

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

Einfluss erythrozytär gebildeten Stickstoffmonoxids auf die
Hämorrheologie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Intan Fatah Kumara

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Kelm
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. V. Suschek

Liste der Abkürzungen

EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NOS
eNOS ^{-/-}	Defiziente Allele des eNOS-Genes
engl.	englisch
<i>g</i>	Gravitationsfeldstärke
GSNO	S-Nitrosoglutathion (NO-Donator)
HbNO	Nitrosylhämoglobin
HBSS	Puffer (Hank's Balanced Salt Solution)
iNOS	induzierbare NOS
L-NNA	N ω -Nitro-L-Arginin
M	Erythrozytenaggregations-Index bei Stillstand
M1	Erythrozytenaggregations-Index bei einem Schergrad von 3 ^{-s}
NaCl	Kochsalz
nNOS	neuronale NOS
NO	Freies Radikal des Stickstoffmonoxids
NO ₂	Stickstoffdioxid
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase (EC 1.14.13.39)
OxyHb	Oxyhämoglobin
PBS	Saliner Phosphatpuffer
PPP	thrombozytenarmes Plasma (platelet poor plasma)
PRP	thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma)
rpm	Umdrehung pro Minute (rotation per minute)
RT	Raumtemperatur
SIN-1-HCL	3-morpholino-sydnonimine HCl (NO-Donator)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
2.	Material und Methoden.....	14
2.1.	Blutentnahme, Probenaufarbeitung und Studienprotokoll.....	14
2.2.	Einfluss von NO auf die Erythrozytenaggregabilität.....	15
2.3.	Einfluss von NO auf die Thrombozytenaggregabilität	16
2.4.	Einfluss von NO auf die Blut- und Plasmaviskosität	17
2.5.	Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit	18
2.5.1.	Filtrationsmethode nach Reid et al., (1976).....	18
2.5.2.	Modifizierung der Filtrationsmethode.....	20
2.5.3.	Charakterisierung der modifizierten Analytik	21
2.5.4.	Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit	22
2.6.	Kontrollversuche zur Erythrozytenverformbarkeits-Untersuchung.....	23
2.6.1.	Osmolarität	23
2.6.2.	pH-Wert	23
2.6.3.	Mikroskopische Untersuchung der Erythrozyten	23
2.7.	Statistische Analysen.....	23
3.	Ergebnisse	25
3.1.	Einfluss von NO auf die Aggregabilität von Erythrozyten.....	25
3.2.	Einfluss von NO auf die Thrombozytenaggregabilität.....	28
3.3.	Einfluss von NO auf die Plasma- und Vollblutviskosität.....	29
3.4.	Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mittels „Filtrationsassay“	30
3.4.1.	Methodeneigenschaften der vorhandenen Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit.....	30
3.4.2.	Etablierung der modifizierten Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit (Spezifität des Assays)	33
3.4.3.	Spezifität und Reproduzierbarkeit der neu etablierten Methode	39
3.4.4.	Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit	42

3.4.5. Kontrollversuch zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit	45
4. Diskussion	48
4.1. Methode zur rheologischen Untersuchung	48
4.2. Verbesserung des Filtrationsassays zur Untersuchung der Erythrozytenverformbarkeit.....	50
4.3. Regulation der Erythrozytenverformbarkeit	53
4.4. NO und Hämorheologie	55
4.5. „Erythrozytäre“ NOS: Eine physiologisch relevante NO-Quelle?	58
4.6. Relevanz der NO-abhängigen Modifikation der rheologischen Parameter - Ausblick zur therapeutischen Relevanz -	61
5. Zusammenfassung.....	63
6. Literaturverzeichnis.....	64
7. Danksagung	72
8. Lebenslauf.....	73

1. Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger Mediator in den unterschiedlichsten biologischen Prozessen, unter anderem bei der Regulation des vaskulären Tonus. Der Gefäßwiderstand wird zu einem großen Teil in den Kapillaren auf zellulärer Ebene geregelt; hier spielt NO eine besondere Rolle. Neben dem vaskulären Tonus wird der Blutfluss in der Mikrozirkulation durch die rheologischen Eigenschaften des Blutes (Hämorheologie) beeinflusst. Im Folgenden wird zunächst die physiologische Relevanz der Mikrozirkulation und Hämorheologie (Blutviskosität, Erythrozyten- und Thrombozytenaggregabilität, Erythrozytenverformbarkeit) erläutert. Danach wird auf die Charakteristika des Radikals NO eingegangen sowie auf die Rolle von NO im humanen Kreislaufsystem, insbesondere unter hämorheologischen Gesichtspunkten.

Mikrozirkulation und Hämorheologie

Der Blutfluss durch viele parallele kleine Gefäße (Mikrozirkulation) hat eine vitale Bedeutung für die Sauerstoffversorgung der Organe. Die Mikrozirkulation ist meist als Blutfluss durch Gefäße definiert, die einen Durchmesser von weniger als 150 µm haben ¹. Diese Definition schließt Arteriolen (Durchmesser 10-100 µm), Kapillaren (4-10 µm) und Venolen (10-100 µm) ein. In Bezug auf die Funktion kann die Mikrozirkulation als Blutzirkulation mit Austauschvorgängen zwischen Blut und Interstitium im Bereich der Endstrombahn (terminale Gefäße: Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen) angesehen werden ².

Entsprechend der oben genannten funktionellen Definition sind die Hauptfunktionen der Kapillaren der Nährstofftransport zum Gewebe, die Beseitigung von Zellabbauprodukten sowie letztendlich die Sauerstoffzufuhr, die optimal auf die veränderten Bedürfnisse innerhalb des Gewebes abgestimmt werden muss. Eine weitere wichtige Funktion der Mikrozirkulation ist es, die großen Fluktuationen des hydrostatischen Druckes innerhalb der Kapillaren zu vermeiden, welche zu Störungen des Austauschprozesses in den Kapillaren führen kann ¹.

