

Untersuchung der Wirkung von modifizierten LDL auf die Stickstoffmonoxidsynthese in Endothelzellen

Anke Bill

Praktikantin in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Regine Heller (Friedrich-Schiller Universität Jena, Außenstelle Erfurt)

Vaskuläre Medizin

Zusammenfassung

Modifizierte Lipoproteine geringer Dichte (englisch low density proteins, LDL) gelten als einer der Hauptverursacher von Arteriosklerose.

Die Zugabe von Hypochlorid-modifizierten LDL (HOCl-LDL) zu menschlichen, venösen Endothelzellen ging mit einer zeit- und konzentrationsabhängigen verringerten Bildung von L-Citrullin und cGMP einher, die als Maßstab der eNOS-Aktivität angesehen werden können. Dabei zeigte sich keine erniedrigte Expression von eNOS noch eine verminderte Verfügbarkeit des Cofaktors Tetrahydrobiopterin. Auch konnte keine mengenmäßige Veränderung der Aufnahme von L-Arginin in die Zelle festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich eine Delokation von eNOS aus der Zellmembran und dem Golgiapparat in einen Bereich rund um den Zellkern, die durch ein immunhistochemisches Verfahren nachgewiesen werden konnte (1).

Eine Behandlung mit Kupferoxidierten-LDL bewirkte eine starke Schädigung der Zellen. Eine Dislokation von eNOS wird aber vermutet.

Das Zusetzen von Catechin und Epicatechin zeigte dagegen keine Veränderungen in der Lokalisation von eNOS.

Einleitung

Arteriosklerose, auch als Arterienverkalkung bekannt, ist in den Industrienationen die Todesursache Nummer eins (2). Sie gilt u.a. als Urheber von Herzinfarkten, Angina pectoris, Schlaganfällen und Bluthochdruck. Bis vor Kurzem stellte man sich ihren Verlauf wie das Verkalken von Wasserleitungen vor, d.h. mit Fett beladenes organisches Material lagere sich an der Innenseite der Arterienwand ab und enge allmählich den Blutstrom ein, was zu den oben beschriebenen Krankheitserscheinungen führe.

Doch neuere Untersuchungen deuten eher darauf hin, dass Entzündungsvorgänge eine Schlüsselrolle im Verlauf der Arteriosklerose spielen. Als Auslöser gilt die Anreicherung von LDL-Partikeln (low density lipoprotein) in der innersten Schicht der Arterienwand (Intima), die von einer Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet wird und in direktem Kontakt zu dem Blutstrom steht. Diese Lipoproteine geringer Dichte bestehen, wie der Name es schon sagt, aus Lipidmolekülen kombiniert mit wasserlöslichen Eiweißkomponenten. Ihre Aufgabe ist es Cholesterin aus der Leber in die Zielgewebe zu transportieren, die es für die Reparatur von Zellmembranen oder die Produktion von Steroidhormonen benötigen. Bei normaler LDL-Konzentration im Blut wandern die Partikel frei in die Intima ein und aus. Übersteigt die LDL-Blut-Konzentration aber einen bestimmten Schwellenwert, so bleiben die LDL-Partikel bei ihrer Wanderung durch die Intima zu der darunter liegenden Schicht aus glatten Muskelzellen (Media), stecken. Gleichzeitig werden ihre Lipid- und

