

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Nikotinamidadenindinukleotid-Blutplasmawerte sind unabhängig vom
kalendarischen und vaskulären Alter in einer Normalkohorte aus der Region
Halle-Saalekreis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Luisa Katharina Sultana Genia Schwarzmann

geboren am 19.06.1992 in Marl

Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Babett Bartling

Gutachter:

1. Prof. Dr. Johannes Hirrlinger, Leipzig

2. PD Dr. Thorsten Pfirrmann

04.02.2020

08.10.2020

Für meine Eltern und Großeltern

Referat

Zielstellung: Mit zunehmendem Alter nimmt die Gefäßelastizität ab, der Blutdruck steigt. Da das kalendarische Alter nicht zwangsläufig das biologische Alter repräsentiert, ist die Identifikation von Faktoren von Interesse, welche das Gefäßalter beschreiben. In diesem Zusammenhang wird häufig die Autofluoreszenz der Haut (Haut-AF) gemessen, um Aussagen über das biologische Alter unserer Gefäße und somit auch über das kardiovaskuläre Risiko des Einzelnen treffen zu können. Andere mögliche Altersfaktoren wie die Blutplasmagehalte an Nikotinamidadenindinukleotid in oxidiertem (NAD^+) und reduzierter (NADH) Form oder Renalase, einer potentiellen NADH -Oxidase im Plasma, sind in ihrer Relevanz noch nicht überprüft worden.

Methoden: Von 209 Probanden (18 - 83 Jahre) ohne schwerwiegende Erkrankungen wurden die Gefäßseigenschaften (u.a. Blutdruck in liegender und sitzender Position, Pulswellengeschwindigkeit bzw. PWG, Augmentationsdruck) mit dem Vicorder[®]-Gerät und die Haut-AF mit dem AGE Reader mu[®] ermittelt. Die Gehalte an NAD (NAD^+ und NADH) und Renalase im Blutplasma wurden mit biochemischen Methoden bestimmt.

Ergebnisse: Einige vaskuläre Parameter (Blutdruck in liegender und sitzender Position, Augmentationsdruck) unterscheiden sich zwischen Männern und Frauen. Daher wurden die Daten beider Geschlechter getrennt ausgewertet. Das kalendarische Alter korrelierte stark positiv mit der Haut-AF, wobei die Korrelation bei Männern besser als bei Frauen war. Trotz dieser starken Korrelation waren altersabhängige Veränderungen der Gefäßparameter (Blutdruck, PWG, Augmentationsdruck) und weitere aufgenommene Parameter (z.B. Handkraft, Medikamente) bei Männern und Frauen immer mehr vom kalendarischen Alter als von der Haut-AF abhängig. Der Plasmagehalt an NAD sowie NAD^+/NADH war bei Männern und Frauen unabhängig vom kalendarischen Alter, vaskulären Parametern oder der Haut-AF. Jedoch zeigten Frauen eine höhere Plasma-Ratio an NAD^+/NADH als Männer, die sich mit zunehmendem Alter - insbesondere der altersabhängigen PWG und Haut-AF - angleich. Die Renalase konnte im Plasma nicht ermittelt werden, da sich bisher angewandte Messverfahren als fehlerhaft erwiesen.

Fazit: Das kalendarische Alter ist ein besserer Indikator des Gefäßalters in einer Normalkohorte als die Haut-AF, die als indirekter Parameter von Gefäßalterung und kardiovaskulärem Risiko bestimmt wird. Der Gehalt an NAD sowie NAD^+/NADH im Blutplasma sind keine Prädiktoren des kalendarischen und vaskulären Alters.

Schwarzmann, Luisa: Nikotinamidadenindinukleotid-Blutplasmawerte sind unabhängig vom kalendarischen und vaskulären Alter in einer Normalkohorte aus der Region Halle-Saalekreis, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 54 Seiten, 2020

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Bluthochdruck und Elastizitätsverlust der Blutgefäße	1
1.1.1 Allgemein	1
1.1.2 Methoden zur Bestimmung einer Gefäßerkrankung	3
1.1.3 Gefäßalterung	5
1.2 <i>Advanced glycation end products</i>	8
1.3 Renalase	9
1.4 Nikotinamidadenindinukleotid	10
1.4.1 Bildung und intrazelluläre Wirkung	11
1.4.2 Freisetzung und extrazelluläre Wirkung	12
1.4.3 NAD und Altern	13
1.4.4 NAD-Messmethodik	14
2 Zielstellung	15
3 Material und Methodik	15
3.1 Materialien	15
3.1.1 Geräte	15
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3 Lösungen und Kits	16
3.1.4 Auswertungssoftwares	17
3.2 Methodik	17
3.2.1 Probandenaufnahme und -untersuchungen	17
3.2.2 Renalase-Messung	19
3.2.3 NAD-Messung	20
3.2.4 Auswertung	21
4 Ergebnisse	22
4.1 Studienpopulation	22
4.1.1 Mittlere Geschlechtsunterschiede	22

4.1.2 Altersabhängigkeit	23
4.2 Renalase im humanen Plasma	24
4.3 Extrazelluläres NAD	25
4.3.1 Etablierung der enzymatischen Bestimmung von extrazellulärem NAD	25
4.3.2 NAD-Gehalt im humanen Plasma	26
5 Diskussion	32
5.1 Geschlechtsunterschiede und Gefäßalter	32
5.2 Renalase	33
5.3 Plasma-NAD	34
5.3.1 Plasma-NAD und Altern	37
5.3.2 Plasma-NAD und Geschlecht	37
6 Zusammenfassung	39
7 Literaturverzeichnis	40
8 Thesen	50
9 Anlagen	51
Erklärungen	
Lebenslauf	
Danksagungen	

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AGEs	<i>advanced glycation end products</i>
bf	Brachial-femoral
BMI	<i>body mass index</i>
Ca ²⁺	Kalzium-Ion
CD38	<i>cluster of differentiation 38, cyclic ADP ribose hydrolase 1</i>
CD157	<i>cyclic ADP ribose hydrolase 2</i>
cf	Carotid-femoral
CRP	C-reaktives Protein
Cx43	Connexin-43, <i>Gap junction α-1 protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Haut-AF	Autofluoreszenz der Haut
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
KDIGO	<i>Kidney Diseases: Improving Global Outcomes</i>
K ₃ EDTA, K3E	Tri-Kalium-Ethylendiamintetraacetat
Li-Heparin	Lithium-Heparin
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid unabhängig vom Redoxstatus
NAD ⁺	Oxidierter Form von NAD
NADH	Reduzierter Form von NAD
NADP ⁺	Oxidierter Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Reduzierter Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NAMPT	Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
³¹ P MRS	³¹ P-Magnetresonanzspektroskopie
PWG	Pulswellengeschwindigkeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RR	Blutdruckmessung nach Riva-Rocci
RR _d	Diastolischer Blutdruck
RR _s	Systolischer Blutdruck
SARM1	<i>sterile α and TIR motif-containing 1 protein</i>
SEVR	<i>subendocardial viability ratio</i>

1 Einleitung

1.1 Bluthochdruck und Elastizitätsverlust der Blutgefäße

1.1.1 Allgemein

Blutgefäße bestehen aus drei Schichten, die als Intima, Media und Adventitia bezeichnet werden. Die Intima besteht aus dem Endothel, der von den Endothelzellen gebildeten zellarmen, subendothelialen Schicht und der *Membrana elastica interna*. Das Endothel ist eine einschichtige Grenzbarriere für den Blutstrom, die zusätzlich wichtige Botenstoffe (z.B. Zytokine, Chemokine, Endothelin, Stickstoffmonoxid) zur Gefäßhomöostase bildet (Lüllmann-Rauch, 2012). Durch seine negative Ladung ist das Endothel selektiv permeabel, was v.a. für die glomeruläre Filtration in der Niere wichtig ist. Die subendotheliale Schicht besteht hauptsächlich aus Extrazellulärmatrix, der Kollagen und elastische Fasern angehören. Glatte Muskelzellen und Kollagene sind primäre Bestandteile der Media, an die die *Membrana elastica externa* der Adventitia angrenzt. Die Media enthält in herznahen Bereichen elastisches Bindegewebe und in peripheren Bereichen zunehmend glatte Muskulatur. Die Adventitia enthält u.a. Fibroblasten, welche primär die Bindegewebsfasern der Gefäße ausbilden. Zu den weiteren Zelltypen der Adventitia zählen u.a. dendritische Zellen und Makrophagen zur Immunabwehr. Die Adventitia ist innerviert und verfügt in größeren Gefäßen über eine eigene Gefäßversorgung (Lüllmann-Rauch, 2012; Stenmark *et al.*, 2013).

Abhängig von der Art des Blutgefäßes (herznahe oder herzferne Arterien, Venen, Kapillaren oder Venolen) sind die drei Schichten unterschiedlich stark ausgeprägt. Die *Elastica interna* und die *Elastica externa* sind Membranen aus elastischen Fasern, die, neben dem Muskeltonus, die Gefäßelastizität eines Blutgefäßes entscheidend bestimmen und einen Einfluss auf den Blutdruck haben. Alle drei Schichten der Blutgefäße unterliegen Altersveränderungen (Guzik und Touyz, 2017), welche die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen begünstigen. Funktionell führt dies mit zunehmendem Alter vor allem zur Abnahme der Gefäßelastizität und Veränderung des Drucks in den Blutgefäßen (Guzik und Touyz, 2017).

Der gemessene Blutdruck bezieht sich üblicherweise auf den Druck in den großen arteriellen Gefäßen und wird in einen systolischen und einen diastolischen Wert unterteilt. Der systolische Blutdruck ergibt sich aus der maximalen Herzkontraktion und wird zu Beginn der Herzaustreibungsphase gemessen (Silbernagl und Despopoulos, 2012). Der diastolische Blutdruck hängt von der Vorlast des Herzens und dem peripheren Gefäßwiderstand ab und ist der Minimaldruck, der während der Herzfüllung gemessen wird. Die Abnahme der Gefäßelastizität hat Einfluss auf beide Blutdrücke

(Greenwald, 2007). Durch sie erhöht sich die Geschwindigkeit, mit der die Druckwelle des Blutes, die während der Herzkontraktion generiert wird, das arterielle Gefäßsystem durchläuft. Folglich wird die Reflektion dieser Pulswelle in der Gefäßperipherie begünstigt, wodurch eine Erhöhung des systolischen und eine Erniedrigung des diastolischen Blutdruckes auftritt (Briet *et al.*, 2012).

Neben der Gefäßelastizität gibt es weitere, körpereigene Mechanismen, welche den Blutdruck regulieren. Zu den langsamen Regulatoren zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das Vasopressin (ADH) und das natriuretische Peptid (ANP). Sie wirken auf den Salz- und Wasserhaushalt ein. Zu den schnellen Regulatoren gehören die Katecholamine, die als Folge der Aktivierung von Barorezeptoren aus ihren Bildungsorten in den Nebennieren und im ZNS in die Blutbahn ausgeschüttet werden und den Zelltonus der glatten Gefäßmuskulatur regulieren (Paquet und Savic, 1978).

Mit zunehmendem Alter verändert sich besonders der systolische Blutdruck, welcher ansteigt und so zum Krankheitsbild des Bluthochdrucks führt (Franklin *et al.*, 1997). Daneben hat das Alter auch einen Einfluss auf den diastolischen Blutdruck, der im hohen Alter häufig abnimmt (Franklin *et al.*, 1997). Dies führt zu einer Zunahme des Pulsdrucks, also der Differenz zwischen diastolischem und systolischem Blutdruck (Franklin *et al.*, 1997). Bei erhöhtem Blutdruck spricht man klinisch von einer arteriellen Hypertonie, Hypertonus oder Hypertension. In den meisten Fällen ist die genaue Ätiologie nicht klar abgrenzbar, weshalb die überwiegende Zahl der Betroffenen dem sogenannten essentiellen Bluthochdruck zugeordnet wird (Schaps *et al.*, 2007). Zum einen kommen hier genetische Faktoren zum Tragen, zum anderen auch Risikofaktoren, die die individuelle Lebensführung betreffen. Zu diesen zählen Übergewicht, Bewegungsmangel, Stress, Salzüberschuss, Rauchen und Alkoholkonsum. Dem gegenüber steht ein kleiner Anteil Erkrankter, die dem sekundären Bluthochdruck zugerechnet werden. Diesem liegt in der Regel eine nephrologische oder eine vaskuläre Erkrankung zu Grunde (Schaps *et al.*, 2007).

Verminderte Gefäßelastizität und Bluthochdruck steigern das Risiko für Arteriosklerose, eine Erkrankung, bei der die Intima und die Media der zumeist großen Arterien sklerotisch verändert sind (Lusis, 2000). Es kommt zur Plaquebildung innerhalb der Intima, die zur Gefäßverengung (Stenose) und bei Ablösung eines Thrombus bis zum Gefäßverschluss führen kann (Lusis, 2000; Stocker und Keaney, 2004). Das Risiko, als Folgeerkrankung der Arteriosklerose eine koronare Herzerkrankung, eine periphere arterielle Verschlusskrankheit, einen Herzinfarkt, einen Schlaganfall oder eine Herzhypertrophie zu entwickeln, steigt ebenfalls an, da das Herz in der Systole gegen

eine erhöhte Nachlast arbeiten muss, wohingegen die Koronarperfusion in der Diastole verringert ist (Stern *et al.*, 2003).

Der Bluthochdruck erschwert auch die Filtrationsfunktion der Niere, sodass eine Niereninsuffizienz entstehen kann (Sternlicht und Bakris, 2017). Aus diesem Grund sollte er frühzeitig behandelt werden, wobei beim essentiellen Bluthochdruck zunächst nichtmedikamentöse Behandlungskonzepte (Gewichtsreduktion durch Diät und gesteigerte körperliche Aktivität, Nikotin- und Alkoholentwöhnung, reduzierte Salzaufnahme, Stressbewältigung) herangezogen werden (Whelton *et al.*, 2017). Greifen diese Methoden nicht mehr oder liegt ein sekundärer Bluthochdruck vor, werden Medikamente zur Behandlung eingesetzt (Whelton *et al.*, 2017). Dazu zählen in erster Linie Betablocker, die den Sympathikotonus und somit die Gefäßspannung senken, Diuretika, die das Blutvolumen durch gesteigerte Flüssigkeitsausscheidung über die Niere senken, Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (sog. ACE-Hemmer) oder des Angiotensin-Rezeptors 1 (sog. AT1-Rezeptorblocker), die das RAAS inhibieren, sowie Kalziumantagonisten, die eine Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur in den Arterien bewirken (Graefe *et al.*, 2011). Abgesehen von den Betablockern werden die o.g. Medikamente auch in Kombination eingesetzt. In Bezug auf die Nebenwirkungen erwies sich dieses Vorgehen als bessere Maßnahme als eine Dosissteigerung bei Monotherapie (Graefe *et al.*, 2011).

1.1.2 Methoden zur Bestimmung einer Gefäßerkrankung

Hoher Blutdruck ist das einfachste messbare Symptom einer Gefäßerkrankung. Obwohl es direkte katheterbasierte invasive Verfahren zur Erfassung des arteriellen Blutdrucks gibt (Perloff *et al.*, 1993; Schaps *et al.*, 2007), wird dieser in der Routine indirekt durch die nicht-invasive Methode nach Riva-Rocci (RR) und Korotkoff erfasst (Perloff *et al.*, 1993; Eckert, 2006). In der Fachliteratur steht daher die Abkürzung RR auch für den indirekt gemessenen Blutdruck. Dieser wird mit Hilfe von Armmanschette und Stethoskop manuell erfasst. Mittlerweile hat sich die elektronische Messung durchgesetzt (Eckert, 2006). Diese ist weniger abhängig von der Messperson und kann zudem vom Patienten selbst vorgenommen werden. Bei den elektronischen Messgeräten wird zwischen Oberarm- und Handgelenksgeräten unterschieden, wobei besonders bei den Handgelenksmessgeräten darauf zu achten ist, dass die Manschette während der Messung auf Herzhöhe gehalten wird.

Neben der Blutdruckmessung werden in der Praxis Gefäßwandveränderungen und damit verbundene Elastizitätsverluste der Arterienwände auch morphologisch mittels hochauflösender Ultrasonographie nicht-invasiv bestimmt (Marcus *et al.*, 1994). Diese

beurteilt die Gefäßelastizität durch Messung der Verdickung von Intima und Media. So ist z.B. die *Arteria carotis* ab einer Intima-Media-Dickenzunahme über 80 µm pathologisch vergrößert (Naylor *et al.*, 2018).

Ein ebenfalls geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Gefäßelastizität ist die nicht-invasive Messung der Pulswellengeschwindigkeit (Horváth *et al.*, 2010; AlGhatrif *et al.*, 2013), die als PWG abgekürzt wird. Die Berechnung der PWG erfolgt auf der Basis der Pulswellenmessung durch einen Druckpulsometer an zwei definierten Punkten einer Gefäßstrecke. Dabei wird der Zeitverzug des Eintreffens der Pulswelle an diesen definierten Punkten erfasst und durch Messung der Strecke zwischen den Punkten die Geschwindigkeit berechnet. Die PWG ist umgekehrt proportional zur Gefäßelastizität und sollte für die Strecke zwischen *Arteria carotis* und *Arteria femoralis* unter 10 m/s liegen (Mancia *et al.*, 2013). Da die PWG vom Gefäßlumen abhängt, wird sie immer für zwei definierte Gefäße angegeben. Der Einfluss der verminderten Gefäßelastizität auf die PWG und den Pulsdruck ist schematisch in **Abbildung 1** dargestellt. Anhand der Pulswellenreflektion können auch die *subendocardial viability ratio* (SEVR) sowie der Augmentationsdruck und -index bestimmt werden (Debowska *et al.*, 2018). Die SEVR gibt Aufschluss über die myokardiale Mikrozirkulation (Debowska *et al.*, 2018). Ist die SEVR vermindert, ist der Bedarf an Sauerstoff im Herzmuskel nicht gedeckt (Amah *et al.*, 2017). Folglich können mit Hilfe der SEVR indirekt Aussagen über die Herzleistung getroffen werden. Der Augmentationsdruck dagegen ergibt sich aus der Differenz der gemessenen Druckunterschiede zwischen dem Blutausschuss in die Aorta und der Reflektion in den großen Arterien. Normalwerte für den Augmentationsdruck liegen für Männer zwischen 8 und 30 mmHg und für Frauen zwischen 15 und 32 mmHg (Gomez-Sanchez *et al.*, 2015). Je kleiner der Augmentationsdruck ist, desto elastischer ist das vorliegende Gefäß (**Abb. 1**).

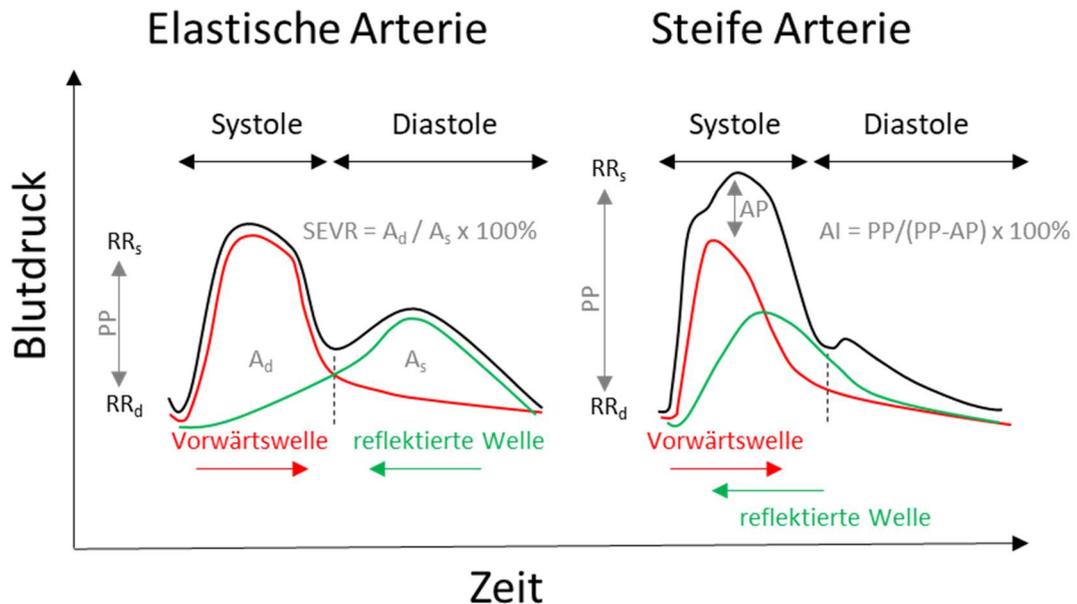


Abb. 1 Schematische Darstellung zum Einfluss der Gefäßelastizität auf die Pulswelle und die daraus errechneten Parameter; modifiziert nach Zanoli *et al.* (2015) und Poleszczuk *et al.* (2018). A_d , diastolic area; A_s , systolic area; AI, Augmentationsindex; AP, Augmentationsdruck; P, Puls; PP, Pulsdruck; RR_s , systolischer Blutdruck (Riva-Rocci); RR_d , diastolischer Blutdruck (Riva-Rocci); SEVR, subendocardial viability ratio

1.1.3 Gefäßalterung

Eine arterielle Hypertonie liegt, trotz vielfältiger Behandlungsmöglichkeiten, in der Bundesrepublik Deutschland überdurchschnittlich häufig im Bundesland Sachsen-Anhalt vor (Stang und Stang, 2014).