Die Kapillaren bestehen aus einschichtigen Endothelzellen, wohingegen die Arteriolen ein bis zwei Schichten an glatten Muskelzellen in der Tunika intima enthalten. Eine kleine Arterie (0,1-2 mm) hat bis zu 8 glatte Muskelzellschichten. Der Blutfluss durch die Kapillaren wird durch die Kontraktion der glatten Gefäßmuskeln der Arteriolen kontrolliert ^{1;3;4}. Die Kontraktion der Arteriolen selbst, und damit der

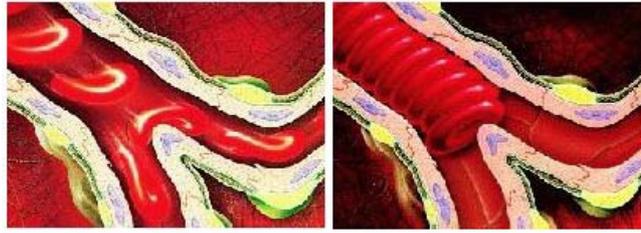
Tonus, ist durch Innervation und zirkulierende Mediatoren reguliert. In dem Sinus karotikus und der Aorta liegen Barorezeptoren, welche über den Nervus vagus den systemischen Blutdruck regulieren. Wenn diese Rezeptoren durch einen erhöhten Blutdruck stimuliert werden, leitet die Medulla oblongata das Signal durch sympathische und parasympathische Nerven weiter. Die Folgen sind Vasodilatation, eine niedrigere Herzfrequenz und ein erhöhtes Herzzeitvolumen. Im Gegensatz dazu spielt Renin-Angiotensin eine wichtige Rolle, wenn der Blutdruck zu niedrig ist. Die in den Nieren produzierten Hormone bewirken eine Konstriktion der systemischen Arteriolen, wodurch der Blutdruck wieder erhöht wird. Neben der systemischen Regulation wird der Gefäßtonus durch lokal gebildete Hormone (z.B. Histamin und Bradykinin), Metabolite (Adenosin, Milchsäure, Ionen) und endotheliale Produkte reguliert ⁵. Die endothelial vermittelte Dilatation ist eine der lokalen Kontrollfaktoren, welche bei der Regulation des peripheren Blutflusses eine entscheidende Determinante ist ⁶. Diese Gefäßdilatation wird durch NO - lange Zeit als nicht näher zu definierender EDRF (*endothelium-derived relaxing factor*, engl.) bekannt - verursacht ⁷ (siehe Untertitel Stickstoffmonoxid Seite 8).

Die Regulation des Blutflusses wird nicht nur durch den aktiven Tonus der Arteriolen kontrolliert, sondern auch durch die passive Regulation, die von den rheologischen Eigenschaften des Blutes abhängig ist. Die rheologischen Faktoren scheinen sogar eine größere Rolle als der arterielle Tonus bei der Erhaltung der Kapillarfunktionen zu spielen, besonders bei niedrigem Blutfluss ⁸. Die kleinsten Kapillaren haben einen Durchmesser von ca. 4-6 µm. Die Erythrozyten sind flexibel, damit sie die Kapillaren passieren können. Diese Eigenschaft nennt man Erythrozytenverformbarkeit ^{9;10} (Abbildung 1). Unter normalen osmotischen Verhältnissen hat der Erythrozyt seine typische bikonkave Form mit einem mittleren Durchmesser von 7,6 µm ¹¹⁻¹³.

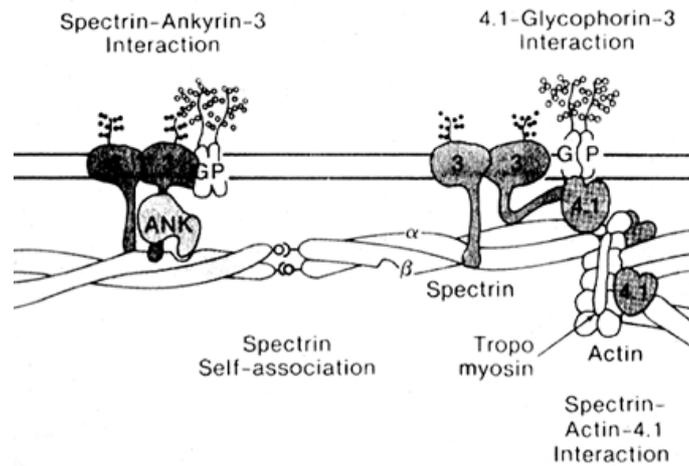
Die Mechanismen der Erythrozytenverformbarkeit wurden in vielen Studien untersucht. Die Erythrozytenmembran besteht aus einem Lipidbilayer (Lipid-Doppelschicht) mit verankerten Proteinen, die wiederum mit einem Zytoskelett verbunden sind. Das Zytoskelett wird hauptsächlich aus Spektrin-Vernetzungen gebildet. Spektrin ist ein dehnbares Protein (Abbildung 1A). Diese Verbindungen zwischen Proteinen, Lipidbilayer und Zytoskelett scheinen bedeutend bei der Verformbarkeitsregulation zu sein ¹⁴⁻¹⁶. Direkt oder indirekt wird die Membranstruktur von vielen Faktoren beeinflusst. Prostaglandin initiiert z.B. den Wasseraustausch

zwischen extra- und intrazellulärem Raum, welcher das Zellvolumen beeinflusst ¹⁵. Medikamente, wie z.B. Aspirin, verändern den osmotischen Zustand ¹⁷. Der pH-Wert verändert die Dehnbarkeit der Membranen ¹⁸. Krankheiten, wie z.B. Sepsis, verursachen intrazelluläre Änderungen der ATP-Konzentration und der Membranzusammensetzung ^{19;20}. Bei erhöhtem Blutdruck ist die Membranfluidität erniedrigt ¹⁶.