Eiweißkomponenten oxidiert und glykolytisch. Auf diese Veränderungen reagieren die Endothelzellen mit der Ausbildung von speziellen Haftmolekülen, an denen Monocyten und T-Zellen aus dem Blut hängen bleiben und angezogen durch chemische Signale der Muskelzellen in die Media einwandern. Nach der nun folgenden Proliferation der Monocyten zu Makrophagen, nehmen diese die oxidierten LDL-Partikel in sich auf und werden so zu Schaumzellen (Pathologen bezeichnen die mit LDL-Partikeln gefüllten Makrophagen so wegen ihres schaumigen Aussehens unter dem Mikroskop). Die T-Lymphozyten produzieren unterdessen Entzündungsmediatoren, die u.a. die Zellteilung fördert. Durch die Beteiligung der Schaumzellen entstehen so genannte Lipidläsionen (Lipidstreifen) an der Innenwand der Intima, die die frühe Form der arteriosklerotischen Plaques darstellen. Die durch die Entzündungsmediatoren aktivierten glatten Muskelzellen synthetisieren nun im verstärkten Maße das Faserprotein Kollagen, was die Lipidläsion wie eine Kappe überwuchert. Die Region unter der Kollagenkappe bezeichnet man jetzt als Lipidkern. Diese Ablagerung an der Arterieninnenwand führt selten zu Beschwerden, da sie den Blutfluss nur in geringem Maße behindert. Im Laufe der Zeit allerdings kann die Synthese von Kollagenfasern zu einer erheblichen Vergrößerung des Plaques kommen, so dass Stenosen (Verengungen des Blutkanals) auftreten, die dann zu Brustenge (angina pectoris) oder Bluthochdruck führen. Allerdings lassen sich nur etwa 15 % aller Herzattacken auf Stenosen durch Plaques zurückführen. Weitaus häufiger werden Infarkte durch Blutgerinnsel hervorgerufen. Denn im Laufe der Zeit kommt es unter dem Plaque zu Veränderungen. Die Schaumzellen streben ab und setzen die dabei die LDL-Partikel wieder frei, die ihrerseits neue Entzündungen in den angrenzenden Zellen verursachen können. Es kommt zu einer erneuten Produktion von Entzündungsmediatoren, die zum Einen die verbleibenden Makrophagen zu der Produktion von Kollagen abbauenden Enzymen (Kollagenasen) anregen zum anderen die T-Zellen dazu verleiten Gewebefaktor (tissue factor, TF) zu synthetisieren, einen potenten Auslöser der Gerinnungskaskade. Es kommt also durch die Arbeit der Kollagenasen zu einem Aufbrechen der Faserkappe. TF lässt das in den Plaque einströmende Blut sofort gerinnen. Es bildet sich ein Blutgerinnsel, was nicht selten die Arterie verstopft. Ein Infarkt ist jetzt kaum noch zu verhindern. (3,4,5)

Stickstoffmonoxid - Ein bedeutendes Signalmolekül

Erst in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde die Rolle des Stickstoffmonoxids als Signalmolekül in Endothelzellen und zur Regulation der Kontraktion von glatten Muskelzellen entdeckt. Forschern war aufgefallen, dass die Häufigkeit von Arteriosklerose bei Arbeitern einer Sprengstofffabrik wesentlich niedriger war als bei dem Rest der Bevölkerung. Bei genaueren Untersuchungen entdeckte man tatsächlich einen Faktor, der von Endothelzellen gebildet wird und eine Entspannung der glatten Muskeln in den Gefäßwänden bewirkt. Zunächst bezeichnete man diesen Faktor als EDRF (endothelial derived relaxing factor, von Endothelzellen gebildeter Relaxationsfaktor), doch nach der Entdeckung seiner Struktur stellte sich heraus, dass es sich um das Gas Stickstoffmonoxid handelte. Stickstoffmonoxid (NO) ist sowohl wasser- als auch fettlöslich, so dass es ohne Probleme durch die Zellmembranen diffundieren kann. Gebildet wird NO durch die Umwandlung von der Aminosäure L-Arginin in L-Citrullin. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), welches NADPH, FAD, FMN und Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Cofaktoren benötigt.(4)

NO zeigt antiarteriosklerotische Wirkungen. So dient es der Guanylatcyclase als Cofaktor bei der Umwandlung von Guanosintriphosphat in cyclischen Guanosinmonophosphat, welches u.a. eine Muskelrelaxation (Muskelerschlaffung) bewirkt. Auch vermindert NO die Aggregation von Blutplättchen und sorgt für eine Erhöhung der Membranpermeabilität. (6)

So ist es nicht verwunderlich, dass NOS sehr häufig in Endothelzellen zu finden ist. Um sie von NO-Synthasen zu unterscheiden, bezeichnet man sie als endothelial NOS (eNOS).

Durchführung

Präparation der Nabelschnüre zur Gewinnung von venösen Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

Die Präparation und Kultivierung der HUVEC wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Säubern der Nabelschnüre mit einem Desinfektionsmittel

Dazu wurden die Nabelschnüre vereinzelt und auf einer sterilen Folie mit dem Desinfektionsmittel äußerlich abgewaschen.