Nach Bundesländern getrennte Messdaten zur Gefäßelastizität sind nicht verfügbar. Wegen der überdurchschnittlich hohen Blutdrücke liegt möglicherweise auch die Gefäßelastizität in der Bevölkerung Sachsen-Anhalts überproportional häufig außerhalb der Norm.

Einhergehend mit der Hypertonieproblematik ist in Sachsen-Anhalt im Bundesländervergleich auch das Risiko, kardiovaskulären Erkrankungen im Allgemeinen zu erleiden, besonders hoch (**Abb. 2**). Gründe dafür sind im bundesweiten Vergleich häufiger auftretende kardiovaskuläre Risikofaktoren, wie z.B. Adipositas, ungünstige Körperfettverteilung, Rauchen, Diabetes mellitus, Depressionen, körperliche Inaktivität. Sie treten häufig zusammen mit geringer Bildung und niedrigem sozialen Status auf (Stang und Stang, 2014). Ein weiterer Einflussfaktor ist das Alter, denn Sachsen-Anhalt hat mit durchschnittlich 45,9 Jahren die älteste Bevölkerung in ganz Deutschland (Stand 2008; Stang und Stang, 2014). Da kardiovaskuläre Erkrankungen laut statistischem Bundesamt die häufigste Todesursache darstellen (Statistisches

Bundesamt (Destatis), 2017), spielt die Prävention und Aufklärung der Ätiologie dieser Erkrankungen eine wichtige Rolle.

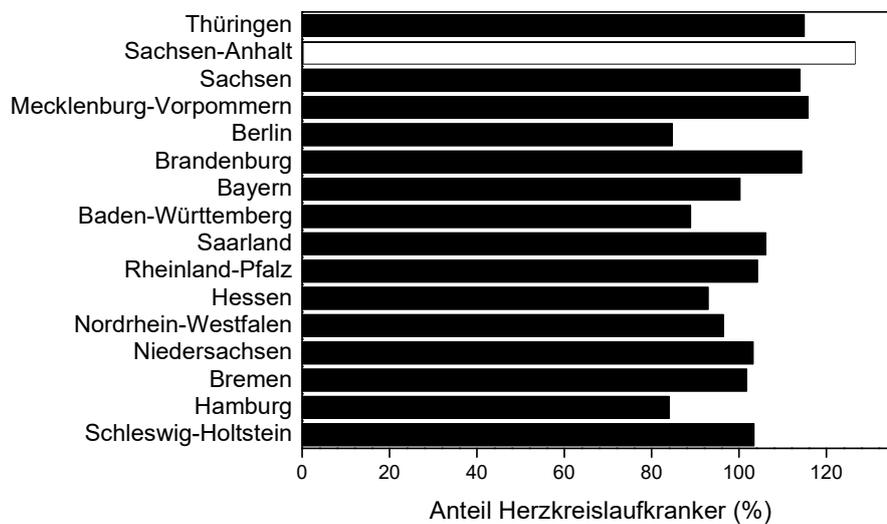


Abb. 2 Anteil Herz-Kreislaufkranker in der Bundesrepublik Deutschland in Abhängigkeit vom Bundesland. Sachsen-Anhalt ist weiß hervorgehoben. Modifizierte Darstellung nach den Daten von Stang und Stang, 2014.

Doch was sind zelluläre und morphologische Veränderungen, die die Gefäßelastizität vermindern und zum Bluthochdruck führen?

Die Alterung der Gefäße stellt ein multifaktorielles Geschehen dar. Zu den zellulären Veränderungen zählt die endotheliale Dysfunktion. Unter normalen Bedingungen reguliert das Endothel den Gefäßtonus mit Hilfe von Mediatoren, die eine Vasokonstriktion oder Vasodilatation bewirken (Xu *et al.*, 2017). Stickstoffmonoxid (NO) ist ein starker Vasodilatator, der bei der endothelialen Dysfunktion vermindert vorliegt (Zieman *et al.*, 2005). Ein Grund dafür ist die reduzierte Bildung von NO durch Inhibierung der NO-Synthase durch das C-reaktive Protein (CRP; Jialal *et al.*, 2009; Mikael *et al.*, 2017), welches infolge inflammatorischer Prozesse vermehrt vorliegt (Wilkinson *et al.*, 2002; Tsioufis *et al.*, 2007; Abdul-Salam *et al.*, 2010). Gleichzeitig wird NO durch die gesteigerten CRP-Level vermehrt abgebaut (Mikael *et al.*, 2017). Die Zunahme an proinflammatorischen Faktoren ist auch mit der Zunahme an *reactive oxygen species* (ROS) und der erhöhten Stimulation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor-κB* (NF-κB) verbunden (Donato *et al.*, 2009; Scioli *et al.*, 2014). ROS haben mehrere degenerative Wirkungen auf das Gefäßsystem (Guzik und Touyz, 2017) und in diesem Zusammenhang auch auf NO (u.a. verminderte Expression der NO-Synthase, Inaktivierung von bereits gebildetem NO), während NF-κB die Apoptose der Endothelzellen fördert (Xu *et al.*, 2017). Als weitere Veränderung ist im Rahmen der endothelialen Dysfunktion und der damit verbundenen inflammatorischen Prozesse

auch die Permeabilität der Endothelschicht für Plasmaproteine erhöht (Zieman *et al.*, 2005). Zu den Plasmaproteinen gehören z.B. Lipoproteine, die eine Anlagerung von Fett (*fatty streaks*) in der Intima fördern (Stocker und Keaney, 2004). Unter normalen Bedingungen verhindert die Endothelschicht die Adhäsion von Blutzellen. Durch gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen bei der endothelialen Dysfunktion wird eine vermehrte Anlagerung von Leukozyten an der Gefäßwand beobachtet (Stocker und Keaney, 2004). In der Folge dieser Veränderungen kann es zur weiter oben beschriebenen Gefäßverengung kommen. Deshalb wird die endotheliale Dysfunktion häufig als Vorstufe der Arteriosklerose gesehen (Stocker und Keaney, 2004). Eine weitere zelluläre Veränderung ist die Zunahme der glatten Gefäßmuskelzellen in der Media, sowie ihre Proliferation in die Intima (Xu *et al.*, 2017). Damit zusammenhängend tritt eine gesteigerte G-Protein-vermittelte Signalwirkung mit nachfolgender Zunahme des Gefäßtonus auf (Wirth *et al.*, 2016).

Zusätzlich zu den zellulären Veränderungen in alternden Gefäßen kommt es zum Umbau der extrazellulären Matrix. So nimmt der Anteil elastischer Fasern innerhalb der Gefäßwand ab und der an kollagenem Bindegewebe zu, was letztlich zu einer Dickenzunahme von Intima und Media führt (Zieman *et al.*, 2005; Mikael *et al.*, 2017). Sowohl das Kollagen als auch das Elastin in Intima und Media werden durch Einlagerungen von *advanced glycation end products* (AGEs; s. 1.2) steifer (Zieman *et al.*, 2005). Dieser altersbedingte Umbau der extrazellulären Matrix wird vor allem in den großen Arterien beobachtet und fördert neben Bluthochdruck die Entstehung und das Fortschreiten von Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose und Aneurysma (Cocciolone *et al.*, 2018). Neben der Intima und Media wird auch in der Adventitia vermehrt Kollagen gebildet (Zieman *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2017). Dazu kommt, dass Adventitia-nahe/ -ständige Adipozyten bei erhöhtem Blutdruck weniger Adiponektin bilden (Peri-Okonny *et al.*, 2017). Da Adiponektin zusammen mit anderen Adipokinen die Glukoseaufnahme und Fettsäureoxidation fördert (El Husseny *et al.*, 2017), wird hier auch eine Verbindung zwischen Gefäßveränderungen und Stoffwechselerkrankungen (Diabetes mellitus, Adipositas) im Alter gesehen (Villarreal-Molina und Antuna-Puente, 2012).

Der Prozess der Gefäßalterung ist allerdings nicht bei allen Menschen gleich und scheint zudem vom Geschlecht abzuhängen. Insbesondere Geschlechterunterschiede in den hormonellen Faktoren wie dem Östrogen werden als Ursache angenommen (Mozos *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Frauen erst ab dem postmenopausalen Alter und damit später als Männer eine Hypertonie entwickeln (Doumas *et al.*, 2013). Das Substituieren von Östrogen bei Frauen im postmenopausalen Alter hatte jedoch keinen Schutzeffekt, wie zunächst angenommen

wurde (Hulley *et al.*, 1998). Vielmehr scheinen Veränderungen im Endothelin-System wichtige Gründe für das verminderte kardiovaskuläre Risiko von Frauen zu sein (Gohar und Pollock, 2018). Zusätzlich war auch unter Rauchern die Gefäßalterung bei Männern stärker als bei Frauen ausgeprägt (Mozos *et al.*, 2017).

1.2 Advanced glycation end products

Die elastischen Fasern alternder Gefäße sind nicht nur durch quantitative (1.1.3), sondern auch durch qualitative Veränderungen wie Oxidation durch ROS und enzymatische Fragmentierung gekennzeichnet (Duca *et al.*, 2016). Hauptbestandteil der elastischen Fasern ist das Elastin. Aufgrund seiner hohen Halbwertszeit von 70 Jahren (Moore und Thibeault, 2012) sind chemische Veränderungen am Elastin im Laufe eines Lebens relativ wahrscheinlich. Unter diesen Veränderungen spielt die Elastinmodifikation durch fortgeschrittene Glykierungsendprodukte, die allgemein AGEs genannt werden, eine wichtige Rolle (Greenwald, 2007). Einige dieser AGEs können Elastinmoleküle irreversibel quervernetzen und tragen so zur Abnahme der Elastizität der elastischen Fasern bei. AGEs am Elastin und andere intra- und extrazelluläre Moleküle entstehen primär als Folge der nicht-enzymatischen Reaktion der Aminosäuren Arginin und Lysin mit reaktiven Carbonylen (z.B. Glyoxal, Methylglyoxal), die Metabolite des Glukose-, aber auch des Fettsäurestoffwechsels sind (Thornalley, 2008). Die Gegenwart von ROS trägt zusätzlich zur AGE-Bildung bei (Marques *et al.*, 2017). Einige AGEs weisen fluoreszierende Eigenschaften auf, was man sich bei ihrer Quantifizierung in biologischen Proben zu Nutze macht. In diesem Zusammenhang hat sich die nicht-invasive Messung der AGEs in der Haut mittels eines AGE Readers der Firma Diagnostics Technologies B.V. etabliert (Mulder *et al.*, 2006). Bei dieser Messmethode wird die Autofluoreszenz der Haut (Haut-AF) durch eine Lichtquelle mit 300 - 420 nm Wellenlänge angeregt und die fluoreszierenden AGEs durch einen Detektor bei 420 - 600 nm erfasst. Die Bestimmung der Haut-AF wird oft als Parameter für die Beurteilung des biologischen Alters sowie des kardiovaskulären Risikos herangezogen. So steigt mit zunehmendem Alter die Haut-AF hochsignifikant an (Hofmann *et al.*, 2013; van Waateringe *et al.*, 2016). Auch haben Patienten mit Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz, die allgemein ein sehr hohes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben, eine besonders hohe Haut-AF (Rigalleau *et al.*, 2015).

Obwohl die Haut-AF nicht notwendigerweise mit dem AGE-Gehalt in den elastischen Fasern der Gefäße zusammenhängen muss, haben vorangegangene Arbeiten an der hiesigen Klinik gezeigt, dass es bei herzkranken Patienten eine positive Korrelation

zwischen der Haut-AF, dem Gehalt an fluoreszierenden AGEs in der Extrazellulärmatrix (Kollagene) von Gefäßen und der PWG gibt (Hofmann *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 2015).

1.3 Renalase

Der Blutdruck wird durch eine Reihe von kurz- und langfristig wirkenden Mechanismen reguliert (1.1), die seit langem bekannt sind. Weniger bekannt ist dagegen die blutdruckregulierende Wirkung der Renalase. Obwohl zunächst als Nieren-spezifisches Protein entdeckt, wird die Renalase auch von anderen Organen exprimiert und ins Plasma sezerniert (Xu *et al.*, 2005). Durch Injektion von rekombinanter Renalase, aber auch durch Studien an Renalase *knockout*-Mäusen, konnte eine blutdrucksenkende Wirkung durch die Renalase festgestellt werden (Desir, 2012). Als zugrundeliegender Mechanismus wurde zunächst der Abbau von Katecholamin durch die Renalase beschrieben (Li *et al.*, 2008). Allerdings gibt es weitere Theorien, da sich die Renalase später als Oxidase für Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und -phosphat (NADPH) erwiesen hat (Milani *et al.*, 2011; Beaupre *et al.*, 2013a; Moran, 2015). In diesem Zusammenhang soll Renalase auf der Oberfläche von Endothelzellen NADPH oxidieren können und damit eine Dilatation der Blutgefäße bewirken (Beaupre *et al.*, 2013b). Obwohl die blutdrucksenkende Wirkung der Renalase im tierexperimentellen Modell offensichtlich ist (Wu *et al.*, 2011), zeigen Humanstudien an gesunden Probanden keine eindeutige Korrelation zwischen Blutdruck und dem Renalase-Gehalt im Plasma oder Serum (**Tab. 1**). Auch weichen die ermittelten Renalase-Gehalte im Blut stark voneinander ab (**Tab. 1**), obwohl alle Studien den Renalase-Gehalt mit dem identischen Assay der Firma Wuhan USCN Business Corp. (jetzt *Cloud-Clone Corp.*) bestimmt haben. Zudem wurden fast alle Studien an Patienten mit verschiedenen Grunderkrankungen durchgeführt (**Tab. 1**). Studien, die an gesunden Probanden den Renalase-Gehalt im Blut in Abhängigkeit von Alter und Blutdruck untersucht haben, fehlen dagegen.

Tab. 1 Blutgehalt an Renalase (ng/ml) von gesunden Probanden und Abhängigkeit des Renalasegehaltes zum Blutdruck in bisherigen humanen Studien.

Proben	Gesunde ^a	Patienten mit				Abhängigkeit zum Blutdruck	Referenz
		Bluthochdruck	andere Herz-Kreislauf-erkrankungen	Niereninsuffizienz	Diabetes		
Plasma	13160			x	x	n.d.	Stec, 2017
Plasma	3720	x				keine	Wang <i>et al.</i> , 2016
Plasma	16	x		x	x	positiv	Stojanovic <i>et al.</i> , 2015
Plasma	8564	x				negativ	Wybraniec <i>et al.</i> , 2014
Plasma	0,12		x			n.d.	He <i>et al.</i> , 2014
Serum	112	x	x	x	x	positiv	Gok Oguz <i>et al.</i> , 2017
Serum	27			x		positiv	Skrzypczyk <i>et al.</i> , 2017
Serum	135000					n.d.	Yoshida <i>et al.</i> , 2017
Serum	116	x	x	x	x	positiv	Oguz <i>et al.</i> , 2016
Serum	39800			x		positiv	Qi <i>et al.</i> , 2015
Serum	3980	x		x		positiv	Malyszko <i>et al.</i> , 2015
Serum	3950	x		x		positiv	Maciorkowska <i>et al.</i> , 2015
Serum	3860	x	x	x		n.d.	Przybylowski <i>et al.</i> , 2013
Serum	4000	x		x	x	keine	Koc-Zorawska <i>et al.</i> , 2012
Serum	3860	x		x		keine	Zbroch <i>et al.</i> , 2012

^a Konzentrationen sind mittlere Angaben der gesunden Probanden
n.d., nicht definiert; x, Probanden der Studie mit Vorerkrankungen

1.4 Nikotinamidadenindinukleotid

Die Renalase ist vermutlich eine extrazelluläre Oxidase, die NADH zu NAD⁺ bzw. NADPH zu NADP⁺ oxidiert (Milani *et al.*, 2011; Beaupre *et al.*, 2013a; Moran, 2015). NAD besteht aus Nikotinamid (Pyridinring mit einer Amidgruppe am C2-Atom), Ribose und Adenosindiphosphat (ADP; **Abb. 3**). Erstmal entdeckt wurde das NAD-Molekül 1906 von Harden und Young. In den darauffolgenden Jahren, bis in die heutige Zeit, wurden Bildung und Funktion von NAD erforscht (Cantó und Auwerx, 2011).

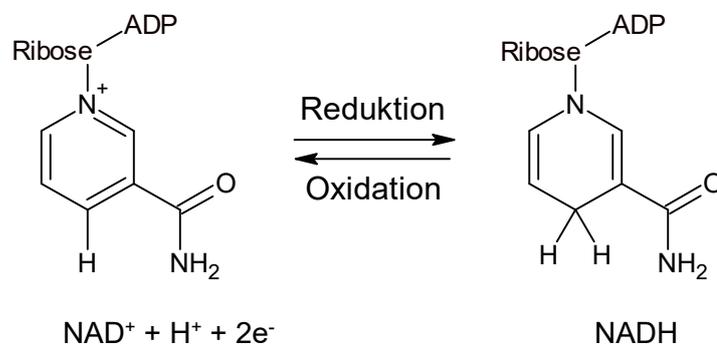


Abb. 3 Vereinfachte Strukturformel von NAD in seiner oxidierten und reduzierten Form; modifiziert nach Pehar *et al.*, 2018. ADP, Adenosindiphosphat; e⁻, Elektron; NAD⁺, oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid; NADH, reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid

1.4.1 Bildung und intrazelluläre Wirkung

Die Bildung von NAD⁺ erfolgt auf drei unterschiedlichen Wegen. Zum einen kann NAD⁺ auf Grundlage des Kynurein-Stoffwechsels *de novo* aus L-Tryptophan gebildet werden (Xiao *et al.*, 2018). Dieser Syntheseweg spielt eine untergeordnete Rolle für den Großteil des vom Körper benötigten NAD⁺, da sich die meisten zugehörigen Enzyme ausschließlich in der Leber befinden (Okabe *et al.*, 2019). Über den Preiss-Handler Stoffwechselweg wird NAD⁺ aus seinen Vorstufen Nicotinsäure (Niacin) bzw. Nicotinsäure-Ribose gebildet (Okabe *et al.*, 2019). Der letzte und gleichzeitig vorherrschende Stoffwechselweg ist der Salvage Weg, bei dem Nicotinamid zur NAD⁺-Synthese dient (Okabe *et al.*, 2019). Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) im Salvage Weg wird v.a. im Knochenmark, in der Leber und in Muskeln exprimiert (Xiao *et al.*, 2018), kann aber auch extrazellulär lokalisiert sein (Friebe *et al.*, 2011). Niacin und die weiter oben genannten Vorstufen gehören zum Vitamin B₃-Komplex (Belenky *et al.*, 2007). Sie werden u.a. über fleischhaltige Ernährung und Milchprodukte aufgenommen oder können in Tablettenform als Nahrungsergänzungsmittel dem Körper zugeführt werden (Belenky *et al.*, 2007; Okabe *et al.*, 2019). Zusätzlich kann über körperliche Aktivität oder Diät das Verhältnis von NAD⁺ zu NADH in Richtung NAD⁺ verschoben werden (Connell *et al.*, 2019). Die intrazelluläre Wirkung von NAD entfaltet sich hauptsächlich im katabolen Stoffwechsel (**Abb. 4**). Dort wird NAD⁺ reversibel an ein Enzym gebunden, nimmt ein H⁺-Ion und zwei Elektronen auf und wird als reduziertes NADH wieder abgegeben (Stein und Imai, 2012). So ist es z.B. an der Oxidation der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase im Rahmen der Glykolyse beteiligt (Stein und Imai, 2012). Auch im mitochondrialen Citratzyklus und in der Atmungskette trägt es als Coenzym zur Energiegewinnung der Zelle bei, während NADH in der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette unter Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) wieder zurück oxidiert wird (Stein und Imai, 2012; Xiao *et al.*, 2018).