A



B



C

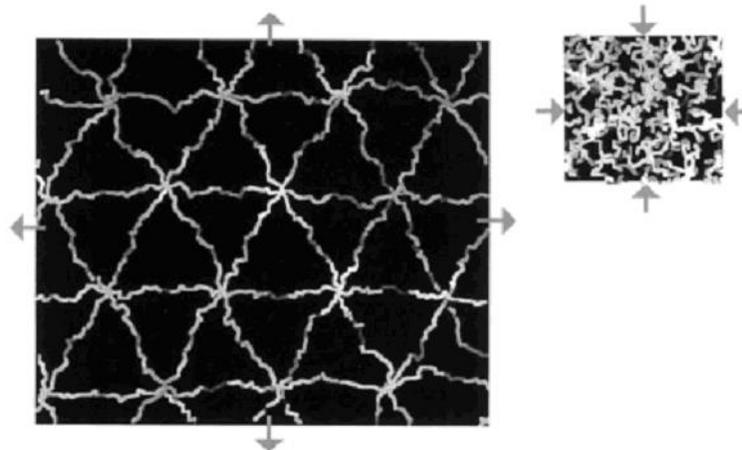


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Physiologie der Erythrozytenverformbarkeit. **A:** Die Erythrozyten müssen kleine Gefäße passieren (links). Wenn die Zellen nicht mehr verformbar sind, kann dies zu einer Okklusion führen (rechts). **B:** Erythrozytenmembran: Lipidbilayer mit verankerten Proteinen und unterliegendem Zytoskelett (Spektrin). **C:** Spektrin ist durch Interaktion mit Aktin verbunden, eine Spektrinvernetzung entsteht. Spektrin ist bis auf das 2,5fache seiner normalen Länge dehnbar (links) und um 40% kontrahierbar (rechts).

Die Erythrozytenverformbarkeit ist eine wesentliche Determinante für die Viskosität des Blutes, besonders bei hoher Scherrate (Schergeschwindigkeit). Eine optimale Viskosität ermöglicht einen gleichmäßigen Blutfluss gerade an der Bifurkation kleinerer Gefäße ²¹. Außer von der Erythrozytenverformbarkeit ist die Vollblutviskosität abhängig unter anderem von der Erythrozytenaggregation, der Temperatur, dem Hämatokrit und der Plasmapviskosität ^{19;22;23}.

Die Erythrozytenaggregation beeinflusst, insbesondere bei niedrigen Schergeschwindigkeiten, die Viskosität des Blutes. Als Erythrozytenaggregation bezeichnet man das Zusammenlagern der roten Blutkörperchen zu Geldrollen (rouloux) oder in einem pathologischen Zustand zu Klumpen ²⁴. Die physiologische Aggregation ermöglicht die Gewährleistung der Zellströmung mittig in den Blutgefäßen, welche für den Blutfluss elementar ist ²⁵. Die Erythrozytenaggregation wird durch Plasmaproteine über die Bildung von Interzellularbrücken gefördert ²⁵.

Die Thrombozytenaggregation steht in engem Zusammenhang mit rheologischen Parametern, insbesondere bei pathologischen Veränderungen der Mikrozirkulation ²⁶. Während das Blut fließt, aggregieren die Thrombozyten. Dies führt im Weiteren zu zirkulierenden Thrombozytenaggregaten oder einem muralen Thrombus an der Gefäßwand. Der pathologische Zustand rheologischer Parameter und erhöhter Thrombozytenaggregation hat einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von myokardialen Ischämien ²⁷.

Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein intrazellulärer und interzellulärer Botenstoff, welcher an physiologischen Regulationsmechanismen nicht nur im Herzkreislaufsystem, sondern auch im Zentralnervensystem, im peripheren Nervensystem und im Immunsystem beteiligt ist ²⁸⁻³⁰. Durch die NO-Freisetzung in der Gefäßwand wird der Tonus der glatten Gefäßmuskulatur beeinflusst, so dass NO an der Blutdruckregulation beteiligt ist ³¹.

NO wird von der NO-Synthase (NOS) gebildet, welche die Aminosäure L-Arginin zu NO und L-Citrullin umsetzt. Die Synthese von NO hängt von verschiedenen Kofaktoren ab, ebenfalls geht molekularer Sauerstoff in die Reaktion ein. Die unterschiedlichen Isoformen der NOS werden in Kalzium- und Calmodulin-abhängige (eNOS) oder Kalzium- und Calmodulin-unabhängige Formen eingeteilt

(iNOS) ³². Die Isoformen haben eine unterschiedliche Affinität zu Calmodulin. Das Calmodulin ist bei normalen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen fest an die iNOS gebunden. An die eNOS bindet Calmodulin jedoch erst, wenn der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ansteigt. Der Kalziumgehalt ist abhängig von extrazellulären Signalen, z.B. einem Anstieg der flussvermittelten Scherkräfte im Gefäß oder der Freisetzung von rezeptorabhängigen Stimulanzen der NOS ³³. Vier verschiedene Isoformen der NOS sind bisher identifiziert worden: die neuronale NOS (nNOS), die endotheliale NOS (eNOS), die induzierbare NOS (iNOS) aus Makrophagen und zuletzt die NOS aus Mitochondrien ^{34;35}. Die Isoformen wurden meist nach den Geweben benannt, in denen sie zuerst nachgewiesen worden sind. Die in den Mitochondrien identifizierte NOS ist bislang nur dort gefunden worden ³⁴. Die anderen Isoformen der NOS werden jedoch auch in anderen Geweben exprimiert. Im vaskulären System entsteht - unter physiologischen Bedingungen - NO vor allem durch eNOS-Aktivität. Im Gegensatz dazu kann bei inflammatorischen Erkrankungen die iNOS induziert werden und dies somit zu extrem erhöhter NO-Konzentration führen.