2. Säubern der Vene

Ein Ende der Nabelschnur wurde abgeschnitten, um die Gefäße besser zu erkennen. In die Vene wurde eine sterile Kanüle eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Die Kanüle wurde mit einer Spritze verbunden und so die Vene zwei- bis dreimal mit phosphatgepufferten physiologischer Kochsalzlösung (PBS) durchspült, die aufgrund der hohen Außentemperaturen und der damit erhöhten Verkeimungsgefahr mit Antibiotika versetzt wurde.

3. Inkubation mit Kollagenase-Lösung

Das andere Ende der Nabelschnur wurde entfernt und ebenfalls eine sterile Kanüle in die Vene eingeführt. Mithilfe einer Spritze konnte so die Vene mit der Kollagenase-Lösung gefüllt werden. Die dreiminütige Inkubation erfolgte in einem 37°C warmen Wasserbad. Durch sanftes Massieren wurde eine gleichmäßige Verteilung der Lösung sichergestellt. Die Kollagenase-Lösung bewirkt den Abbau der hauptsächlich aus Kollagen bestehenden Matrix, die Intima und Media voneinander trennt und als „Träger“ der Endothelzellen fungiert. Nach drei Minuten wurde die Kollagenase-Lösung mit den in ihr enthaltenen abgelösten Endothelzellen in ein steriles Gefäß überführt und die Enzymreaktion mit fötalem Kälberserum und Medium 199 abgestoppt. Die Vene wurde ebenfalls mit dem Stoppmedium gespült und die Spülflüssigkeit in das gleiche Gefäß gegeben.

4. Gewinnung der Endothelzellen

Die abgestoppte Kollagenase-Lösung wurde bei 500x g 6 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit fötalem Kälberserum (FKS) und Zellmedium resuspendiert.

Zellkultivierung

1. *Herstellung von Primärkulturen*

75 cm² Zellkulturflaschen wurden mit 0,2 % Gelatine beschichtet (verbessert Anheftung und Wachstum der Zellen), kurz getrocknet und mit 10 ml M199+FKS gefüllt. Die Zellsuspension wurde in die Zellkulturflaschen überführt. Gleichmäßiges Schwenken garantierte die gleichmäßige Verteilung der Zellen. Die Zellkulturen wurden über Nacht bei 37°Celsius und 5% CO₂ kultiviert.

2. *Waschen der Zellen*

Das Medium wurde vollständig abgesaugt, um nicht-adhärenente Zellen und Zerfallsprodukte zu entfernen. Nach mehrmaligem Spülen der Zellen mit M199+FKS wurden diese mit einem Wachstumsmedium bestehend aus humanem Serum, FKS, „Endothelial cell growth supplement“ (ECGS) und Heparin (erhöht die Affinität zu Wachstumsfaktoren und verhindert Blutgerinnung) versetzt.

Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Halbwechsel des Mediums.

Die Zellen waren nach 5 Tagen konfluent (es hatte sich ein gleichmäßiger Zellrasen gebildet und die Zellen begannen sich abzulösen).

3. *Ablösen der Endothelzellen*

Die Lochplatte für die Kultivierung der auf Coverslips (dünne Glasplättchen) ausgesäten Zellen (wells) wurde vorbereitet, indem man mithilfe einer Pinzette die Coverslips in die Ausbuchtungen überführte und mit Gelatine beschichtete.

Aus den Zellkulturflaschen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gespült um Serumreste zu entfernen. Danach erfolgte die Zugabe von Trypsin/EDTA um die Zellen zu dissoziieren. Der Ablösevorgang kann unter dem Mikroskop beobachtet werden. Nach drei Minuten wird die Wirkung des Trypsins durch serumhaltiges Medium blockiert. Die Suspension wurde in ein steriles Röhrchen überführt und bei 500 x g 6min zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in M199+FKS resuspendiert.

4. *Zählen der Zellen*

Um die gewünschte Zellzahl aussäen zu können ist es nötig zu wissen, wie viele Zellen sich in der Suspension befinden. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Suspension in einer Thoma-Zählkammer ausgezählt und mit einfachem Dreisatz der Verdünnungsfaktor bestimmt.

5. *Aussaat*

Die Zellsuspension wird mit M199+FKS auf die gewünschte Konzentration verdünnt und jeweils 2ml in die Ausbuchtung, in der die Coverslips liegen, gegeben.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂.