Einige Enzyme nutzen NAD⁺ auch als Cosubstrat. Sie spalten NAD⁺ in Nicotinamid und ADP-Ribose (Belenky *et al.*, 2007; Imai und Guarente, 2014; Nikiforov *et al.*, 2015). Dazu zählt z.B. Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP-1), die zur DNA-Reparatur dient (Imai und Guarente, 2014). Auch Sirtuine (1.4.3) gehören zu den NAD⁺-abhängigen Enzymen (Imai und Guarente, 2014). Zudem gibt es *sterile α and TIR motif-containing 1 protein* (SARM1), eine NADase, die mitochondriales NAD⁺ im Zusammenhang mit der Degeneration von Axonen abbaut (Gerdtts *et al.*, 2015; Hikosaka *et al.*, 2019).

1.4.2 Freisetzung und extrazelluläre Wirkung

Die zelluläre Freisetzung von NAD⁺ in den Extrazellularraum erfolgt über Connexin-43-(Cx43)-Kanäle (Billington *et al.*, 2006), die besonders stark in Gehirn und Herz exprimiert werden (Mühlfeld *et al.*, 2010). Außerdem kann NAD⁺ auch während nervaler Stimulation aus verschiedenen glatten Muskelzellen sezerniert werden (Alefisat *et al.*, 2015). Eine Möglichkeit wie sowohl NADH als auch NAD⁺ ins Blut abgegeben werden, ist ihre Freisetzung während der Zellyse.

Die *cyclic ADP ribose hydrolase 1* (CD38) ist ein Ektoenzym, d.h. sie liegt zellmembrangebunden vor und übt eine extrazelluläre Wirkung aus (Belenky *et al.*, 2007). Sie wird hauptsächlich in lymphatischem Gewebe exprimiert (Malavasi *et al.*, 2008). Zusammen mit der *cyclic ADP ribose hydrolase 2* (CD157) reguliert CD38, als extrazelluläre NADase, über die aus der Reaktion mit NAD gewonnene ADP-Ribose den intrazellulären Kalzium (Ca²⁺)-Stoffwechsel (Belenky *et al.*, 2007; Malavasi *et al.*, 2008). Das Ca²⁺ wiederum hat als Signalmolekül Einfluss auf weitere Stoffwechselwege, wie Immunantwort, Muskelaktivität, Zellproliferation und Hormonsekretion (Malavasi *et al.*, 2008). Im Tierversuch konnte extrazelluläres NAD⁺ und NADH über purinerge Rezeptoren eine Veränderung des Gefäßtonus in unterschiedlichen Spezies bewirken (Burnstock, 2007; Alefishat *et al.*, 2015). Diese Entdeckung zeigt, dass eine kardiovaskuläre Wirkung im Zusammenhang mit NAD möglich ist. Zur Familie der purinergen Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind, gehören die P1, P2X und die P2Y-Rezeptoren (Alefisat *et al.*, 2015). Sowohl durch Aktivierung von P2X, als auch durch P2Y wurde in Gegenwart von NAD⁺ eine intrazelluläre Erhöhung des Ca²⁺ festgestellt (Grahner *et al.*, 2009; Klein *et al.*, 2009). Für P2X wird vermutet, dass es über ATP-abhängige Ionenkanäle, die auch von extrazellulärem NAD geöffnet werden können, wirkt (Grahner *et al.*, 2009). P1 und P2Y hingegen sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Rossi *et al.*, 2012). Ebenso wie CD38 liegen P2Y-Rezeptoren vorwiegend in immunmodulatorischem Gewebe vor (Rossi *et al.*, 2012), weshalb NAD möglicherweise auch eine entscheidende Rolle bei Immunreaktionen spielt (Umapathy *et al.*, 2010).

Inwiefern im extrazellulären Bereich gebildetes NADH wieder zu NAD⁺ oxidiert werden kann, ist nicht erforscht (**Abb. 4**). Theoretisch kämen dafür extrazellulärständige NADH-Oxidasen in Frage, zu denen neben den *ecto-nicotinamide dinucleotide oxidase disulfide thiol exchanger 1* und 2 als membranständige Enzyme (Bosneaga *et al.*, 2008) auch die Renalase als lösliches Enzym (Severina *et al.*, 2015) gehören könnte (**Abb. 4**). Auch kann die bereits erwähnte extrazelluläre NAMPT, die auch als Visfatin - da in Adipozyten gebildet - bekannt ist, neue NAD-Vorstufen regenerieren (Revollo *et al.*, 2007). Sie kann

vermutlich NADPH-Oxidasen aktivieren und so auf den Blutdruck einwirken (Boini *et al.*, 2010; Vallejo *et al.*, 2011; Romacho *et al.*, 2013). Außerdem wird Visfatin sowohl als Biomarker für chronische Erkrankungen wie Arteriosklerose und Diabetes, als auch für Krebs angesehen, obwohl die genauen Mechanismen dahinter noch nicht bekannt sind (Xia *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2017).

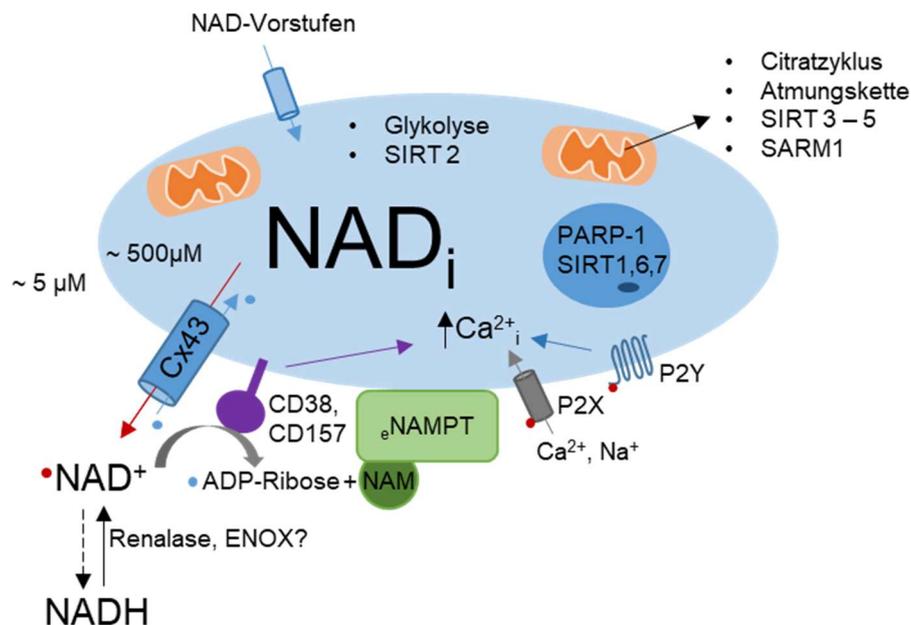


Abb. 4 Schematische Darstellung zur intra- und extrazellulären Wirkung von NAD nach den unter 1.4.1 und 1.4.2 genannten Referenzen. ADP-Ribose, Adenosindiphosphat-Ribose; Ca^{2+} , Kalzium-Ion; CD38, *cyclic ADP ribose hydrolase 1*; CD157, *cyclic ADP ribose hydrolase 2*; Cx43, Connexin-43; eNAMPT, extrazelluläre Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase; ENOX, *ecto-nicotinamide dinucleotide oxidase disulfide thiol exchanger*; _i, intrazellulär; Na^{+} , Natrium-Ion; NAD, Nicotinamidadenindinukleotid; NAD^{+} , oxidierte Form von NAD; NADH, reduzierte Form von NAD; NAM, Nikotinamid; P1, P2X, P2Y, purinerge Rezeptoren; PARP-1, Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1; SARM1, *sterile α and TIR motif-containing 1*; SIRT, Sirtuine

1.4.3 NAD und Altern

Mehrere Tierstudien und einige Humanstudien weisen darauf hin, dass intrazelluläres NAD im Alter reduziert vorliegt und dass damit verbunden vermehrter Zelltod auftritt (Massudi *et al.*, 2012; Imai und Guarente, 2014; Zhu *et al.*, 2015). Eine Ursache ist das verringerte Vorliegen von NAMPT, dass folglich zu einer verringerten Bildung von NAD im Salvage Weg führt (Stein und Imai, 2012). Neben NAD-Bildungsstörungen wird der vermehrte Verbrauch von NAD durch NAD-konsumierende Enzyme im Alter diskutiert (Camacho-Pereira *et al.*, 2016). So soll es bei starker Aktivierung von CD38 und PARP-1 zur Leerung der NAD^{+} -Speicher kommen, sodass anderen mitochondrialen oder im Cytoplasma liegenden Enzymen nicht mehr genug NAD^{+} zur Verfügung steht (Stein und Imai, 2012; Imai und Guarente, 2014; Camacho-Pereira *et al.*, 2016). Zu den benachteiligten Enzymen gehören auch die Sirtuine. Sie sind eine Gruppe von NAD^{+} -abhängigen Protein-Deacetylasen, denen eine Bedeutung für die Verlangsamung des

Alterungsprozesses zugeschrieben wird (Stein und Imai, 2012; Imai, 2016). Die Sirtuine sollen u.a. positiv auf Gen-Expression, Immunantwort und oxidativen Stress einwirken (Imai und Guarente, 2014; Okabe *et al.*, 2019). Wird ihnen das Substrat NAD⁺ entzogen, können die Sirtuine ihre Wirkung nicht entfalten und die Zellalterung wird beschleunigt (Imai und Guarente, 2014).

Bei allen Funktionen die zur Charakterisierung des NADs untersucht werden, ist es wichtig, sensitive Messmethoden für intrazelluläres und extrazelluläres NAD zu entwickeln.

1.4.4 NAD-Messmethodik

In den meisten Humanstudien, die den NAD-Status an biologischem Material untersucht haben, wurde NAD bisher mittels enzymatischer Verfahren in Blut- oder Gewebeproben bestimmt (Singhal und Zhang, 2006; Massudi *et al.*, 2012; Braidy *et al.*, 2013; Guest *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Bei der enzymatischen Bestimmung von NAD wird die Probe mit einem NAD⁺-abhängigen Enzym und einem NADH-abhängigen Enzym versetzt. Dabei wird das vorhandene NAD⁺ in der Probe komplett zu NADH reduziert. In einer zweiten Reaktion wird NADH verstärkt zu NAD⁺ oxidiert, wobei ein photometrisch messbarer Farbumschlag stattfindet. Durch die Verstärkung der Reaktion können auch geringe Konzentrationen gemessen werden. Allerdings sind die Konzentrationsangaben für NAD, die im Plasma oder Serum enzymatisch bestimmt worden sind, sehr inhomogen (Singhal und Zhang, 2006; Braidy *et al.*, 2013; Guest *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017).

Neben der enzymatischen Bestimmung von NAD in biologischen Proben hat sich die ³¹P-Magnetresonanzspektroskopie (³¹P MRS), eine Methode zur *in vivo* NAD-Bestimmung, etabliert (Lu *et al.*, 2014), die bisher jedoch nur für die Messung des NAD-Status im Gehirn angewandt worden ist (Zhu *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017). Dabei wird das im zu untersuchenden Gewebe enthaltene ATP zuvor mit radioaktivem Phosphor markiert. Anschließend wird der markierte Phosphor in einer Magnetresonanzspektroskopie dargestellt, wobei neben ADP/ATP das Spektrum von NAD⁺ und NADH abgebildet wird. Mit Hilfe der theoretisch angenommenen pro Gramm ATP-Konzentration im Gehirn kann dann eine Normalisierung des NAD-Anteils vorgenommen werden (Zhu *et al.*, 2015).

Einige der durchgeführten Humanstudien weisen darauf hin, dass sich mit zunehmendem Alter oder bei definierten Erkrankungen (Multiple Sklerose, Schwindel) das Verhältnis von NAD⁺ zu NADH (NAD⁺/NADH-Ratio) in den Geweben bzw. im Blut verringern können (Braidy *et al.*, 2013; Kao *et al.*, 2014). Jedoch muss beachtet werden,

dass der Zellmetabolismus und somit die NAD⁺/NADH-Ratio sehr zelltypabhängig sein dürften. Es ist auch nicht klar, welche Zelltypen exakt zum extrazellulären Vorkommen von NAD beitragen und in welchem Verhältnis. Zudem muss eine mit dem Alter zunehmende Insulinresistenz der insulinabhängigen Zelltypen in Betracht gezogen werden (Abdelhafiz und Sinclair, 2015). Da die Insulinresistenz zur verminderten Glukoseaufnahme in den Zellen führt, hätte dies natürlich einen Einfluss auf die zelluläre NAD⁺/NADH-Ratio. Ob sich mit zunehmendem Alter auch der NAD-Gesamtgehalt ändert, ist nicht ausreichend untersucht.

2. Zielstellung

Die Doktorarbeit sollte herausarbeiten, ob die Haut-AF als ein bekannter Parameter für das biologische Alter sowie die Gehalte an NAD und Renalase im Blutplasma als potentielle Altersparameter für die Bestimmung der Gefäßalterung bei Mann und Frau in Frage kommen. Dazu sollte eine Normalkohorte ohne schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankung aus der Region Halle-Saalekreis rekrutiert und daraufhin untersucht werden.

3. Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

AGE-Reader mu [®]	Diagnostics Technologies B.V., Groningen, Niederlande
Blutdruckmessgerät, boso-medicus control	Boso Bosch + Sohn GmbH u. Co. KG, Jungingen, Deutschland
Dynamometer, Saehan Grip	Saehan Corp./Corporation, Changwon-City, Südkorea
Eismaschine AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Gefriertruhe -150 °C	Panasonic, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Kirsch, Offenburg, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Personenwaage Typ Gala	Soehnle, Leifheit AG, Nassau, Deutschland
Photometer Fluostar [®] optima	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Pipet-Aid [®] XP	Drummond, Broomall, Pennsylvania, USA

Infinite® M1000 Plattenreader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ThermoScan®	Braun, Kronberg, Deutschland
TRIO-Thermoblock Biometra	Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Vicorder®	SMT medical GmbH&Co., Würzburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

<i>CRT® bacteria refill paraffin</i>	Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein
<i>Cryogenic vial 2 ml</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Klare 384-well-Mikroplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<i>Safety-Multifly®</i> -Kanülen 20G	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
9 ml K3E S-Monovetten®	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
9 ml Li-Heparin S-Monovetten®	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pierce™ Protein Concentrators, 10 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Weitere Verbrauchsmaterialien	SARSTEDT AG; Eppendorf AG

3.1.3 Lösungen und Kits

Gibco® PBS pH 7,4 (10×)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Human Renalase ELISA	
- USC- SEC845HU-96	<i>Cloud-Clone Corp.</i> , Wuhan, China
- LS-F67597	<i>LifeSpan BioScience</i> , Seattle, Washington, USA
Pierce™ BCA Protein Assay	<i>Thermo Fisher Scientific</i> , Waltham, Massachusetts, USA
Total NAD ⁺ / NADH Assay	
- ab186032	Abcam, Cambridge, England

Triton X-100

Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA

3.1.4 Auswertungssoftware

Microsoft® Office Paket 2016

Microsoft® Deutschland GmbH, Unterschleißheim,
Deutschland

Origin 6.0

OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts,
USA

SigmaStat® 3.5

Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA

3.2 Methodik

3.2.1 Probandenaufnahme und -untersuchung

Die nachfolgend beschriebene Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am 30.09.2016 genehmigt. An dieser Studie am Universitätsklinikum Halle (Saale) nahmen 209 Probanden im Alter von 18 bis 83 Jahre teil (91 Männer, 118 Frauen). Bereits zum Zeitpunkt der Rekrutierung wurden die Probanden nach dem kalendarischen Alter in Gruppen unterteilt, um eine gleichmäßige Altersverteilung zu erreichen (**Abb. 5**). Ausschlusskriterien waren: Alter < 18 Jahre, Verwendung von Selbstbräunern, (vermutete) Schwangerschaft, Tumorerkrankungen, Niereninsuffizienz (\geq KDIGO G3), Herzinsuffizienz (\geq NYHA 2), Lebererkrankungen, Diabetes mellitus Typ I, Diabetes mellitus Typ II mit Niereninsuffizienz, neurologische Erkrankungen, chronisch entzündliche Erkrankungen (z.B. Multiple Sklerose, Rheuma, Morbus Crohn), akute Erkältung und Fieber (> 38 °C). Die Fiebertemperatur wurde am Ohr durchgeführt.

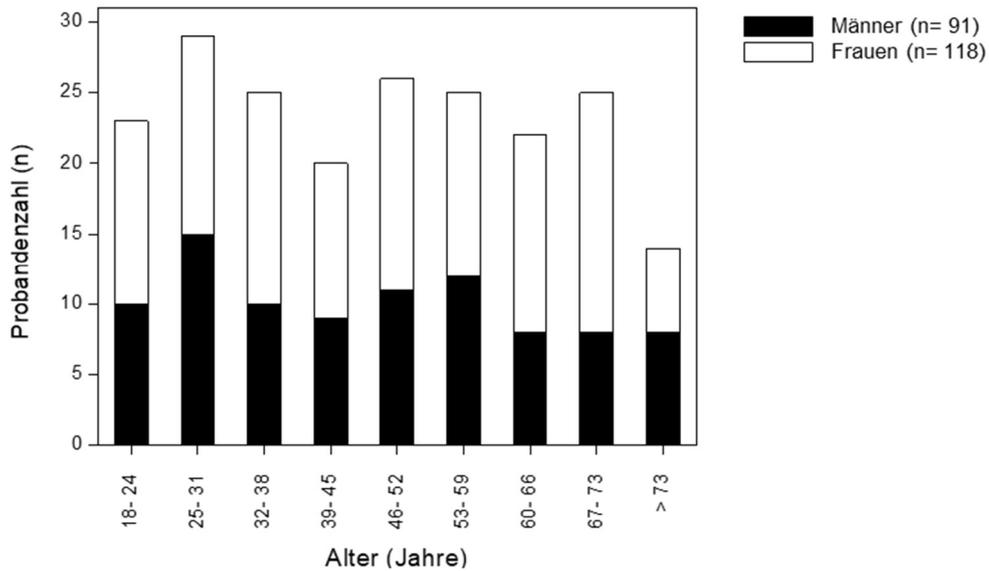


Abb. 5 Sieben-Jahres-Altersgruppierung mit Anzahl der männlichen und weiblichen Studienprobanden.

Die Untersuchung wurde nach einem definierten Protokoll durchgeführt und dauerte pro Proband ca. 60 Minuten:

1. Aufklärung und Erfassung von allgemeinen Angaben, Einwilligung in die Studie auf einem Dokumentationsbogen.
2. Ermittlung des *body mass index* (BMI = kg/m²) nach Messung von Größe und Gewicht mittels Maßband bzw. Personenwaage. Erhebungsbogen mit Befragung zur individuellen Lebensführung. Die Fragen enthielten Angaben zur sportlichen Aktivität, Ernährung, Allergien, Krankheiten und Medikamenteneinnahme (s. Anlagen).
3. Sterile Blutabnahme mit Stauschlauch aus einer Armvene durch geschultes Personal oder den studienbetreuenden Arzt von insgesamt 20 ml Blut in Lithium-Heparin- (Li-Heparin) und 10 ml Blut in K₃-Ethyldiamintetraacetat (K₃EDTA)-S-Monovetten®.
4. Messung der PWG mit dem Vicorder®:
 - a. cf-PWG: gleichzeitige Messung mit Manschette inklusive Sensor an der *Arteria carotis* (c) und *Arteria femoralis* (f).
 - b. bf-PWG: Analog oben an *Arteria carotis* (c) und *Arteria brachialis* (b)

Die Messung wurde nach Herstellervorgaben im Liegen und als Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Abstand zwischen den Manschettenunterkanten wurde mit einem Zentimetermaßband bestimmt.

