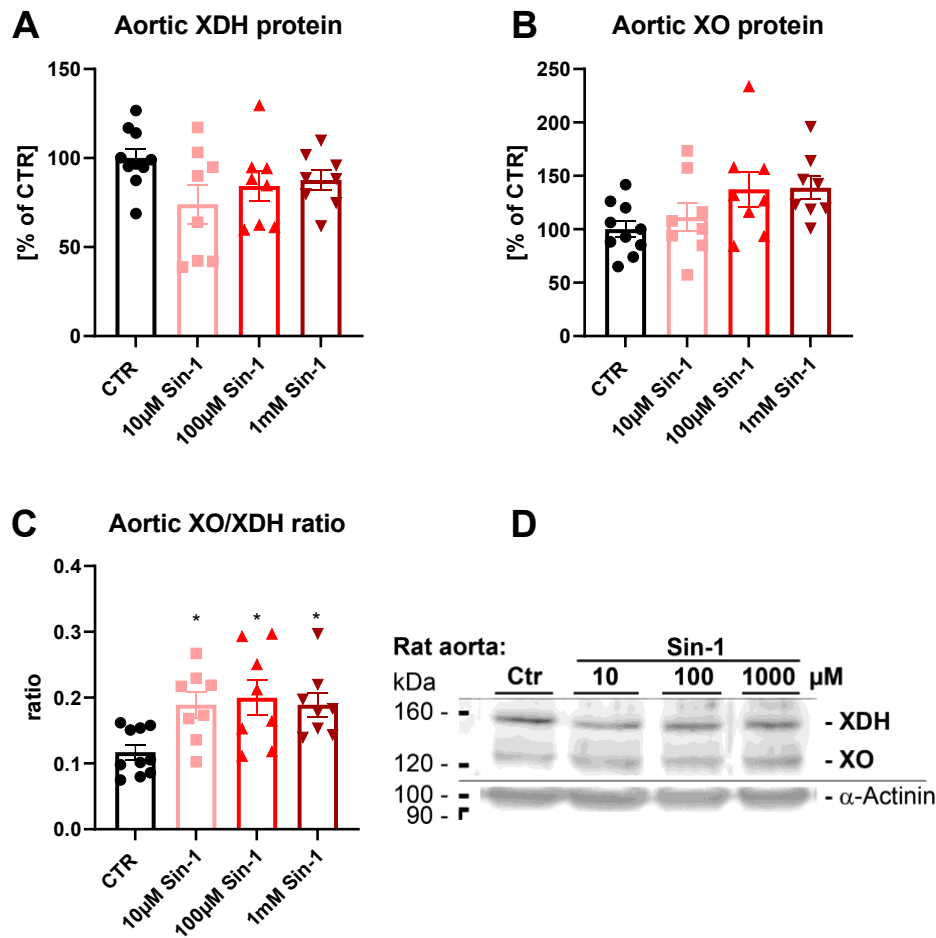


Abbildung 4-8: Effekte von Sin-1 auf die Expression der Xanthin-Dehydrogenase (XDH) und Xanthin-Oxydase (XO) im Aortengewebe von Ratten. Die Quantifizierung der Proteinexpression erfolgte mithilfe des Western Blot Verfahrens unter Verwendung spezifischer Antikörper. Das Aortengewebe wurde direkt nach Gewinnung und Präparation für 90 Minuten mit dem Peroxynitrit-Donor Sin-1 unterschiedlicher Konzentration inkubiert. C zeigt das Verhältnis der Proteinexpression von XO/XDH im jeweiligen Aortengewebe. D zeigt einen repräsentativen Western Blot, n = 8 – 10, Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM dargestellt, p < 0,05% * vs. CTR

4.2 Effekte von diätetischem Nitrit auf die Gefäßfunktion und die Rolle des Mikrobioms für die Bioaktivierung von Nitrit

Zur Überprüfung des Einflusses von diätetischem Nitrit auf die Gefäßfunktion erfolgte eine orale Gabe von NaNO₂ (7,5 mg/kg) via Gavage in Mäusen zwei Stunden vor

Euthanasie der Tiere und anschließender Organentnahme. Um die Bedeutung des Mikrobioms für die Bioaktivierung von Nitrit zu klären, wurden zusätzlich zu den in offener Käfighaltung aufgewachsenen Mäusen keimfreie Mäuse verwendet.

4.2.1 Vaskuläre Funktion

Analog zum ersten Studienteil wurde die vaskuläre Funktion durch isometrische Tonusstudien bestimmt. Neben der endothelabhängigen Vasodilatation wurde die endothelunabhängige Relaxation der Aortenringsegmente mit GTN Dosis-Wirkungskurven untersucht. Anhand dessen wurde die glattmuskuläre Funktion der Gefäße überprüft.

4.2.1.1 Endothelabhängige Relaxation

Bei den in konventioneller Käfighaltung aufgewachsenen Versuchstieren (CONV-R) wurde die endothelabhängige Relaxation durch orales Nitrit (NO_2^-) im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl) nicht verändert. Lediglich unter Verwendung hoher ACh Konzentrationen ($\log M$ (ACh) -7 bis $-5,5$) ließ sich ein geringfügiger, nicht signifikanter Trend zum Vorteil der NO_2^- -Behandlungsgruppe verzeichnen. In gleicher Weise zeigten sich in der Gruppe der keimfreien Mäuse keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe (GF-NaCl) und der Behandlungsgruppe (GF- NO_2^-). Bei Gegenüberstellung der in offener Käfighaltung aufgewachsenen Tiere (CONV-R) und der keimfreien Mäuse (GF) konnten indessen deutliche Unterschiede beobachtet werden. Hier waren die endothelabhängigen ACh-Relaxations-Kurven der keimfreien Mäuse (GF-NaCl und GF- NO_2^-) signifikant nach rechts verschoben. In dieser Gruppe wurde dem entsprechend eine Endotheldysfunktion gezeigt. (s. Abbildung **4-9**)

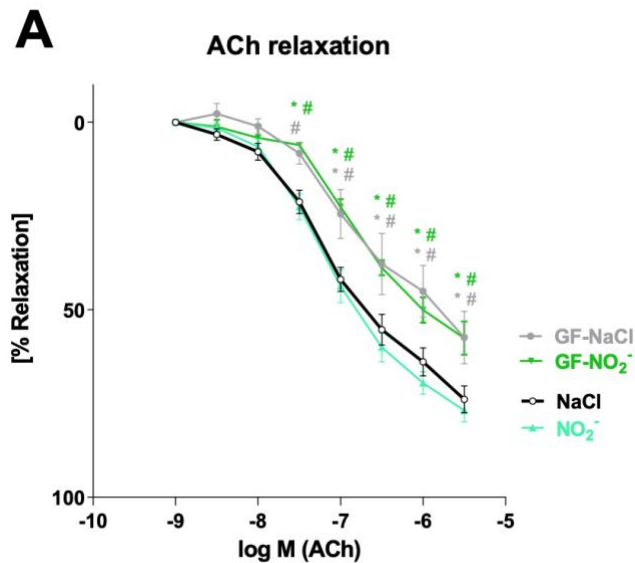


Abbildung 4-9: Effekte einer *in vivo* Behandlung mit anorganischem Nitrit (vs. NaCl) in Gegenwart und Abwesenheit des Mikrobioms (GF-NaCl, GF-NO₂⁻) auf die endothelabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Maus-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. Prozentuale Relaxation infolge von Acetylcholin-Gabe. n = 6 – 14 Tiere/Gruppe. Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM dargestellt, p < 0,05% * vs. NaCl, # vs. NO₂⁻.

4.2.1.2 Endothelunabhängige Relaxation

Durch Verwendung des endothelunabhängigen Vasodilatators GTN wird die glattmuskuläre Funktion der Gefäße untersucht. Diese konnte durch eine Behandlung mit diätetischem Nitrit (NO₂⁻) nicht verbessert werden. Zudem wirkte sich eine keimfreie Haltung der Versuchstiere, ergo die Verhinderung der Ausbildung eines enteralen Mikrobioms, nicht negativ auf die glattmuskuläre Funktion aus. Zusammenfassend zeigten sich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. (s. Abbildung 4-10)

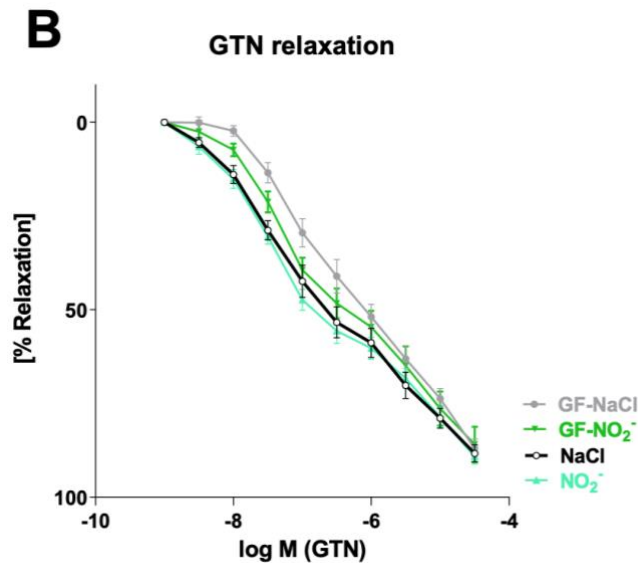


Abbildung 4-10: Effekte einer in vivo Behandlung mit anorganischen Nitrit in Gegenwart (NaCl, NO₂⁻) und Abwesenheit des Mikrobioms (GF-NaCl, GF-NO₂⁻) auf die endothel-unabhängige Vasodilatation. Die Untersuchung der Gefäßfunktion in Maus-Aortenringsegmenten erfolgte mit Hilfe isometrischer Tonusstudien im Organbad. Prozentuale Relaxation infolge Acetylcholin-Gabe. n = 6 – 14 Tiere/Gruppe. Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM dargestellt, p < 0,05% * vs. NaCl, # vs. NO₂⁻.

Diese Methode zeigte, dass die einmalige orale Gabe von Nitrit keinen positiven Einfluss auf die Gefäßfunktion hat. Jedoch konnte beobachtet werden, dass sich die ausbleibende Bildung des Mikrobioms negativ auf die endothelabhängige Relaxation auswirkt.

4.2.2 Effekte von diätetischem Nitrit auf die S-Nitrosylierung von Plasmaproteinen und die Rolle des Mikrobioms

Für die Herausarbeitung der Rolle des Mikrobioms für die Bioaktivierung von diätetischem Nitrit wurde der quantitative Nachweis von S-Nitrosothiol-positiven Proteinen im Plasma verwendet. Die Plasmalevel von DMPO-positiven Proteinen (die S-Nitrosylierung repräsentierend, wie im Methodenteil ausführlich beschrieben) diente als Maß für die Bioaktivierung. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines Dot Blot Assays.

Die densitometrische Auswertung ergab, dass eine Behandlung mit Nitrit per Gavage in konventionell gehaltenen Mäusen in einem signifikant gesteigerten DMPO-

positiven Plasmalevel resultierte (NaCl vs. NO_2^-). Im Gegensatz dazu waren die Plasmalevel in den keimfreien Mäusen (GF-NaCl und GF- NO_2^- vs. NaCl) nicht erhöht. Auch im direkten Vergleich der keimfreien Mäuse untereinander (GF-NaCl vs. GF- NO_2^-) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (s. Abbildung 4-11). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Nitrit Bioaktivierung in keimfreien Mäusen nahezu abwesend ist, also offensichtlich Bakterien im gastrointestinalen Trakt für die Nitrit Bioaktivierung und Bildung von S-Nitrosothiol-Spezies verantwortlich sind.

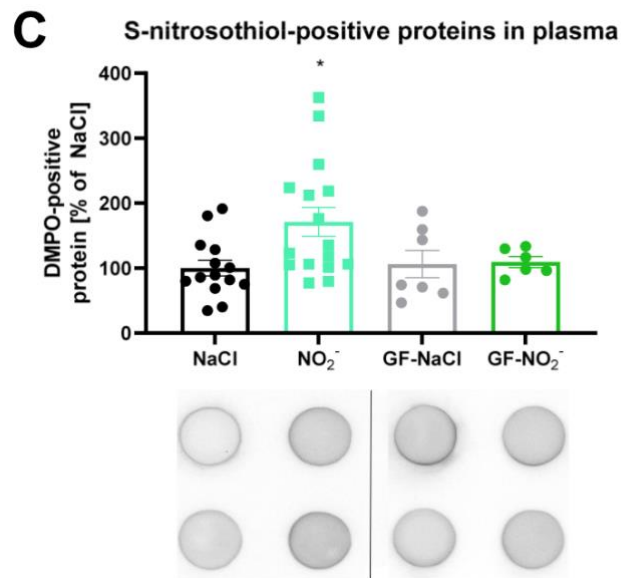


Abbildung 4-11: Effekte einer in vivo Behandlung mit anorganischen Nitrit auf die S-Nitrosylierung der Plasmaproteine (repräsentiert durch DMPO positive Proteine). Die Quantifizierung der Proteinexpression in Maus-Aortengewebe erfolgte mithilfe des Dot Blot Verfahrens unter Verwendung spezifischer Antikörper. n = 6 – 16 Tiere/Gruppe. Ergebnisse werden als Mittelwert \pm SEM dargestellt, $p < 0,05$ * vs. NaCl

5 Diskussion

Kardiovaskuläre Erkrankungen (engl. *cardiovascular disease, CVD*) stellen weltweit die führende Todesursache dar. Im Jahr 2019 konnten 17,9 Millionen Sterbefälle auf CVD zurückgeführt werden, was in etwa 32 % aller globalen Todesfälle entspricht. Die häufigsten damit assoziierten Krankheitsentitäten (85 %) sind Herzinfarkte und Schlaganfälle. Ein Großteil der kardiovaskulären Erkrankungen könnte jedoch durch eine Modifikation von Risikofaktoren (v.a. arterieller Hypertonie, Rauchen, Übergewicht, Diabetes mellitus und Bewegungsmangel) verhindert werden. Daher kommt der Vermeidung bzw. Behandlung der Risikofaktoren eine herausragende Bedeutung in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen bzw. Todesfällen zu (1).

Die arterielle Hypertonie konnte als einer der entscheidendsten Risikofaktoren herausgearbeitet werden. Nach einem kürzlich publizierten Bericht der WHO ist ein erhöhter systolischer Blutdruck ursächlich für mehr als 10 Millionen vermeidbare Todesfälle pro Jahr; das entspricht jeden fünften Sterbefall. Damit verursacht ein Hypertonus mehr Todesfälle als jeder andere Risikofaktor wie Rauchen, Übergewicht oder Diabetes (2). Führt man sich diese Zahlen vor Augen, wird die Relevanz einer adäquaten Therapie der arteriellen Hypertonie unmittelbar ersichtlich. Leider ist auch im Jahre 2023 die medizinische Versorgung von Hypertonikern unzureichend. Lediglich 54% aller Erwachsenen zwischen 30 – 79 Jahren mit Bluthochdruck wurden als Hypertoniker diagnostiziert, 42% werden therapiert und nur bei 21% der Patienten gilt die Hypertonie als gut eingestellt (2). Abbildung **5-1** stellt die globale medizinische Versorgung der arteriellen Hypertonie für beide Geschlechter dar. Wenn es gelänge die Versorgung von Hypertonikern zu verbessern, so könnten nach Schätzungen der WHO zwischen 2023 und 2050 76 Millionen Todesfälle verhindert werden (244).