Vorinkubation

24 h vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen mit der Testsubstanz (natives LDL, Catechin, Epicatechin, Kupfer modifiziertes LDL, HOCL modifiziertes LDL) versetzt. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen, d.h. 2x Kontrolle + jeweils 2x einer der Testsubstanzen, bzw. eine Konzentration.

Die Testsubstanz wurde direkt in das Medium gegeben und durch leichtes Schwenken der wells gleichmäßig verteilt.

Immunhistochemischer Nachweis von eNOS in Endothelzellen (APAAP-Färbung)

1. Fixierung der Zellen

Nach dem man das Medium aus den wells abgesaugt hatte, wurden die Coverslips mit einer HEPES-Ca-Lösung (HEPES-Puffer+Ca₂Cl₂) gespült. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1% Paraformaldehyd/PBS. Die anschließende Waschung der Coverslips wurde mit PBS vorgenommen.

2. Permeabilisierung

Die Permeabilisierung erfolgte durch Aceton. Zu diesem Zweck wurden Petrischalen mit kaltem 50%igem und 100%igem Aceton vorbereitet (bei der Reaktion von Aceton mit Restwasser entsteht Wärme (Turbulenzen). Um eine Beschädigung der Zellen zu vermeiden wurde zum einen ein Schritt mit 50% Aceton vorgeschaltet und zum anderen gekühltes Aceton verwendet). Mithilfe einer umgebogenen Kanüle wurden die Coverslips aus den wells gefischt, kurz in 50%iges Aceton getaucht, für 10min in 100%igem Aceton inkubiert, kurz in 50%igem Aceton gewaschen und schließlich in mit PBS gefüllten, nummerierte Küvetten gegeben (Vorteil: Der diagonale Durchmesser der Küvetten ist kaum größer als der der Coverslips, diese können also in die Küvetten hineingestellt werden). Die Orientierung der Coverslips war über die gesamte Färbung beizubehalten, da diese nur auf einer Seite mit Zellen beschichtet waren.

Die Coverslips wurden dreimal mit PBS gespült, indem man das PBS aus den Küvetten absaugte und durch frisches ersetzte.

3. Inkubation mit dem 1. Antikörper (anti eNOS, monoklonal)

Der 1. Antikörper (anti eNOS, monoklonal, aus Maus) wurde 1:100 in PBS/N3/RSA verdünnt. Pro Coverslip wurde ein Objektträger in eine feuchte Kammer gelegt und am äußeren Rand 50µl des verdünnten Antikörpers aufgetragen. Die Coverslips wurden einzeln aus den jeweiligen Küvetten entnommen, upside-down (also Zellen nach unten) in den aufgetragenen Antikörper gelegt und 30 min inkubiert. Zum Waschen wurden sie von den Objektträgern in einer mit PBS gefüllten Petrischale abgeschwemmt und in die mit PBS gefüllten Küvetten gestellt. Insgesamt wurde dreimal gewaschen.

4. Inkubation mit dem 2. Antikörper (APAAP-Brückenantikörper)

Der 2. Antikörper (APAAP- Brückenantikörper, anti Maus, aus Hase) wurde 1+30 mit PBS/N3/RSA verdünnt. Es wurden ebenfalls 50µl auf die Objektträger aufgetragen und die Coverslips upside-down für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Das Waschen erfolgte wie oben beschrieben, nur wurde im letzten Durchgang mit TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) gespült (Entfernen des phosphathaltigen Puffers, da er die alkalische Phosphatase-Reaktion stören könnte).

5. Inkubation mit dem 3. Antikörper (APAAP-Maus-Antikörper)

Die Verdünnung des 3. Antikörpers (APAAP-Maus-Antikörper) erfolgte 1+50 in TBS. Auch hier wurde upside-down für 30min in 50µl verdünntem Antikörper in der feuchten Kammer inkubiert und zweimal mit TBS gespült. Dieser 3. Antikörper trägt

ein Enzym (alkalische Phosphatase), welches mit einem speziellen Chromogen in einer Farbreaktion reagiert. D.h. nach Inkubation mit dem Chromogen färbten (in diesem Fall rot) sich nur die Bereiche, die den 2. Antikörper tragen, der wiederum an den 1. Antikörper, der das zu untersuchende Enzym eNOS markiert, gebunden ist.