Auf seinem Weg vom Bildungsort zu den Zielzellen kann NO mit molekularem Sauerstoff zu höheren Stickoxiden (z.B. NO_2 und N_2O_3) reagieren. Diese Stickoxide können entweder mit anderen Molekülen, z.B. Thiolen und Aminen, reagieren oder zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) hydrolysieren. Des Weiteren reagiert NO mit Hämoproteinen und mit Sauerstoffradikalen. Wenn NO die Erythrozyten erreicht, so kann es mit dem Hämoglobin drei verschiedene Reaktionen eingehen. Einerseits kann NO mit Oxyhämoglobin (OxyHb) zu Methämoglobin und Nitrat reagieren. Eine andere Reaktion besteht in der Bildung von Nitrosylhämoglobin (HbNO) aus NO und Deoxyhämoglobin. Ferner kann NO durch Bindung an das Hämoglobin im Rahmen einer Nitrosierungsreaktion S-Nitrosohämoglobin bilden. Diese Reaktionen können nicht nur zur Inaktivierung von NO führen, sondern auch maßgeblich an einer Veränderung der Erythrozytenfunktion (z.B. Sauerstoffabgabe) beteiligt sein ³⁶.

Hämorrheologie und NO

Wie bereits erwähnt, stammt NO im Gefäßsystem hauptsächlich von der konstitutiv exprimierten endothelialen NOS ab. Ferner wurde gezeigt, dass im Herzkreislaufsystem NO nicht nur den Tonus der Gefäße beeinflusst, sondern auch die Interaktion und Funktion von Blutzellen, wie z.B. die Thrombozytenaktivität und die Inhibition der Monozyten-Endothel-Adhäsion^{33;37;38}. Bei den roten Blutzellen, den Erythrozyten, beeinflusst NO die Verformbarkeit und Aggregabilität dieser Zellen^{39;40}.

Der Einfluss von NO auf die Thrombozytenaggregation wurde in einigen Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Die Aggregation der Thrombozyten und deren Adhäsion zur Gefäßwand wird durch NO gehemmt^{41;42}. Dies gilt sowohl für exogenes NO, das durch NO-Donatoren appliziert wurde, als auch für das vom Endothel synthetisierte NO. Einige Studien beweisen, dass mononukleare Leukozyten ebenfalls die Thrombozyten-Endothel-Adhäsion, abhängig vom NO-Stoffwechselweg, inhibieren⁴³. Leukozyten besitzen eine iNOS, die durch Entzündungsprozesse stimuliert wird^{44;45}. In einigen Studien wird sogar die Expression einer NOS in Thrombozyten beschrieben, die bei der Thrombozytenaggregation hemmend eingreift. Um welche Isoform es sich handelt und ob diese eine Aktivität aufweist, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Einerseits wurde postuliert, dass NO von Thrombozyten im Ruhezustand produziert werden kann, andererseits gibt es Hinweise, dass nur bei Aktivierung der Thrombozyten NO freigesetzt werden kann⁴⁶⁻⁴⁹.

NO kann auch die Erythrozytenverformbarkeit modulieren. 1999 haben Starzyk et al. beschrieben, dass unter physiologischen Bedingungen ein NO-Donator (SIN-1-HCl) die Verformbarkeit verbessern kann⁴⁰. Hingegen haben Bateman et al. 2001 berichtet, dass bei Sepsis - eine Krankheit mit höherer NO-Konzentration und schlechterer Erythrozytenverformbarkeit - eine Zugabe von Aminoguanidin (iNOS-Inhibitor) weder die gesteigerte systemische NO-Konzentration, noch die Verschlechterung der Verformbarkeit vermindern konnte⁵⁰. Dies könnte auf eine biphasische Rolle der NO-Menge auf die Erythrozytenverformbarkeit hindeuten. Wie genau NO die Verformbarkeit reguliert, ist bisher unklar.

Wie bereits oben erwähnt, reagiert NO sehr schnell mit Hämoglobin. Die Rolle der Erythrozyten im Rahmen der NO-Speicherung und NO-Produktion ist in den letzten Jahren neu definiert worden. Lange Zeit galten Erythrozyten lediglich als Ort

der Inaktivierung von NO (siehe oben). Eine Speicherung und sogar die Synthese von NO ist in der neueren Literatur beschrieben, wird jedoch kontrovers diskutiert. Das vom Erythrozyten freigesetzte NO stammt eventuell nicht ausschließlich aus den NO-Speichern. In der Literatur existieren widersprüchliche Hinweise auf eine „erythrozytäre“ NOS-Expression und deren Aktivität ⁵¹⁻⁵⁴. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass in der Mikrozirkulation die NOS-Expression im Endothel und konsekutiv die NO-Synthese wesentlich geringer ist als in Leitungsgefäßen ⁵⁵.

Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Relevanz von NO für die Regulation der Mikrozirkulation untersucht werden. Bisher wurde für das Gefäßsystem postuliert, dass NO nur aus Endothelzellen freigesetzt wird. Es bestehen jedoch Hinweise, dass im Bereich der Mikrozirkulation die NO-Bildung durch die eNOS sehr gering ist. Dennoch kann NO eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Mikrozirkulation durch Einfluss auf die hämorrheologischen Parameter spielen. Des Weiteren liegen seit kurzem konkrete Hinweise vor, dass Erythrozyten möglicherweise selbst NO synthetisieren.