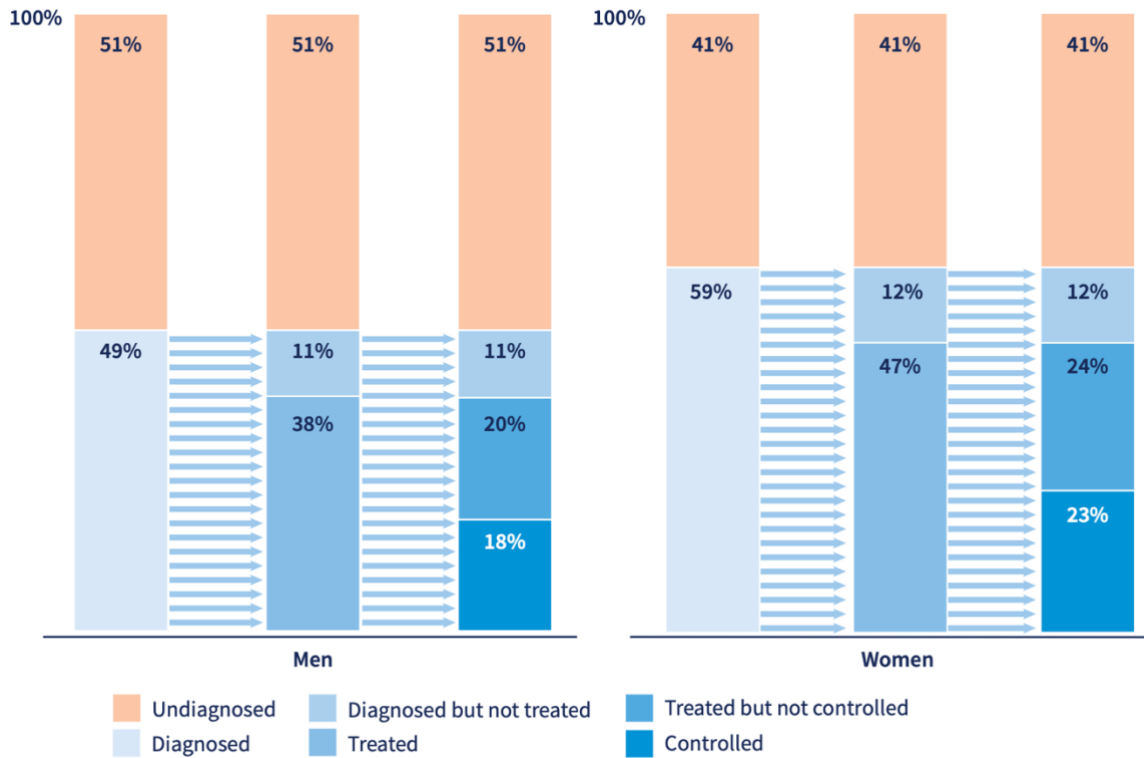


Abbildung 5-1: medizinische Versorgung der arteriellen Hypertonie. Übersicht zur globalen Versorgung von Hypertonikern zwischen 30 – 79 Jahren im Jahr 2019. Jeweils für beide Geschlechter Darstellung der prozentualen Anteile von (un-)diagnostizierter, (un-)behandelter oder (un-)kontrollierter Hypertonie. Es zeigt sich, dass lediglich 18% der Männer und 23% der Frauen hinsichtlich ihrer arteriellen Hypertonie adäquat eingestellt sind. [Abbildung aus (2)].

Anorganisches Nitrat und Nitrit stellen mögliche und interessant ergänzende Therapieoptionen dar. Als Stickstoffmonoxid Speicher erhöhen sie u.a. die Bioverfügbarkeit von •NO, wodurch sie die kardiovaskuläre Gesundheit positiv beeinflussen könnten. Zudem können sie unkompliziert mit der Nahrung, z.B. durch den Konsum von Nitrat/Nitrit reichem Gemüse oder Trinkwasser aufgenommen werden (198). Stamm et al. (Arbeitsgruppe Prof. Daiber) konnte bereits in einem Mausmodell für experimentelle arterielle Hypertonie (AT-II über 7 Tage) zeigen, dass oral aufgenommenes anorganisches Nitrit den Blutdruck normalisieren, die Endothelfunktion verbessern und den oxidativen Stress sowie die vaskuläre Inflammation verringern kann. Im direkten Vergleich von Nitrat und Nitrit konnten Stamm et al. die Überlegenheit von Nitrit herausarbeiten. Im Gegensatz zu Nitrit, verbesserte Nitrat zwar einzelne Parameter des oxidativen Stresses bzw. der Inflammation, konnte jedoch nicht einen normalen Blutdruck resp. die Gefäßfunktion wiederherstellen. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass Nitrit seine vorteilhafte Wirkung

nicht nur über die Funktion als •NO Donor entfaltet, sondern auch antioxidative und antiinflammatorische Effekte aufweist (7).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in dieser Arbeit die gefäßregulatorischen Eigenschaften von anorganischem Nitrit und die Bedeutung des Mikrobioms für dessen Bioaktivierung untersucht. Da oxidativer Stress und damit die einhergehende Störung der Endothelfunktion im engen Zusammenhang mit der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie stehen (57), wurden isolierte Aortenringsegmente mit verschiedenen Oxidantien exponiert und die Gefäßrelaxation in Abhängigkeit von ACh bzw. Nitrit gegenübergestellt (245).

Die Untersuchung der Gefäßfunktion erfolgte mithilfe der isometrischen Spannungsmessung im Organbad. Diese Methode ist in der Arbeitsgruppe Münzel/Daiber fest etabliert und wurde bereits vielfach publiziert (228, 229, 246). Als Tiermodell wurden in Anlehnung zur oben beschriebenen Arbeit von Stamm et al. Wistar Ratten verwendet. Die Vasorelaxation von Rattenaorten auf Nitrit wurde auch bereits in anderen Studien untersucht, was die Validität unseres Experiments unterstützt (247). Zur Untersuchung der Gefäßfunktion im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie wurde das Modell der AT-II Infusion (1 mg/kg/d) verwendet. Auch dieses Modell ist in der Arbeitsgruppe fest etabliert (127, 248). Es wurde ebenfalls in der Vergleichsstudie anorganisches Nitrat vs. Nitrit von Stamm et al. verwendet, was eine bessere Vergleichbarkeit beider Studien ermöglicht (7). Ferner bildet dieses Hypertonie-Modell einen ähnlichen Endorgan-Schaden ab, wie er auch bei Menschen mit anhaltend erhöhten Blutdruckwerten beobachtet wird (249).

5.1 Einfluss von Oxidantien auf die Endothelfunktion

Im Folgenden erfolgt eine detaillierte Betrachtung der Einflüsse der verwendeten Oxidantien (H_2O_2 , HOCl und $ONOO^-$) auf die Endothelfunktion. Die Inkubation der Aorten-Ringsegmente mit den Oxidantien zeigte erwartungsgemäß eine Verminderung der endothelabhängigen Relaxation, sodass auf eine Störung des Endothels durch die ROS/RNS geschlossen werden kann.

5.1.1 Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Nach einer Inkubation mit H₂O₂ zeigte sich die Endothelfunktion weniger stark eingeschränkt im Unterschied zur Inkubation mit hypochloriger Säure bzw. dem Peroxynitrit Donor Sin-1 (s.u.). Erst nach Exposition von 1 mM H₂O₂ Lösung zeigte sich eine signifikante Abnahme des Relaxationsvermögens. Zu beachten ist, dass die Konzentration von 1 mM H₂O₂ deutlich das physiologische Maß überschreitet. Physiologisch sind intrazellulär Konzentrationen von 1 bis 100 µM bzw. extrazellulär 0,1 – 10 µM H₂O₂. Die Konzentration im Plasma wird zwischen 1 – 5 µM angegeben (250). In diesem Bereich ist Wasserstoffperoxid wenig toxisch, vielmehr ist es ein wichtiges vaskuläres Signalmolekül, welches an der Regulation zahlreicher Prozesse wie Tonus, Inflammation oder Zellwachstum beteiligt ist (251).

Die Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie von Mian et al. Auch dort wurden Aortenringe von Ratten mit verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlicher Dauer mit H₂O₂ exponiert. Analog zu unseren Resultaten zeigte sich ein eingeschränktes Relaxationsvermögen auf ACh ab einer Konzentration von 1 mM H₂O₂ (252). Bei der Studie von Witting et al. wurde eine eingeschränkte Endothelfunktion bereits ab einer Konzentration von 25 µM H₂O₂ beobachtet (86). Allerdings wurden in diesem Experiment Aorten von Schweinen verwendet, sodass eine direkte Vergleichbarkeit nur eingeschränkt gegeben ist. Die Notwendigkeit einer hohen Konzentration der ROS für die Störung der Endothelfunktion mag u.a. dadurch begründet sein, dass H₂O₂ eine eher milde ROS darstellt, die mit den meisten Biomolekülen nur sehr langsam bis gar nicht reagiert. Hinsichtlich der relativen Reaktivität der ROS bzw. RNS weist H₂O₂, gemessen an der Geschwindigkeitskonstante (Reaktion mit GSH), im Vergleich zu Peroxynitrit oder HOCl eine deutlich geringere Reaktionsgeschwindigkeit auf (0,9 vs. 700 bzw. 10⁷ M⁻¹s⁻¹) (12). Erst bei hohen Konzentrationen führt H₂O₂ durch oxidative Zerstörung von Biomolekülen zur Dysfunktion und Apoptose bzw. Nekrose von Endothelzellen. Es wird angenommen, dass Superoxid-Anionen eine Schlüsselrolle in der H₂O₂ induzierten Abnahme der Bioaktivität von •NO bzw. Auslösung einer ED spielen. Dabei triggert H₂O₂ die •O₂⁻-Produktion durch die XOR, NOX und Mitochondrien (253). Die Beteiligung der eNOS bzw. deren Entkopplung durch H₂O₂ ist weniger deutlich. Witting et al. konnten in ihrer Studie keine Monomerisierung der eNOS, als

Hinweis für deren Entkopplung mit konsekutiver Superoxid Bildung, nachweisen (86). Stattdessen scheint H_2O_2 sogar die Transkription bzw. Translation der eNOS zu erhöhen (254). Weiterhin sind sekundäre Produkte wie das Hydroxyl-Radikal, welches aus H_2O_2 in der Fenton-Reaktion entsteht, sehr reaktiv und tragen zur Schädigung von Biomolekülen bei (12, 13).

5.1.2 Hypochlorige Säure (HOCl)

Hypochlorige Säure ist eine sehr reaktive Spezies, passend dazu wurde ein signifikant eingeschränktes Relaxationsvermögen auf ACh bereits ab Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ beobachtet. Zhang et al. haben ebenfalls eine konzentrationsabhängige Einschränkung der Endothelfunktion nach Inkubation der Aortenringe mit HOCl beobachtet. Dort stellte sich im Gegensatz zur hiesigen Studie ein vermindertes Relaxationsvermögen bereits ab $5 \mu\text{M}$ HOCl ein (255). Möglicherweise sind methodische Unterschiede ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnisse. Eine stärkere Vorkontraktion der Aortenringe in der hier durchgeführten Studie (70 – 80% vs. 50%) könnte zumindest teilweise das gemessene verminderte Relaxationsvermögen erst bei höheren HOCl Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$ vs. $5 \mu\text{M}$) erklären. Mechanistisch scheint HOCl die Bildung von Superoxid-Ionen zu stimulieren und dadurch zu einer ED beizutragen. Zhang et al. konnten ein protektiven Effekt der SOD im Kontext der HOCl induzierten ED nachweisen (256). Daraus lässt sich folgern, dass insbesondere das Superoxid-Radikal in der Induktion der ED involviert ist. Die SOD ist eines der Schlüsselenzyme des antioxidativen Systems und katalysiert die Dismutation von Superoxid-Radikalen zu Wasserstoffperoxid (257). Weiterhin gibt es Hinweise, dass HOCl L-Arginin – das Substrat der eNOS – modifiziert und infolgedessen als kompetitiver Inhibitor der eNOS wirken kann. Gestützt wird diese Erkenntnis durch die Beobachtung, dass die Zugabe von L-Arginin zu mit HOCl exponierten Aorten-Ringsegmenten zur Verbesserung der endothelabhängigen Relaxation führt (255). Ferner scheint HOCl die Bioverfügbarkeit von $\bullet\text{NO}$ durch die Entkopplung der eNOS zu mindern (256). Die Reaktion von Superoxid-Ionen mit $\bullet\text{NO}$ unter Bildung von Peroxynitrit verringert das $\bullet\text{NO}$ Angebot weiter. Zudem konnten Radovits et al. zeigen, dass auch die Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase durch HOCl zur ED beiträgt (258).

5.1.3 Peroxynitrit (ONOO⁻)

Peroxynitrit vermag als sehr reaktives nicht-Radikal eine Vielzahl an Biomolekülen zu oxidieren. Die Reaktion mit CO₂ führt zur Bildung der noch reaktiveren Radikale •CO₃⁻ und •NO₂, welche überwiegend für die oxidativen und nitrierenden Effekte von Peroxynitrit verantwortlich gemacht werden (13). Durch die Oxidation von Thioethern und Sulfhydryl-Gruppen, sowie Nitrierung und Hydroxylierung von aromatischen Gruppen werden die Zellfunktionen maßgeblich beeinflusst. Zou, Ullrich und Münzel konnten ferner zeigen, dass Peroxynitrit zur Hemmung der Prostazyklin-Synthese führt (259). Das Produkt Prostazyklin ist für die Integrität des Endothels essenziell und stellt den Gegenspieler zu Thromboxan und PGH₂ dar (260). Weiterhin inhibiert Peroxynitrit die sGC durch Oxidation des Enzyms (261). Zudem wird durch oxidative Depletion von BH₄ die eNOS entkoppelt und dysfunktional (262). Auf diese Weise wird der NO-cGMP Signalwege vielfach gestört. In der Summe kommt es zur Herunterregulation der protektiven Botenstoffe •NO und PGI₂ sowie zur gesteigerten Superoxidproduktion infolge der eNOS Entkopplung. In dieser Studie konnte die konzentrationsabhängige Einschränkung des Relaxationsvermögens bei der Exposition der Aorten-Ringsegmente mit dem Peroxynitrit Donor Sin-1 am besten beobachtet werden. Zwar führte die Inkubation mit 10 µM ONOO⁻ zu keiner signifikanten Einschränkung, dennoch konnte hier bereits (im Gegensatz zu den beiden anderen verwendeten Oxidantien) eine leichte Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve aufgezeichnet werden. Unter Verwendung der höheren Konzentrationen zeigte sich eine signifikante Störung der Endothelfunktion. Kongruent zu diesen Ergebnissen zeigte sich bei Korkmaz et al. ebenfalls eine deutlich eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation nach Inkubation mit 200 µM ONOO⁻ (263, 264).

Abbildung **5-2** stellt die o.g. Vorgänge zusammenfassend dar.

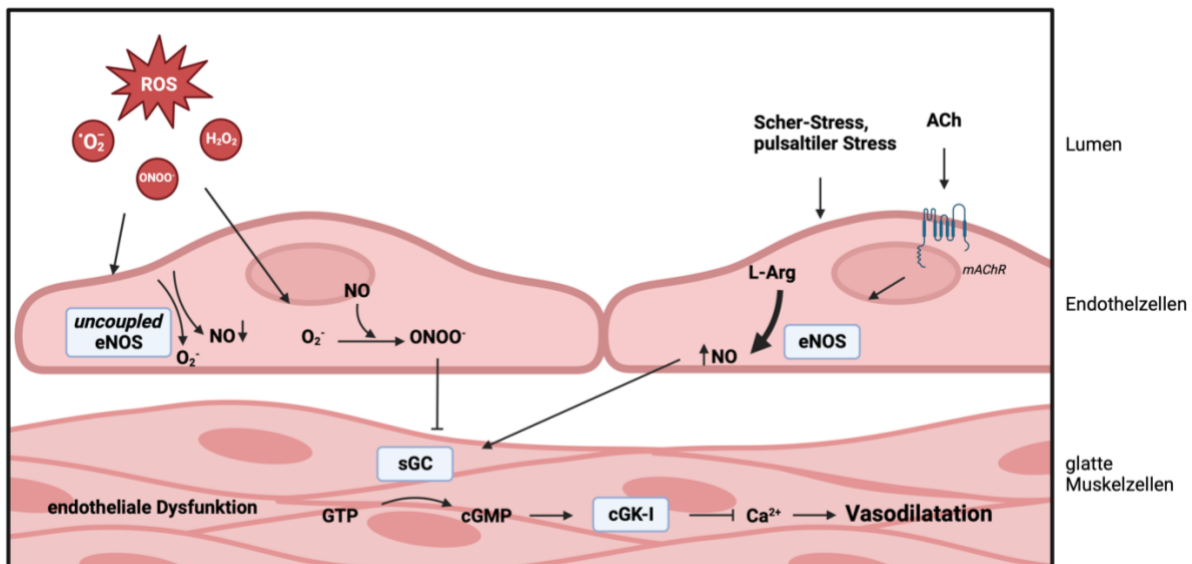


Abbildung 5-2: Einfluss der RONS auf die Endothelfunktion. Im gesunden Endothel führen Signale wie Scher-Stress, pulsatile Stress oder Acetylcholin (ACh) zur Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) mit konsekutiver Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin (L-Arg). Als ungeladenes gasförmiges Molekül kann •NO ungehindert in die glatte Gefäßmuskulatur diffundieren und die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktivieren. Die vermehrte Bildung von Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) führt zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGK-I). Dadurch nimmt die intrazelluläre Kalziumkonzentration ab, wodurch die Vasodilatation induziert wird. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies führen neben direkter Schädigung von zahlreichen Makromolekülen (nicht dargestellt) zu Abnahme der Bioverfügbarkeit von •NO in der Endothelzelle. Wichtige Mechanismen sind Entkopplung der eNOS, wodurch einerseits die •NO Produktion abnimmt und andererseits vermehrt Superoxid Radikale ($\bullet\text{O}_2^-$) generiert werden. Weiterhin reagiert O_2^- mit •NO zu Peroxynitrit (ONOO^-). ONOO^- fördert seinerseits die Entkopplung der eNOS und inhibiert die sGC. Adaptiert nach (265). Erstellt mit BioRender.com.