5. Messung weiterer kardiovaskulärer Parameter mit dem Vicorder® analog dem Messaufbau zur bf-PWG-Bestimmung (Vicorder®-Menü: Pulswellenanalyse): Puls, Pulsdruck, Augmentationsdruck und -index sowie SEVR.
6. Aufsitzen des Probanden und Messung der Haut-AF am Unterarm mit dem AGE-Reader mu® nach Herstellerangaben und als Dreifachbestimmung.
7. Messung von Blutdruck und Puls am linken Oberarm mit einem durch die deutsche Hochdruckliga zertifizierten, automatischen Blutdruckmessgerät nach einer zweiminütigen Ruhezeit im Sitzen. Die Zeitdifferenz zwischen der Blutdruckmessung im Liegen und Sitzen betrug dadurch ca. fünf Minuten.
8. Abwechselnde Messung der maximalen Handkraft beider Hände mit einem Dynamometer. Der Bestwert von drei Versuchen wurde notiert.
9. Messung von Blutdruck und Puls ohne Ruhezeit im Sitzen analog 7.
10. Gewinnung einer Speichelprobe nach zweimaligem Ausspülen des Mundes mit Leitungswasser, 30-sekündigem Kauen eines Paraffin-Kaugummis und 5-minütigem Sammeln in einem Kunststoffbehältnis.

Im unmittelbaren Anschluss wurden die entnommenen Blut- und Speichelproben für 10 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert. Durch die Zentrifugation trennte sich das Blutplasma von den sich absetzenden Erythrozyten. Das erhaltene Blutplasma sowie der klare Speichel in der oberen Schicht der S-Monovette® wurden jeweils in 2 ml-Kryogefäße aliquotiert, im flüssigen Stickstoff eingefroren und dann bei - 150° C gelagert.

3.2.2 Renalase-Messung

Die Messung der humanen Renalase im Plasma wurde mit den *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Kits der Firmen *LifeSpan BioScience* (LS-F67597) und *Cloud-Clone Corp.* (zuvor Wuhan USCN Business Corp.; USC-SEC845HU-96) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden sowohl Li-Heparin- als auch K₃EDTA-versetzte Plasmaproben verwendet. Diese wurden in einer Verdünnungsreihe von 1:100 bis 1:1.000 in *phosphate buffered saline* (PBS) getestet, da die Hersteller jeweils eine Vorverdünnung von 1:500 für humane Plasmaproben empfohlen hatten. Die Proben wurden im Plattenreader bei 450 nm im Vergleich zur rekombinanten humanen Renalase als Standard gemessen und nach Herstellerangaben ausgewertet.

3.2.3 NAD-Messung

Die NAD-Gehalte in Plasma- und Speichelproben wurden mit Hilfe des *Total NAD⁺/NADH Assay* (ab186032), jedoch in Anlehnung an die Anleitung des *NAD⁺/NADH Assay* (ab65348) von Abcam untersucht. Hierbei handelte es sich um die indirekte Bestimmung von NAD mithilfe zweier Enzyme, einem NAD⁺- und NADH-abhängigem Enzym, die wiederum unter Bildung eines redoxabhängigen Farbsubstrates NADH und NAD⁺ generieren. Aufgrund der zyklischen Aktion beider Enzyme und der daraus resultierenden Verstärkung des NAD-Signals wird auch von einem *Enzymatic Cycling Assay* gesprochen. Die Differenzierung zwischen NAD⁺ und NADH erfolgte dabei auf der Basis der Hitzeelabilität von NAD⁺ bei bereits 60 °C, die durch eine vergleichende Analyse von gereinigtem NAD⁺ und NADH in der *high-performance liquid chromatography* HPLC zuvor überprüft wurde (Arbeiten durch Katja Zunkel in der Arbeitsgruppe).

Die Probenvorbereitung und NAD-Messung wurden analog der Darstellung in **Abbildung 6** durchgeführt. Aufgrund der Abhängigkeit des *Enzymatic Cycling Assay* von bivalenten Kationen wurde kein K₃EDTA-, sondern Li-Heparin-Blutplasma, verwendet. Für die NAD-Messung wurden zunächst die Proben (Plasma, Speichel) aufgetaut und dann durch einen 10 kDa-Filter für 30 Minuten bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt diente dem Ausschluss größerer Moleküle, die den *Enzymatic Cycling Assay* beeinflussen, und der Anreicherung von NAD. Das Filtrat wurde dann im gleichen Verhältnis mit PBS verdünnt und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Ein Reaktionsgefäß wurde für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert, um das thermolabile NAD⁺ in der Probe zu zersetzen, wohingegen das andere Reaktionsgefäß auf Eis verblieb. Daher konnte in der unbehandelten Probe der NAD-Gesamtgehalt und in der erhitzten Probe das NADH bestimmt werden. Aus der Differenz beider Messwerte ergab sich der NAD⁺-Gehalt. Aufgrund der hohen Probenanzahl wurde zunächst die Probenpräparation durchgeführt. Die präparierten Proben wurden anschließend eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt zusammen mit den NADH-Konzentrationsstandards im *384-well*-Mikrotiterplattenformat untersucht. Die Verdünnung des NADH-Standards (0 bis 5 µM) in PBS wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur Durchführung des *Enzymatic Cycling Assay* wurden 20 µl des jeweiligen Standards sowie 20 µl der jeweiligen Probe in Vierfachbestimmung in die *Wells* einer klaren Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend mit je 20 µl des zyklischen Enzymmixes versetzt. Die Messung der Absorptionsveränderung (ΔOD), infolge der Reduktion des Farbsubstrates, erfolgte bei 460 nm im *infinite[®] M1000* Plattenreader jede Minute über insgesamt 120 Minuten für das Plasma bzw. über 80 Minuten für den Speichel (**Abb. 6**).

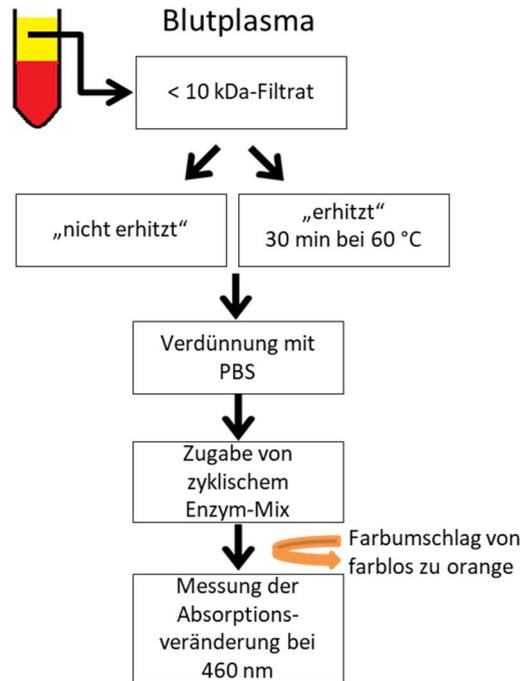


Abb. 6 Schematische Darstellung der NAD-Messung in Plasmaprobe. PBS, *phosphate buffered saline*

Die anschließende Beurteilung des Verlaufs der Enzymreaktion und deren Auswertung wurden im Softwareprogramm Excel (*Microsoft® Office 2016*) durchgeführt. Die Bestimmung von ΔOD per Minute wurde von $x - 120$ Minuten vorgenommen, wobei x den Zeitpunkt angab, ab dem die Enzymreaktion im *steady state* war. Aus den Mehrfachbestimmungen wurden die Mittelwerte bestimmt und eine Umrechnung auf den Standard durchgeführt. Bei starken Werteschwankungen wurden Messungen wiederholt.

3.2.4 Auswertung

Die direkt am Probanden aufgenommenen Parameter wurden zunächst in eine Access-Datenbank (*Microsoft® Office 2016*) eingetragen und für spätere statistische Auswertungen in das Softwareprogramm Excel (*Microsoft® Office 2016*) importiert. Die abschließende graphische Darstellung und statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Softwareprogramm Origin 6.0 bzw. SigmaStat® 3.5 durchgeführt. Der *Rank-sum-Test* bzw. der unpaarige *Student`s t-Test* wurden zum statistischen Vergleich von zwei Gruppen verwendet. Die Altersabhängigkeiten wurden als polynomischen Regression berechnet. Die Signifikanzen der P-Werte wurden mit * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

4.1.1 Mittlere Geschlechtsunterschiede

Die Studienpopulation umfasste 91 Männer und 118 Frauen. Das durchschnittliche Alter lag bei den Männern bei 46,7 Jahren und bei den Frauen bei 48,2 Jahren. Während die meisten aufgenommenen Studienparameter im Mittel kaum Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern zeigten, war die Handkraft bei den Frauen wesentlich geringer als bei den Männern (**Tab. 2**). Frauen nahmen außerdem insgesamt mehr Medikamente als Männer ein, jedoch nicht mehr Antihypertensiva (**Tab. 2**).

Die Bestimmung der Gefäßqualität durch Pulswellenanalyse im Liegen zeigte bei den Frauen einen leicht höheren Augmentationsdruck und -index als bei den Männern ohne geschlechterabhängige Unterschiede in der PWG für die cf- und bf-Messung (**Tab. 2**). Zudem war auch die SEVR bei den Frauen niedriger als bei den Männern (**Tab. 2**). Die im Liegen und Sitzen gemessenen Blutdrücke zeigten ebenfalls Geschlechterunterschiede, die wiederum von der Körperposition abhingen. So waren bei vergleichbaren RR_s -Werten im Liegen die RR_d -Werte bei den Männern geringfügig höher als bei den Frauen und somit deren Pulsdrücke etwas geringer (**Tab. 2**). Blutdruckmessungen in der Sitzposition, die ca. 5 Minuten nach der Liegeposition durchgeführt wurden, zeigten jedoch bei vergleichbaren RR_d -Werten höhere RR_s -Werte und somit höhere Pulsdrücke bei den Männern als bei den Frauen (**Tab. 2**).

Tab. 2 Geschlechtsabhängigkeit der aufgenommenen Studienparameter in einer Normalkohorte aus der Region Halle-Saalekreis.

Nr.	Parameter	Männer (n = 91)	Frauen (n = 118)
-----	-----------	-----------------	------------------

1	Alter	Jahre	46,7 ± 17,5	48,2 ± 17,2
2	Haut-AF	aU	2,05 ± 0,48	2,01 ± 0,48
3	BMI	kg/m ²	25,7 ± 3,37	25,1 ± 4,66
4	Handkraft (schwächere Hand)	kg	45,3 ± 9,94	27,2 ± 5,37 **
5a	Medikation	n	1,00 ± 1,58	1,59 ± 1,90 *
5b	Antihypertensiva	n	0,43 ± 0,75	0,42 ± 0,92
<u>Messungen in liegender Position:</u>				
6	cf-PWG	m/s	8,84 ± 1,63	8,99 ± 2,13
7	bf-PWG	m/s	12,7 ± 3,92	13,6 ± 5,20
8a	Augmentationsdruck	mmHg	8,05 ± 5,03	11,5 ± 6,86 **
8b	Augmentationsindex	%	17,1 ± 9,01	22,0 ± 10,1 **
9	SEVR	%	172 ± 28,8	162 ± 38,5 *
10	Puls	n/min	64,5 ± 9,32	66,3 ± 9,50
11a	RR _s	mmHg	129 ± 12,1	129 ± 16,4
11b	RR _d	mmHg	77,1 ± 8,20	74,2 ± 9,21 *
12	Pulsdruck	mmHg	52,3 ± 7,50	54,8 ± 11,4 *
<u>Messungen in sitzender Position:</u>				
13	Puls	n/min	66,5 ± 10,2	67,8 ± 8,90
14a	RR _s	mmHg	136 ± 15,9	130 ± 19,4 *
14b	RR _d	mmHg	86,9 ± 9,60	87,8 ± 11,3
15	Pulsdruck	mmHg	49,2 ± 11,9	43,0 ± 12,7 **

Die Daten sind als Mittelwerte ± SD mit *P < 0.05, ** P < 0.01 vs. Männer angegeben.

bf-, zwischen *Arteria carotis* (c) und *Arteria brachialis* (b); BMI, *body mass index*; cf-, zwischen *Arteria carotis* (c) und *Arteria femoralis* (b); Haut-AF, Autofluoreszenz der Haut; PWG, Pulswellengeschwindigkeit; RR_d, diastolischer Blutdruck; RR_s, systolischer Blutdruck; SEVR, *subendocardial viability ratio*

4.1.2 Altersabhängigkeit

Auswertungen zur Altersabhängigkeit der in **Tabelle 2** gelisteten Parameter wurden mithilfe der polynominellen Regressionsanalyse durchgeführt, da diese die Altersabhängigkeit am besten repräsentieren konnte. Je höher der Regressionswert R² ausfiel, desto ähnlicher war der Parameter dem entgegengestellten kalendarischen Alter bzw. der Haut-AF. Abgesehen von der Handkraft, nahmen alle in **Tabelle 3** gelisteten Parameter mit zunehmendem Alter zu. Als Alter wurden das kalendarische Alter und die Haut-AF als Marker des biologischen Alters für die Analyse herangezogen und miteinander verglichen. Aufgrund der unter 4.1.1 beschriebenen basalen Geschlechtsunterschiede wurden die Regressionsanalysen zudem getrennt für Männer und Frauen durchgeführt. Diese ergaben, dass sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen eine bessere Altersabhängigkeit aller ermittelten Gefäßparameter sowie sonstigen Parameter vom kalendarischen Alter als von der Haut-AF bestand (siehe R²-Werte, **Tab. 3**). In diesem Zusammenhang zeigten vor allem die cf-PWG und bf-PWG der Frauen deutlich unterschiedliche Korrelationswerte zwischen dem kalendarischen Alter und der Haut-AF, mit deutlich schlechteren Werten bei der Haut-AF (**Tab. 3**). Vergleicht man Haut-AF und bf-PWG zwischen Männern und Frauen, fällt auf, dass die Männer eine bessere Korrelation von Haut-AF zum kalendarischen Alter hatten und für die Frauen die bf-PWG einen besseren Regressionswert zum kalendarischen Alter hatte (**Tab. 3**). Unter den Gefäßparametern korrelierten bei beiden Geschlechtern die PWG

sowie der Augmentationsdruck und -index deutlich besser als die Blutdrücke mit dem Alter (**Tab. 3**).

Tab. 3 Vergleichende Abhängigkeit der aufgenommenen Studienparameter vom kalendarischen Alter und der Haut-AF für Männer und Frauen.

Nr.	Parameter	Abhängigkeit von:	Männer (n = 91)		Frauen (n = 118)	
			Alter	Haut-AF	Alter	Haut-AF
1	Alter	Jahre		0,60 ***		0,42 ***
2	Haut-AF	aU	0,60 ***		0,42 ***	
3	BMI	kg/m ²	0,05 *	0,01	0,07 *	0,08 **
4	Handkraft (schwächere Hand)	kg	0,17 ***	0,12 **	0,21 ***	0,08 **
5a	Medikation	n	0,34 ***	0,13 **	0,23 ***	0,15 ***
5b	Antihypertensiva	n	0,35 ***	0,10 **	0,18 ***	0,16 ***
<u>Messungen in liegender Position:</u>						
6	cf-PWG	m/s	0,49 ***	0,32 ***	0,51 ***	0,18 ***
7	bf-PWG	m/s	0,56 ***	0,28 ***	0,61 ***	0,26 ***
8a	Augmentationsdruck	mmHg	0,51 ***	0,32 ***	0,64 ***	0,36 ***
8b	Augmentationsindex	%	0,47 ***	0,30 ***	0,58 **	0,32 ***
9	SEVR	%	0,01	0,01	0,11 **	0,02
10	Puls	n/min	0,01	0,01	0,02	0,01
11a	RR _s (systolischer Blutdruck)	mmHg	0,23 ***	0,12 **	0,36 ***	0,20 ***
11b	RR _d (diastolischer Blutdruck)	mmHg	0,16 ***	0,06	0,15 ***	0,08 **
12	Pulsdruck	mmHg	0,25 ***	0,09 *	0,52 ***	0,20 ***
<u>Messungen in sitzender Position:</u>						
13	Puls	n/min	0,03	0,01	0,04	0,01
14a	RR _s	mmHg	0,16 ***	0,09 *	0,39 ***	0,21 ***
14b	RR _d	mmHg	0,11 **	0,02	0,15 ***	0,08 **
15	Pulsdruck	mmHg	0,23 ***	0,08 *	0,48 ***	0,29 ***

Die Altersabhängigkeiten sind als Korrelationskoeffizient einer polynomischen Regression zweiter Ordnung (R²) und deren Signifikanz (*P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001) angegeben.

bf-, zwischen *Arteria carotis* (c) und *Arteria brachialis* (b); BMI, *body mass index*; cf-, zwischen *Arteria carotis* (c) und *Arteria femoralis* (b); Haut-AF, Autofluoreszenz der Haut; PWG, Pulswellengeschwindigkeit; RR_d, diastolischer Blutdruck; RR_s, systolischer Blutdruck; SEVR, *subendocardial viability ratio*

4.2 Renalase

Die Bestimmung der Renalase im humanen Plasma erfolgte mit den kommerziellen ELISA-Kits der Firmen *LifeSpan BioScience* und *Cloud-Clone Corp.* (zuvor Wuhan USCN Business Corp.), von denen letzterer in den anderen Humanstudien verwendet worden ist (**Tab. 1**). Beide ELISA-Testverfahren zeigen keine ausreichend gute Linearität zwischen der verwendeten Verdünnung der Plasmaproben (Li-Heparin- und K₃EDTA-Plasma) und den im Bezug zum Renalase-Standard kalkulierten Konzentrationen (**Abb. 7** für den ELISA von *Cloud-Clone Corp.*). Aufgrund der unzureichenden Spezifität beider kommerziellen ELISA-Kits konnten keine Renalase-Messungen in den Plasmaproben der Studienprobanden durchgeführt werden.

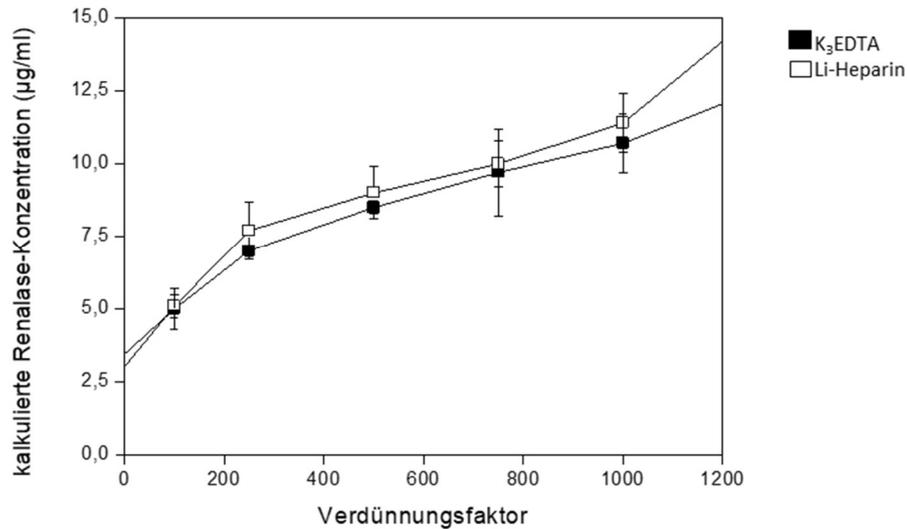


Abb. 7 Kalkulierte Plasmakonzentrationen von Renalase im Bezug zur Verdünnung der humanen Plasmaprobe für Li-Heparin-Plasma (n = 3) und K₃EDTA-Plasma (n = 2). Die Daten sind Mittelwerte ± SD.