Hieraus ergeben sich folgende Ziele:

1. Es sollen entsprechend sensitive und spezifische Methoden zur Bestimmung von hämorrheologischen Parametern etabliert und/oder aus bestehenden Methoden weiterentwickelt werden.
2. Die Wirkung von sowohl exogenem als auch erythrozytär gebildetem NO auf hämorrheologische Parameter (Viskosität des Blutes, Erythrozytenaggregabilität, Erythrozytenverformbarkeit und Thrombozytenaggregabilität) sollen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Blutentnahme, Probenaufarbeitung und Studienprotokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurde humanes und murines Blut verwendet. Humanes Blut: Blut von gesunden Personen wurde aus der Vena mediana cubiti über eine venöse Punktionskanüle (Butterfly[®], Ø 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo, Irland) unter Vermeidung von Hämolyse entnommen. Als Antikoagulans wurde, wenn nicht gesondert aufgeführt, Hirudin (Refludan[®], Schering; 0,4 mg/ml = 0,005 mg/ml Blut) eingesetzt. Sollte das Vollblut als Probe untersucht werden, so wurde es direkt, ohne besondere Aufarbeitung, verwendet. In einigen Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein resuspendiertes Erythrozytensediment oder Plasma verwendet. Hierzu wurde Vollblut in eine an der Spitze verschlossenen Spritze ohne Kolben 15 min bei 800g und 4°C zentrifugiert und der plasmatische Überstand vorsichtig entnommen, um das Zellsediment nicht zu beschädigen. Zur Separierung reiner Erythrozyten wurde nach Lösen des Verschlusses ca. 2/3 der sedimentierten Erythrozyten durch vorsichtiges Abtropfen gewonnen, ohne dabei die leukozytäre Grenzschicht zu beschädigen. Die Erythrozyten wurden mit Puffer oder Plasma auf den gewünschten Hämatokrit eingestellt. Wenn nicht besonders benannt, wurde Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) als Puffer verwendet. HBSS-Puffer wurde aus Hank's Balanced Salt Pulver mit Aqua dest. (Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) gelöst und danach filtriert (0,45 µm).

Murines Blut: Zur Blutabnahme wurden die Mäuse mittels intraperitonealer Gabe von 15% Urethan (w/v in NaCl 0,9%, Dosis 1,5 g/kg Körpergewicht) anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die untere Hohlvene stumpf, mit Hilfe feiner Pinzetten, unter einem Binokular dargestellt. Nach Punktion der unteren Hohlvene im Retroperitoneum mit einer 21G-Venenpunktionskanüle (Butterfly[®], Ø 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo, Irland), dessen Nadel zuvor mit Hirudin benetzt worden war, wurde das Blut unter leichter Aspiration entnommen. Der Hämatokrit des Blutes wurde direkt mittels Mikrozentrifugation (12.000g, 5 min, Raumtemperatur (RT)) gemessen. Daraufhin wurde das entnommene Vollblut mit HBSS-Puffer auf den gewünschten Hämatokrit eingestellt.

Chemikalien: Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deutschland bezogen. NO-Lösung wurde nach Rassaf et al., (2002)⁵⁶ hergestellt. Die Herstellung von OxyHb wurde nach Feelisch et al., (1996)⁵⁷ durchgeführt.

Studienprotokoll: In dieser Arbeit wurde der Einfluss von NO auf die rheologischen Eigenschaften des Blutes untersucht. Als Parameter wurden die Erythrozyten- und Thrombozytenaggregabilität, Plasma- und Blutviskosität und schließlich die Erythrozytenverformbarkeit untersucht. Die Messung der Osmolarität und des pH-Wertes des Plasmas sowie eine mikroskopische Untersuchung der Ausstriche der Erythrozyten wurden durchgeführt. Das entnommene Blut wurde mit NO-Donatoren, dem NOS-Substrat L-Arginin, dem NOS-Inhibitor L-NNA und anderen Substanzen inkubiert. Zur Aufarbeitung der Proben wurde eine Separation durch eine Zentrifugation (800g, 15 min, 4°C) vorgenommen. In dem auf diese Weise gewonnenen Plasma wurden die Plasmaviskosität und –osmolarität sowie der pH-Wert und die Thrombozytenaggregation gemessen. Die Aggregation und die Verformbarkeit der Erythrozyten wurden in dem mit Plasma oder Puffer resuspendierten Erythrozytensediment untersucht. Ein Ausstrich der Erythrozyten erfolgte vor und nach der Verformbarkeitsuntersuchung.

NO-Donatoren (NO-Lösung, S-Nitrosoglutathion (GSNO), SIN-1-HCl) wurden als exogene NO-Quelle verwendet. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass Erythrozyten eine endotheliale NOS besitzen^{51;53}. Die Aktivität der NOS kann durch L-Arginin gesteigert und durch L-NNA inhibiert werden. In dieser Arbeit wurde die Inkubation von Blut mit L-Arginin und L-NNA (jeweils 3 mmol/l) durchgeführt, um die Konzentration von NO in den Proben zu steuern. Nachfolgend werden ausführlich das Aufarbeitungs- und Messprotokoll beschrieben.