5.2 Einfluss von Oxidantien auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation

Die endothelabhängige Vasodilatation (ACh) wird insbesondere über •NO vermittelt (266). Aus den obigen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass die Exposition mit den verschiedenen Oxidantien zu einer Abnahme der Bioverfügbarkeit von •NO in den Aorten-Ringsegmenten geführt hat. Aller Wahrscheinlichkeit nach reagieren dabei Superoxid-Radikale (stimuliert durch H_2O_2 und HOCl) mit •NO unter Bildung von Peroxynitrit und/oder die eNOS wird durch die ROS/RNS gehemmt bzw. entkoppelt, sodass die •NO Bildung vermindert wird.

Wenn anorganisches Nitrit eine alternative •NO Quelle des klassischen L-Arginin-NO-Synthase-Weg darstellt, dann sollte die Nitrit-abhängige Relaxation – trotz der

Störung der eNOS und der verminderten Bioverfügbarkeit des endogenen •NO – nicht maßgeblich gestört sein. Tatsächlich wurde die Nitrit-abhängige Vasodilatation, konträr zu der endothelabhängigen Vasodilatation gegenüber ACh deutlich weniger stark durch die Oxidantien beeinflusst. Interessanterweise konnte nach einer Vorinkubation der Aorten weder bei Wasserstoffperoxid noch bei Sin-1 ein signifikanter Unterschied im Relaxationsvermögen der Ringsegmente beobachtet werden. Lediglich bei 1 mM HOCl zeigte sich eine deutlich eingeschränkte Relaxation auf Nitrit. Diese Ergebnisse weisen also darauf hin, dass durch Nitrit ausreichende Mengen •NO generiert werden, die die durch die Oxidantien induzierte Depletion von •NO kompensieren können und damit zu einer adäquaten Aktivierung der sGC in der *Tunica muscularis* mit konsekutiver Relaxation führen (267, 268).

Ferner zeigen die Ergebnisse aus dieser Studie, dass die Exposition mit den Oxidantien primär zur Schädigung der Endothelschicht und weniger der Muscularis geführt hat. Die für das Relaxationsvermögen notwendige Maschinerie, bestehend aus sGC und PKG, scheint hinreichend intakt zu sein. Das aus dem Nitrit generierte •NO diffundiert also zur Muscularis, aktiviert dort die sGC, die die Bildung von cGMP stimuliert. cGMP aktiviert seinerseits die PKG, welche durch Phosphorylierung der MLCK die Vasodilatation der Aorten-Ringsegmente vermittelt (160, 269). Auf Grund der erhaltenen Nitrit-abhängigen Relaxation kann eine hinreichende Funktion des sGC-PKG-Systems vermutet werden. Eine Studie von Korkmaz et al. unterstützt diese Hypothese. Dort zeigte sich die endothelunabhängige Vasodilatation (induziert durch Natrium Nitroprussid) nach Inkubation mit Peroxynitrit (200 µM) ebenfalls nicht gestört (264). Analoge Beobachtungen konnten auch für H₂O₂ (400 µM) (251) sowie HOCl (400 µM) (258) gemacht werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich nach Exposition von 1 mM HOCl auch bei der Nitrit-abhängigen Vasodilatation eine deutliche Einschränkung der Gefäßfunktion. Möglicherweise führt die hohe – deutlich supraphysiologische – Konzentration von HOCl zur Störung des sGC-PKG-Systems in der Tunica muscularis, sodass das durch Nitrit bereitgestellte •NO keine adäquate Gefäßreaktion evozieren kann. Shirasaki et al. zeigten in ihrer Studie, dass die vasodilatierenden Effekte von anorganischem Nitrit (NaNO₂) nach Entfernung des Endothel sogar noch verstärkt werden. Demnach ist für die Nitrit evozierte Vasorelaxation überwiegend die Intaktheit der Muscularis notwendig. Vor diesem Hintergrund stützen die Beobachtungen von Shirasaki et al. die Hypothese, dass die deutlich

supraphysiologischen Konzentrationen von HOCl zur Störung des Relaxationsapparates der Muscularis führen (270). Ergo ist für die Auslösung der Nitrit-abhängigen Relaxation vor allem die Intaktheit der Muscularis entscheidend. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die hochkonzentrierte HOCl die Nitrit reduzierenden Enzyme (z.B. die XOR) inhibiert bzw. zerstört, sodass weniger/unzureichend bioaktives •NO gebildet wird.

5.2.1 Vergleich der Nitrit-abhängigen Vasodilatation mit der endothelunabhängigen Dilatation anderer Studien

Interessanterweise zeigte sich die Nitrit-abhängige Vasodilatation in dieser Studie resistenter gegenüber den Oxidantien als eine durch andere •NO Donatoren evozierte Vasodilatation in vergleichbaren Studien. So zeigte sich bei Mian et al. nach Vorbehandlung der Aorten-Ringsegmente mit 1 mM H₂O₂ eine eingeschränkte endothelunabhängige Relaxation auf den Vasodilatator und •NO Donor GTN. Korkmaz et al. stellten in ihrem Experiment eine reduzierte Sensitivität auf Natrium Nitroprussid (engl. sodium nitroprusside, SNP) nach Exposition mit Peroxynitrit fest (263). Die Substanz SNP zerfällt im Gewebe spontan zu •NO und aktiviert auf diese Weise die sGC (263).

Diese Abweichungen in den Ergebnissen könnten einerseits methodisch begründet sein. Beispielsweise könnte eine interexperimentell unterschiedliche Vorspannung der Aorten-Ringsegmente zu einem differenten Relaxationsverhalten geführt haben.

Andererseits könnten diese Resultate auch darauf hinweisen, dass anorganisches Nitrit nicht nur als reiner •NO Donor fungiert, sondern über weitere Mechanismen eine Relaxation evoziert. Unterstützt wird diese Hypothese von Ling et al., die zeigen konnten, dass Nitrit über endothelabhängige und endothelunabhängige Mechanismen wirkt. Anorganisches Nitrit scheint direkt die eNOS zu aktivieren, da in Gegenwart des eNOS Inhibitors L-NAME die Nitrit-abhängige Vasodilatation abgeschwächt wurde. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Nitrit direkt die sGC aktiviert. Denn trotz der Gegenwart eines eNOS Inhibitors (L-NAME) und eines •NO Scavengers konnte eine Nitrit-abhängige Relaxation verzeichnet werden, welche erst nach Hinzufügen eines sGC Inhibitors aufgehoben wurde (267). Passend dazu ist

Peroxynitrit ein starker Inhibitor der sGC (261), sodass Nitrit womöglich hier direkt entgegenwirken kann und dadurch die endothelunabhängige Relaxation weniger gestört ist als bei anderen •NO Donatoren. In Kongruenz zu dieser Vermutung, konnte durch den direkten sGC Stimulator Cinaciguat die Peroxynitrit induzierte endotheliale Dysfunktion verbessert werden (263). Abbildung 5-3 fasst die wesentlichen Mechanismen zusammen.

Zudem konnte in der Studie von Stamm et al. der AG Daiber/Münzel (7) die chronische Behandlung mit Nitrit in hypertensiven Mäusen (AT-II induziert) die Expression der eNOS und der sGC im Aortengewebe wieder normalisieren. Weiterhin führte die Nitrit Behandlung zur Normalisierung der aortalen Phosphorylierung des VASP Proteins (Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein) an Serin²³⁹, was einen Surrogat Parameter des intakten NO-cGMP/cGK1 Signalwegs darstellt (271). Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Nitrit neben der Erhöhung der Bioverfügbarkeit von •NO auch direkt im eNOS-cGMP/cGK1 Signalweg eingreift. Allerdings erfolgte dort die Behandlung mit Nitrit *in vivo*, sodass eine Übertragbarkeit auf die hier durchgeführte Studie nur bedingt möglich ist. Dennoch ist vaskulärer oxidativer Stress ein wesentliches Merkmal der AT-II induzierten Hypertonie (186), sodass dort z.T. ähnliche oxidative Schäden wie auch im *in vitro* Modell beobachtet werden können.

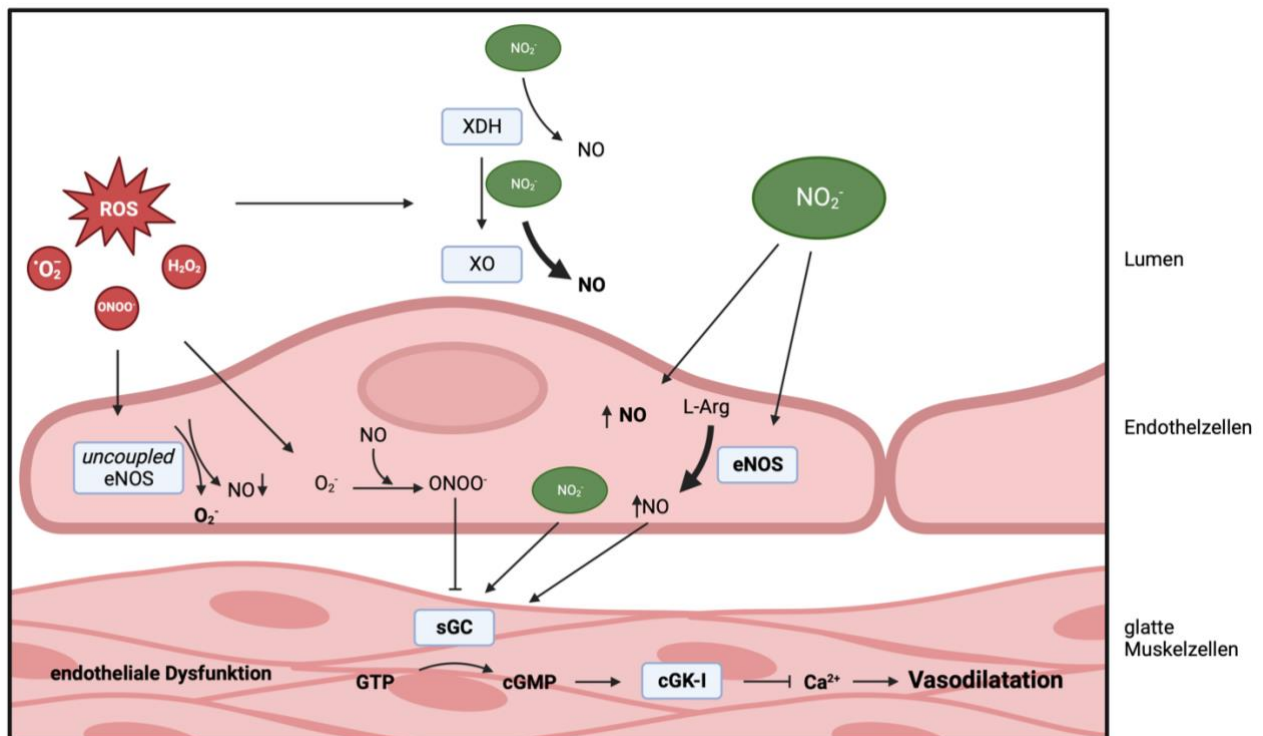


Abbildung 5-3: Einfluss von Nitrit auf die Endothelfunktion. Die Bioaktivierung von anorganischem Nitrit (NO_2^-) erfolgt durch das Enzym Xanthin-Dehydrogenase (XDH) bzw. Xanthin-Oxidase (XO). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) fördern dabei die Konversion der XDH zur XO. Dabei scheint die Bioaktivierung von NO_2^- durch die XO gefördert zu werden. Als alternative $\bullet\text{NO}$ Quelle steigert NO_2^- das Stickstoffmonoxid (NO) Angebot im Endothel. Zudem scheint NO_2^- die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) direkt zu aktivieren und dadurch die Bioverfügbarkeit von $\bullet\text{NO}$ zu erhöhen. Weiterhin vermag anorganisches NO_2^- auch die lösliche Guanylatzyklase (sGC) direkt zu aktivieren und dadurch die Vasodilatation zu fördern. Durch Erhöhung des $\bullet\text{NO}$ Angebots und der Stimulierung der Schlüsselenzyme des NO/sGC/cGK-I Signalwegs kann anorganisches NO_2^- die Endothelfunktion verbessern. Abbildung nach (265) und modifiziert. Erstellt mit BioRender.com.

5.3 Einfluss einer AT-II induzierten Hypertonie auf die Nitrit-abhängige Vasodilatation

Als Teil des RAAS-Systems spielt AT-II eine fundamentale Rolle in der Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie. Vaskulärer oxidativer Stress und endotheliale Dysfunktion stehen dabei im engen Zusammenhang in der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie. In den von Münzel et al. durchgeführten Studien konnte für AT-II gezeigt werden, dass es die Superoxid-Radikal Produktion über die Stimulierung und Hochregulierung der NOX steigert (272, 273). Die Aktivierung der NOX ist von besonderer Bedeutung, da sie als Hauptquelle der AT-II induzierten ROS Produktion – gemäß der zündelnden Radikal Hypothese (114) – durch

Stimulierung sekundärer RONS Quellen den oxidativen Stress aggravieren kann (61, 274). Die Bedeutung der Superoxid Produktion resp. des oxidativen Stresses wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Hemmung der NOX zur Verbesserung des Blutdrucks führt (275).

Erwartungsgemäß zeigte sich in den durchgeführten Tonusstudien eine gestörte endothelabhängige Vasodilatation. Dabei war einerseits die Sensitivität auf den Neurotransmitter ACh als auch die maximal evozierte Relaxation vermindert. Der mit der (AT-II induzierten) Hypertonie einhergehende oxidative Stress vermag, analog der Exposition mit den Oxidantien, zur Entkopplung der eNOS sowie zur Störung des NO-cGMP/cGK1 Signalweges geführt haben (176, 273).

Vor dem Hintergrund der zuvor dargestellten pathophysiologischen Überlegungen, insbesondere hinsichtlich verminderter Verfügbarkeit des Vasodilatators •NO sowie der möglichen vielfältigen Effekte von Nitrit, könnte man erwarten, dass die Nitrit-abhängige Vasodilatation weit weniger gestört ist. Denn wie bereits dargestellt, könnte Nitrit als •NO Donor und möglicher eNOS- bzw. sGC-Aktivator den AT-II induzierten oxidativen Schaden kompensieren. Jedoch war die Nitrit-abhängige Vasodilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe ähnlich eingeschränkt wie die endothelabhängige Relaxation gegenüber ACh. Allerdings war die maximal erreichbare Dilatation nicht signifikant eingeschränkt. Zudem zeigte sich die Sensitivität bei der Nitrit-Reaktion tendenziell weniger gestört als bei der ACh-Reaktion. Das im Model der AT-II induzierten Hypertonie die endothelunabhängige Relaxation weniger gestört ist als die ACh induzierte Vasodilatation konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden (248, 276). Diese Ergebnisse weisen auf eine leichte Schädigung des muskulären Relaxationsapparates der behandelten Tiere hin. Aufgrund der weitgehend erhaltenen maximalen Relaxation scheint die Maschinerie jedoch insgesamt funktionsfähig zu sein.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass im Rahmen der arteriellen Hypertonie (AT-II) andere bzw. weitere Schädigungsmechanismen auf das Gefäß einwirken müssen als bei der alleinigen Exposition mit den Oxidantien. Denn dort zeigte die Gefäßantwort auf Nitrit im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen relevanten Unterschied (exklusive 1 mM HOCl). Möglicherweise reicht die kurze Expositionszeit mit den Oxidantien nicht aus, um die glatte Gefäßmuskulatur entscheidend zu schädigen. Denkbar wäre, dass beispielsweise keine ausreichende Menge von

Peroxynitrit bis zur Tunica muscularis diffundieren und dort den NO-cGMP/cGK1 Signalweg in dem Umfang oxidativ schädigen, der nicht mehr von Nitrit kompensiert werden kann (263, 267). Ein wichtiger Unterschied ist, dass bei den behandelten Tieren das AT-II sieben Tage lang *in vivo* wirken konnte.

Während dieser langen Expositionsdauer könnte durch die intrinsische Bildung von •NO und Superoxid-Radikalen genügend Peroxynitrit generiert worden sein, welches zur oxidativen Schädigung glatter Muskelzellen geführt haben könnte. Ferner führt AT-II neben der Aktivierung der NOX2 im Endothel auch zur Stimulierung der NOX1. Diese Isoform wird insbesondere in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert und ist dadurch eine wichtige Quelle der AT-II induzierten Superoxid Produktion (277-279). Im Gegensatz zur *ex vivo* Exposition mit den Oxidantien vermag so der oxidative Stress bei der AT-II induzierten Hypertonie die gesamte Gefäßwand erreichen. Weiterhin trägt auch die Einwanderung von Immunzellen in die Gefäßwand und die damit einhergehende vaskuläre Inflammation entscheidend zur Entstehung des oxidativen Stresses und der arteriellen Hypertonie bei (186, 280). Die Aktivierung der NOX durch AT-II mit konsekutiver ROS Produktion scheint die Migration von Leukozyten in die Aorta zu triggern (281). Wenzel et al. konnten zeigen, dass insbesondere proinflammatorische Monozyten die vaskuläre Dysfunktion in der AT-II induzierten Hypertonie vermitteln. Hierbei scheint die phagozytäre NOX im Schädigungsprozess eine wichtige Rolle zu spielen (186). Ferner induziert AT-II auch strukturelle Veränderungen am Gefäß im Sinne eines vaskulären Remodelings. Die Stimulierung des Wachstums der glatten Gefäßmuskulatur und Veränderungen in der extrazellulären Matrix führen zwar einerseits zu verstärktem Kontraktionsvermögen, andererseits ist dadurch auch das Relaxationsvermögen gestört (282). Phosphorylierungen verschiedener Kinasen, oxidativer Stress und die vaskuläre Inflammation werden mit der Hypertrophie der Media assoziiert (186, 281-283). Die Bedeutung des oxidativen Stresses für die Pathogenese der Media-Hypertrophie wird gestützt durch die Beobachtung, dass durch Hemmung der NOX die Hypertrophie abgeschwächt werden kann (281).