6. *Inkubation mit dem Chromogen*

Das Chromogen (Dako Fuchsin Substrate-Chromogen) wurde gemäß Packungsbeilage zusammengemischt. Die Coverslips wurden upside-up (also mit den Zellen nach oben) auf die Objektträger gelegt, mit 50µl Chromogen bedeckt und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Es wurde dreimal mit Leitungswasser gewaschen.

7. *Kernfärbung*

Um die Zellorganellen später besser unterscheiden zu können wurde der Zellkern mit Hematoxylin angefärbt. Dazu wurden die Coverslips upside-up mit Hematoxylin 3 sec. gefärbt und nach dem Absaugen des überschüssigen Hematoxylin in Leitungswasser überführt (Küvetten).

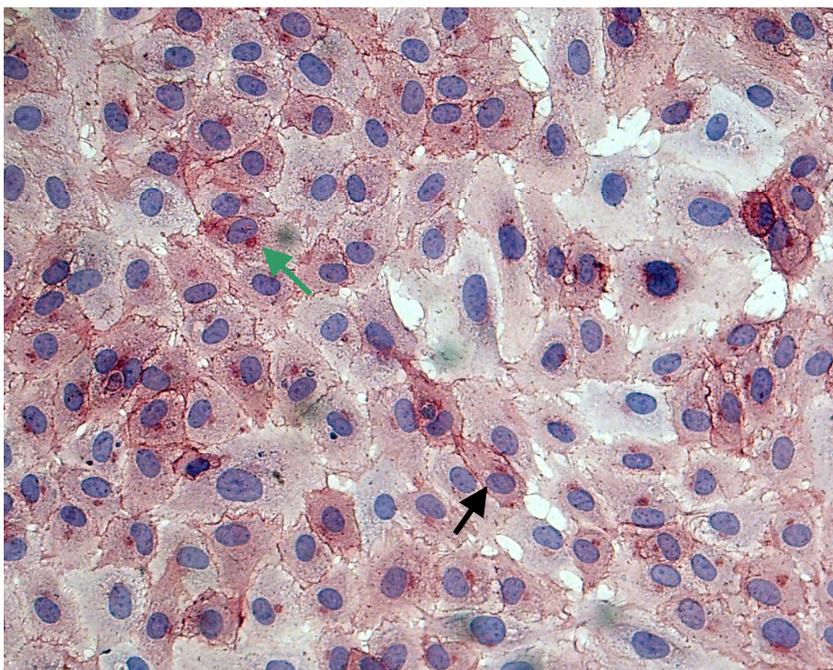
Auch hier wurde mehrfach gespült, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Wässerungszeit durfte 10min aber nicht übersteigen.

8. *Eindecken*

Zur Konservierung der Ergebnisse wurden die Coverslips mit Gelatine/Glycerol eingedeckt. Dazu gab man pro Coverslip einen Tropfen Eindeckungsmittel auf ein Deckglas und einen Objektträger, legte die Coverslips upside-down in den Tropfen auf dem Deckglas und kippte dieses mit den Coverslips nach unten auf den Objektträger.

Ergebnisse

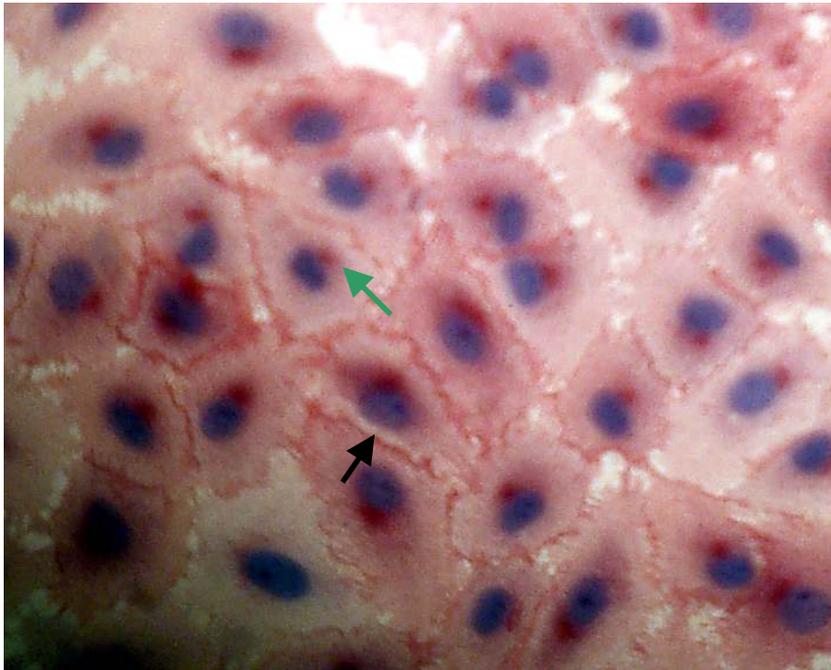
Unbehandelte HUVEC (Kontrolle)