2.2. Einfluss von NO auf die Erythrozytenaggregabilität

Zur Bestimmung der Erythrozytenaggregabilität wurde ein photometrisches Rheoskop (Erythrozyten-Aggregometer, Myrenne GmbH, Roetgen) verwendet. Die Blutprobe wurde für 10 sec einem Schergrad von 600^s ausgesetzt, um eventuell vorhandene Aggregate zu zerstören. Bei dem dann folgenden Stillstand (M) oder einem Schergrad von 3^s (M1) wurde die spontane Aggregation der Erythrozyten ausgelöst. Durch die Aggregation entstehen zellfreie Plasmalücken. Durch diese kann das Infrarotlicht dringen, welches durch eine Photozelle quantifiziert wird. Die

Transmission ist proportional der Erythrozytenaggregation und wird nach wenigen Sekunden gemessen. Der Aggregations-Index wird automatisch berechnet^{58;59}. Eine Dreifachbestimmung wurde mit jeder Probe im Stillstand (M) und bei einem Schergrad von 3^{-5} (M1) durchgeführt.

Versuchsprotokoll:

a.) Einfluss des exogenen NOs auf die Erythrozytenaggregabilität

Nach 10 min Inkubation des Vollblutes mit NO-Lösung (0-600 $\mu\text{mol/l}$) oder GSNO (600 nmol/l) wurden die Proben direkt gemessen.

b.) Einfluss des endogenen NOs auf Erythrozytenaggregabilität

Vollblut wurde mit L-Arginin (3 mmol/l), L-NNA (3 mmol/l) und OxyHb (0,1 mmol/l) bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurden die Erythrozyten separiert (siehe Kapitel 2.1.). Die Erythrozyten wurden mit Plasma auf einen Hämatokrit von 42% eingestellt.

2.3. Einfluss von NO auf die Thrombozytenaggregabilität

Die Thrombozytenaggregation wurde nach Born et al., (1963) durchgeführt⁶⁰. Humanes Vollblut wurde mit L-Arginin (3 mmol/l) bzw. L-NNA (3 mmol/l) 10 min im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (300g, 20 min, RT, ungebremster Rotor) separiert. Hierbei wurde thrombozytenreiches Plasma (PRP = *platelet rich plasma*, engl.) gewonnen. Als Referenz/Blank wurde das thrombozytenarme Plasma (PPP = *platelet poor plasma*, engl.) desselben Probanden herangezogen. Die Herstellung von PPP wurde aus unbehandeltem, thrombozytenreichem Plasma mittels weiterer Zentrifugation (4000g, 10 min, RT, ungebremster Rotor) durchgeführt. Es wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, indem PRP direkt mit einem NO-Donator oder NOS-Substrat bzw. -Inhibitor inkubiert und gemessen wurde.

Für die Aggregation wurden 250 μl PRP (250.000 Thrombozyten/ μl) in den Strahlengang eines Thrombozyten-Aggregometers (Chronolog Corporation, Haverton Ph., USA) gebracht und bei 37°C mit einem kleinen Rührmagneten (1.200 rpm) konstant gerührt. Als Referenz diente PPP, das in den parallelen Strahlengang des Aggregometers eingebracht wurde. Nach Temperieren bei 37°C für 3 min wurde die Aggregation mit ADP (10 $\mu\text{mol/l}$) initiiert.

Die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit (Transmission) der Küvetten-suspension, bedingt durch Aggregatbildung und Ausfällung nach Stimulation der Thrombozytenaggregation, wurde mit dem Programm Aggro/Link (Chronolog Corporation) über 15 min verfolgt und aufgezeichnet. Auswertparameter war die maximale Aggregation in % Transmissionszunahme.

2.4. Einfluss von NO auf die Blut- und Plasmaviskosität

Die Plasmaviskosität wurde mittels Kapillarschlauch-Viskosimeter (KSV 6, Rheomed GmbH, Heppenheim, Deutschland) bestimmt. Zur Ermittlung der Viskosität wurde die Auslaufzeit einer Flüssigkeitssäule unter konstanten Randbedingungen (Temperatur, hydrostatischer Druck und Widerstand der Messkapillare) gemessen und die Viskosität angegeben. Mindestens 1 ml der zu messenden Probe (PPP) wurde in eine 2 ml Spritze mit stumpfer Kanüle luftblasenfrei aufgezogen und anschließend der Messkapillarschlauch auf die Kanüle gesteckt. Nach Einlegen der Messkapillare und vor dem Start des Messvorganges wurde die Kapillare nebst Plasma auf 37°C temperiert. Über Lichtschranken wurde die Laufzeit des Plasmas erfasst und über eine Eichkurve in mPas angegeben.

Die Blutviskosität wurde mittels DCR-Gerät (Anton Paar, Österreich) bestimmt. In der die Blutprobe enthaltenden Kapillare des Gerätes wurde mit Hilfe eines elektrodynamischen Schwingers eine oszillierende Strömung erzeugt. Eine Koppelflüssigkeit überträgt die Oszillation mit vorgegebener Frequenz und Amplitude vom Schwinger zur Kapillare, wobei die Blutprobe durch eine Membran von der Koppelflüssigkeit getrennt ist. Die Auslenkung des Schwingers und der Druck werden vom Sensor gemessen und die Viskosität mit Hilfe eines mit dem Gerät verbundenen PC automatisch berechnet.

Versuchsprotokoll:

Humanes Vollblut wurde mit L-Arginin (3 mmol/l), L-NNA (3 mmol/l), L-NNA und OxyHb (3 mmol/l und 0,1 mmol/l) 30 min bei 37°C inkubiert. Das Plasma wurde mittels Zentrifugation (800g, 10 min, RT) separiert und vermessen. Bei jeder Probe wurde eine 2-fach Messung durchgeführt.

2.5. Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit

Die Erythrozytenverformbarkeit kann durch unterschiedliche Analyseverfahren untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Erythrozytenverformbarkeit mit einer Filtrationsmethode bestimmt, die 1976 von Reid et al. ⁶¹ etabliert worden war. Diese Methode wurde modifiziert, um die Reproduzierbarkeit der Messung zu erhöhen und das Verfahren zu vereinfachen.