Wird anorganisches Nitrit *in vivo* angewendet, vermag es bei hypertensiven Mäusen (AT-II) die Gefäßfunktion zu verbessern. Stamm et al. (7) konnten zeigen, dass die Behandlung mit anorganischem Nitrit (7,5 mg/kg/d) sowohl den Blutdruck senken als auch die endothelabhängige und die endothelunabhängige Vasodilatation (im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit AT-II) verbessern konnte. Passend dazu war

in der Studie bei den behandelten Tieren die Expression der NOX1 und die ROS Bildung im Aortengewebe verringert und die Entzündungsmarker in der Aorta im Vergleich zu den nur mit AT-II behandelten Tieren signifikant reduziert. Auch das vaskuläre Remodeling resp. die Hypertrophie konnte durch die Nitrit Therapie leicht verbessert werden (nicht signifikant). Die Studie zeigt also, dass die (AT-II induzierte) Hypertonie zum oxidativen Stress, Inflammation und Hypertrophie der Gefäßwand führt. Diese Gefäßveränderungen gehen mit einer Schädigung des kompletten Relaxationsapparates einher, was auch in dieser Studie die endothelunabhängige Vasodilatation (AT-II Gruppe) eingeschränkt haben könnte. In der Studie von Stamm et al. konnte jedoch die *in vivo* Behandlung mit anorganischem Nitrit diese Folgen abmildern (7), indem es neben der Erhöhung der Bioverfügbarkeit von •NO auch antiinflammatorisch wirkte und den oxidativen Stress reduzierte. *Ex vivo* können diese Wirkmechanismen nicht vollständig reproduziert werden, zudem sind die mit AT-II assoziierten strukturellen Gefäßveränderungen in einem solchen *in vitro* Experiment wahrscheinlich nicht mehr beeinflussbar. Vermutlich wirkt Nitrit in diesem Szenario ausschließlich über den NO/sGC/cGMP-Signalweg, was sich in einer eingeschränkten endothelunabhängigen/Nitrit-abhängigen Vasodilatation zeigt. Die Abbildung 5-4 stellt die wesentlichen Mechanismen zusammenfassend dar.

Im Gegensatz dazu wurde bei Ling et al. interessanterweise ein verstärkte Nitrit-abhängige Vasodilatation in Aortenringen von hypertensiven Ratten beobachtet (267). Allerdings wurde in diesem Experiment auf spontan hypertensive Ratten (SHR) zur Erzeugung einer arteriellen Hypertonie zurückgegriffen. Pathophysiologisch basiert die arterielle Hypertonie bei SHR überwiegend auf vererbaren Mechanismen. Insbesondere scheint sie über eine Aktivierung des RAAS und des sympathischen Nervensystems vermittelt zu werden. Ferner spielt auch oxidativer Stress eine wichtige Rolle (284). Die unterschiedlichen Pathomechanismen mögen zu anderen vaskulären Veränderung als bei der AT-II induzierten Hypertonie führen. Möglicherweise ist die differierenden Beobachtung die Konsequenz der Verwendung dieser verschiedenen Hypertoniemodelle.

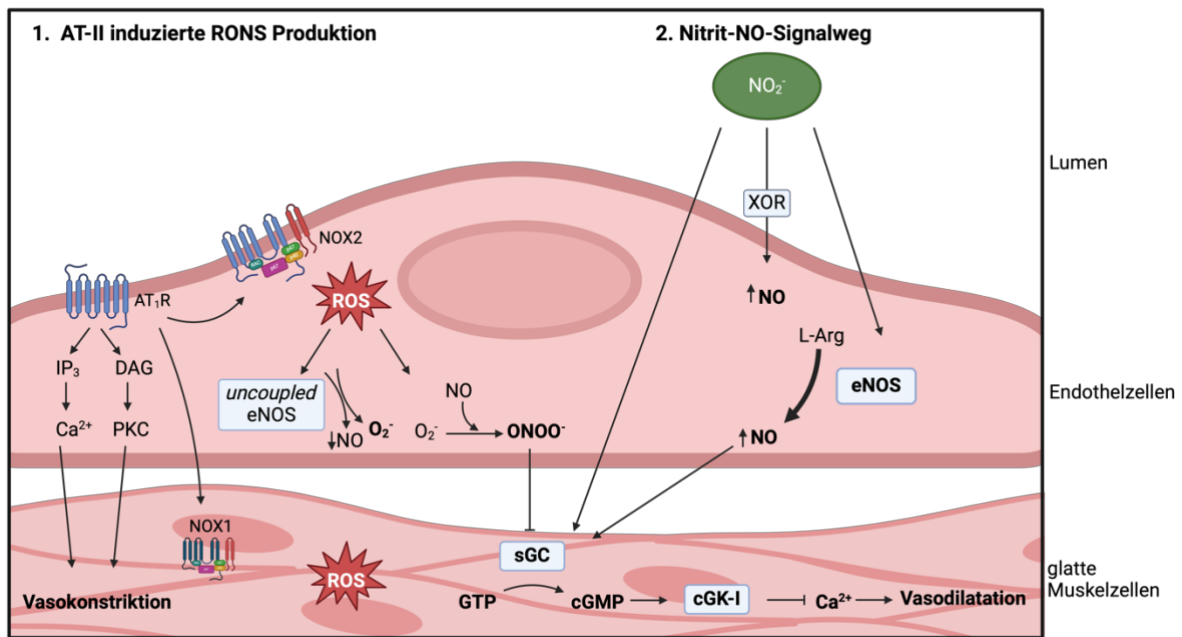


Abbildung 5-4: Vasculäre Effekte von Angiotensin II. Angiotensin II (AT-II) evoziert über Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺ Spiegel und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur. Daneben kann es über Aktivierung der NADPH Oxidase 2 (NOX 2) oxidativem Stress in den Endothelzellen induzieren und die Bioverfügbarkeit von •NO verringern. Weiterhin wird durch AT-II die NOX 1 (die insbesondere in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert wird) stimuliert und dadurch auch in den glatten Muskelzellen die ROS Produktion gesteigert. Ferner führt AT-II auch zu Einwanderung von Immunzellen und zum vasculärem Remodeling (hier nicht dargestellt). Abbildung adaptiert von (285) und modifiziert. Erstellt mit BioRender.

5.4 Einfluss des Peroxynitrit-Donators Sin-1 auf die XOR

Die Bioaktivierung von Nitrit erfolgt durch zahlreiche Enzyme. Insbesondere sind Häm-basierte (z.B. Hämoglobin und Myoglobin) und Molybdän-basierte Reduktasen (XOR) an der Reduktion von Nitrit zu •NO beteiligt (286). Vielfach wurde für eine ausreichende Bioaktivierung die Notwendigkeit von hypoxischen bzw. aziden Bedingungen beschrieben. Daher wird der Nitrat-Nitrit-NO Signalweg oft als sog. Salvage-Pathway der NOS-abhängigen •NO Bildung angesehen, wenn diese durch O₂-Mangel kompromittiert wird (6, 192, 287).

Auch im Versuchsaufbau dieser Studie wurde ein hypoxisches Umfeld abgebildet. Zwar wurde im Organbad ein physiologisches Milieu simuliert, jedoch wurden die Aorten-Ringsegmente mit Carbogen begast (95% CO₂ und 5% O₂). Entsprechend zeigten sich konzentrationsabhängige Relaxationsmuster auf Nitrit, sodass unter den

gegebenen Bedingungen von einer adäquaten Umwandlung von Nitrit in •NO ausgegangen werden kann. Allerdings gibt es auch mehrere Studien, die in einem ähnlichen Versuchsaufbau normoxische Bedingungen simulierten und dennoch eine Nitrit-abhängige Relaxation verzeichnen konnten (267, 288).

Es ist jedoch unklar, welchen Einfluss die Inkubation mit den RONS auf die Bioaktivierung von Nitrit und die induzierte Vasodilatation hatte. Totzeck et al. berichteten in Ihrer Studie, dass die Nitrit-abhängige Relaxation von ROS negativ beeinflusst wird. Die zusätzliche Inkubation der Aortenringe mit Katalase und dem SOD-Mimetikum Tempol verbesserte die Vasodilatation auf Nitrit (289). Trotz der Ergebnisse von Totzeck et al. wurde die Nitrit-abhängige Relaxation durch oxidativen Stress nicht wesentlich eingeschränkt, wie es sich in unserem Experiment im konstanten Relaxationsverhalten bei steigenden RONS Konzentrationen zeigte.

In unserer Studie wurde zudem der Einfluss von oxidativem Stress auf die XOR untersucht. Da Peroxynitrit einer der bedeutendsten RONS ist, welche zu oxidativen Schäden im Organismus führt, wurden für die Analyse der XOR Aorten nach Inkubation mit Sin-1 verwendet. Die XOR gilt als eines der wesentlichen Enzyme, dass die Bioaktivierung von Nitrit vermittelt (145, 290, 291). So postulierten Webb et al., dass die XOR das zentrale Enzym im Kontext der protektiven Eigenschaften von Nitrit im myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens ist (144). Weiterhin schwächte der XOR Inhibitor Allopurinol die blutdrucksenkenden Effekte von Nitrit in SHR deutlich ab (146). Die XOR ist im Organismus überwiegend als Dehydrogenase (XDH) aktiv. Durch oxidative Modifikation oder Proteolyse kann sie jedoch reversibel bzw. irreversibel in die Oxidase-Form überführt werden (131).

Die Exposition der Aortenringe mit dem Peroxynitrit Donor Sin-1 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die XDH Expression. Hinsichtlich der Xanthin-Oxidase Isoform konnte man mit steigender Sin-1 Konzentration eine im Trend steigende Expression beobachten. Konsekutiv erhöhte die Inkubation mit Sin-1 das XO/XDH Verhältnis. Demzufolge lässt sich ableiten, dass die Exposition mit RONS die Umwandlung der XDH-Isoform in die Oxidase Isoform fördert. Untersuchungen von Sakuma et al. unterstützen diese These. Dort evozierte die Exposition mit Peroxynitrit ebenfalls die Konversion der XDH zur XO im Lebergewebe (292).

Dabei ist besonders interessant, dass es Hinweise gibt, dass die XO eine stärkere Nitrit-Reduktase Aktivität als die XDH aufweist (147). Scheinbar fördern RONS durch

Induktion der Konversion zur Xanthin-Oxidase-Isoform die Bildung von protektivem •NO aus Nitrit. Dies könnte womöglich einen Schutzmechanismus vor oxidativem Stress darstellen. Durch vermehrte Bildung von •NO über den Nitrit-NO-Weg wird versucht die NO-Depletion durch oxidativen Stress (teils) zu kompensieren. Diese Idee wird von Montenegro et al. unterstützt, die postulierten, dass womöglich die erhöhte XOR-Aktivität im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie einen Kompensationsmechanismus darstellt, der die Reaktion auf Nitrit verbessert und die •NO Bioverfügbarkeit erhöht (293). Passend dazu wird offenbar die XOR Aktivität in eNOS defizitären Mäusen hochreguliert – also in einem •NO Mangelzustand (294). Interessanterweise geht dies unter Nitrat/Nitrit Supplementation einerseits mit einer erhöhten •NO Verfügbarkeit einher, andererseits konnte gleichzeitig eine reduzierte ROS Produktion durch die XOR beobachtet werden. Peleli et al. gehen davon aus, dass es Wechselwirkungen (*crossstalks*) zwischen der XOR und eNOS geben muss, die den Nitrat-Nitrit-NO Signalweg beeinflussen und dadurch eine ausreichende •NO Bioverfügbarkeit sicherstellen (294). Die verstärkte Nitrit-Reduktase Aktivität der XOR könnte in unserer Studie daher ausreichend •NO produziert haben, sodass Sin-1 die Nitrit-abhängige Relaxation nicht einschränken konnte. Diese Hypothese steht jedoch im Widerspruch mit den Ergebnissen aus der Studie von Maia et al. Dort wurde die Nitrit-Reduktase Aktivität zwischen XDH und XO gegenübergestellt und zeigte sich in Bezug auf die Reaktionskinetik nicht unterschiedlich (295).

5.4.1 Die potenzielle Rolle der XOR bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die Bedeutung der XOR als Nitritreduktase bzw. für die Bioaktivierung von Nitrit ist unumstritten. In vielen Studien wurde gezeigt, dass die Hemmung der XOR mit XOR-Inhibitoren wie Allopurinol oder Oxypurinol eine deutlich Abnahme der durch Nitrit evozierten Effekte zur Folge hat (204, 288, 296). Denn sowohl die Oxidation von (Hypo-)Xanthin als auch die Reduktion von Nitrit findet an der Molybdän Domäne des Enzyms statt. Allopurinol bindet an diese Domäne und wird dabei zu Oxypurinol oxidiert. Oxypurinol geht mit dem reduzierten Molybdän eine feste Bindung ein, wodurch das Enzym kompetitiv gehemmt wird (297). Außerdem zeigt diese Arbeit

Hinweise, dass die Redox-Umwandlung der XDH zur XO die Bioaktivierung von weiterem Nitrit fördert.

Allerdings ist die XOR auch zweifelsfrei eine relevante ROS Quelle und wirkt bei der Entstehung und Unterhaltung von oxidativem Stress mit. Insbesondere die XO scheint für die Produktion von Superoxid-Ionen verantwortlich zu sein, da sie molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor bevorzugt (130). Sowohl tierexperimentelle als auch humane Studien geben Hinweise, dass die pharmakologische Hemmung der XOR den oxidativen Stress verringern und die Endothelfunktion verbessern kann (298). Guthikonda et al. berichten in ihrer Arbeit, dass die Gabe von Allopurinol die Endothelfunktion von Rauchern verbessert (133). In Kongruenz zu diesen Berichten konnten auch Xin et al. in einer Meta-Analyse von randomisiert kontrollierten Studien beobachten, dass Allopurinol bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil die Endothelfunktion verbessert (299). Auch eine Multicenter-Studie von Maclsaac et al. zeigte, dass die Einnahme von Allopurinol in älteren Patienten mit einer geringeren Rate von Schlaganfällen und kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist (142).

Die Meta-Analyse von van der Pol et al. ergab, dass die Daten der untersuchten Studien darauf hindeuten, dass die Einnahme von Allopurinol das kardiovaskuläre Risiko senken könnte. Allerdings attestierten die Autoren den untersuchten Studien nur eine geringe bis moderate Qualität. Insbesondere fehlte es an ausreichend dimensionierten, randomisierten und prospektiven Studien (143). Passend dazu zeigte die im Jahre 2022 publizierte multizentrische, prospektive und randomisierte Studie von Mackenzie et al. keine Unterschiede in Bezug auf Myokardinfarkte, Schlaganfälle oder tödliche kardiovaskuläre Ereignisse (300). Daher bleibt die protektive Rolle einer XOR-Hemmung umstritten, wohingegen die Enzymhemmung die Effekte einer Nitrit Supplementierung abschwächt (288). Insofern wären Studien interessant, die bei Probanden mit arterieller Hypertonie oder kardiovaskulärer Erkrankungen/Risiko eine Nitrit Supplementation und eine XOR Hemmung miteinander vergleichen und ggf. zusätzlich eine gleichzeitige Einnahme von XOR Hemmern und Nitrit gegenüberstellen.

5.5 Akute Effekte einer Nitrit Supplementierung auf die Gefäßfunktion und der Einfluss des Mikrobioms auf die Bioaktivierung

Neben der akuten Wirkung von anorganischem Nitrit auf die Gefäßfunktion *in vitro*, wurde auch die akuten Effekte von Nitrit *in vivo* auf die vaskuläre Funktion untersucht. Hierfür wurde den Versuchstieren zwei Stunden vor Euthanasie anorganisches Nitrit (7,5 mg/kg) via oraler Gavage verabreicht. Diese Dosis ist auf Basis der Studie von Stamm et al. der AG Daiber/Münzel gewählt worden, da sie bei 7-tägiger Gabe die Gefäßfunktion verbessern und den Blutdruck senken konnte (7). Der Zeitraum von zwei Stunden ist für eine adäquate Magen-Darm-Passage ausreichend, denn bereits nach einer Stunde kann Mageninhalt in Dünndarm bis Zökum gefunden werden (301). Zudem konnte durch Friedman et al. gezeigt werden, dass relevante Mengen von oralem Nitrit bereits nach 10 Minuten resorbiert werden (302). Die Relevanz der kommensalen Mikrobiota für die Bioaktivierung von anorganischem Nitrat ist unbestritten (189); für Nitrit ist sie weit weniger gut untersucht. Um die Bedeutung der Mikrobiota als Modulator der antihypertensiven Wirkung und den Metabolismus von Nitrit zu untersuchen, wurden zusätzlich keimfreie Mäuse (GF) verwendet. Hier wurde das Mausmodell gegenüber Ratten bevorzugt, da die keimfreie Haltung von Mäusen bereits in der Arbeitsgruppe etabliert gewesen war.