4.3 Extrazelluläres NAD

4.3.1 Etablierung der enzymatischen Bestimmung von extrazellulärem NAD

In der Arbeitsgruppe zuvor durchgeführte NAD-Messungen per HPLC zeigten einen Schwellenwert für die Detektion von gereinigtem NAD⁺ und NADH bei einer Konzentration von ca. 1 µM. Gleichzeitige Untersuchungen ausgewählter humaner Blutplasmaproben wiesen dabei auf einen NAD⁺- bzw. NADH-Gehalt im Bereich dieses Schwellenwertes hin. Alternativ wurde ein *Enzymatic Cycling Assay* für die NAD-Messung etabliert und auf Nutzbarkeit für die Quantifizierung von NAD in humanen Proben überprüft. Dabei wurde neben dem Blutplasma auch Speichelflüssigkeit von jungen Probanden in verschiedenen Vorverdünnungen getestet. Der kinetische Verlauf der Messung von Plasma in der später genutzten Verdünnung sowie unverdünntem Speichel ist vergleichend mit gereinigtem NADH in **Abbildung 8** dargestellt. Diese Darstellung zeigt:

1. den linearen Anstieg der Absorption für gereinigtes NADH.
2. den anfänglich hyperbolen, dann linearen Anstieg der Absorption für das Li-Heparin-Plasma (unbehandelt).
3. den linearen, flacheren Anstieg der Absorption für das erhitzte Li-Heparin-Plasma.
4. keinen Anstieg für den Speichel (unbehandelt).

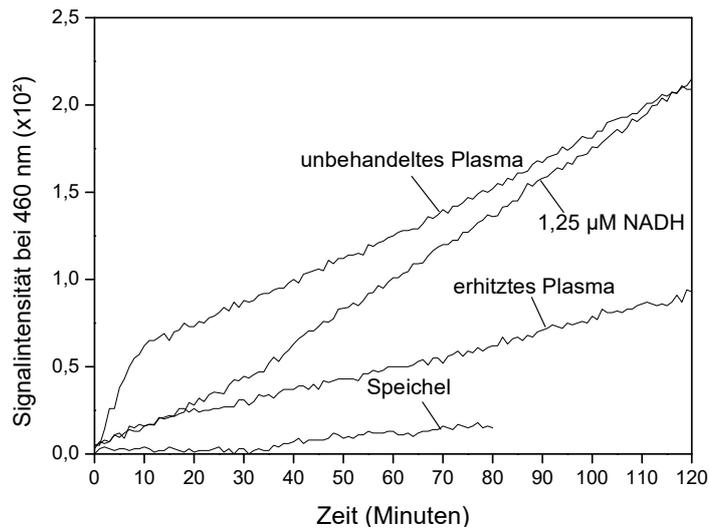


Abb. 8 Zeit-abhängige Signalintensität der *Enzymatic Cycling Assay*-Reaktion für gereinigtes NADH, unbehandelte und erhitzte Plasmaproben, sowie Speichelflüssigkeit. Der Schwellenwert der Detektion lag bei ca. 0,15 µM NADH. NADH, reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid

Die Auswertung der Messwerte für unbehandeltes Plasma im hyperbolen Kurvenbereich der enzymatischen Reaktion ergab im Vergleich zum NADH-Standard NAD-Werte von über 10 µM, was sich nicht mit den Messwerten der vorangegangenen HPLC-Analyse und mit den Werten für erhitztes Plasma deckte. Daher wurde für unbehandeltes Plasma die zeitliche Änderung der Absorption im linearen (*steady state*) Bereich der Enzymreaktion für die Datenauswertung herangezogen. Die dabei ermittelten Werte deckten sich mit den vorangegangenen, im Bereich des Schwellenwertes liegenden HPLC-Untersuchungen von Plasmaproben. Für den Speichel wurde die Messung nach 80 Minuten eingestellt, da eine insignifikante Menge von NAD in der Speichelflüssigkeit vorlag und keine weitere Steigerung der Menge an umgesetzten NAD zu erwarten war.

4.3.2 NAD-Gehalt im humanen Plasma

Im Anschluss an die Etablierung des *Enzymatic Cycling Assays* wurden die Plasmaproben aller Studienprobanden im Vergleich zum NADH-Standard in Mehrfachbestimmung untersucht. Aufgrund einer technischen Standardabweichung von knapp 30 % des daraus berechneten Mittelwertes (**Abb. 9**) dürfte die Genauigkeit der ermittelten Plasma-NAD-Gehalte bei ca. 70 % liegen.

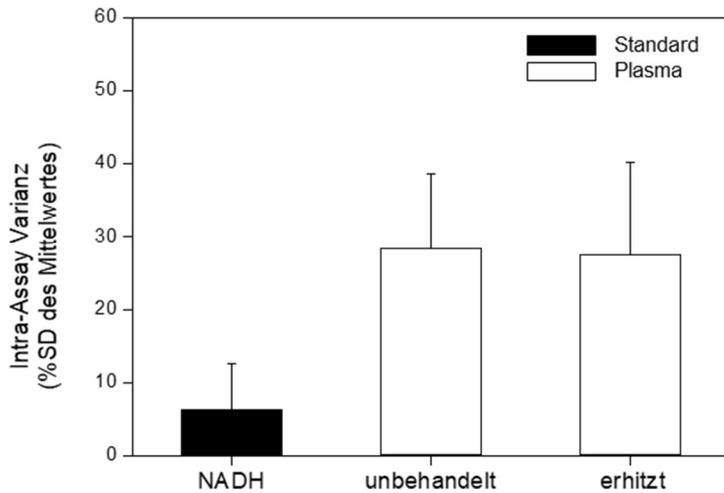


Abb. 9 Technische Standardabweichung der mit dem *Enzymatic Cycling Assay* in Vierfachbestimmung ermittelten NAD-Gehalte im humanen Plasma (n = 209) im Vergleich zum 1,25- μ M-NADH-Standard (n = 15). Die Daten sind gezeigt als Mittelwerte \pm SD. NADH, reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid

Die detaillierte Auswertung der NAD-Plasmawerte für die Studienprobanden wurde, wie zuvor, für beide Geschlechter getrennt durchgeführt. Die Plasmagehalte von NAD⁺ und NADH lagen im Median bei ca. 0,6 - 0,7 μ M für Männer und Frauen, wobei NADH etwas geringer als NAD⁺ konzentriert war (**Abb. 10**). Frauen hatten einen etwas höheren Plasmagehalt an NAD⁺ als NADH im Vergleich zu den Männern (**Abb. 10**) und aufgrund dessen eine signifikant höhere NAD⁺/NADH-Ratio (**Abb. 11**).

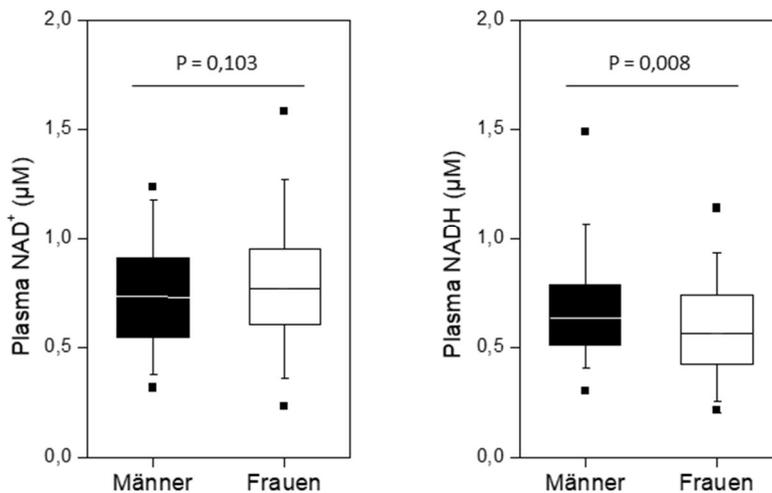


Abb. 10 Geschlechter-abhängige Konzentrationen an NAD⁺ und NADH im Plasma. Die Daten sind als Boxplot-Diagramme (25 - 75 % Bereich) dargestellt. Die mittleren Linien in den Boxen sind die Median-Werte. Die Whisker zeigen die 5 - 95% Abweichungen, wohingegen die Punkte die 1 - 99 % Abweichung darstellen.

Der mediane Gesamtgehalt an NAD lag für alle untersuchten Proben bei 1,34 μM (Bereich: 0,44 - 2,88 μM) ohne Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern (**Abb. 11**). Eine direkte Korrelation zwischen dem NAD-Gesamtgehalt und der NAD^+/NADH -Ratio konnte weder bei den Männern noch den Frauen festgestellt werden (Regressionsanalysen; Daten nicht gezeigt).

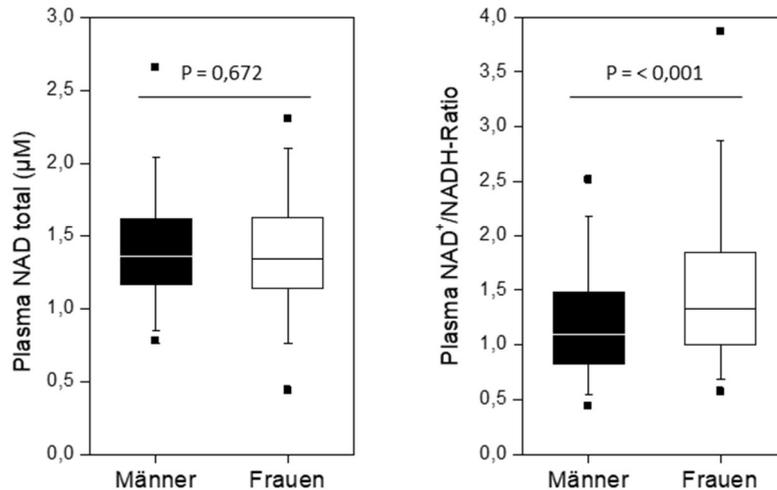


Abb. 11 Geschlechter-abhängige Konzentrationen an Gesamt-NAD sowie die NAD^+/NADH -Ratio im Plasma. Die Daten sind als Boxplot-Diagramme (25 - 75 % Bereich) dargestellt. Die mittleren Linien in den Boxen sind die Median-Werte. Die Whisker zeigen die 5 - 95 % Abweichungen, wohingegen die Punkte die 1 - 99 % Abweichung darstellen.

Regressionsanalysen der NAD-Plasmawerte zeigten für beide Geschlechter keine Abhängigkeiten vom kalendarischen Alter. So korrelierten weder der Gesamtgehalt an NAD noch die NAD^+/NADH -Ratio mit dem Alter der Probanden (**Abb. 12**). Allerdings deutet die graphische Darstellung in **Abbildung 12** darauf hin, dass Geschlechterunterschiede in der NAD^+/NADH -Ratio bevorzugt für das mittlere kalendarische Alter zutreffen.

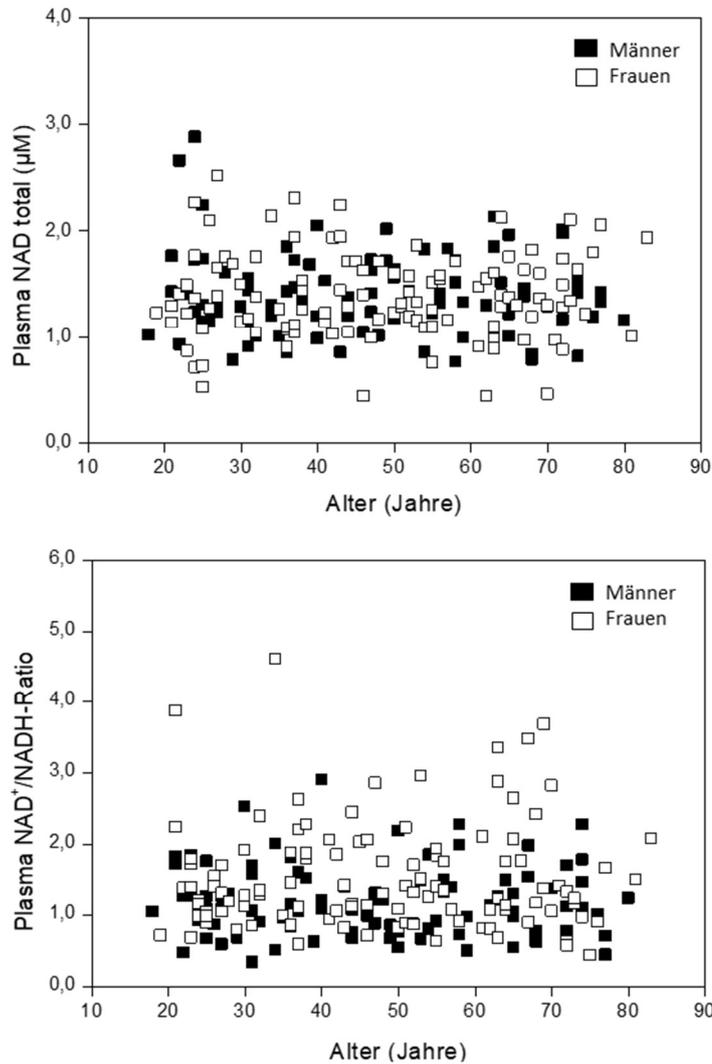


Abb. 12 NAD-Gesamtgehalt und NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma von Männern und Frauen in Abhängigkeit vom kalendarischen Alter. Die Daten sind als Punktauftragung dargestellt.

Aufgrund der Geschlechtsunterschiede in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio wurden alle Männer und Frauen entsprechend dem geschlechtsabhängigen Median in zwei Untergruppen aufgeteilt und bezüglich aller in der Studie aufgenommenen Parameter ausgewertet. Diese Untergruppen-Analyse zeigte, dass Probanden mit niedriger Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio auch weniger Gesamtgehalt an NAD im Plasma hatten als Probanden mit hoher Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio (**Abb. 13**). Allerdings war diese Beziehung zwischen der NAD⁺/NADH-Ratio und dem NAD-Gesamtgehalt bei den Männern deutlich stärker als bei den Frauen ausgeprägt (**Abb. 13**). Die anderen in der Studie aufgenommenen Parameter waren zwischen beiden Untergruppen nicht verändert (Daten nicht gezeigt).

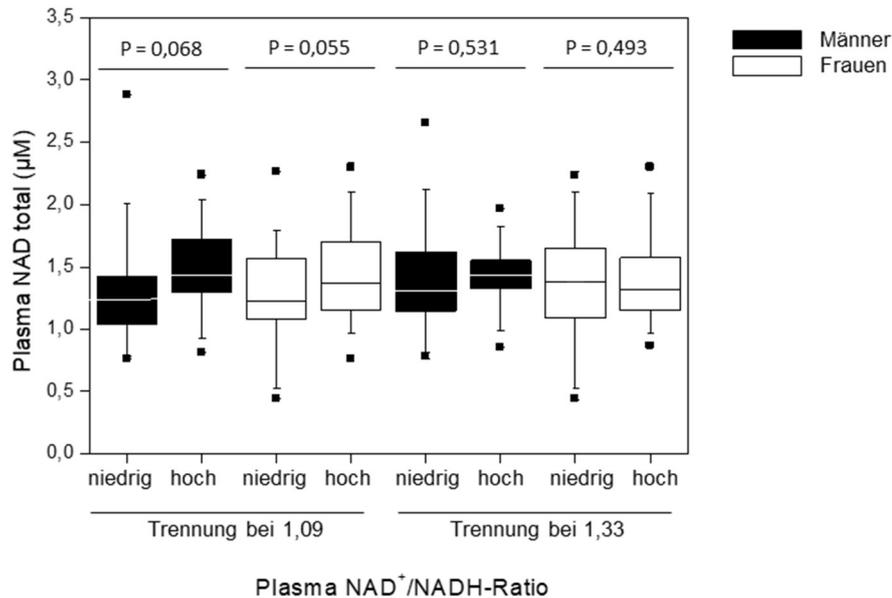


Abb. 13 NAD-Gesamtgehalt im Plasma in Abhängigkeit von der NAD⁺/NADH-Ratio. Die Untergruppierung in Probanden mit hohen und niedrigen Plasma-NAD⁺/NADH-Ratios erfolgte sowohl anhand des Medianwertes für Männer (1,09), als auch anhand des Medianwertes für Frauen (1,33). Die Daten sind als Boxplot-Diagramme (25 - 75 % Bereich) dargestellt. Die mittleren Linien in den Boxen sind die Median-Werte. Die Whisker zeigen die 5 - 95% Abweichungen, wohingegen die Punkte die 1 - 99 % Abweichung darstellen.

Da die Darstellung in **Abbildung 12** darauf hindeutete, die Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio könne je nach Alter vom Geschlecht abhängen, wurde auch hier eine Untergruppenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Männer und Frauen entsprechend ihres kalendarischen Alters sowie ihrer Haut-AF in je drei Altersgruppen eingeteilt. Für das kalendarische Alter bestätigte sich, dass die Geschlechterunterschiede in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio besonders hoch in der mittleren Altersgruppe (40 - 60 Jahre) waren (**Abb. 14**). Für die Haut-AF zeigte sich allerdings, dass die Geschlechterunterschiede in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio mit zunehmender Haut-AF abnehmen (**Abb. 14**). Dies konnte auch beobachtet werden, wenn statt der Haut-AF die PWG für die bf-Messung als Marker für das biologische Alter herangezogen wurden (**Abb. 14**). Frauen mit einem Alter über 60 Jahren, einer Haut-AF über 2,3 aU oder einer bf-PWV von mehr als 14 m/s hatten keine höhere NAD⁺/NADH-Ratio mehr als die Männer (**Abb. 14**).

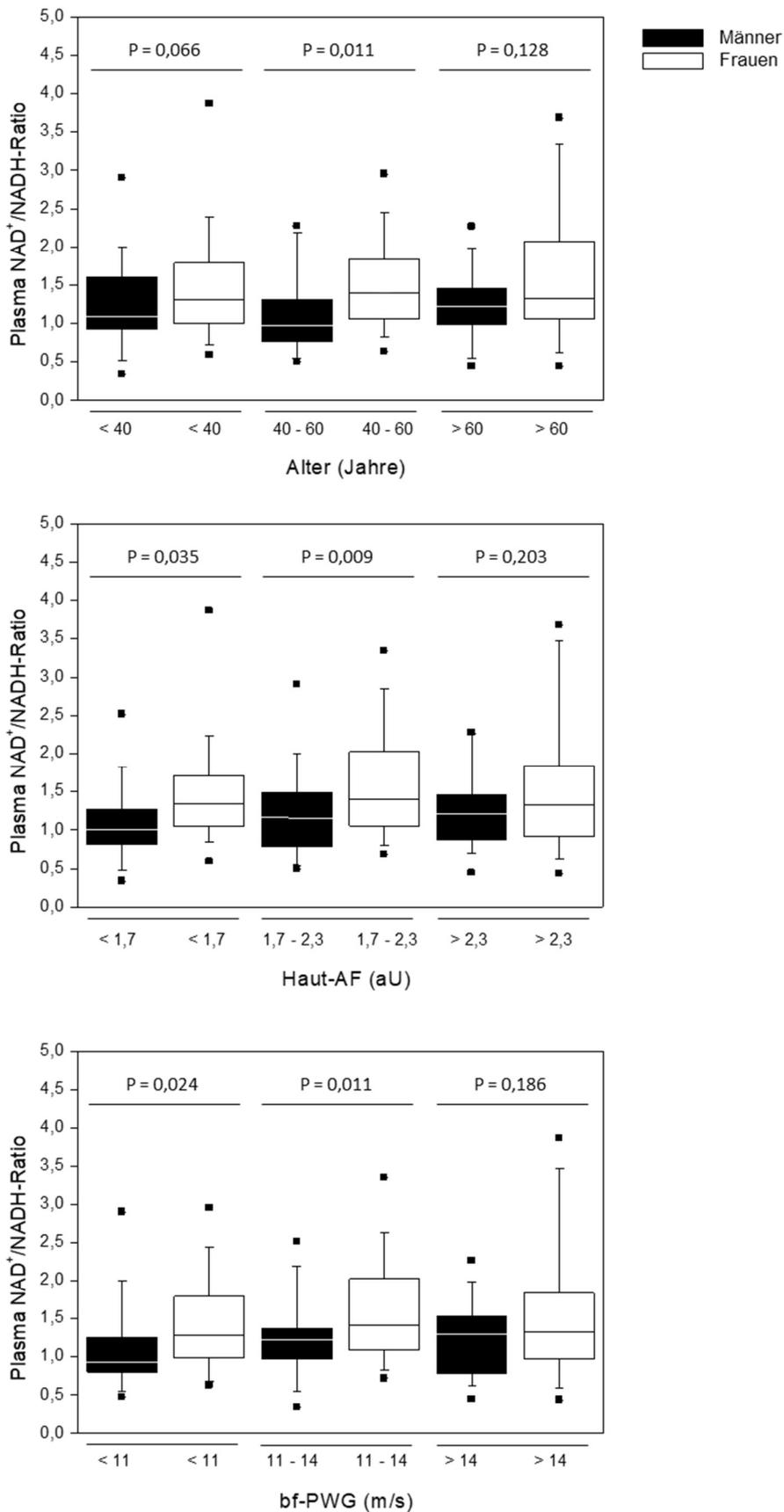


Abb. 14 NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma von Männern und Frauen in Abhängigkeit vom kalendarischen Alter (oben), Haut-AF (mittig) und bf-PWV (unten). Die Daten sind als Boxplot-Diagramme (25 - 75 % Bereich)

dargestellt. Die mittleren Linien in den Boxen sind die Median-Werte. Die Whisker zeigen die 5 - 95% Abweichungen, wohingegen die Punkte die 1 - 99 % Abweichung darstellen.