2.5.1. Filtrationsmethode nach Reid et al., (1976)

Das Prinzip der von Reid et al., (1976) etablierten Filtrationsmethode beruht darauf, dass Erythrozyten (Durchmesser im Mittelwert von 7,6 μm ¹¹⁻¹³) einen Membranfilter mit der Porengröße von 5 μm passieren. Die Passagezeit der Erythrozyten durch die Membran gilt als Maß der Verformbarkeit. Die in der Literatur von Reid et al., (1976) beschriebene Methode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit wurde den Angaben entsprechend aufgebaut ⁶¹. Das Vollblut wird über eine 1 ml Spritze ohne Stempel aufgegeben und durch den anschließenden Membranfilter filtriert. Der Filterhalter verbindet die Spritze mit dem Vakuumsystem (Abbildung 2).

Mit dieser Methode wurde die Erythrozytenverformbarkeit von gesunden Probanden gemessen. Die Passagezeit des Blutes innerhalb einer Minute wurde als Flussgeschwindigkeit/Flussrate (ml/min) benannt und gilt als Parameter für die Erythrozytenverformbarkeit.

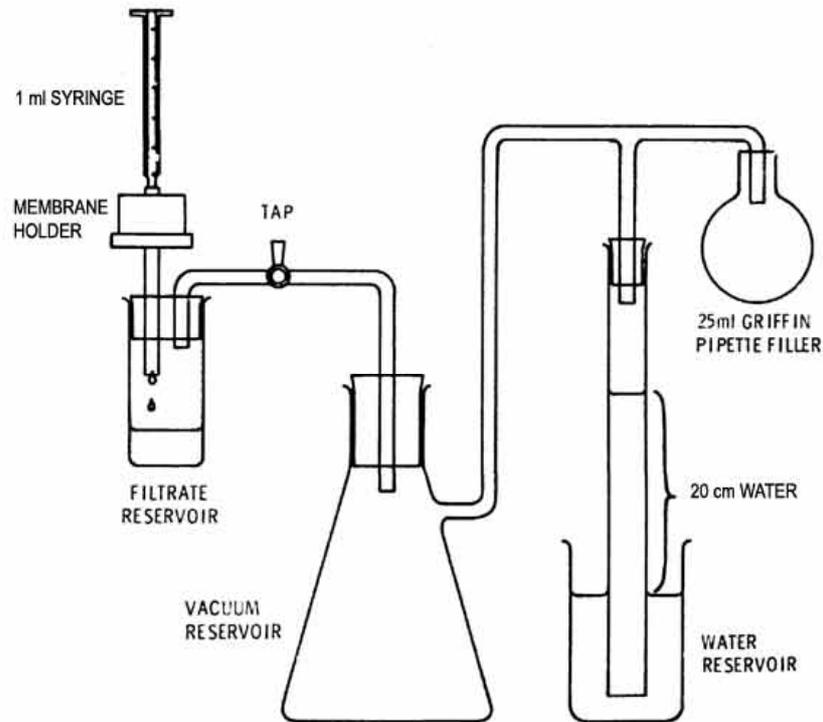


Abbildung 2: Originalabbildung aus Reid et al., (1976)⁶¹. Schematische Darstellung der Filtrationsmethode. Ein Membranfilter mit einer Porengröße von 5 μm und einem Durchmesser von 13 mm wurde in einen Filterhalter eingesetzt. Der Peleusball dient als Vakuumquelle. Eine Wassersäule wurde als Manometer für den angelegten Unterdruck verwendet. Ein Luftreservoir vermindert die Druckschwankung.

2.5.2. Modifizierung der Filtrationsmethode

Die Modifizierungen der Methode beziehen sich auf Systemdruck, Filterporengröße und Probenaufarbeitung.

Aufgrund des hohen Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mittels des beschriebenen Assays, wurde der Filtrationsassay im Rahmen der vorliegenden Arbeit modifiziert und somit die Verwendung zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit einfacher, sensitiver und reproduzierbarer.

Als Vakuumquelle wurde statt eines Peleusballes eine elektrische Vakuumpumpe (Liquiport Membran-Flüssigkeitspumpe, Welabo, Düsseldorf), die ein kontinuierliches Vakuum produziert, verwendet. Der Absaugmechanismus wurde mit einem 5 Liter Glasgefäß als Vakuumreservoir und einer Wassersäule als Manometer verbunden. Drei Filtratreservoir-Gefäße mit aufgestecktem Filterhalter und Membranfilter wurden parallel an das neue Vakuumsystem angeschlossen (siehe Abbildung 11, Kapitel 3.4.2.).