Zwei Stunden nach der Nitrit Behandlung zeigte sich die endothelabhängige und endothelunabhängige Relaxation der Aortenringe von den CONV-R und GF-Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (NaCl) unverändert. Möglicherweise reicht die Bolusgabe und die kurze Zeitspanne (2 Stunden) nicht aus, um ausreichende Effekte an der Gefäßwand zu erzielen und die Gefäßfunktion zu verbessern. Denn in den meisten Studien, die einen vorteilhaften Effekt auf die vaskuläre Funktion zeigen konnten, erfolgte eine Langzeit-Behandlung mit anorganischem Nitrit (293, 303, 304). Allerdings konnte in der Studie von Moretti et al. bereits eine einmalige Bolusgabe nach 90 Minuten einen blutdrucksenkenden Effekt evozieren (305). Demzufolge sollte die Zeitspanne ausreichend sein, damit genügend •NO aus Nitrit generiert wird, welches die Vasodilatation vermittelt. Jedoch wurde in jener Studie eine Dosis von 15

mg/kg (versus. 7,5 mg/kg) verwendet. Daraus lässt sich ableiten, dass 7,5 mg/kg als Einzeldosis wahrscheinlich zu gering sind, um die Gefäßfunktion zu verbessern. Im Gegensatz dazu scheint die Dosis in der Langzeit Anwendung (7 Tage) adäquat zu sein (7).

Im direkten Vergleich zu den CONV-R Tieren konnte bei den keimfreien Mäusen jedoch eine verschlechterte endothelabhängige Relaxation aufgezeichnet werden. Ergo führte die keimfreie Haltung in Richtung einer endothelialen Dysfunktion. Mehrere Studien zeigten bereits eine starke Assoziation zwischen der intestinalen Mikrobiota und kardiovaskulären Erkrankungen (8, 210, 306). Einerseits wirken durch kommensale Darmbakterien produzierte kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Acetat, protektiv und können die kardiovaskuläre Funktion und Gesundheit verbessern (221). Weiterhin gibt es Hinweise, dass die Mikrobiota vor der Entwicklung einer Atherosklerose schützt (307). Andererseits gibt es auch zahlreiche Hinweise, dass die Darmkeime an der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind (214, 217, 223, 308, 309). So konnten Vikram et al. in einer Studie sogar zeigen, dass die Eradikation der intestinalen Mikrobiota die Endothelfunktion von *high fat diet* Mäusen verbesserte (310). Allerdings gibt es auch Studien, bei denen kein Unterschied in der Endothelfunktion zwischen CONV-R und GF Mäusen beobachtet werden konnte (311).

Die GTN evozierte Vasodilatation war nicht eingeschränkt. Die GF-Bedingungen scheinen den muskulären Relaxationsapparat daher nicht beeinträchtigt zu haben. Unterstützt wird diese Beobachtung durch die Ergebnisse von Moretti et al., da auch dort die keimfreie Haltung die endothelunabhängige Vasodilatation nicht kompromittierte (305).

Die Untersuchung des Nitrit Metabolismus mit Hilfe des Dot Blot Assays zur Detektion der DMPO positiven Proteine zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. So konnte in der Gruppe der CONV-R Mäuse nach der Bolusgabe ein Anstieg der S-Nitrosocystein positiven Proteine im Plasma beobachtet werden. Dies zeigt, dass die gastrointestinale Mikrobiota nicht nur bei anorganischem Nitrat (305, 312), sondern auch bei Nitrit eine wichtige Rolle im Metabolismus spielt. Neben dem sGC/cGMP Weg stellt die S-Nitros(yl)ierung den wichtigsten Signalweg im physiologischen •NO Signalweg dar. Durch die kovalente Anlagerung einer NO-Gruppe an Thiol-Gruppen von Proteinen, werden diese in ihrer Funktion modifiziert.

Diese Nitrosothiole beeinflussen die zelluläre sowie inter-zelluläre Signaltransduktion (269) und scheinen in der kardiovaskulären Physiologie von zentraler Bedeutung zu sein. So beeinflusst diese posttranslationale Proteinmodifikation an beta-Rezeptoren und Kalzium-Kanälen die kardiale Kontraktilität (313). Die Relevanz der S-Nitros(yl)ierung durch Nitrit wird dadurch deutlich, dass diese wesentlich an der Vermittlung der antihypertensiven Effekte beteiligt ist. Es wird angenommen, dass dabei die Nitros(yl)ierung der Proteinkinase C von zentraler Bedeutung ist. Diese scheint die Aktivierung von AT1 Rezeptoren und die intrazelluläre Kalzium-Mobilisation zu beeinflussen (48). Vermutlich war in unserer Studie die Zeitspanne von zwei Stunden nicht ausreichend, dass die im Plasma beobachtete Nitros(yl)ierung der Proteine auch das Gefäßsystem erreichte, sodass eine Verbesserung der Gefäßfunktion ausgeblieben ist.

In welcher Weise die Mikrobiota den Nitrit Metabolismus beeinflusst, kann mit dieser Studie nicht beantwortet werden. Der pH-Wert des Magens scheint eine wichtige Bedeutung bei der S-Nitros(yl)ierung bzw. bei der Bildung von S-Nitrosothiolen zu haben, da bei niedrigem pH die Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3) aus Nitrit gefördert wird. N_2O_3 induziert als starkes nitrosierendes Agens die Bildung von S-Nitrosothiolen. So führte die Erhöhung des pH Wertes im Magen mit dem Protonenpumpen Hemmer Omeprazol, zur deutlichen Senkung der S-Nitrosothiol-Spiegel im Plasma und konsekutiv zur Abschwächung der antihypertensiven Effekte von Nitrit (47). Möglicherweise beeinflusst das Mikrobiom den pH Wert des Magens und infolgedessen auch die S-Nitros(yl)ierung der Plasmaproteine. Tatsächlich wird der Magen von Nagern, ungleich zum Menschen, mit einer relevanten Anzahl (10^7 g/Mukosa) von Bakterien (insbesondere *Lactobacillus*) besiedelt (314). Zudem scheint die intestinale Mikrobiota auch den pH Wert des Verdauungstraktes zu modifizieren. Ward et al. untersuchte den Einfluss der mikrobiellen Flora auf den gastrointestinalen pH Wert und konnte zeigen, dass bei den keimfreien Tieren der pH Wert in der *pars glandularis* des Magens gegenüber CONV-R Tieren um ca. 1 Zähler erhöht gewesen war (315). Es ist daher möglich, dass diese pH-Wert Unterschiede die N_2O_3 bzw. S-Nitrosothiol Bildung beeinflussen.

5.6 Klinische Abwägungen

Die Betrachtung von Nitrit als mögliches (ergänzendes) Therapeutikum in der Behandlung der arteriellen Hypertonie ist besonders attraktiv, da es womöglich die Therapieadhärenz verbessern könnte.

Non-Adhärenz ist ein wesentlicher Faktor für die unzureichende Kontrolle des arteriellen Blutdrucks. Bis zu 45% der Patienten nehmen ihre Medikamente nicht so ein, wie es von deren behandelnden Ärzten empfohlen wird. Bei den Patienten mit einem unkontrollierten Blutdruck, steigt dieser Anteil sogar auf 83% (316). Nach einer Meta-Analyse von Chowdhury et al. sind in Europa 9% aller kardiovaskulären Ereignisse (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall) auf eine schlechte Medikamenten Adhärenz zurückzuführen (317). Um dieser mangelnden Adhärenz zu begegnen, müssen neben einer ausführlichen Aufklärung, auch alternative Therapiestrategien ins Auge gefasst werden. Ein Wirkstoff, der mit der Nahrung aufgenommen werden kann, erscheint dabei besonders attraktiv. Hohe Kosten für die Anschaffung der Medikamente entfallen, sowie das tägliche Schlucken einer Pille als auch das Gefühl von den Medikamenten abhängig zu sein (318).

Die mediterrane Ernährung, die als besonders gesundheitsförderlich gilt, ist reich an grünem Gemüse wie Salat, Mangold, Spinat und roter Beete. Damit ist sie im Vergleich zur westlichen Ernährung besonders reich an Nitrat resp. Nitrit (319). Dies könnte einer der Gründe sein, weshalb die mediterrane Diät mit einer kardioprotektiven Wirkung assoziiert wird. In diesem Zusammenhang scheint das Mikrobiom die protektiven Effekte der mediterranen Diät zu modulieren bzw. zu vermitteln (319). Daher ist es im Kontext der arteriellen Hypertonie sinnvoll, das Augenmerk neben der (Nitrit reichen) Ernährung auch auf das Mikrobiom bzw. die Mikrobiota zu lenken. Die intestinale Flora wird durch zahlreiche äußere Faktoren wie Medikamente (Antibiotika), Infektionen oder Lebensstiländerungen und Ernährungsumstellungen beeinflusst (223). Diese können zur intestinalen Dysbiose führen, die zunehmend mit der arteriellen Hypertonie assoziiert wird (223, 320). Insbesondere vor dem Hintergrund, dass nach dieser Studie auch die Nitrit Bioaktivierung von der gastrointestinalen Mikrobiota abhängig ist, sollte eine gezielte Modulation des Mikrobioms in der Therapie der arteriellen Hypertonie (sowie weiterer

kardiovaskulärer Erkrankungen) in Betracht gezogen werden. Dadurch könnten gezielt vorteilhafte Bakterien der intestinalen Flora begünstigt werden. Probiotika könnten die Bioaktivierung von Nitrit fördern und die •NO Signalwirkung stärken (321, 322). Das sich Pro- resp. Prebiotika günstig auf die Endothelfunktion auswirken, wurde bereits in mehreren Studien berichtet (323, 324). Auch für die Nitrit bzw. Nitrat Supplementation gibt es zahlreiche positive Studien, die einen Nutzen für die kardiovaskuläre Gesundheit belegen (195, 205, 325, 326).

Zum aktuellen Zeitpunkt fehlen indes größere klinische Studien, die eine gleichzeitige Anwendung von Probiotika und anorganischem Nitrit untersuchen. Hier wären sowohl präklinische als auch klinische Studien interessant, insbesondere unter dem Aspekt koinzidenter kardiovaskulärer und gastrointestinaler Erkrankungen.

In der Vergangenheit wurde diätetisches Nitrit bzw. Nitrat mit einem erhöhten Karzinomrisiko (z.B. Magenkarzinom) in Verbindung gebracht, was der Favorisierung Nitrit reicher Nahrung/Supplementierung entgegensprechen würde. Insbesondere die Umwandlung in karzinogene Nitrosamine scheint dafür verantwortlich zu sein. Bis heute ist allerdings die Korrelation zwischen Karzinomrisiko und Nitrat bzw. Nitrit Aufnahme umstritten. Zahlreiche Studien konnten positive als auch negative Effekte zeigen (313, 327, 328). Nitrosamine entstehen durch die Bindung des Nitrosonium-Ions an Amine (N-NO, sog. N-Nitrosierung) statt der Addition an eine Thiol-Gruppe (S-NO = S-Nitros(yl)ierung). Diese Reaktion ist vor allem bei sekundären Aminen (R-NH-R) von Bedeutung, da die hervorgehenden Nitrosamine deutlich stabiler sind, als bei Reaktion mit primären Aminen (R-NH₂) (313). Erstere werden insbesondere mit der karzinogenen Wirkung assoziiert. In Hinblick auf das Magenkarzinom läuft im Magen unter physiologischen Bedingungen die S-Nitros(yl)ierung gegenüber der N-Nitrosierung deutlich bevorzugt ab. Die spontane Bildung von Nitrosaminen findet primär bei neutralem bis basischen pH statt, wie es etwa bei der Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren oder Anchlorhydrie der Fall ist. Zudem wird auch die Bildung durch Antioxidantien wie Vitamin C stark beeinträchtigt, welches reichlich in vielen Gemüsesorten vorhanden ist (313). Infolgedessen erscheint das Milieu im (gesunden) Magen eher die Bildung von (nützlichen) S-Nitrosothiolen zu fördern (313). Passend dazu ist die mediterrane Diät reich an Nitrat bzw. Nitrit und wird dennoch mit einer protektiven Wirkung gegenüber malignen Erkrankungen assoziiert. So ist die Inzidenz von Malignomen in der Bevölkerung im Mittelmeerraum deutlich geringer als bei Nordeuropäern oder US-Amerikanern (329). Zwar gibt es in

Deutschland und auch weiteren europäischen Ländern Grenzwerte für Nitrat im Trinkwasser (meist 50 mg/l), dennoch gibt es keine eindeutigen Studien, die Gesundheitsrisiko belegen (330). Vielmehr überwiegen Berichte über förderliche Wirkungen einer Nitrat/Nitrit Supplementierung, z.B. in Form von Rote Beete Saft (331).

Vor diesem Hintergrund könnte die Nitrit Therapie (ggf. zusammen mit Probiotika) aufgrund der einfachen Einnahme bzw. Bereitstellung/Zugang und geringen Kosten eine wichtige Rolle im öffentlichen Gesundheitswesen spielen, insbesondere in Regionen mit geringen Einkommen und erschwerten Zugang zum Gesundheitswesen.

5.7 Einschränkungen

Eine wichtige Limitierung dieser Studie ist, dass die meisten Experimente *ex vivo* an isolierten Aorten-Ringsegmenten durchgeführt worden sind. Demzufolge sind die Ergebnisse nur eingeschränkt auf ein *in vivo*-Modell übertragbar. Zudem waren die untersuchten Konzentration der Oxidationsmittel (H_2O_2 und HOCl) eher supraphysiologisch, was die (patho-)physiologischen Überlegungen in Hinblick auf die Auswirkungen von H_2O_2 und HOCl auf die Endothelfunktion im Vergleich zur Nitrit-abhängigen Vasodilatation einschränkt. Die verwendeten Sin-1 Konzentrationen können als annähernd physiologisch angesehen werden. Sin-1 zerfällt unter physiologischen Bedingungen mit einer Halbwertszeit von 40 Minuten und erzeugt dabei Steady-State-Konzentrationen von Peroxynitrit im unteren nanomolaren Bereich.

Weiterhin waren die *in vivo* Experimente an den Mäusen nur von kurzer Dauer (zwei Stunden), wodurch nur sehr eingeschränkt Schlüsse auf eine chronische Supplementierung geschlossen werden können. Zudem scheint auch die applizierte Dosis zu gering gewesen zu sein, da keine Effekte im Organbad beobachtet werden konnten (305).

Auch die Verwendung von verschiedenen Tiermodellen (Ratte versus Maus) limitiert eine direkte Vergleichbarkeit untereinander, da auch zwischen den beiden Tierspezies pharmakodynamische und -kinetische Unterschiede zu erwarten sind.

Ferner wird die Translation der Ergebnisse auf den Menschen dadurch eingeschränkt, dass sie sich im Metabolismus von Nitrat bzw. Nitrit unterschiedlich zeigen. So können Menschen im Speichel deutlich höhere Nitrat-Konzentrationen erreichen als Nagetiere (332), was in Bezug auf den entero-salivären-Kreislauf von großer Bedeutung ist.

Auch wurde hier den Mäusen eine konzentrierte Nitrit-Lösung verabreicht. Alternativ könnte Nitrit auch über Nahrungsmittel substituiert werden, die neben Nitrit auch zahlreiche weitere Inhaltsstoffe enthalten. Diese könnten eventuell die Bioverfügbarkeit und -aktivierung von Nitrit modifizieren. Daher wäre es interessant zu sehen, ob eine Nitrit-Supplementierung in anderer Weise ähnliche bzw. andere Effekte evoziert.

Schließlich wurden in dieser Studie ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet. In Zeiten, in der die genderspezifische Medizin zunehmend in den Fokus der Forschung gerät, wäre die zusätzliche Verwendung von weiblichen Versuchstieren durchaus sinnvoll. Zumal in einer humanen Studie von Kapil et al. bereits eine unterschiedliche Sensitivität auf Nitrat zwischen weiblichen und männlichen Probanden gezeigt wurde (326). Daher wäre es interessant gewesen zu sehen, ob sich auch in Bezug auf Nitrit geschlechtsspezifische Unterschiede abbilden.