5 Diskussion

Meine Studie an gesunden Probanden aus der Region Halle-Saalekreis konnte zeigen, dass bei Mann und Frau das kalendarische Alter besser mit ausgewählten Parametern der Gefäßalterung korreliert als die getesteten biologischen Faktoren, zu denen die Haut-AF und der Plasmagehalt an NAD zählten. Zudem konnte ich zeigen, dass neben dem Puls- und Augmentationsdruck als bekannte vaskuläre Parameter auch der relative Plasmagehalt an NAD⁺/NADH bei den Frauen höher als bei den Männern ist. Allerdings war die Geschlechterdifferenz im NAD⁺/NADH-Plasmagehalt nur bei jungen und mittelalten (18 - 60 Jahre) aber nicht alten Probanden (> 60 Jahre) nachweisbar. Ob unterschiedliche Plasmagehalte an Renalase, einer potentiellen extrazellulären NADH-Oxidase, eine Ursache für die Geschlechtsunterschiede in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio sind, konnte aufgrund technischer Einschränkungen nicht beantwortet werden.

5.1 Geschlechtsunterschiede und Gefäßalter

Meine Studienpopulation zeigte eine relativ ausgeglichene Alters- und Geschlechtsverteilung. In Übereinstimmung mit der Studie von Yue *et al.* (2011) konnten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede in der Haut-AF, einem bekannten nicht-invasivem Altersparameter, gefunden werden. Aufgrund der geringeren Muskelmasse bei Frauen als bei Männern (Janssen *et al.*, 2000), war die Handkraft zwischen beiden Geschlechtern erwartungsgemäß unterschiedlich. Aufgrund der zusätzlichen Einnahme von oralen Antikontrazeptiva von Frauen war auch die Anzahl der eingenommenen Medikamente zwischen Frauen und Männern erwartungsgemäß verschieden. Entsprechend meiner Vermutungen gab es auch geschlechterabhängige Unterschiede bei einigen vaskulären Parametern, wie dem Augmentationsdruck- bzw. -index und der SEVR. Auch Higashi *et al.* (2013) stellten fest, dass gesunde Frauen einen höheren Augmentationsindex als gesunde Männer hatten, obwohl die brachiale PWG keine Unterschiede zeigte. Gleichzeitig war der SEVR der Frauen in der von mir durchgeführten Studie niedriger. In einigen Studien wurden geringere SEVR-Werte bei Frauen gefunden, so z.B. durch Laugesen *et al.* (2016) und Amah *et al.* (2017). Gonzales und Hadri (2016) sehen als Ursache einen höheren Ruhepuls bei den Frauen, der die Diastole und somit auch die Durchblutungszeit des Myokards verkürzt.

Aufgrund meiner zeitlich versetzten Blutdruckmessungen in der liegenden und sitzenden Position, konnte ich zudem Unterschiede in den Blutdrücken je Körperposition identifizieren, welche sich durch den Baroreflex erklären lassen (Rienzo *et al.*, 2009). Bei

den Frauen war auch der systolische Blutdruck nach dem Aufsitzen kaum erhöht, was mit dem verbreiteten, schlechteren Ansprechen des weiblichen Körpers auf orthostatische Veränderungen zusammenhängt (Convertino, 1998; Cheng *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu reagierte der diastolische Blutdruck bei beiden Geschlechtern erwartungsgemäß mit einer Erhöhung auf die orthostatische Veränderung (Privšek *et al.*, 2018).

Die Haut-AF korrelierte in meiner Studie gut mit dem kalendarischen Alter, das konnte laut Hofmann *et al.* (2013) und van Waateringe *et al.* (2016) bereits vermutet werden. In meiner Studie fiel die Korrelation bei den Männern besser aus als bei den Frauen, was auch bei van Waateringe *et al.* (2016) der Fall war. Außerdem korrelierte die Haut-AF in meiner Studie auch mit der PWG, einem Parameter des vaskulären Alters, was auch Hofmann *et al.* (2013) gefunden haben. Allerdings habe ich festgestellt, dass das kalendarische Alter besser mit den ermittelten Gefäßparametern korrelierte als die Haut-AF (**Tab. 3**), was auch Randag *et al.* (2015) bei gesunden Frauen zeigen konnten. Es bleibt hierbei zu berücksichtigen, dass in meiner Studie gesunde Probanden untersucht wurden, während in anderen Studien Patienten mit kardiovaskulären und metabolischen Vorerkrankungen untersucht wurden (Hofmann *et al.*, 2013; van Waateringe *et al.*, 2016). Speziell bei Patienten mit vaskulären Erkrankungen ist dabei davon auszugehen, dass das kalendarische Alter schlechter mit Gefäßparametern korreliert als die Haut-AF. Im Gegensatz zur PWG sowie zum Augmentationsdruck und -index korreliert der zunehmende Blutdruck wesentlich schlechter mit dem Alter. Dies wurde u.a. auch durch Cho *et al.*, (2015) gezeigt. Neben der stärkeren natürlichen Schwankung des Blutdrucks (McAlister und Straus, 2001) dürfte hierbei die Einnahme von Antihypertensiva bei älteren Probanden einen Einfluss haben.

5.2 Renalase

Als potentielle NADH- bzw. NADPH-Oxidase ist die extrazellulär vorliegende Renalase vermutlich an der Gefäßregulation beteiligt (Moran, 2015; Beaupre *et al.*, 2013b). Auch wenn der zugrundeliegende Regulationsmechanismus noch nicht bekannt ist, gibt es tierexperimentelle Ansätze, denen zu folge extrazelluläres NAD eine Wirkung auf den Blutdruck ausübt (Alefisat *et al.*, 2015). Daher sollte im Rahmen meiner Arbeit auch der Plasmagehalt der Renalase in der Normalkohorte aus der Region Halle-Saalekreis untersucht und auf seine Korrelation mit den erhobenen vaskulären Parametern sowie dem Plasma-NAD-Gehalt analysiert werden. Allerdings habe ich in meinen Voruntersuchungen festgestellt, dass der einzige kommerzielle Assay zur Bestimmung

des Renalase-Gehaltes im humanen Plasma nicht spezifisch ist. Da ausschließlich dieser Assay, ein ELISA der Firma *Wuhan USCN Business Corp.* (jetzt *Cloud-Clone Corp.*), in sämtlichen bisherigen humanen Studien zur Detektion der Renalase verwendet worden ist (**Tab. 1**), deutet dies auf eine mögliche Inkorrektheit dieser Studien hin. Zudem erklärt die unspezifische Funktion des verwendeten Assays bzw. der im Assay verwendeten Antikörper die sehr unterschiedlichen Konzentrationen, die für die Renalase im Blutplasma oder -serum rechnerisch ermittelt worden sind, sowie die sehr widersprüchlichen Korrelationen mit dem Blutdruck in der jeweiligen Untersuchungsgruppe (**Tab. 1**). Weiterführende Untersuchungen zu der Funktionalität dieses EILSA-Kits sollten daher durchgeführt werden.

5.3 Plasma-NAD

Bisher gibt es nur wenige klinische Studien, die sich mit dem Plasmagehalt an NAD beschäftigt haben (**Tab. 4**). Zudem geben diese sehr unterschiedliche Konzentrationen für NAD an (**Tab. 4**). Ein weiterer Unterschied ist, dass Guest *et al.* (2014) und Singhal und Zhang (2006) gesunde Probanden untersucht haben, während in den anderen Studien Patienten mit Multipler Sklerose, chronischem Schwindel oder zerebralen Fehlbildungen einbezogen wurden (Braidy *et al.*, 2013; Kao *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). In meiner Studie wurden Probanden mit schwerwiegenden Erkrankungen von vornherein ausgeschlossen, weshalb meine Ergebnisse mit den Studienergebnissen aus **Tabelle 4** nur bedingt vergleichbar sind.

Tab. 4 NAD-Gehalt im Blut bisheriger humaner Studien.

Proben	Gehalt in μM ^a				Gesunde	Patienten	Referenz
	NAD total	NAD ⁺	NADH	NAD ⁺ /NADH-Ratio			
Plasma	~ 550				x		Guest <i>et al.</i> , 2014
Plasma	< 0,07	< 0,03	< 0,04	< 1,4	x	x	Shi <i>et al.</i> , 2017
Plasma				2,0	x	x	Kao <i>et al.</i> , 2014
Serum			< 1,2	x ^b	x		Singhal und Zhang, 2006
Serum	~ 55	~ 27	~ 18	~ 1,5	x	x	Braidy <i>et al.</i> , 2013

^a Konzentrationen sind mittlere Angaben der gesunden Probanden

^b Kongressabstrakt ohne detaillierte Zahlenangaben

x, Probanden der Studie

NAD⁺, oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid; NADH, reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid

In meiner Studienpopulation lag der gemessene Plasmagesamtgehalt für NAD bei durchschnittlich 1,34 μM in einem Bereich zwischen 0,44 μM und 2,88 μM . Dabei stimmen meine Messwerte am besten mit den Werten überein, die in einem Kongressbeitrag von Singhal und Zhang (2006) vorgestellt worden sind (**Tab. 4**). In dieser Studie wurde der Serumgehalt von NADH in einem *Enzymatic Cycling Assay* bestimmt, den auch ich für meine Messungen verwendet habe. Obwohl auch Braidy *et al.* (2013) und Guest *et al.* (2014) einen *Enzymatic Cycling Assay* zur Bestimmung von extrazellulärem NAD im Blut verwendet haben, sind meine ermittelten Werte dagegen deutlich geringer. Nach genauem Vergleich mit deren Messprotokoll dürfte ein Grund dafür sein, dass beide Studien keine Kinetik, sondern eine Endpunktmessung der *Enzymatic Cycling*-Reaktion nach bereits 10 Minuten Enzymreaktion durchgeführt haben (vgl. **Abb. 8** unter Beachtung des anfänglich hyperbolen Kurvenverlaufs der Enzymreaktion bei Plasmaproben). Zusätzlich ist in den beiden beschriebenen Studien nicht erwähnt, ob die verwendeten Proben vor der Untersuchung filtriert wurden (Braidy *et al.*, 2013; Guest *et al.*, 2014). Die Filtration stellt jedoch einen essentiellen Bestandteil der Enzymmessung dar, weil so verhindert wird, dass größere Proteine die Enzymreaktion stören. Die Studie von Shi *et al.* (2017), welche keine Angaben zum Messverfahren gemacht hat, zeigt dagegen sehr geringe NAD-Gehalte im Blutplasma. Diese Werte sind allerdings unglaublich, da sie unterhalb des Detektionsschwellenwertes für die *Enzymatic Cycling*-Reaktion liegen (0,15 μM entsprechend der Enzymkinetik in **Abb. 8**).

Andere Plasmamoleküle liegen in humanem Blut häufig mit höheren Konzentrationen vor als NAD, wie z.B. Albumin, welches mit durchschnittlich 50 mg/l Plasma das am häufigsten vorkommende Plasmaprotein ist (Parviainen *et al.*, 2011). Genauso gibt es auch Moleküle, die geringfügig im Plasma vorkommen. Darunter fallen z.B. die Zytokine, die im Bereich von pg/ml im Plasma gemessen wurden (Parviainen *et al.*, 2011). NAD mit Konzentrationen von umgerechnet 0,89 $\mu\text{g/ml}$ (1,34 μM) liegt darüber. Trotzdem bleibt NAD ein Molekül mit vergleichsweise geringen Plasmawerten.

Der vice-versa-Vergleich zwischen allen humanen Studien, die sich mit der Bestimmung von extrazellulärem NAD im Blut beschäftigt haben, zeigt, dass es technische Schwierigkeiten bei der NAD-Bestimmung gibt. Auch konnte ich zeigen, dass - trotz viel Etablierungsarbeit - die technische Standardabweichung der *Enzymatic Cycling*-Reaktion mit durchschnittlich 30 % des errechneten Mittelwertes nicht gering ist (**Abb. 9**). Gründe dafür dürften eine zu geringe Sensitivität des Assays aber auch, trotz vorheriger Filtration (**Abb. 6**), verbleibende Assay-beeinflussende Bestandteile im Blutplasma sein.

Da die HPLC nicht genügend sensitiv ist, ist der *Enzymatic Cycling Assay* in niedrigen Messbereichen, wie sie im Blut vorkommen, die geeignetere Bestimmungsmethode für NAD. Auf der einen Seite sind enzymatische Reaktionen zwar einfach und im Multiwellformat durchzuführen, auf der anderen Seite werden sie aber durch meist unbekannte Faktoren im Blut beeinflusst. Diesen Umstand konnte ich in der Auswertung der unbehandelten Plasmaproben im hyperbolen Kurvenverlauf beobachten (**Abb. 8**), der vermutlich durch interferierende Plasmamoleküle ausgelöst wurde. Dabei könnte es sich z.B. um ein niedermolekulares Molekül handeln, das die Reaktion beschleunigte. Da bei erhitztem Plasma initial kein hyperboler Kurvenverlauf zu beobachten war, ist das interferierende Molekül vermutlich hitzelabil. Möglich wäre auch eine Interaktion mit mehreren aktivierenden als auch inhibierenden Faktoren, die insgesamt eine Reaktionssteigerung bewirken. Vermutlich sind diese Faktoren nach einigen Minuten vollständig verbraucht, sodass der *steady state* der Enzymreaktion erreicht wird. Ein weiterer Grund für eine hohe Varianz könnte darin liegen, dass NAD generell äußerst sensibel gegenüber äußeren Einflüssen ist. Zu den äußeren Einflüssen zählen der pH-Wert, die Temperatur, die Lagerungsdauer vor der NAD-Messung und die gewählte Pufferlösung (Lowry *et al.*, 1961). In dem Zusammenhang könnten auch das mehrmalige Einfrieren und erneute Auftauen der verwendeten Proben eine Rolle spielen. Die einheitliche NAD-Messung wird zusätzlich verkompliziert durch die Tatsache, ob gebundenes und ungebundenes NAD oder nur das ungebundene NAD gemessen wird (Zhu *et al.*, 2015). In *Enzymatic Cycling Assays* wird allein das ungebundene NAD gemessen, während bei der ³¹P MRS-Methode davon auszugehen ist, dass beide Zustandsformen und damit das gesamte in einer Zelle enthaltene NAD gemessen wird (Zhu *et al.*, 2015). Eine weitere Limitation der Studie stellt die Probandenzahl dar. So sollten überregionale NAD-Untersuchungen möglicherweise innerhalb einer Kohorten-Studie, erwogen werden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erlangen und noch mehr Klarheit über eine mögliche Alters- bzw. Geschlechtsabhängigkeit des NAD⁺/NADH-Status im Blutplasma zu gewinnen.

Zusätzlich habe ich den NAD-Status im Speichel gemessen. Es wurden sehr geringe Konzentrationen ermittelt, die darauf zurückzuführen sind, dass der Speichel hauptsächlich aus dem wässrigen Anteil des Blutes filtriert wird, während andere Blutbestandteile nicht filtriert werden (Pedersen *et al.*, 2018).

5.3.1 Plasma-NAD und Alter

Bisherige Studien zu den intrazellulären NAD⁺-Gehalten in tierischen und humanen Probenmaterialien zeigten eine Abnahme von NAD⁺ bzw. NAD⁺/NADH mit steigendem Alter (Yoshino *et al.*, 2011; Massudi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016; Yaku *et al.*, 2018). Da auch die im Kongressbeitrag von Singhal und Zhang (2006) berichtete Studie eine altersabhängige Abnahme von NAD⁺/NADH im Blut humaner Probanden (46 - 78 Jahre) andeutete, habe auch ich einen Einfluss des kalendarischen Alters auf den Plasma-NAD-Gehalt erwartet. Entgegen meiner Erwartung, zeigte meine Studie allerdings keinen Einfluss des kalendarischen Alters oder anderer altersrelevanter Parameter, wie die Haut-AF oder die PWG, auf den Gesamtgehalt an NAD und die NAD⁺/NADH-Redoxratio im Blut. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Gehalt und Redoxratio von extrazellulärem NAD bei gesunden Personen zumindest im Blut zeitlebens stabil sind.

5.3.2 Plasma-NAD und Geschlecht

Im Gegensatz zum Alter konnte meine Studie allerdings einen Einfluss des Geschlechtes auf die NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma identifizieren. Analog der im Kongressbeitrag von Singhal und Zhang (2006) berichteten Studie mit gesunden Probanden, war auch in meiner Studiengruppe der relative Anteil an NAD⁺ bei den Frauen leicht höher als bei den Männern. Die anderen Studien aus **Tabelle 4** fanden diese Geschlechterdifferenz nicht (Braidy *et al.*, 2013; Guest *et al.*, 2014) oder haben sie nicht untersucht (Kao *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Warum sowohl Braidy *et al.* (2013) als auch Guest *et al.* (2014) keinen geschlechterabhängigen Einfluss auf die Redoxratio von extrazellulärem NAD im Blut ermittelt haben, könnte an den bereits erwähnten technischen Unzulänglichkeiten (siehe 5.3.1), der Ungleichverteilung von Männern und Frauen in deren gesunden Kohorten sowie dem simultanen Einfluss des Alters liegen. So konnte ich im Rahmen meiner Studie zeigen, dass es nur bei jungen bis mittelalten Probanden Unterschiede in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio zwischen beiden Geschlechtern gab. Bei der Einstufung der Probanden nach Alter erwiesen sich dabei Parameter für das biologische Alter (PWG, Haut-AF) als sinnvoller als das kalendarische Alter. Letzteres bestärkt auch den Nutzen von sogenannten Biomarkern des Alters.

Mehrere Faktoren könnten die Geschlechterdifferenz in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio und deren Altersabhängigkeit begründen. Zum einen könnte in der NAD⁺-freisetzenden Zelle schon die Bildung von NAD⁺ bei Frauen erhöht oder bei Männern vermindert sein, so z.B. über das Enzym NAMPT, welches sowohl intra- als auch extrazellulär auf die NAD-Synthese einwirkt (Garten *et al.*, 2009). Auch die orale Aufnahme von NAD⁺-

Vorstufen könnte eine Rolle spielen. Da Frauen häufiger zum Konsum von Nahrungsergänzungsmitteln neigen als Männer, jedoch mit zunehmendem Alter auch mehr Männer Nahrungsergänzungsmittel einnehmen, könnte ein solches Verhalten ebenfalls das Aufheben der Geschlechtsunterschiede im höheren Alter erklären (Dickinson und MacKay, 2014). Zum anderen könnten geschlechtsspezifische Unterschiede im Freisetzungsmechanismus existieren. NAD⁺ wird durch Cx43 aus den Zellen freigesetzt (Song *et al.*, 2011). Daher könnte der Plasmagehalt an NAD entscheidend von der Aktivität der Cx43-bildenden Zellen abhängen, also von Herzmuskelzellen und Nervenzellen (Mühlfeld *et al.*, 2010; Márquez-Rosado *et al.*, 2012). Für Cx43 wurde zumindest ein altersabhängiges vermindertes Vorkommen in Herzen männlicher Meerschweinchen, sowie in Astrozyten männlicher Mäuse nachgewiesen (Nagibin *et al.*, 2016; Bronzuoli *et al.*, 2019).