Kontrolle

Die Zellen liegen planar und dicht auf der Oberfläche des Coverslips. Die Zellkerne sind blau angefärbt. Der Golgiapparat ist als rotgefärbter, punktförmiger Bereich in der Nähe des Kerns gut zu erkennen (grüner Pfeil). Auch die Plasmamembran zeigt eine rote Färbung (schwarzer Pfeil).

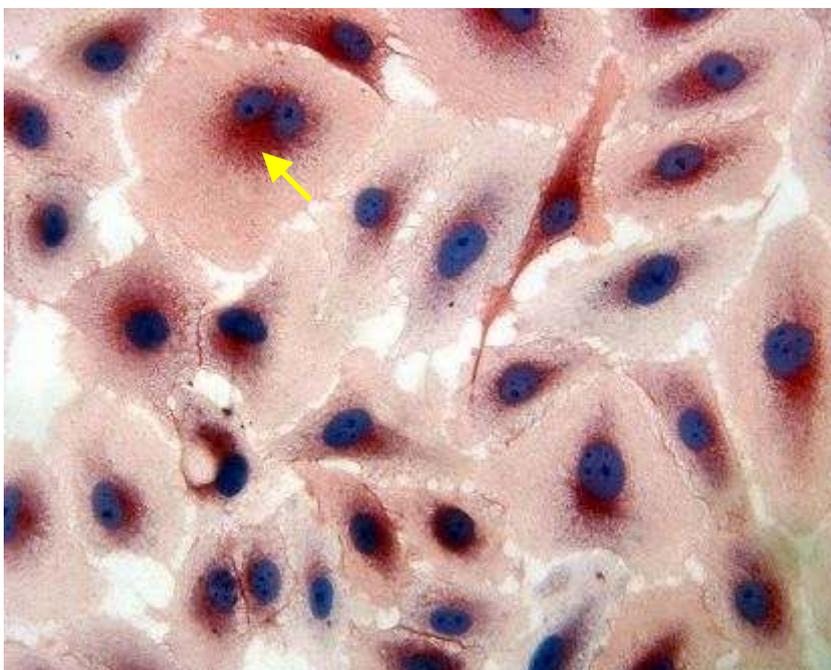
Mit nativen LDL behandelte HUVEC (nLDL)



Natives LDL

Die Zellen liegen planar und dicht auf der Oberfläche des Coverslips. Der Zellkern ist deutlich blau gefärbt. Der Golgiapparat (grüner Pfeil) und die Plasmamembran (schwarzer Pfeil) zeigen eine rote Färbung.

Mit HOCl-LDL (Hypochlorid modifiziertes LDL) behandelte HUVEC



HOCl-LDL

Die Zellen liegen planar und dicht auf der Oberfläche des Coverslips. Der Zellkern ist deutlich blau gefärbt und von einem rotgefärbten Bereich umgeben (gelber Pfeil). Die Plasmamembran und der Golgiapparat zeigen keine Färbung.