6 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie gilt als entscheidendster Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen wie Myokardinfarkte oder Schlaganfälle. In diesem Zusammenhang ist sie jährlich für mehr als 10 Millionen Todesfälle verantwortlich (1). Vor diesem Hintergrund ist eine frühzeitige adäquate Therapie entscheidend, um die kardiovaskuläre Mortalität in der Bevölkerung zu verringern. Trotz zahlreicher guter (pharmakologischer) Behandlungsmöglichkeiten ist die Bilanz der medizinischen Versorgung von Hypertonikern ernüchternd – lediglich 42% aller diagnostizierten Hypertoniker werden behandelt und nur 21% gelten als ausreichend therapiert. Eine mangelnde Therapieadhärenz bzw. Compliance der Patienten stellt einen wesentlichen Faktor für die unzureichende Kontrolle des Blutdrucks dar. Schätzungen zufolge halten sich weniger als 60% an die Therapieempfehlungen der behandelnden Ärztinnen und Ärzte (2). Ein häufiger Grund ist, dass die Patientinnen und Patienten nicht lebenslang von einer Pille abhängig sein möchten (318).

Folglich müssen zwecks besserer Versorgung alternative Therapieoptionen in Betracht gezogen werden. Nitrat und insbesondere Nitrit konnten in mehreren Studien zeigen, dass sie eine potenzielle Alternative bzw. Ergänzung in der Behandlung der arteriellen Hypertonie darstellen (7, 202).

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass anorganisches Nitrit einen potenten Vasodilatator darstellt, welcher durch oxidativen Stress *ex vivo* nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Dies ist in Hinblick auf die arterielle Hypertonie besonders relevant, da oxidativer Stress einen wesentlichen Aspekt in der Pathogenese dieser Krankheitsentität darstellt. Die erhöhte Resistenz gegenüber RONS könnte auf die oxidative Konversion der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase zurückzuführen sein, die die Bioaktivierung von Nitrit fördert. Möglicherweise stellt diese Konversion eine Art Schutzmechanismus vor oxidativem Stress dar, welcher die Bioverfügbarkeit des protektiven NO erhöht.

Weiterhin führt auch die einmalige Bolusgabe von anorganischem Nitrit per oraler Gavage zum Anstieg der Nitroso-Cystein positiven Proteine im Blutplasma. Dieser Effekt wird über die gastrointestinale Mikrobiota vermittelt, wie es hier durch die Verwendung der keimfreien Mäuse gezeigt werden konnte. Allerdings führte die

einmalige Behandlung mit anorganischem Nitrit wider Erwarten nicht zu einer Verbesserung der Endothelfunktion in den konventionell gezüchteten Mäusen.

Gemeinsam mit Probiotika, die eine Bioaktivierung verbessern könnten, stellt anorganisches Nitrit eine attraktive Therapieoption für die Behandlung der arteriellen Hypertonie dar. Insbesondere da Nitrit auch über die Nahrung supplementiert werden kann, könnte diese Therapieform die Adhärenz bzw. Compliance der Patientinnen und Patienten verbessern.

Das Konzept der unter oxidativem Stress geförderten Bioaktivierung von Nitrit ist besonders attraktiv. Es könnte eine Erklärung für die beobachteten vorteilhaften Effekte der Nitrit Therapie bei verschiedenen ischämischen Herzerkrankungen sein, wie etwa beim Reperfusionsschaden nach Myokardinfarkt. Die Redox-Umwandlung der XDH zur XO erzeugt ein potentes Nitrit reduzierendes Enzym, welches die vasodilatierende Wirkung von Nitrit auch unter oxidativem Stress sicherstellt. In zukünftigen Studien könnte durch Verwendung von XDH Knockout-Mäusen die Bedeutung der XDH – XO Umwandlung für die Bioaktivierung und protektive Wirkung von anorganischem Nitrit bei Mäusen mit kardiovaskulären Erkrankungen herausgearbeitet werden.

7 Literaturverzeichnis

1. Organisation WH. Cardiovascular Diseases [Internet]2021.
2. Organization WH. Global report on hypertension: the race against a silent killer. 2023.
3. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb CD, et al. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Hypertension*. 2018;71(6):e13-e115.
4. Organisation WH. Hypertension [Internet]2023.
5. Burnier M, Egan BM. Adherence in Hypertension. *Circ Res*. 2019;124(7):1124-40.
6. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008;7(2):156-67.
7. Stamm P, Oelze M, Steven S, Kröller-Schön S, Kvandova M, Kalinovic S, et al. Direct comparison of inorganic nitrite and nitrate on vascular dysfunction and oxidative damage in experimental arterial hypertension. *Nitric Oxide*. 2021;113-114:57-69.
8. Tang WHW, Kitai T, Hazen SL. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circulation Research*. 2017;120(7):1183-96.
9. Govoni M, Jansson EA, Weitzberg E, Lundberg JO. The increase in plasma nitrite after a dietary nitrate load is markedly attenuated by an antibacterial mouthwash. *Nitric Oxide*. 2008;19(4):333-7.
10. D'Auréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):813-24.
11. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(7):363-83.
12. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*. 2008;4(5):278-86.
13. Zhang L, Wang X, Cueto R, Effi C, Zhang Y, Tan H, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biology*. 2019;26:101284.
14. Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine: Oxford university press, USA; 2015.
15. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*. 2019;294(51):19683-708.
16. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:715-48.
17. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(9):689-709.
18. Guzik TJ, West NE, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension*. 2002;39(6):1088-94.
19. Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 1983;258(8):4759-61.
20. Gebicki JM, Bielski BHJ. Comparison of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *Journal of the American Chemical Society*. 1981;103(23):7020-2.
21. Panov AV, Dikalov SI. Cardioplipin, Perhydroxyl Radicals, and Lipid Peroxidation in Mitochondrial Dysfunctions and Aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:1323028.
22. Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(9):4642.

23. Chen H-Y. Why the Reactive Oxygen Species of the Fenton Reaction Switches from Oxoiron(IV) Species to Hydroxyl Radical in Phosphate Buffer Solutions? A Computational Rationale. *ACS Omega*. 2019;4(9):14105-13.
24. Fujiwara O, Fukuda S, Lopez E, Zeng Y, Niimi Y, DeWitt DS, et al. Peroxynitrite decomposition catalyst reduces vasopressin requirement in ovine MRSA sepsis. *Intensive Care Med Exp*. 2019;7(1):12.
25. Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43-50.
26. Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biol*. 2018;14:618-25.
27. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(24):9265-9.
28. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6.
29. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(1):158-89.
30. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758(8):994-1003.
31. Wong HS, Benoit B, Brand MD. Mitochondrial and cytosolic sources of hydrogen peroxide in resting C2C12 myoblasts. *Free Radic Biol Med*. 2019;130:140-50.
32. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem*. 2016;85:765-92.
33. Jomova K, Raptova R, Alomar SY, Alwasel SH, Nepovimova E, Kuca K, et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Arch Toxicol*. 2023;97(10):2499-574.
34. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1992;298(2):446-51.
35. Di Dalmazi G, Hirshberg J, Lyle D, Freij JB, Caturegli P. Reactive oxygen species in organ-specific autoimmunity. *Auto Immun Highlights*. 2016;7(1):11.
36. Brieger K, Schiavone S, Miller Jr FJ, Krause K-H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*. 2012;142(3334):w13659-w.
37. Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(9):734-46.
38. Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. Preconditioning in cardiomyocytes protects by attenuating oxidant stress at reperfusion. *Circ Res*. 2000;86(5):541-8.
39. ZAHLER S, KUPATT C, BECKER BF. Endothelial preconditioning by transient oxidative stress reduces inflammatory responses of cultured endothelial cells to TNF- α . *The FASEB Journal*. 2000;14(3):555-64.
40. Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Direct Evidence That Initial Oxidative Stress Triggered by Preconditioning Contributes to Second Window of Protection by Endogenous Antioxidant Enzyme in Myocytes. *Circulation*. 1996;93(6):1177-84.
41. Stomberski CT, Hess DT, Stamler JS. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxidants & redox signaling*. 2019;30(10):1331-51.
42. Lima B, Forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. *Circulation Research*. 2010;106(4):633-46.
43. Maron BA, Tang SS, Loscalzo J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(3):270-87.
44. Zhao S, Tang X, Miao Z, Chen Y, Cao J, Song T, et al. Hsp90 S-nitrosylation at Cys521, as a conformational switch, modulates cycling of Hsp90-AHA1-CDC37 chaperone machine to aggravate atherosclerosis. *Redox Biol*. 2022;52:102290.
45. Tang X, Zhao S, Liu J, Liu X, Sha X, Huang C, et al. Mitochondrial GSNOR Alleviates Cardiac Dysfunction via ANT1 Denitrosylation. *Circ Res*. 2023;133(3):220-36.

46. Chao ML, Luo S, Zhang C, Zhou X, Zhou M, Wang J, et al. S-nitrosylation-mediated coupling of G-protein alpha-2 with CXCR5 induces Hippo/YAP-dependent diabetes-accelerated atherosclerosis. *Nat Commun.* 2021;12(1):4452.
47. Pinheiro LC, Amaral JH, Ferreira GC, Portella RL, Ceron CS, Montenegro MF, et al. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2015;87:252-62.
48. Pinheiro LC, Oliveira-Paula GH, Ferreira GC, Dal-Cin de Paula T, Duarte DA, Costa-Neto CM, et al. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. *Redox Biol.* 2021;38:101769.
49. Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005;6(2):150-66.
50. Kharitonov VG, Sundquist AR, Sharma VS. Kinetics of nitrosation of thiols by nitric oxide in the presence of oxygen. *J Biol Chem.* 1995;270(47):28158-64.
51. Herold S, Röck G. Mechanistic studies of S-nitrosothiol formation by NO*/O2 and by NO*/methemoglobin. *Arch Biochem Biophys.* 2005;436(2):386-96.
52. Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, et al. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O2 reaction. *Chem Res Toxicol.* 1994;7(4):519-25.
53. Möller MN, Li Q, Vitturi DA, Robinson JM, Lancaster JR, Jr., Denicola A. Membrane "lens" effect: focusing the formation of reactive nitrogen oxides from the *NO/O2 reaction. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(4):709-14.
54. Martínez-Ruiz A, Lamas S. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research.* 2004;62(1):43-52.
55. Fernando V, Zheng X, Walia Y, Sharma V, Letson J, Furuta S. S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(9).
56. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English.* 1986;25(12):1058-71.
57. Touyz RM, Rios FJ, Alves-Lopes R, Neves KB, Camargo LL, Montezano AC. Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology.* 2020;36(5):659-70.
58. Davies KJA. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life.* 2000;50.
59. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des.* 2014;20(22):3579-94.
60. Sedeek M, Hébert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(2):122-7.
61. Zhang Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17(3):170-94.
62. Förstermann U, Xia N, Li H. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017;120(4):713-35.
63. Griending KK, Camargo LL, Rios FJ, Alves-Lopes R, Montezano AC, Touyz RM. Oxidative Stress and Hypertension. *Circulation Research.* 2021;128(7):993-1020.
64. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010;47:53-67.
65. Malinska D, Mirandola SR, Kunz WS. Mitochondrial potassium channels and reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 2010;584(10):2043-8.
66. Schulz E, Wenzel P, Münzel T, Daiber A. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(2):308-24.
67. Masuda D, Nakanishi I, Ohkubo K, Ito H, Matsumoto K-i, Ichikawa H, et al. Mitochondria Play Essential Roles in Intracellular Protection against Oxidative Stress—Which Molecules among the ROS Generated in the Mitochondria Can Escape the Mitochondria and Contribute to Signal Activation in Cytosol? *Biomolecules.* 2024;14(1):128.

68. Abdal Dayem A, Hossain MK, Lee SB, Kim K, Saha SK, Yang G-M, et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(1):120.
69. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2015;116(3):531-49.
70. Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(17):2794-814.
71. Amanso AM, Griendling KK. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2012;4(3):1044-64.
72. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24(9):471-8.
73. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene*. 2001;269(1-2):131-40.
74. Gimenez M, Schickling BM, Lopes LR, Miller FJ, Jr. Nox1 in cardiovascular diseases: regulation and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(3):151-65.
75. Münzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *European Heart Journal*. 2010;31(22):2741-8.
76. Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, et al. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens*. 2011;5(3):137-53.
77. Kitada M, Koya D, Sugimoto T, Isono M, Araki S, Kashiwagi A, et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C-beta activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003;52(10):2603-14.
78. Fontayne A, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J. Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation. *Biochemistry*. 2002;41(24):7743-50.
79. Daiber A, Münzel T. Pentaerythryltetranitrat—Oxidativer Stress, Redoxregulation und NO-Bioverfügbarkeit—experimentelle und klinische Aspekte. Darmstadt: Steinkopff Verlag. 2006.
80. Kim C, Dinauer MC. Rac2 is an essential regulator of neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation in response to specific signaling pathways. *J Immunol*. 2001;166(2):1223-32.
81. Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause K-H. Two Novel Proteins Activate Superoxide Generation by the NADPH Oxidase NOX1 *. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(6):3510-3.
82. Dutta S, Rittinger K. Regulation of NOXO1 Activity through Reversible Interactions with p22phox and NOXA1. *PLOS ONE*. 2010;5(5):e10478.
83. Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, et al. Novel human homologues of p47^{phox} and p67^{phox} participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(10):6003.
84. Nosalski R, Mikolajczyk T, Siedlinski M, Saju B, Koziol J, Maffia P, et al. Nox1/4 inhibition exacerbates age dependent perivascular inflammation and fibrosis in a model of spontaneous hypertension. *Pharmacol Res*. 2020;161:105235.
85. Ray R, Murdoch CE, Wang M, Santos CX, Zhang M, Alom-Ruiz S, et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(6):1368-76.
86. Witting PK, Rayner BS, Wu BJ, Ellis NA, Stocker R. Hydrogen peroxide promotes endothelial dysfunction by stimulating multiple sources of superoxide anion radical production and decreasing nitric oxide bioavailability. *Cell Physiol Biochem*. 2007;20(5):255-68.
87. Kim Y-W, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 2014;123(5):625-31.
88. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1997;96(10):3602-9.

89. Satoh K, Godo S, Saito H, Enkhjargal B, Shimokawa H. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species: With a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2014;73:50-6.
90. Edwards DH, Li Y, Griffith TM. Hydrogen Peroxide Potentiates the EDHF Phenomenon by Promoting Endothelial Ca²⁺ Mobilization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(10):1774-81.
91. Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):915-22.
92. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, et al. Hydrogen Peroxide, an Endogenous Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, Plays an Important Role in Coronary Autoregulation In Vivo. *Circulation*. 2003;107(7):1040-5.
93. Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, et al. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem*. 2004;279(18):18583-91.
94. Tirone F, Cox JA. NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin. *FEBS Lett*. 2007;581(6):1202-8.
95. Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, et al. Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One*. 2014;9(2):e88405.
96. Pandey D, Fulton DJ. Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300(4):H1336-44.
97. Pandey D, Gratton JP, Rafikov R, Black SM, Fulton DJ. Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5. *Mol Pharmacol*. 2011;80(3):407-15.
98. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46065-72.
99. Mohri H, Ninoyu Y, Sakaguchi H, Hirano S, Saito N, Ueyama T. Nox3-Derived Superoxide in Cochleae Induces Sensorineural Hearing Loss. *The Journal of Neuroscience*. 2021;41(21):4716-31.
100. Rousset F, Nacher-Soler G, Kokje VBC, Sgroi S, Coelho M, Krause K-H, et al. NADPH Oxidase 3 Deficiency Protects From Noise-Induced Sensorineural Hearing Loss. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10.
101. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
102. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357(Pt 3):593-615.
103. Aoyagi M, Arvai AS, Tainer JA, Getzoff ED. Structural basis for endothelial nitric oxide synthase binding to calmodulin. *EMBO J*. 2003;22(4):766-75.
104. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, et al. Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*. 1998;279(5359):2121-6.
105. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006;113(13):1708-14.
106. Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska JM, Dobrucki LW, Kalinowski L. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):21.
107. Stuehr D, Pou S, Rosen GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14533-6.
108. Stuehr DJ, Haque MM. Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *Br J Pharmacol*. 2019;176(2):177-88.
109. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol Rev*. 2019;99(1):311-79.
110. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):532-41.
111. Fulton D, Gratton JP, Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;299(3):818-24.