Geschlechtsspezifische Unterschiede im Gehalt an extrazellulären NAD⁺-Oxidasen könnten die Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio genauso beeinflussen, wobei die Renalase eine potentielle extrazelluläre NAD⁺-Oxidase ist, deren Gehalte jedoch nicht bestimmt werden konnte (vgl. 5.2). Während einige NADH-Oxidasen zumindest bekannt sind, sind nach aktueller Datenlage keine Reduktasen erforscht. Da im Blut aber auch NADH nachweisbar ist, müssen extrazelluläre NAD⁺-Reduktasen existieren. Zuletzt kommen geschlechtsspezifische Unterschiede in der NAD-Bindung an NAD⁺-verbrauchende Enzyme auch in Frage, da durch den *Enzymatic Cycling Assay* nur das freie NAD bestimmt werden kann. Beispielsweise könnte eine vermehrte Bindung von NAD⁺ an CD38 bei Männern auftreten. Diese Annahmen würden in den Kontext passen, dass Männer zusätzlich zur NAD⁺/NADH-Ratio auch niedrigere NAD-Gesamtgehalte haben. Mit den Ergebnissen von Camacho-Pereira *et al.* (2016) könnte das Verschwinden der Geschlechterdifferenz in der Plasma-NAD⁺/NADH-Ratio älterer Probanden ansatzweise erklärt werden. Sie zeigten, dass CD38 bei älteren Mäusen vermehrt vorliegt und dementsprechend mehr extrazelluläres NAD⁺ durch CD38 verbraucht wird. Da die anfänglichen Erwartungen, dass der NAD-Status im Plasma altersabhängig ist, nicht bestätigt wurden, werden die Regulationsmechanismen hinter dem NAD-Status im Plasma weitaus komplexer sein als anfänglich angenommen und müssen noch weiter untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In einer Normalkohorte aus der Region Halle-Saalekreis gibt das kalendarische Alter einen besseren Hinweis auf die Gefäßalterung bei Mann und Frau als die getesteten biologischen Faktoren, zu denen die Haut-AF sowie der Plasmagehalt an NAD zählen. Das Verhältnis von NAD^+ zu NADH im Plasma ist bei den Frauen höher als bei gleichaltrigen Männern. Mit dem höheren Alter, insbesondere dem höheren vaskulären Alter und der mit dem Alter erhöhten Haut-AF, verschwindet der geschlechterabhängige Unterschied in der Redoxratio von extrazellulärem NAD^+/NADH . Die Regulationsmechanismen, die hinter den zwischen beiden Geschlechtern gefundenen Unterschieden stehen, sind noch nicht bekannt. Detaillierte Studien, zu denen auch die korrekte Bestimmung der potentiellen extrazellulären NADH-Oxidase Renalase gehören, sind nun notwendig, um den simultanen Einfluss von Alter und Geschlecht auf die NAD^+/NADH -Ratio im Blutplasma zu identifizieren.

7 Literaturverzeichnis

Referenzen

Abdelhafiz AH, Sinclair AJ (2015) Diabetes, Nutrition, and Exercise. *Clin Geriatr Med* 31(3):439-51.

Abdul-Salam VB, Ramrakha P, Krishnan U, Owen DR, Shalhoub J, Davies AH, Tang TY, Gillard JH, Boyle JJ, Wilkins MR, Edwards RJ (2010) Identification and assessment of plasma lysozyme as a putative biomarker of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(5): 1027-1033.

Alefishat E, Alexander SP, Ralevic V (2015) Effects of NAD at purine receptors in isolated blood vessels. *Purinergic Signal* 11(1): 47-57.

AlGhatrif M, Strait JB, Morrell C, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG (2013) Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: The Baltimore longitudinal study of aging. *Hypertension* 62(5): 934-941.

Amah G, Ouardani R, Pasteur-Rousseau A, Voicu S, Safar ME, Kubis N, Bonnin P (2017) Extreme-Dipper Profile, Increased Aortic Stiffness, and Impaired Subendocardial Viability in Hypertension. *Am J Hypertens* 30(4): 417-426.

Beaupre BA, Carmichael BR, Hoag MR, Shah DD, Moran GR (2013a) Renalase is an α -NAD(P)H oxidase/anomerase. *J Am Chem Soc* 135(37): 13980-13987.

Beaupre BA1, Hoag MR, Carmichael BR, Moran GR (2013b) Kinetics and equilibria of the reductive and oxidative half-reactions of human renalase with α -NADPH. *Biochemistry* 52(49): 8929-8937.

Belenky P, Bogan KL, Brenner C (2007) NAD⁺ metabolism in health and disease. *Trends Biochem Sci* 32(1): 12-19.

Billington RA, Bruzzone S, De Flora A, Genazzani AA, Koch-Nolte F, Ziegler M, Zocchi E (2006) Emerging functions of extracellular pyridine nucleotides. *Mol Med* 12(11-12): 324-327.

Boini KM, Zhang C, Xia M, Han WQ, Brimson C, Poklis JL, Li PL (2010) Visfatin-induced lipid raft redox signaling platforms and dysfunction in glomerular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1801(12): 1294-1304.

Bosneaga E, Kim C, Shen B, Watanabe T, Morre DM, Morr  DJ (2008) ECTO-NOX (ENOX) proteins of the cell surface lack thioredoxin reductase activity. *Biofactors* 34(3): 245-251.

Braidy N, Lim CK, Grant R, Brew BJ, Guillemin GJ (2013) Serum nicotinamide adenine dinucleotide levels through disease course in multiple sclerosis. *Brain Res* 1537: 267-272.

Briet M, Boutouyrie P, Laurent S, London GM (2012) Arterial stiffness and pulse pressure in CKD and ESRD. *Kidney Int* 82(4): 388-400.

Bronzuoli MR, Facchinetti R, Valenza M, Cassano T, Steardo L, Scuderi C (2019) Astrocyte Function Is Affected by Aging and Not Alzheimer's Disease: A Preliminary Investigation in Hippocampi of 3^xTg-AD Mice. *Front Pharmacol* 10: 644.

Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87(2): 659-797.

Camacho-Pereira J, Tarrag  MG, Chini CCS, Nin V, Escande C, Warner GM, Puranik AS, Schoon RA, Reid JM, Galina A, Chini EN (2016) CD38 Dictates Age-Related NAD

- Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab* 23(6): 1127-1139.
- Cantó C, Auwerx J (2011) NAD⁺ as a signaling molecule modulating metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 76: 291-8.
- Carbone F, Liberale L, Bonaventura A, Vecchiè A, Casula M, Cea M, Monacelli F, Caffa I, Bruzzzone S, Montecucco F, Nencioni A (2017) Regulation and Function of Extracellular Nicotinamide Phosphoribosyltransferase/Visfatin. *Compr Physiol* 7(2): 603-621.
- Cheng YC, Vyas A, Hymen E, Perlmutter LC (2011) Gender differences in orthostatic hypotension. *Am J Med Sci* 342(3): 221-225.
- Cho SK, Cho SK, Kim KH, Cho JY, Yoon HJ, Yoon NS, Hong YJ, Park HW, Kim JH, Ahn Y, Jeong MH, Cho JG, Park JC (2015) Effects of age on arterial stiffness and blood pressure variables in patients with newly diagnosed untreated hypertension. *Korean Circ J* 45(1): 44-50.
- Cocciolone AJ, Hawes JZ, Staiculescu MC, Johnson EO, Murshed M, Wagenseil JE (2018) Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 315(2): H189-H205.
- Connell NJ, Houtkooper RH, Schrauwen P (2019) NAD⁺ metabolism as a target for metabolic health: have we found the silver bullet? *Diabetologia* 62(6): 888-899.
- Convertino VA (1998) Gender differences in autonomic functions associated with blood pressure regulation. *Am J Physiol* 275(6): R1909-1920.
- Debowska M, Poleszczuk J, Dabrowski W, Wojcik-Zaluska A, Zaluska W, Waniewski J, (2018) Impact of hemodialysis on cardiovascular system assessed by pulse wave analysis. *PLoS One* 13(11): e0206446.
- Desir G (2012) Novel insights into the physiology of reninase and its role in hypertension and heart disease. *Pediatr Nephrol* 27(5):719-725.
- Dickinson A, MacKay D (2014) Health habits and other characteristics of dietary supplement users: a review. *Nutr J* 13: 14.
- Donato AJ, Pierce GL, Lesniewski LA, Seals DR (2009) Role of NF- κ B in age-related vascular endothelial dysfunction in humans. *Aging (Albany NY)* 1(8): 678-680.
- Doumas M, Papademetriou V, Faselis C, Kokkinos P (2013) Gender differences in hypertension: myths and reality. *Curr Hypertens Rep* 15(4): 321-330.
- Duca L, Blaise S, Romier B, Laffargue M, Gayral S, El Btaouri H, Kawecki C, Guillot A, Martiny L, Debelle L, Maurice P (2016) Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovasc Res* 110(3):298-308.
- Eckert S (2006) Blood pressure self measurement (BPSM). *MMW Fortschr Med* 148(37): 34-6.
- El Husseney MW, Mamdouh M, Shaban S, Ibrahim Abushouk A, Zaki MM, Ahmed OM, Abdel-Daim MM (2017) Adipokines: Potential Therapeutic Targets for Vascular Dysfunction in Type II Diabetes Mellitus and Obesity. *J Diabetes Res* 2017: 8095926.
- Franklin SS, Gustin W 4th, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, Levy D (1997) Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation* 96(1): 308-315.
- Friebe D, Neef M, Kratzsch J, Erbs S, Dittrich K, Garten A, Petzold-Quinque S, Blüher S, Reinehr T, Stumvoll M, Blüher M, Kiess W, Körner A (2011) Leucocytes are a major source of circulating nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)/pre-B cell colony (PBEF)/visfatin linking obesity and inflammation in humans. *Diabetologia* 54(5): 1200-1211.

- Garten A, Petzold S, Körner A, Imai S, Kiess W (2009) Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab* 20(3): 130-138.
- Gerds J, Brace EJ, Sasaki Y, DiAntonio A, Milbrandt J (2015) SARM1 activation triggers axon degeneration locally via NAD⁺ destruction. *Science* 348(6233): 453-457.
- Gohar EY, Pollock DM (2018) Sex-Specific Contributions of Endothelin to Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 20(7): 58.
- Gok Oguz E, Akoglu H, Ulusal Okyay G, Karaveli GURSOY G, Yildirim T, Merhametsiz O, Cimen T, Canbakan B, Yeter E, Aylı MD (2017) Increased serum renalase in peritoneal dialysis patients: is it related to cardiovascular disease risk? *Nefrologia* 37(2): 189-194.
- Gonzales JU, Hadri O (2016) Role of heart rate in the relation between regional body fat and subendocardial viability ratio in women. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 43(9): 789-794.
- Grahnert A, Klein C, Hauschildt S (2009) Involvement of P2X receptors in the NAD⁺-induced rise in [Ca²⁺]_i in human monocytes. *Purinergic Signal* 5(3): 309-319.
- Greenwald SE (2007) Ageing of the conduit arteries. *J Pathol* 211(2): 157-172.
- Guest J, Grant R, Mori TA, Croft KD (2014) Changes in oxidative damage, inflammation and [NAD(H)] with age in cerebrospinal fluid. *PLoS One* 9(1): e85335.
- Guzik TJ, Touyz RM (2017) Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension* 70(4): 660-667.
- Harden A, Young WJ (1906) The alcoholic ferment of yeast-juice. Part II.—The coferment of yeast-juice. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 78(526): 369-375.
- He B, Hao J, Sheng W, Xiang Y, Zhang J, Zhu H, Tian J, Zhu X, Feng Y (2014) Correlation between plasma renalase level and coronary artery disease. *Pak J Med Sci* 30(5): 863-967.
- Higashi H, Okayama H, Saito M, Morioka H, Aono J, Yoshii T, Hiasa G, Sumimoto T, Nishimura K, Inoue K, Ogimoto A, Higaki J (2013) Relationship between augmentation index and left ventricular diastolic function in healthy women and men. *Am J Hypertens* 26(11): 1280-1286.
- Hikosaka K, Yaku K, Okabe K, Nakagawa T (2019) Implications of NAD metabolism in pathophysiology and therapeutics for neurodegenerative diseases. *Nutr Neurosci* 7:1-13.
- Hofmann B, Adam AC, Jacobs K, Riemer M, Erbs C, Bushnaq H, Simm A, Silber RE, Santos AN (2013) Advanced glycation end product associated skin autofluorescence: a mirror of vascular function? *Exp Gerontol* 48(1): 38-44.
- Hofmann B, Jacobs K, Navarrete Santos A, Wienke A, Silber RE, Simm A (2015) Relationship between cardiac tissue glycation and skin autofluorescence in patients with coronary artery disease. *Diabetes Metab* 41(5): 410-415.
- Horváth IG, Németh A, Lenkey Z, Alessandri N, Tufano F, Kis P, Gaszner B, Cziráki A (2010) Invasive validation of a new oscillometric device (Arteriograph) for measuring augmentation index, central blood pressure and aortic pulse wave velocity. *J Hypertens* 28(10): 2068-2075.
- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280(7): 605-613.
- Imai SI (2016) The NAD World 2.0: the importance of the inter-tissue communication mediated by NAMPT/NAD⁺/SIRT1 in mammalian aging and longevity control. *NPJ Syst Biol Appl* 2: 16018.

- Imai S, Guarente L (2014) NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol* 24(8): 464-471.
- Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* 89(1): 81-88.
- Jialal I, Verma S, Devaraj S (2009) Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase by C-Reactive Protein: Clinical Relevance. *Clin Chem* 55(2): 206–208.
- Kao CL, Tsai KL, Cheng YY, Kuo CH, Lee SD, Chan RC (2014) Vestibular rehabilitation ameliorates chronic dizziness through the SIRT1 axis. *Front Aging Neurosci* 6: 27.
- Kim SY, Cohen BM, Chen X, Lukas SE, Shinn AK, Yuksel AC, Li T, Du F, Öngür D (2017) Redox Dysregulation in Schizophrenia Revealed by in vivo NAD⁺/NADH Measurement. *Schizophr Bull* 43(1): 197-204.
- Klein C, Grahnert A, Abdelrahman A, Müller CE, Hauschildt S (2009) Extracellular NAD⁺ induces a rise in [Ca²⁺]_i in activated human monocytes via engagement of P2Y(1) and P2Y(11) receptors. *Cell Calcium* 46(4): 263-272.
- Koc-Zorawska E, Malyszko J, Zbroch E, Malyszko J, Mysliwiec M (2012) Vascular adhesion protein-1 and renalase in regard to diabetes in hemodialysis patients. *Arch Med Sci* 8(6): 1048-1052.
- Laugesen E, Høyem P, Fleischer J, Kumarathas I, Knudsen ST, Hansen KW, Christiansen JS, Hansen TK, Poulsen PL (2016) Reduced Subendocardial Viability Ratio Is Associated With Unfavorable Cardiovascular Risk Profile in Women With Short Duration of Type 2 Diabetes. *Am J Hypertens* 29(10): 1165-1172.
- Li G, Xu J, Wang P, Velazquez H, Li Y, Wu Y, Desir GV (2008) Catecholamines regulate the activity, secretion, and synthesis of renalase. *Circulation* 117(10): 1277-1282.
- Liu CY, Huang QF, Cheng YB, Guo QH, Chen Q, Li Y, Wang JG (2017) A Comparative Study on Skin and Plasma Advanced Glycation End Products and Their Associations with Arterial Stiffness. *Pulse (Basel)* 4(4): 208-218.
- Lowry OH, Passonneau JV, Rock MK (1961) The stability of pyridine nucleotides. *J Biol Chem* 236(10): 2756- 2759.
- Lu M, Zhu XH, Zhang Y, Chen W (2014) Intracellular redox state revealed by in vivo ³¹P MRS measurement of NAD⁺ and NADH contents in brains. *Magn Reson Med* 71(6):1959-72.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-241.
- Maciorkowska D, Zbroch E, Malyszko J (2015) Circulating renalase, catecholamines, and vascular adhesion protein 1 in hypertensive patients. *J Am Soc Hypertens* 9(11): 855-864.
- Magalhães P, Capingana DP, Silva AB, Ferreira AV, de Sá Cunha R, Rodrigues SL, Mill JG (2013) Age- and gender-specific reference values of pulse wave velocity for African adults: preliminary results. *Age (Dordr)* 35(6): 2345-2355.
- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S (2008) Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 88(3): 841-886.
- Malyszko J, Malyszko JS, Rysz J, Mysliwiec M, Tesar V, Levin-Iaina N, Banach M (2013) Renalase, hypertension, and kidney - the discussion continues. *Angiology* 64(3): 181-187.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes

- PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F (2013) 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 31(7): 1281-357.
- Marcus RH, Korcarz C, McCray G, Neumann A, Murphy M, Borow K, Weinert L, Bednarz J, Gretler DD, Spencer KT (1994) Noninvasive method for determination of arterial compliance using Doppler echocardiography and subclavian pulse tracings. Validation and clinical application of a physiological model of the circulation. *Circulation* 89(6): 2688-2699.
- Marques CMS, Nunes EA, Lago L, Pedron CN, Manieri TM, Sato RH, Junior VXO, Cerchiaro G (2017) Generation of Advanced Glycation End-Products (AGEs) by glycooxidation mediated by copper and ROS in a human serum albumin (HSA) model peptide: reaction mechanism and damage in motor neuron cells. *Mutat Res* 824: 42-51.
- Márquez-Rosado L, Solan JL, Dunn CA, Norris RP, Lampe PD (2012) Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. *Biochim Biophys Acta* 1818(8): 1985-1992.
- Massudi H, Grant R, Braidy N, Guest J, Farnsworth B, Guillemin GJ (2012) Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One* 7(7): e42357.
- McAlister FA, Straus SE (2001) Measurement of blood pressure: an evidence based review. *BMJ* 322(7291): 908–911.
- Mikael LR, Paiva AMG, Gomes MM, Sousa ALL, Jardim PCBV, Vitorino PVO, Euzébio MB, Sousa WM, Barroso WKS (2017) Vascular Aging and Arterial Stiffness. *Arq Bras Cardiol* 109(3): 253-258.
- Milani M, Ciriello F, Baroni S, Pandini V, Canevari G, Bolognesi M, Aliverti A (2011) FAD-binding site and NADP reactivity in human renalase: a new enzyme involved in blood pressure regulation. *J Mol Biol* 411(2): 463-473.
- Moore J, Thibeault S (2012) Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease. *J Voice* 26(3): 269-275.
- Moran GR (2015) The catalytic function of renalase: A decade of phantoms. *Biochim Biophys Acta* 1864(1): 177-186.
- Mozos I, Maidana JP, Stoian D, Stehlik M (2017) Gender differences of arterial stiffness and arterial age in smokers. *Int J Environ Res Public Health* 14(6): 565.
- Mulder DJ, Water TV, Lutgers HL, Graaff R, Gans RO, Zijlstra F, Smit AJ (2006) Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol Ther* 8(5): 523-535.
- Mühlfeld C, Cetegen C, Freese S, Volkmann R, Hellige G, Vetterlein F (2010) Phosphorylation of extrajunctional Cx43 in ischemic-preconditioned rat hearts. *J Surg Res* 162(1): e1-8.
- Nagibin V, Egan Benova T, Viczenczova C, Szeiffova Bacova B, Dovinova I, Barancik M, Tribulova N (2016) Ageing related down-regulation of myocardial connexin-43 and up-regulation of MMP-2 may predict propensity to atrial fibrillation in experimental animals. *Physiol Res* 65 Suppl 1: S91-S100.
- Naylor AR, Ricco JB, de Borst GJ, Debus S, de Haro J, Halliday A, Hamilton G, Kakisis J, Kakkos S, Lepidi S, Markus HS, McCabe DJ, Roy J, Sillesen H, van den Berg JC, Vermassen F, Kolh P, Chakfe N, Hinchliffe RJ, Koncar I, Lindholt JS, de Ceniga MV, Verzini F, Archie J, Bellmunt S, Chaudhuri A, Koelemay M, Lindahl AK, Padberg F,

- Venermo M (2018) Editor's choice: Management of atherosclerotic carotid and vertebral artery disease: 2017 clinical practice guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 55: 3-81.
- Nikiforov A, Kulikova V, Ziegler M (2015) The human NAD metabolome: Functions, metabolism and compartmentalization. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 50(4): 284-297.
- Oguz EG, GURSOY GK, Yayar O, Yildirim T, Cimen T, Bulut C, Eser B, Canbakan B, Yeter E, Ayli MD (2016) Increased serum renalase in hemodialysis patients: is it related to left ventricular hypertrophy? *Ren Fail* 38(8): 1180-1186.
- Okabe K, Yaku K, Tobe K, Nakagawa T (2019) Implications of altered NAD metabolism in metabolic disorders. *J Biomed Sci* 26(1): 34.
- Parviainen V, Joenväärä S, Tukiainen E, Ilmakunnas M, Isoniemi H, Renkonen R (2011) Relative quantification of several plasma proteins during liver transplantation surgery. *J Biomed Biotechnol* 2011: 248613.
- Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J (2018) Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil* 45(9): 730-746.
- Pehar M, Harlan BA, Killoy KM, Vargas MR (2018) Nicotinamide Adenine Dinucleotide Metabolism and Neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 28(18): 1652-1668.
- Peri-Okonny PA, Ayers C, Maalouf N, Das SR, de Lemos JA, Berry JD, Turer AT, Neeland IJ, Scherer PE, Vongpatanasin W (2017) Adiponectin protects against incident hypertension independent of body fat distribution: observations from the Dallas Heart Study. *Diabetes Metab Res Rev* 33(2).
- Perloff D, Grim C, Flack J, Frohlich ED, Hill M, McDonald M, Morgenstern BZ (1993) Human blood pressure determination by sphygmomanometry. *Circulation* 88(5 Pt 1): 2460-2470.
- Poleszczuk J, Debowska M, Dabrowski W, Wojcik-Zaluska A, Zaluska W, Waniewski J (2018) Subject-specific pulse wave propagation modeling: Towards enhancement of cardiovascular assessment methods. *PLoS One* 13(1): e0190972.
- Privšek E, Hellgren M, Råstam L, Lindblad U, Daka B (2018) Epidemiological and clinical implications of blood pressure measured in seated versus supine position. *Medicine (Baltimore)* 97(31): e11603.
- Przybyłowski P, Koc-Zorawska E, Malyszko JS, Mysliwiec M, Malyszko J (2013) Renalase and endothelial dysfunction in heart transplant recipients. *Transplant Proc* 45(1): 394-396.
- Qi C, Wang L, Zhang M, Shao X, Chang X, Fan Z, Cao Q, Mou S, Wang Q, Yan Y, Desir G, Ni Z (2015) Serum Renalase Levels Correlate with Disease Activity in Lupus Nephritis. *PLoS One* 10(10): e0139627.
- Randag AC, Graaff R, Dreise MM, Vierkötter A, Werker PM, Stenekes MW (2015) Body mass index, chronological age and hormonal status are better predictors of biological skin age than arm skin autofluorescence in healthy women who have never smoked. *Br J Dermatol* 173(5): 1199-1204.
- Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, Milbrandt J, Kiess W, Imai S (2007) Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 6(5): 363-375.
- Rienzo MD, Parati G, Radaelli A, Castiglioni P (2009) Baroreflex contribution to blood pressure and heart rate oscillations: time scales, time-variant characteristics and nonlinearities. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 367(1892): 1301-1318.

- Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, Gonzalez C, Maury E, Lorrain S, Gin H, Barberger-Gateau P (2015) Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 29(2): 270-274.
- Romacho T, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C (2013) Visfatin/Nampt: an adipokine with cardiovascular impact. *Mediators Inflamm* 2013: 946427.
- Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM (2012) The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood* 120(12): 2365-2375.
- Scioli MG, Bielli A, Arcuri G, Ferlosio A, Orlandi A (2014) Ageing and microvasculature. *Vasc Cell* 6: 19.
- Severina IS, Fedchenko VI, Veselovsky AV, Medvedev AE (2015) The history of renalase from amine oxidase to a a-NAD(P)H-oxidase/anomerase. *Biomed Khim* 61(6): 667-679.
- Shi H, Enriquez A, Rapadas M, Martin EMMA, Wang R, Moreau J, Lim CK, Szot JO, Ip E, Hughes JN, Sugimoto K, Humphreys DT, Mclnerney-Leo AM, Leo PJ, Maghzal GJ, Halliday J, Smith J, Colley A, Mark PR, Collins F, Sillence DO, Winlaw DS, Ho JWK, Guillemin GJ, Brown MA, Kikuchi K, Thomas PQ, Stocker R, Giannoulatou E, Chapman G, Duncan EL, Sparrow DB, Dunwoodie SL (2017) NAD Deficiency, Congenital Malformations, and Niacin Supplementation. *N Engl J Med* 377(6): 544-552.
- Singhal RP, Zhang JJ (2006) NAD⁺ and NADH concentrations in younger and older human adults. *Faseb J* 20: A1357.
- Skrzypczyk P, Przychodzień J, Mizerska-Wasiak M, Kuźma-Mroczkowska E, Okarska-Napierała M, Górka E, Stelmaszczyk-Emmel A, Demkow U, Pańczyk-Tomaszewska M (2017) Renalase in Children with Glomerular Kidney Diseases. *Adv Exp Med Biol* 1021: 81-92.
- Song EK, Rah SY, Lee YR, Yoo CH, Kim YR, Yeom JH, Park KH, Kim JS, Kim UH, Han MK (2011) Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport. *J Biol Chem* 286(52): 44480-44490.
- Stang A, Stang M (2014) An inter-state comparison of cardiovascular risk factors in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 111(31-32): 530-536.
- Stec A (2017) Rs10887800 renalase gene polymorphism influences the level of circulating renalase in patients undergoing hemodialysis but not in healthy controls. *BMC Nephrol* 18(1): 118.
- Stein LR, Imai S (2012) The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23(9): 420-428.
- Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG (2013) The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* 75: 23–47.
- Stern S, Behar S, Gottlieb S (2003) Cardiology patient pages. Aging and diseases of the heart. *Circulation* 108(14): e99-101.
- Sternlicht H, Bakris GL (2017) The kidney in hypertension. *Med Clin North Am* 101(1): 207-217.
- Stocker R, Keaney JF (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4): 1381-1478.

- Stojanovic D, Cvetkovic T, Stojanovic M, Bojanic V, Stefanovic N, Stojanovic I (2015) The assessment of renalase: searching for the best predictor of early renal dysfunction by multivariate modeling in stable renal transplant recipients. *Ann Transplant* 20: 186-192.
- Thornalley PJ (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact* 23(1-2): 125-150.
- Tsioufis C, Dimitriadis K, Selima M, Thomopoulos C, Mihos C, Skiadas I, Tousoulis D, Stefanadis C, Kallikazaros I (2007) Low-grade inflammation and hypoadiponectinaemia have an additive detrimental effect on aortic stiffness in essential hypertensive patients. *Eur Heart J* 28(9): 1162-1169.
- Umapathy NS, Zemskov EA, Gonzales J, Gorshkov BA, Sridhar S, Chakraborty T, Lucas R, Verin AD (2010) Extracellular beta-nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) promotes the endothelial cell barrier integrity via PKA- and EPAC1/Rac1-dependent actin cytoskeleton rearrangement. *J Cell Physiol* 223(1): 215-223.
- Vallejo S, Romacho T, Angulo J, Villalobos LA, Cercas E, Leivas A, Bermejo E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C (2011) Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS One* 6(11): e27299.
- van Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, Smit AJ, Lutgers HL, Wolffenbuttel BHR (2019) Skin autofluorescence predicts incident type 2 diabetes, cardiovascular disease and mortality in the general population. *Diabetologia* 62(2): 269-280.
- Van Waateringe RP, Slagter SN, van der Klauw MM, van Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, Lutgers HL, Wolffenbuttel BHR (2016) Lifestyle and clinical determinants of skin autofluorescence in a population-based cohort study. *Eur J Clin Invest* 46(5): 481-490.
- Villarreal-Molina MT, Antuna-Puente B (2012) Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie* 94(10): 2143-2149.
- Wang Y, Lv YB, Chu C, Wang M, Xie BQ, Wang L, Yang F, Yan DY, Yang RH, Yang J, Ren Y, Yuan ZY, Mu JJ (2016) Plasma Renalase is not associated with blood pressure and brachial-ankle pulse wave velocity in Chinese adults with normal renal function. *Kidney Blood Press Res* 41(6): 837-847.
- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb CD, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA, Williamson JD, Wright JT, Jr (2017) 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. *J Am Coll Cardiol* 71(19): e127-e248.
- Wilkinson IB, Qasem A, McEnery CM, Webb DJ, Avolio AP, Cockcroft JR (2002) Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo. *Circulation* 105(2): 213-217.
- Wirth A, Wang S, Takefuji M, Tang C, Althoff TF, Schweda F, Wettschreck N, Offermanns S (2016) Age-dependent blood pressure elevation is due to increased vascular smooth muscle tone mediated by G-protein signalling. *Cardiovasc Res* 109(1):131-40.

- Wu Y, Xu J, Velazquez H, Wang P, Li G, Liu D, Sampaio-Maia B, Quelhas-Santos J, Russell K, Russell R, Flavell RA, Pestana M, Giordano F, Desir GV (2011) Renalase deficiency aggravates ischemic myocardial damage. *Kidney Int* 79(8): 853-860.
- Wybraniec MT, Mizia-Stec K, Trojnaraska O, Chudek J, Czerwieńska B, Wikarek M, Więcek A (2014) Low plasma renalase concentration in hypertensive patients after surgical repair of coarctation of aorta. *J Am Soc Hypertens* 8(7): 464-474.
- Xia M, Zhang C, Boini KM, Thacker AM, Li PL (2011) Membrane raft-lysosome redox signalling platforms in coronary endothelial dysfunction induced by adipokine visfatin. *Cardiovasc Res* 89(2): 401-409.
- Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J (2018) NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal* 28(3): 251-272.
- Xu J, Li G, Wang P, Velazquez H, Yao X, Li Y, Wu Y, Peixoto A, Crowley S, Desir GV (2005) Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure. *J Clin Invest* 115(5): 1275–1280.
- Xu X, Wang B, Ren C, Hu J, Greenberg DA, Chen T, Xie L, Jin K (2017) Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. *Aging Dis* 8(5): 590–610.
- Yaku K, Okabe K, Nakagawa T (2018) Simultaneous measurement of NAD metabolome in aged mice tissue using liquid chromatography tandem-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 32(6): e4205.
- Yoshida Y, Sugasawa T, Hoshino M, Tokinoya K, Ishikura K, Ohmori H, Takekoshi K (2017) Transient changes in serum renalase concentration during long-distancerunning: The case of an amateur runner under continuous training. *J Phys Fitness Sports Med* 6 (3): 159-166.
- Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S (2011) Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab* 14(4): 528-536.
- Yue X, Hu H, Koetsier M, Graaff R, Han C (2011) Reference values for the Chinese population of skin autofluorescence as a marker of advanced glycation end products accumulated in tissue. *Diabet Med* 28(7): 818-823.
- Zanoli L, Rastelli S, Inserra G, Castellino P (2015) Arterial structure and function in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 21(40): 11304-11311.
- Zbroch E, Malyszko J, Malyszko JS, Koc-Zorawska E, Mysliwiec M (2012) Renalase, a novel enzyme involved in blood pressure regulation, is related to kidney function but not to blood pressure in hemodialysis patients. *Kidney Blood Press Res* 35(6): 395-399.
- Zhou CC, Yang X, Hua X, Liu J, Fan MB, Li GQ, Song J, Xu TY, Li ZY, Guan YF, Wang P, Miao CY (2016) Hepatic NAD⁺ deficiency as a therapeutic target for non-alcoholic fatty liver disease in ageing. *Br J Pharmacol* 173(15): 2352-2368.
- Zhu XH, Lu M, Lee BY, Ugurbil K, Chen W (2015) In vivo NAD assay reveals the intracellular NAD contents and redox state in healthy human brain and their age dependences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(9): 2876-2881.
- Zieman SJ, Melenovsky V, Kass DA (2005) Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5): 932-943.

Monographien

Gesundheit - Todesursachen in Deutschland, 2015, Fachserie 12, Reihe 4, Abbildung 1 Häufigste Todesursachen 2015, Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017.

Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012, S. 256-269.

Paquet KJ, Savic B: Allgemeine Chirurgie für Zahnmediziner. 1.Aufl., Springer- Verlag, Heidelberg, 1978, S. 25-31, 296.

Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie. 8.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012, S. 202, 203.

Herausgeberwerke

Barreiro Cotón S, Schaps KP: Kardiologie. In: Schaps KP, Kessler O, Fetzner U (Hrsg): Das Zweite - kompakt Innere Medizin, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, S. 8-11.

Barreiro Cotón S, Schaps KP: Angiologie. In: Schaps KP, Kessler O, Fetzner U (Hrsg): Das Zweite - kompakt Innere Medizin, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, S. 58.

Graefe KH: Teil B Klinische Pharmakologie übergreifender Systeme. In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (Hrsg): Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie, Thieme, Stuttgart, 2011, S. 145-166.

Graefe KH: Teil C Klinische Pharmakologie einzelner Organsysteme und wichtiger Indikationsgebiete In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H (Hrsg): Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie, Thieme, Stuttgart, 2011, S. 478-486.

8 Thesen

1. In einer Normalkohorte wird das biologische Alter der Gefäße besser durch das kalendarische Alter vorhergesagt als durch die ebenfalls mit dem Alter veränderte Autofluoreszenz der Haut.
2. Humanes Plasma enthält geringe Mikromolar-Konzentrationen an Nikotinamidadenindinukleotid (NAD), wobei der Anteil an NAD⁺ etwas höher als der von NADH ist.
3. In einer Normalkohorte hat das kalendarische Alter keinen Einfluss auf die NAD-Konzentration oder NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma.
4. Ausgewählte Parameter des vaskulären Alters (Blutdruck, Pulswellengeschwindigkeit) zeigen ebenfalls keinen Zusammenhang mit der NAD-Konzentration oder NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma.
5. Die NAD⁺/NADH-Ratio im Plasma war bis zum mittleren Alter bei den Frauen höher als bei den Männern aber nicht darüber hinaus.
6. Der Plasmagehalt von Renalase, einer potentiellen extrazellulären NADH-Oxidase, lässt sich derzeit technisch nicht einwandfrei auf dessen Rolle bei der geschlechter-abhängigen NAD⁺/NADH-Ratio bestimmen.

9 Anlagen

8

 UKH Universitätsklinikum Halle (Saale)
Allgemeiner Dokumentationsbogen

Studie: Altersabhängige Blutwerte des Renalase-NAD⁺/NADH-Systems in einer Normalpopulation

Studiennummer: NAD-.....

Herr: Frau: Titel:

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Kontaktdaten:

.....

.....

.....

Bevorzugter Kontakt: Telefon E-Mail Briefpost

Gibt es die folgenden Ausschlusskriterien nicht:

- < 18 Jahre Verwendung von Selbstbräunern
 (vermutete) Schwangerschaft

Erkrankungen:

- Tumorerkrankungen Niereninsuffizienz (\geq KDIGO G3)
 Herzinsuffizienz (\geq NYHA 2) Lebererkrankungen (Leberzirrhose, Hepatitis)
 Diabetes Typ I Diabetes Typ II mit Niereninsuffizienz
 Neurologische Erkrankungen (Alzheimer, Demenz, Parkinson)
 Chronisch entzündliche Erkrankungen (Multiple Sklerose, Rheuma, Morbus Crohn)
 akute Erkältung Fieber (..... °C)

Vorlage der Einwilligungserklärung: ja nein

Wenn ja, Folgeuntersuchungen an

Blut/Speichel eingewilligt: ja nein

Studienprotokoll und Bögen, NAD-Studie, Version 1.4., 04.01.2020

	 Universitätsklinikum Halle (Saale)
Erhebungsbogen	
Studie: Altersabhängige Blutwerte des Renalase-NAD ⁺ /NADH-Systems in einer Normalpopulation	
Studiennummer:	NAD-.....
Geschlecht:	<input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich
Größe:, m	Gewicht:, kg BMI (kg/m ²):
Kalendarisches Alter: Jahre
Biologisches Alter: (a.U. Hautfluoreszenz)
Pulswellengeschwindigkeit (m/s)*:aortal proximal Abstand cfcm Abstand bfcm
Pulswellenanalyse (m/s)*:	BP(liegend) / PPmmHg SEVR%
PulsHF	MAPmmHg COl/min SV ml Aug-Index%
	*keine Messung bei Probanden mit Herzrhythmusstörungen durchführen!
Blutdruck: / systolisch / diastolisch (vor Handkraftmessung) / systolisch / diastolisch (nach Handkraftmessung)
Puls (/min): (vor Handkraftmessung) (nach Handkraftmessung)
Handkraft (kg): links rechts (3 Versuche, max. Wert unterstreichen)
Händigkeit:	<input type="checkbox"/> links <input type="checkbox"/> rechts
Körperliche Aktivität:	<input type="checkbox"/> hoch <input type="checkbox"/> mäßig <input type="checkbox"/> kaum <input type="checkbox"/> keine
Berufliche/Private Belastung:	<input type="checkbox"/> sehr hoch <input type="checkbox"/> hoch <input type="checkbox"/> mäßig <input type="checkbox"/> gering
Raucher:	<input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> aktiv <input type="checkbox"/> passiv

- Ernährung:**
- gemischt überwiegend vegetarisch
 vegetarisch vegan
 Aufnahme kalorischer Nahrung ≤ 4 h vor der Untersuchung
 Alkoholkonsum in den letzten 24 h vor der Untersuchung

- Nahrungsergänzung:**
- Vitamin B3 Aminosäuren
 Andere Welche:

Allgemeinzustand (Selbsteinschätzung):

- sehr gut gut befriedigend schlecht

Infektanfälligkeit (Selbsteinschätzung):

- sehr normal gering

- Chronische Erkrankungen/Symptome:** nein ja

Wenn ja, welche (alphabetisch):

- Allergien
 Asthma
 Apnoe/Schnarchen
- Bluthochdruck behandelt: nein ja
- Diabetes mellitus Typ II seit wann (falls bekannt):
behandelt: Diät Medikamente
- Durchblutungsstörungen Arteriosklerose
 Andere Ursachen:
- Hauterkrankungen welche:
- Herzerkrankungen seit wann (falls bekannt):
 Angina pectoris Herzinfarkt
 Herzklappendefekt Rhythmusstörungen

Immunologische Erkrankungen welche:

Lungenerkrankungen COPD
 Andere:

Schilddrüsenerkrankung Unterfunktion Überfunktion

Schmerzen Migräne Stützapparat
 chronisch oft manchmal selten

Schwindelanfälle Ursache (falls bekannt):
 oft manchmal selten

Stoffwechselerkrankungen (außer Diabetes mellitus und Schilddrüsendysfunktion)
 Adipositas Gicht Andere:

Mundgesundheit: Zahnstein Karies
 Parodontitis Zahnfleischtaschen
..... (Anzahl mit >3 mm Tiefe)

Liste der eingenommen Medikamente:

Handelsname	Wirkstoff
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Einlagerung von Proben: Blutplasma Blutzellpellet
 EDTA EDTA
 Heparin Heparin
 Speichel: ml

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Erklärung zum Wahrheitsgehalt der Angaben

Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Luisa Katharina Sultana Genia Schwarzmann
Geburtsdatum: 19.06.1992
Geburtsort: Marl
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung

1998 bis 2003 Overbergschule in Marl, Grundschule
2003 bis 2012 Albert-Schweitzer-/Geschwister-Scholl-Gymnasium
2012 Abitur

Studium

2012 bis 2017 Martin-Luther-Universität Halle, Studium der Zahnmedizin
2013 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
2015 Medizinische Vorprüfung (Physikum)
2017 Staatsexamen

seit 2016 Herzchirurgie, Universitätsklinikum Halle, Promotionsarbeit

Berufliche Tätigkeit

Seit 2018 Zahnärztin in Gemeinschaftspraxis Schwarzmann Paßmann, Marl

Halle (Saale), den 02.01.2020

Danksagungen

Mein besonderer Dank geht an meine Betreuerin, Frau PD Dr. rer. nat. Babett Bartling für ihre große Unterstützung dieses Projekts. Ich danke ihr für die Strukturierung meiner Arbeit, für das Aufzeigen neuer Perspektiven und dafür, dass sie mich bis zum Ziel immer aufmerksam begleitet hat. Des Weiteren möchte ich Anika Küttner und Katja Zunkel für die gute Zusammenarbeit danken. Mein Dank gilt dem gesamten Team im Forschungslabor der Herzchirurgie, sowie den ärztlichen Kollegen. An dieser Stelle möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Rainer Pliquett für die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Geräten für die Probandenuntersuchungen und Herrn Prof. Dr. Andreas Simm für die Akquirierung von Probanden im Rahmen der Altersvorlesung danken. Herzlichst danke ich allen Probandinnen und Probanden, die an meiner Studie teilgenommen haben und allen, die mir geholfen haben weitere Probanden zu finden. Zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Motivation und für die Korrekturen der Dissertation.