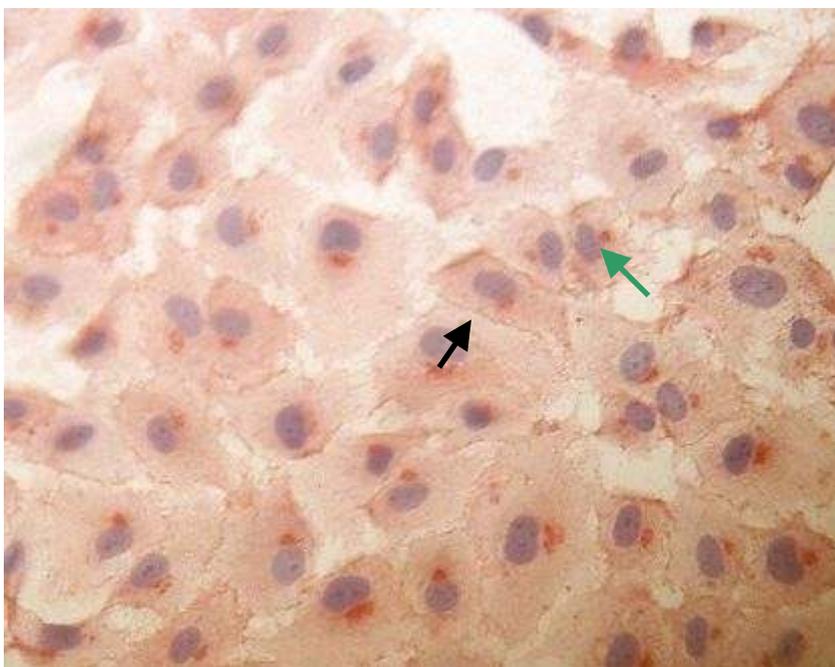
Mit Cu-LDL (Kupfer modifiziertes LDL) behandelte HUVEC



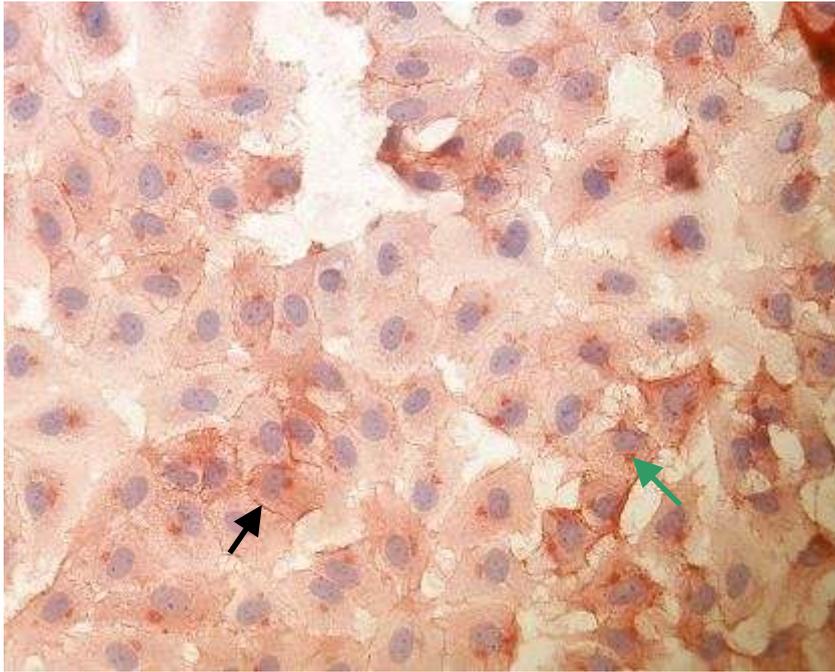
Cu-LDL

Die Zellen wurden teilweise von der Oberfläche des Coverslips abgelöst und liegen nur noch vereinzelt planar vor. Die Zellkerne zeigen eine blassblaue Färbung. Der Golgiapparat (grüner Pfeil) ist rot gefärbt, aber nicht deutlich abgegrenzt. Die Plasmamembran ist nicht angefärbt.

Mit Catechin, bzw. Epicatechin behandelte HUVEC



Catechin



Epicatechin

Die Zellen liegen planar und dicht auf der Oberfläche des Coverslips. Die Zellkerne sind blau angefärbt. Der Golgiapparat ist als rotgefärbter, punktförmiger Bereich in der Nähe des Kerns gut zu erkennen (grüner Pfeil). Auch die Plasmamembran zeigt eine rote Färbung (schwarzer Pfeil).