112. Qian J, Fulton D. Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Front Physiol.* 2013;4:347.
113. Daiber A, Steven S, Vujacic-Mirski K, Kalinovic S, Oelze M, Di Lisa F, et al. Regulation of Vascular Function and Inflammation via Cross Talk of Reactive Oxygen and Nitrogen Species from Mitochondria or NADPH Oxidase-Implications for Diabetes Progression. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
114. Daiber A, Oelze M, Daub S, Steven S, Schuff A, Kröller-Schön S, et al. Vascular Redox Signaling, Redox Switches in Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS Uncoupling), and Endothelial Dysfunction. In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014. p. 1177-211.
115. Daiber A, Xia N, Steven S, Oelze M, Hanf A, Kröller-Schön S, et al. New Therapeutic Implications of Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) Function/Dysfunction in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(1).
116. Münzel T, Daiber A. Vascular Redox Signaling, Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling, and Endothelial Dysfunction in the Setting of Transportation Noise Exposure or Chronic Treatment with Organic Nitrates. *Antioxid Redox Signal.* 2023;38(13-15):1001-21.
117. Montezano AC, Touyz RM. Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012;110(1):87-94.
118. Milstien S, Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;263(3):681-4.
119. Münzel T, Daiber A. Does endothelial tetrahydrobiopterin control the endothelial NO synthase coupling state in arterial resistance arteries? *Br J Pharmacol.* 2017;174(14):2422-4.
120. Whitsett J, Picklo MJ, Sr., Vasquez-Vivar J. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(11):2340-7.
121. Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol.* 2004;7(3):254-61.
122. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J.* 2018;41(1):9-20.
123. Queliconi BB, Wojtovich AP, Nadtochiy SM, Kowaltowski AJ, Brookes PS. Redox regulation of the mitochondrial K(ATP) channel in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1309-15.
124. Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 2001;89(12):1177-83.
125. Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):897-906.
126. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res.* 2007;100(4):460-73.
127. Kröller-Schön S, Steven S, Kossmann S, Scholz A, Daub S, Oelze M, et al. 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.* 2014;20(2):247-66.
128. Polito L, Bortolotti M, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: A leading actor in cardiovascular disease drama. *Redox Biol.* 2021;48:102195.
129. Bortolotti M, Polito L, Battelli MG, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase: One enzyme for multiple physiological tasks. *Redox Biol.* 2021;41:101882.
130. Battelli MG, Polito L, Bolognesi A. Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: not only oxidative stress. *Atherosclerosis.* 2014;237(2):562-7.
131. Battelli MG, Polito L, Bortolotti M, Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:3527579.

132. White CR, Darley-USmar V, Berrington WR, McAdams M, Gore JZ, Thompson JA, et al. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(16):8745-9.
133. Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation*. 2003;107(3):416-21.
134. Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4754-9.
135. Furuhashi M, Higashiura Y, Koyama M, Tanaka M, Murase T, Nakamura T, et al. Independent association of plasma xanthine oxidoreductase activity with hypertension in nondiabetic subjects not using medication. *Hypertension Research*. 2021;44(9):1213-20.
136. Nomura J, Busso N, Ives A, Matsui C, Tsujimoto S, Shirakura T, et al. Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates experimental atherosclerosis in mice. *Sci Rep*. 2014;4:4554.
137. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, et al. Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2290-7.
138. Ganji M, Nardi V, Prasad M, Jordan KL, Bois MC, Franchi F, et al. Carotid Plaques From Symptomatic Patients Are Characterized by Local Increase in Xanthine Oxidase Expression. *Stroke*. 2021;52(9):2792-801.
139. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 2003;107(10):1383-9.
140. Desco M-C, Asensi M, Márquez R, Martínez-Valls J, Vento Mx, Pallardó FV, et al. Xanthine Oxidase Is Involved in Free Radical Production in Type 1 Diabetes: Protection by Allopurinol. *Diabetes*. 2002;51(4):1118-24.
141. Bletsas E, Paschou SA, Tsigkou V, Stampoulou PK, Vasileiou V, Kassi GN, et al. The effect of allopurinol on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes: a systematic review. *Hormones (Athens)*. 2022;21(4):599-610.
142. MacIsaac RL, Salatzki J, Higgins P, Walters MR, Padmanabhan S, Dominiczak AF, et al. Allopurinol and Cardiovascular Outcomes in Adults With Hypertension. *Hypertension*. 2016;67(3):535-40.
143. van der Pol KH, Wever KE, Verbakel M, Visseren FLJ, Cornel JH, Rongen GA. Allopurinol to reduce cardiovascular morbidity and mortality: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021;16(12):e0260844.
144. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(37):13683-8.
145. Baliga RS, Milsom AB, Ghosh SM, Trinder SL, Macallister RJ, Ahluwalia A, et al. Dietary nitrate ameliorates pulmonary hypertension: cytoprotective role for endothelial nitric oxide synthase and xanthine oxidoreductase. *Circulation*. 2012;125(23):2922-32.
146. Ghosh SM, Kapil V, Fuentes-Calvo I, Bubb KJ, Pearl V, Milsom AB, et al. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension*. 2013;61(5):1091-102.
147. Webb AJ, Milsom AB, Rathod KS, Chu WL, Qureshi S, Lovell MJ, et al. Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2008;103(9):957-64.
148. Duda M, Konior A, Klemenska E, Beresewicz A. Preconditioning protects endothelium by preventing ET-1-induced activation of NADPH oxidase and xanthine oxidase in post-ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):400-10.
149. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol*. 1987;18(3):234-9.
150. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007;115(10):1285-95.
151. Sturtzel C. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2017;1003:71-91.

152. Daiber A, Steven S, Weber A, Shuvaev VV, Muzykantov VR, Laher I, et al. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2017;174(12):1591-619.
153. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001;2(10):907-16.
154. Carreau A, Kieda C, Grillon C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. *Exp Cell Res.* 2011;317(1):29-41.
155. Griffith TM, Henderson AH. EDRF and the regulation of vascular tone. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1989;8(4):383-96.
156. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med.* 2005;26(1-2):33-65.
157. Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003;1(10):2112-8.
158. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Response to Fluid Shear Stress. *Circulation Research.* 1996;79(5):984-91.
159. Montfort WR, Wales JA, Weichsel A. Structure and Activation of Soluble Guanylyl Cyclase, the Nitric Oxide Sensor. *Antioxid Redox Signal.* 2017;26(3):107-21.
160. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329(27):2002-12.
161. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* 2000;404(6774):197-201.
162. Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-Dependent Vasorelaxation. *Circulation Research.* 2000;87(9):825-30.
163. Münzel T, Feil R, Mülsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation.* 2003;108(18):2172-83.
164. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature.* 1994;372(6503):231-6.
165. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia.* 2004;93(1):105-13.
166. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;23(2):168-75.
167. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.* 2013;9(10):1057-69.
168. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation.* 2002;105(13):1567-72.
169. Gokce N, Keaney JF, Jr., Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(10):1769-75.
170. Gori T, Muxel S, Damaske A, Radmacher MC, Fasola F, Schaefer S, et al. Endothelial function assessment: flow-mediated dilation and constriction provide different and complementary information on the presence of coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2012;33(3):363-71.
171. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020;36(2):307-21.
172. Münzel T, Hahad O, Kuntic M, Keaney JF, Deanfield JE, Daiber A. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. *Eur Heart J.* 2020;41(41):4057-70.
173. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 1990;323(1):22-7.
174. Shaito A, Aramouni K, Assaf R, Parenti A, Orekhov A, Yazbi AE, et al. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *FBL.* 2022;27(3).

175. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*. 2000;87(10):840-4.
176. Schulz E, Gori T, Münzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res*. 2011;34(6):665-73.
177. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter D, Miller O, Sullivan I, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *The Lancet*. 1992;340(8828):1111-5.
178. Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*. 1990;81(2):491-7.
179. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42(7):1149-60.
180. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
181. Schächinger V, Zeiher AM. Quantitative Assessment of Coronary Vasoreactivity in Humans In Vivo. *Circulation*. 1995;92(8):2087-94.
182. Oparil S, Acelajado MC, Bakris GL, Berlowitz DR, Cífková R, Dominiczak AF, et al. Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18014.
183. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74(6):1141-8.
184. Birk M, Baum E, Zadeh JK, Manicam C, Pfeiffer N, Patzak A, et al. Angiotensin II Induces Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Mouse Ophthalmic Arteries via Involvement of AT1 Receptors and NOX2. *Antioxidants*. 2021;10(8):1238.
185. Dandona P, Karne R, Ghanim H, Hamouda W, Aljada A, Magsino CH, Jr. Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation*. 2000;101(2):122-4.
186. Wenzel P, Knorr M, Kossmann S, Stratmann J, Hausding M, Schuhmacher S, et al. Lysozyme M-Positive Monocytes Mediate Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *Circulation*. 2011;124(12):1370-81.
187. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(10):2449-60.
188. Tannenbaum SR, Correa P. Nitrate and gastric cancer risks. *Nature*. 1985;317(6039):675-6.
189. Lundberg JO, Weitzberg E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;396(1):39-45.
190. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003;9(12):1498-505.
191. Feelisch M, Akaike T, Griffiths K, Ida T, Pryszyzna O, Goodwin JJ, et al. Long-lasting blood pressure lowering effects of nitrite are NO-independent and mediated by hydrogen peroxide, persulfides, and oxidation of protein kinase G1 α redox signalling. *Cardiovascular Research*. 2019;116(1):51-62.
192. Maher AR, Milsom AB, Gunaruwan P, Abozguia K, Ahmed I, Weaver RA, et al. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation*. 2008;117(5):670-7.
193. Montenegro MF, Sundqvist ML, Larsen FJ, Zhuge Z, Carlström M, Weitzberg E, et al. Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. *Hypertension*. 2017;69(1):23-31.
194. Oliveira-Paula GH, R IMB, Stransky S, Tella SC, Ferreira GC, Portella RL, et al. Orally administered sodium nitrite prevents the increased α -1 adrenergic vasoconstriction induced by hypertension and promotes the S-nitrosylation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem Pharmacol*. 2023;212:115571.

195. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension*. 2008;51(3):784-90.
196. Griffiths K, Lee JJ, Frenneaux MP, Feelisch M, Madhani M. Nitrite and myocardial ischaemia reperfusion injury. Where are we now? *Pharmacol Ther*. 2021;223:107819.
197. Huang L, Borniquel S, Lundberg JO. Enhanced xanthine oxidoreductase expression and tissue nitrate reduction in germ free mice. *Nitric Oxide*. 2010;22(2):191-5.
198. Liu Y, Croft KD, Hodgson JM, Mori T, Ward NC. Mechanisms of the protective effects of nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. *Nitric Oxide*. 2020;96:35-43.
199. Sobko T, Reinders C, Norin E, Midtvedt T, Gustafsson LE, Lundberg JO. Gastrointestinal nitric oxide generation in germ-free and conventional rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(5):G993-7.
200. Omar SA, Webb AJ. Nitrite reduction and cardiovascular protection. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:57-69.
201. Shiva S. Nitrite: A physiological store of nitric oxide and modulator of mitochondrial function. *Redox Biology*. 2013;1(1):40-4.
202. Kapil V, Khambata RS, Jones DA, Rathod K, Primus C, Massimo G, et al. The Noncanonical Pathway for In Vivo Nitric Oxide Generation: The Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway. *Pharmacol Rev*. 2020;72(3):692-766.
203. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J Biol Chem*. 2004;279(17):16939-46.
204. Jansson EA, Huang L, Malkey R, Govoni M, Nihlén C, Olsson A, et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol*. 2008;4(7):411-7.
205. Kapil V, Khambata RS, Robertson A, Caulfield MJ, Ahluwalia A. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. *Hypertension*. 2015;65(2):320-7.
206. Ren X, Ding Y, Lu N. Nitrite attenuated peroxynitrite and hypochlorite generation in activated neutrophils. *European Journal of Pharmacology*. 2016;775:50-6.
207. Ling WC, Mustafa MR, Vanhoutte PM, Murugan DD. Chronic administration of sodium nitrite prevents hypertension and protects arterial endothelial function by reducing oxidative stress in angiotensin II-infused mice. *Vascul Pharmacol*. 2018;102:11-20.
208. Bar-On YM, Phillips R, Milo R. The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(25):6506-11.
209. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):e1002533.
210. Muralitharan RR, Jama HA, Xie L, Peh A, Snelson M, Marques FZ. Microbial Peer Pressure: The Role of the Gut Microbiota in Hypertension and Its Complications. *Hypertension*. 2020;76(6):1674-87.
211. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012;486(7402):207-14.
212. Sommer F, Bäckhed F. The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11(4):227-38.
213. Zhang LS, Davies SS. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome Med*. 2016;8(1):46.
214. Adnan S, Nelson JW, Ajami NJ, Venna VR, Petrosino JF, Bryan RM, Jr., et al. Alterations in the gut microbiota can elicit hypertension in rats. *Physiol Genomics*. 2017;49(2):96-104.
215. Honour J. The possible involvement of intestinal bacteria in steroidal hypertension. *Endocrinology*. 1982;110(1):285-7.
216. Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, Paju S, Nieminen MS, Sinisalo J, et al. A common periodontal pathogen has an adverse association with both acute and stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2012;223(2):478-84.

217. Mell B, Jala VR, Mathew AV, Byun J, Waghulde H, Zhang Y, et al. Evidence for a link between gut microbiota and hypertension in the Dahl rat. *Physiol Genomics*. 2015;47(6):187-97.
218. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, Hellmig S, Freitag S, Rehman A, et al. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006;113(7):929-37.
219. Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, et al. Altered Intestinal Function in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50(16):1561-9.
220. Jama HA, Beale A, Shihata WA, Marques FZ. The effect of diet on hypertensive pathology: is there a link via gut microbiota-driven immunometabolism? *Cardiovasc Res*. 2019;115(9):1435-47.
221. Marques FZ, Nelson E, Chu PY, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, et al. High-Fiber Diet and Acetate Supplementation Change the Gut Microbiota and Prevent the Development of Hypertension and Heart Failure in Hypertensive Mice. *Circulation*. 2017;135(10):964-77.
222. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(11):4410-5.
223. Avery EG, Bartolomaeus H, Maifeld A, Marko L, Wiig H, Wilck N, et al. The Gut Microbiome in Hypertension: Recent Advances and Future Perspectives. *Circ Res*. 2021;128(7):934-50.
224. Karbach SH, Schönfelder T, Brandão I, Wilms E, Hörmann N, Jäckel S, et al. Gut Microbiota Promote Angiotensin II-Induced Arterial Hypertension and Vascular Dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(9).
225. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(3):979-84.
226. Coggan AR, Racette SB, Thies D, Peterson LR, Stratford RE. Simultaneous Pharmacokinetic Analysis of Nitrate and its Reduced Metabolite, Nitrite, Following Ingestion of Inorganic Nitrate in a Mixed Patient Population. *Pharmaceutical Research*. 2020;37(12):235.
227. Kevil CG, Kolluru GK, Pattillo CB, Giordano T. Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(3):576-93.
228. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, Bachschmid M, Wenzel P, Sydow K, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol*. 2004;66(6):1372-82.
229. Münzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG. Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*. 1995;95(1):187-94.
230. Compton SJ, Jones CG. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*. 1985;151(2):369-74.
231. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
232. Sengupta R, Billiar TR, Stoyanovsky DA. Studies toward the analysis of S-nitrosoproteins. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2009;7(2):232-4.
233. Buettner GR. Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free Radical Biology and Medicine*. 1987;3(4):259-303.
234. Janzen E, Haire D. *Advances in free radical chemistry*. JAI Press, Greenwich. 1990;1:253-95.
235. Rangelova K, Mason RP. The fidelity of spin trapping with DMPO in biological systems. *Magn Reson Chem*. 2011;49(4):152-8.
236. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analytical biochemistry*. 1982;119(1):142-7.

237. Schuhmacher S, Schulz E, Oelze M, König A, Roegler C, Lange K, et al. A new class of organic nitrates: investigations on bioactivation, tolerance and cross-tolerance phenomena. *British journal of pharmacology*. 2009;158(2):510-20.
238. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
239. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*. 1984;1:41-55.
240. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981;112(2):195-203.
241. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34.
242. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.
243. Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Müller J, Schuhmacher S, Alhamedani MSS, et al. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;45(5):619-26.
244. Organisation WH. First WHO report details devastating impact of hypertension and ways to stop it2023.
245. Stamm P, Kalinovic S, Oelze M, Steven S, Czarnowski A, Kvandova M, et al. Mechanistic Insights into Inorganic Nitrite-Mediated Vasodilation of Isolated Aortic Rings under Oxidative/Hypertensive Conditions and S-Nitros(yl)ation of Proteins in Germ-Free Mice. *Biomedicines*. 2022;10(3).
246. Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Müller J, Schuhmacher S, Alhamedani MS, et al. AT1-receptor blockade by telmisartan upregulates GTP-cyclohydrolase I and protects eNOS in diabetic rats. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(5):619-26.
247. Alzawahra WF, Talukder MA, Liu X, Samouilov A, Zweier JL. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;295(2):H499-508.
248. Schuhmacher S, Wenzel P, Schulz E, Oelze M, Mang C, Kamuf J, et al. Pentaerythritol Tetranitrate Improves Angiotensin II--Induced Vascular Dysfunction via Induction of Heme Oxygenase-1. *Hypertension*. 2010;55(4):897-904.
249. Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, et al. Animal Models of Hypertension: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Hypertension*. 2019;73(6):e87-e120.
250. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*. 2017;11:613-9.
251. Radovits T, Lin L-n, Zotkina J, Gerő D, Szabó C, Karck M, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by reactive oxidant hydrogen peroxide in vitro. *European Journal of Pharmacology*. 2007;564(1):158-66.
252. Mian KB, Martin W. Hydrogen peroxide-induced impairment of reactivity in rat isolated aorta: potentiation by 3-amino-1,2,4-triazole. *Br J Pharmacol*. 1997;121(4):813-9.
253. Coyle CH, Kader KN. Mechanisms of H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Endothelial Cells Exposed to Physiologic Shear Stress. *ASAIO Journal*. 2007;53(1):17-22.
254. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Hydrogen Peroxide. *Circulation Research*. 2000;86(3):347-54.
255. Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, et al. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281(4):H1469-75.
256. Stocker R, Huang A, Jeranian E, Hou JY, Wu TT, Thomas SR, et al. Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):2028-33.
257. Rosa AC, Corsi D, Cavi N, Bruni N, Dosio F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules*. 2021;26(7).

258. Radovits T, Zotkina J, Lin L-N, Bömicke T, Arif R, Gerö D, et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition Improves Endothelial Dysfunction Induced by Hypochlorite. *Experimental Biology and Medicine*. 2007;232(9):1204-12.
259. Hink U, Oelze M, Kolb P, Bachschmid M, Zou MH, Daiber A, et al. Role for peroxynitrite in the inhibition of prostacyclin synthase in nitrate tolerance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(10):1826-34.
260. Zou M-H, Cohen RA, Ullrich V. Peroxynitrite and Vascular Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Endothelium*. 2004;11(2):89-97.
261. Weber M, Lauer N, Mülsch A, Kojda G. The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(11):1360-7.
262. Münzel T, Daiber A, Ullrich V, Mülsch A. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(8):1551-7.
263. Korkmaz S, Loganathan S, Mikles B, Radovits T, Barnucz E, Hirschberg K, et al. Nitric Oxide- and Heme-Independent Activation of Soluble Guanylate Cyclase Attenuates Peroxynitrite-Induced Endothelial Dysfunction in Rat Aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2013;18(1):70-7.
264. Korkmaz S, Radovits T, Barnucz E, Neugebauer P, Arif R, Hirschberg K, et al. Dose-dependent effects of a selective phosphodiesterase-5-inhibitor on endothelial dysfunction induced by peroxynitrite in rat aorta. *European Journal of Pharmacology*. 2009;615(1):155-62.
265. Liu W, Wang X, Feng Y. Restoring endothelial function: shedding light on cardiovascular stent development. *Biomaterials Science*. 2023;11(12):4132-50.
266. Chataigneau T, Félétou M, Huang PL, Fishman MC, Duhault J, Vanhoutte PM. Acetylcholine-induced relaxation in blood vessels from endothelial nitric oxide synthase knockout mice. *Br J Pharmacol*. 1999;126(1):219-26.
267. Ling WC, Lau YS, Murugan DD, Vanhoutte PM, Mustafa MR. Sodium nitrite causes relaxation of the isolated rat aorta: By stimulating both endothelial NO synthase and activating soluble guanylyl cyclase in vascular smooth muscle. *Vascul Pharmacol*. 2015;74:87-92.
268. Tropea T, Wareing M, Greenwood SL, Feelisch M, Sibley CP, Cottrell EC. Nitrite mediated vasorelaxation in human chorionic plate vessels is enhanced by hypoxia and dependent on the NO-sGC-cGMP pathway. *Nitric Oxide*. 2018;80:82-8.
269. Lundberg JO, Weitzberg E. Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell*. 2022;185(16):2853-78.
270. YasufumiShirasaki, Su C. Endothelium removal augments vasodilation by sodium nitroprusside and sodium nitrite. *European Journal of Pharmacology*. 1985;114(1):93-6.
271. Oelze M, Mollnau H, Hoffmann N, Warnholtz A, Bodenschatz M, Smolenski A, et al. Vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation as a sensitive monitor of defective nitric oxide/cGMP signaling and endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2000;87(11):999-1005.
272. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-23.
273. Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, et al. Effects of Angiotensin II Infusion on the Expression and Function of NAD(P)H Oxidase and Components of Nitric Oxide/cGMP Signaling. *Circulation Research*. 2002;90(4):e58-e65.
274. Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, Kröller-Schön S, Steven S, Schulz E, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase via reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1670-89.
275. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*. 2001;89(5):408-14.
276. Kalinovic S, Stamm P, Oelze M, Steven S, Kröller-Schön S, Kvandova M, et al. Detection of extracellular superoxide in isolated human immune cells and in an animal model

- of arterial hypertension using hydropropidine probe and HPLC analysis. *Free Radic Biol Med.* 2021;168:214-25.
277. Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP. Noxa1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radical Biology and Medicine.* 2006;41(2):193-201.
278. Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al. Novel gp91^{phox} Homologues in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research.* 2001;88(9):888-94.
279. Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, et al. Nox1 Is Involved in Angiotensin II-Mediated Hypertension. *Circulation.* 2005;112(17):2677-85.
280. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med.* 2007;204(10):2449-60.
281. Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ. NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(5):776-82.
282. Touyz RM. The role of angiotensin II in regulating vascular structural and functional changes in hypertension. *Current Hypertension Reports.* 2003;5(2):155-64.
283. Ebrahimian T, Li MW, Lemarié CA, Simeone SM, Pagano PJ, Gaestel M, et al. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in angiotensin II-induced inflammation and hypertension: regulation of oxidative stress. *Hypertension.* 2011;57(2):245-54.
284. Reckelhoff JF, Yanes Cardozo LL, Fortepiani MLA. Chapter 52 - Models of Hypertension in Aging. In: Ram JL, Conn PM, editors. *Conn's Handbook of Models for Human Aging (Second Edition)*: Academic Press; 2018. p. 703-20.
285. Ambrosino P, Bachetti T, D'Anna SE, Galloway B, Bianco A, D'Agnano V, et al. Mechanisms and Clinical Implications of Endothelial Dysfunction in Arterial Hypertension. *Journal of Cardiovascular Development and Disease.* 2022;9(5):136.
286. Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Mechanisms of nitrite bioactivation. *Nitric Oxide.* 2014;38:58-68.
287. Crawford JH, Isbell TS, Huang Z, Shiva S, Chacko BK, Schechter AN, et al. Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation. *Blood.* 2006;107(2):566-74.
288. Oliveira-Paula GH, Pinheiro LC, Guimaraes DA, Tella SOC, Blanco ALF, Angelis CD, et al. Tempol improves xanthine oxidoreductase-mediated vascular responses to nitrite in experimental renovascular hypertension. *Redox Biology.* 2016;8:398-406.
289. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. Crosstalk between Nitrite, Myoglobin and Reactive Oxygen Species to Regulate Vasodilation under Hypoxia. *PLOS ONE.* 2014;9(8):e105951.
290. Baker JE, Su J, Fu X, Hsu A, Gross GJ, Tweddell JS, et al. Nitrite confers protection against myocardial infarction: Role of xanthine oxidoreductase, NADPH oxidase and KATP channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2007;43(4):437-44.
291. Berry CE, Hare JM. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol.* 2004;555(Pt 3):589-606.
292. Sakuma S, Fujimoto Y, Sakamoto Y, Uchiyama T, Yoshioka K, Nishida H, et al. Peroxynitrite Induces the Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Rabbit Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;230(2):476-9.
293. Montenegro MF, Amaral JH, Pinheiro LC, Sakamoto EK, Ferreira GC, Reis RI, et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radical Biology and Medicine.* 2011;51(1):144-52.
294. Peleli M, Zollbrecht C, Montenegro MF, Hezel M, Zhong J, Persson EG, et al. Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2016;99:472-84.
295. Maia LB, Pereira V, Mira L, Moura JJG. Nitrite Reductase Activity of Rat and Human Xanthine Oxidase, Xanthine Dehydrogenase, and Aldehyde Oxidase: Evaluation of Their Contribution to NO Formation in Vivo. *Biochemistry.* 2015;54(3):685-710.

296. Montenegro MF, Pinheiro LC, Amaral JH, Ferreira GC, Portella RL, Tanus-Santos JE. Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2014;387(6):591-8.
297. Maia LB, Moura JJG. Nitrite reduction by molybdoenzymes: a new class of nitric oxide-forming nitrite reductases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2015;20(2):403-33.
298. Mervaala EMA, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, et al. Endothelial Dysfunction and Xanthine Oxidoreductase Activity in Rats With Human Renin and Angiotensinogen Genes. *Hypertension.* 2001;37(2):414-8.
299. Xin W, Mi S, Lin Z. Allopurinol therapy improves vascular endothelial function in subjects at risk for cardiovascular diseases: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cardiovasc Ther.* 2016;34(6):441-9.
300. Mackenzie IS, Hawkey CJ, Ford I, Greenlaw N, Pigazzani F, Rogers A, et al. Allopurinol versus usual care in UK patients with ischaemic heart disease (ALL-HEART): a multicentre, prospective, randomised, open-label, blinded-endpoint trial. *The Lancet.* 2022;400(10359):1195-205.
301. Padmanabhan P, Grosse J, Asad AB, Radda GK, Golay X. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI Res.* 2013;3(1):60.
302. Friedman MA, Greene EJ, Epstein SS. Rapid Gastric Absorption of Sodium Nitrite in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1972;61(9):1492-4.
303. Rizzi E, Amaral JH, Guimarães DA, Conde-Tella SO, Pinheiro LC, Gerlach RF, et al. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. *Free Radical Biology and Medicine.* 2019;130:234-43.
304. Carlström M, Persson AEG, Larsson E, Hezel M, Scheffer PG, Teerlink T, et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. *Cardiovascular Research.* 2010;89(3):574-85.
305. Moretti C, Zhuge Z, Zhang G, Haworth SM, Paulo LL, Guimarães DD, et al. The obligatory role of host microbiota in bioactivation of dietary nitrate. *Free Radic Biol Med.* 2019;145:342-8.
306. Rahman MM, Islam F, Or-Rashid MH, Mamun AA, Rahaman MS, Islam MM, et al. The Gut Microbiota (Microbiome) in Cardiovascular Disease and Its Therapeutic Regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:903570.
307. Stepankova R, Tonar Z, Bartova J, Nedorost L, Rossman P, Poledne R, et al. Absence of Microbiota (Germ-Free Conditions) Accelerates the Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice Fed Standard Low Cholesterol Diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis.* 2010;17(8):796-804.
308. Chen Y, Zhou J, Wang L. Role and Mechanism of Gut Microbiota in Human Disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:625913.
309. Li J, Zhao F, Wang Y, Chen J, Tao J, Tian G, et al. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome.* 2017;5(1):14.
310. Vikram A, Kim YR, Kumar S, Li Q, Kassan M, Jacobs JS, et al. Vascular microRNA-204 is remotely governed by the microbiome and impairs endothelium-dependent vasorelaxation by downregulating Sirtuin1. *Nat Commun.* 2016;7:12565.
311. Edwards JM, Roy S, Tomcho JC, Schreckenberger ZJ, Chakraborty S, Bearss NR, et al. Microbiota are critical for vascular physiology: Germ-free status weakens contractility and induces sex-specific vascular remodeling in mice. *Vascul Pharmacol.* 2020;125-126:106633.
312. Petersson J, Jädert C, Phillipson M, Borniquel S, Lundberg JO, Holm L. Physiological recycling of endogenous nitrate by oral bacteria regulates gastric mucus thickness. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:241-7.
313. Bryan NS, Alexander DD, Coughlin JR, Milkowski AL, Boffetta P. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(10):3646-65.

314. Yasuhiro K, Toshihiro O, Katsunori K, Yukio A. Probiotic *L. gasseri* strain (LG21) for the upper gastrointestinal tract acting through improvement of indigenous microbiota. *BMJ Open Gastroenterology*. 2019;6(1):e000314.
315. Ward FW, Coates ME. Gastrointestinal pH measurement in rats: influence of the microbial flora, diet and fasting. *Laboratory Animals*. 1987;21(3):216-22.
316. Abegaz TM, Shehab A, Gebreyohannes EA, Bhagavathula AS, Elnour AA. Nonadherence to antihypertensive drugs: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(4):e5641.
317. Chowdhury R, Khan H, Heydon E, Shroufi A, Fahimi S, Moore C, et al. Adherence to cardiovascular therapy: a meta-analysis of prevalence and clinical consequences. *European Heart Journal*. 2013;34(38):2940-8.
318. Gavrilova A, Bandere D, Logviss K, Šmits D, Urtāne I. Adherence Level to Arterial Hypertension Treatment: A Cross-Sectional Patient Survey and Retrospective Analysis of the NHS Prescription Database. *Healthcare*. 2021;9(8):1085.
319. Nadtochiy SM, Redman EK. Mediterranean diet and cardioprotection: the role of nitrite, polyunsaturated fatty acids, and polyphenols. *Nutrition*. 2011;27(7-8):733-44.
320. Kaye DM, Shihata WA, Jama HA, Tsyganov K, Ziemann M, Kiriazis H, et al. Deficiency of Prebiotic Fiber and Insufficient Signaling Through Gut Metabolite-Sensing Receptors Leads to Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2020;141(17):1393-403.
321. Pignatelli P, Fabietti G, Ricci A, Piattelli A, Curia MC. How Periodontal Disease and Presence of Nitric Oxide Reducing Oral Bacteria Can Affect Blood Pressure. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
322. Vanhatalo A, L'Heureux JE, Kelly J, Blackwell JR, Wylie LJ, Fulford J, et al. Network analysis of nitrate-sensitive oral microbiome reveals interactions with cognitive function and cardiovascular health across dietary interventions. *Redox Biol*. 2021;41:101933.
323. Catry E, Bindels LB, Tailleux A, Lestavel S, Neyrinck AM, Goossens J-F, et al. Targeting the gut microbiota with inulin-type fructans: preclinical demonstration of a novel approach in the management of endothelial dysfunction. *Gut*. 2018;67(2):271-83.
324. Rezazadeh L, Gargari BP, Jafarabadi MA, Alipour B. Effects of probiotic yogurt on glycemic indexes and endothelial dysfunction markers in patients with metabolic syndrome. *Nutrition*. 2019;62:162-8.
325. Omar SA, Fok H, Tilgner KD, Nair A, Hunt J, Jiang B, et al. Paradoxical normoxia-dependent selective actions of inorganic nitrite in human muscular conduit arteries and related selective actions on central blood pressures. *Circulation*. 2015;131(4):381-9.
326. Kapil V, Millsom AB, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, et al. Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans. *Hypertension*. 2010;56(2):274-81.
327. Said Abasse K, Essien EE, Abbas M, Yu X, Xie W, Sun J, et al. Association between Dietary Nitrate, Nitrite Intake, and Site-Specific Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2022;14(3).
328. Song P, Wu L, Guan W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients*. 2015;7(12):9872-95.
329. Di Daniele N, Noce A, Vidiri MF, Moriconi E, Marrone G, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. Impact of Mediterranean diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget*. 2017;8(5):8947-79.
330. Wuijts S, Claessens J, Farrow L, Doody DG, Klages S, Christophoridis C, et al. Protection of drinking water resources from agricultural pressures: Effectiveness of EU regulations in the context of local realities. *Journal of Environmental Management*. 2021;287:112270.
331. Zamani H, de Joode M, Hossein IJ, Henckens NFT, Guggeis MA, Berends JE, et al. The benefits and risks of beetroot juice consumption: a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2021;61(5):788-804.
332. Montenegro MF, Sundqvist ML, Nihlén C, Hezel M, Carlström M, Weitzberg E, et al. Profound differences between humans and rodents in the ability to concentrate salivary nitrate: Implications for translational research. *Redox Biology*. 2016;10:206-10.

8 Danksagung

XXX

9 Curriculum vitae

XXX

Publikationen und Veröffentlichungen

Quelle <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Stamm P, Kalinovic S, Oelze M, Steven S, **Czarnowski A**, Kvandova M, et al. Mechanistic Insights into Inorganic Nitrite-Mediated Vasodilation of Isolated Aortic Rings under Oxidative/Hypertensive Conditions and S-Nitros(yl)ation of Proteins in Germ-Free Mice. *Biomedicines*. 2022;10(3):730.

doi: 10.3390/biomedicines10030730.

Tagungsabstracts

By: Stamm, P (Stamm, Paul) ; Mihalikova, D (Mihalikova, Dominika) ; Czarnowski, A (Czarnowski, Alexander) ; Kuntic, M (Kuntic, Marin) ; Kuntic, I (Kuntic, Ivana) ; Hahad, O (Hahad, Omar) ; Ubbens, H (Ubbens, Henning) ; Strohm, L (Strohm, Lea) ; Oelze, M (Oelze, Matthias) ; Daiber, A (Daiber, Andreas) ; Münzel, T (Muenzel, Thomas)

Title: The cardiovascular effects of alternative tobacco products and the role of phagocytic NADPH OXIDASE (NOX-2)

Source: FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE

Volume: 201

Meeting Abstract PP V_52

Supplement: 1

Published: May 20 2023

Conference Title: Annual Meeting of the Society for Free Radical Research Europe (SFRR E)

Conference Date: JUN 06-09, 2023

Conference Location: Vienna, AUSTRIA