Diskussion

Natives LDL, Catechin und Epicatechin haben keine Auswirkungen auf die Lokalisation der eNOS, es lassen sich keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle feststellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben in (1) überein. HOCl-LDL behandelte HUVEC allerdings zeigen einige Veränderungen auf. So zeigt der rotangefärbte Bereich um den Zellkern eine Dislokation der eNOS aus dem Golgiapparat an. HOCl ist eine potente Oxidanzie, die eine wichtige Rolle in der Abtötung von Mikroorganismen und Entzündungsvorgängen im menschlichen Körper spielt. Die in vitro gewonnenen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass HOCl in den frühen arteriosklerotischen Prozessen eine Rolle spielt. So könnte die HOCl-Konzentration im Verlauf von entzündlichen Prozessen im Blut schnell ansteigen, die könnten dadurch LDL oxidiert werden und ihrerseits die NO-Produktion der betroffenen Zellen hemmen. Somit würde ein wichtiges Signalmolekül der Zelle fehlen. Die „antiarteriosklerotischen“ Eigenschaften der Zelle würden negativ beeinflusst werden. So könnte es u.a. zu einer Verschlechterung der Membranpermeabilität kommen, welche den ersten Schritt zur Arteriosklerose, das Anreichern von LDL in der Intima positiv beeinflussen könnte. Doch diese Theorien müssen in vivo erst noch erforscht werden.

Kupfer dagegen kommt im menschlichen Körper nur in sehr geringen Mengen vor (Spurenelement). Die hier verwendete Konzentration war zu hoch, wodurch die Zellen stark beschädigt wurden. Eine genaue Aussage über die Wirkung auf eNOS kann daher nicht gemacht werden. Es wird aber ebenfalls eine Dislokation von eNOS und somit eine verringerte Produktion von NO vermutet.

Festzuhalten ist, dass eine Dislokation von eNOS mit einer verringerten NO-Produktion einhergeht. (1) Es lässt sich vermuten, dass die im Golgiapparat gelegene eNOS eine wichtige Rolle in der zellulären NO-Produktion spielt. In Hinblick auf die Prävention von Arteriosklerose sollte die Oxidation von LDL (und somit auch die Dislokation von eNOS) unterbunden oder die Produktion von NO positiv beeinflusst werden. Vitamin C (Ascorbinsäure) vereint beide Eigenschaften. So stellt es als wasserlöslichen Vitamin eine gute Antioxidanzie dar. Diese Eigenschaft der Ascorbinsäure wirkt sich besonders positiv auf die NO-Produktion der Zelle aus. Untersuchungen zeigen, dass Vitamin C nicht nur die LDL vor einer Oxidation durch z.B. freie Radikale schützt (7), sondern dass hohe Vitamin C Konzentrationen in der Zelle mit einem Anstieg der zellulären Tetrahydrobiopterinkonzentration einhergeht (8), wobei weder die Produktion des BH₄ noch dessen Affinität zu eNOS erhöht wurde. Vielmehr zeigen die Ergebnisse, dass Ascorbinsäure das BH₄ stabilisiert und dadurch als Cofaktor für eNOS vorhanden ist, was eine optimale NO-Produktion zur Folge hat. Hierfür reicht allerdings nicht die bisher angenommene Tagesdosis von 50-70mg, neuere Erkenntnisse gehen von einer benötigten Tagesdosis von 200mg aus.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle im Schutz der Gefäße vor Arteriosklerose spielt. Doch es wird wohl noch einige Zeit vergehen, bis die genauen Vorgänge erklärt werden können. Doch schon jetzt zeigt sich, dass auch altbewehrte Stoffe wie das Vitamin C in der aktuellen Forschung nicht vernachlässigt werden sollten.

Literatur

- 1 Nuszowski, A., Gräbner, R., Marsche, G., Unbehaun, A., Malle, E., Heller, R. (2001) J. Biol. Chem. 276 Hypochloride-modified Low Density Lipoprotein Inhibits Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells via an Intracellular Dislocalization of Endothelial Nitric-oxide Synthase
- 2 Deutsche Herzstiftung Infobroschüre Arteriosklerose
- 3 Spektrum der Wissenschaft-Dossier 3/03: Moderne Medizin
- 4 Encarta Enzyklopädie 2003
- 5 Campbell, Neil A., Biologie 2. Auflage, 2000
- 6 Nelson, Cox, Lehninger Biochemie, 3. Auflage, 2001
- 7 Heller, R., Münscher-Pauling, F., Gräbner, R., Till, U. (1998) J.Biol.Chem. 274 L-Ascorbic Acid Potentiates Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells
- 8 Heller, R., Unbehaun, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., Werner, E. (2000) J. Biol. Chem. 276 L-Ascorbic Acid Potentiates Endothelial Nitric Oxide Sythesis via a Chemical Stabilization of Tetrahydrobiopterin
- 9 Rehm, H. Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics 3. Auflage. 2000