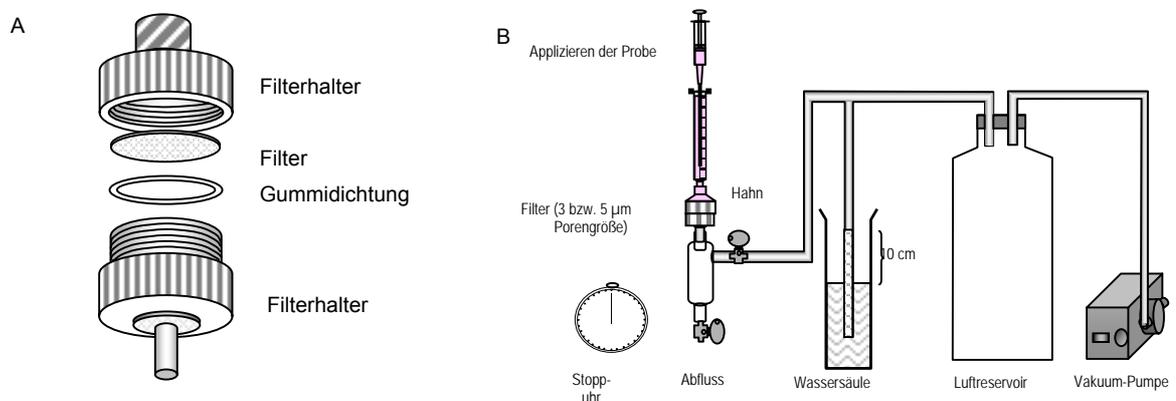


Abbildung 3: Schematischer Aufbau der Filtrationsanlage. **A:** Filter-Komponente bestehend aus Membranfilter, Filterhalter und Gummidichtungsring. Die glänzende Seite der Membran wird nach oben in den Filterhalter eingesetzt. **B:** Anstatt des Peleusballs (Pipettenball) und des Filtratreservoirs werden eine Vakuumpumpe und ein Abflusssystem verwendet.

Es wurden Membranfilter (Isopore[®], Millipore, Eschborn, Deutschland) mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Porengröße von 3 oder 5 µm, Kunststofffilterhalter (Swinnex[®], Millipore, Eschborn, Deutschland) und 1 ml Tuberkulinspritzen mit 100er-Verteilungsstrich BD-Plastipak (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die Modifizierung der Probenaufarbeitung wurde durchgeführt, indem die Flussrate unter Einstellung verschiedener Hämatokritwerte und Verwendung unterschiedlicher Verdünnungsmaterialien (Plasma und Puffer) mittels Filtrationsassay gemessen wurde.

Messprotokoll: Filter und Filterhalter wurden bei geschlossenem Hahn an das Vakuumsystem angeschlossen (Aufbau des Filters siehe Abbildung 3A). 1,5 ml der Probe wurden in eine 2 ml Spritze aufgezogen, davon wurden ca. 0,3 ml in den Filterhalter eingefüllt. Eine 1 ml Spritze ohne Spritzenstempel wurde in den Filterhalter eingesteckt und die Probe von 1 ml eingefüllt. Das Vakuum wurde über eine 10 cm Wassersäule (cmH₂O) ständig kontrolliert (Abbildung 3B). Sobald sich der Meniskus der Probe in der Spritze veränderte, wurde die Zeit über eine digitale Zeitschaltuhr gemessen. Nach 1 min wurde der Probenverlust in der Spritze aufgezeichnet. Die Flussrate der Probe (ml/min) diente als Index der Erythrozytenverformbarkeit. Falls die Proben in weniger als 1 min den Filter passierten, wurde die benötigte Zeit gemessen. Dieses Ergebnis wurde in ml/min umgerechnet.

Messprotokoll für murines Blut: Murine Erythrozyten sind kleiner als humane (6,6 µm)¹². Deshalb wurden Filter mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Porengröße von 3 µm verwendet. Wegen der Volumenbeschränkung bei der Blutentnahme wurde murines Vollblut ohne Separation direkt mit HBSS-Puffer auf einen Hämatokrit von 5% eingestellt. Die Durchführung der Filtration wurde ansonsten nicht verändert.

2.5.3. Charakterisierung der modifizierten Analytik

Es wurde überprüft, ob die modifizierte Methode anwendbar und reproduzierbar ist. Bekannt ist, dass Glutardialdehyd die Erythrozytenmembran durch einen „cross-link“ mit Membranproteinen verfestigt^{62;63}. Glutardialdehyd wurde somit als positive Kontrolle der modifizierten Methode benutzt. Humanes Vollblut wurde mit Glutardialdehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Konzentrationreihe von 0,0001 bis 0,1% bei 37°C im Schüttelwasserbad 10 min inkubiert. Die Erythrozyten wurden separiert, mit HBSS-Puffer auf einen Hämatokrit von 35% eingestellt (siehe Kapitel 2.1.) und die Filtration durchgeführt. Im Gegensatz zu Glutardialdehyd ist Pentoxifyllin eine Substanz, die die Flexibilität der Zellen steigert¹⁵. Die Inkubation von Pentoxifyllin (2 mg/ml) erfolgte parallel zu der mit Glutardialdehyd. Als Kontrolle

wurde HBSS-Puffer verwendet. Die Intra- und Inter-Observer-Reproduzierbarkeit der Methode wurden untersucht.

2.5.4. Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von exogenem und erythrozytärem endogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit untersucht. Die Untersuchungen wurden *in vitro* und *ex vivo* durchgeführt.

a. *In vitro* Untersuchungen

Basale Erythrozytenverformbarkeit: Um die basale Verformbarkeit zu untersuchen, wurde humanes Vollblut mit OxyHb (0,1 mmol/l) 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. OxyHb ist bekannt als „NO-scavenger“, eine Substanz, die NO abfängt und somit die Verfügbarkeit von NO in kürzester Zeit nahezu aufhebt⁵⁷. OxyHb wurde alle 5 min während der Inkubation zu den Erythrozyten gegeben, um ständig reaktives, NO-abfangendes Hb in Lösung zu haben. Nach der Inkubation wurde das Blut aufgearbeitet und schließlich die Erythrozytenverformbarkeit bestimmt (siehe Kapitel 2.1.).

NO-Donator: Hierbei wurde der Einfluss von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit von humanem Blut untersucht. Nach der Blutabnahme wurde das Blut aliquotiert und mit verschiedenen NO-Donatoren (GSNO 600 nmol/l und NO-Lösung 2 µmol/l) inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Aliquot mit NaCl inkubiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Proben separiert, aufgearbeitet und anschließend in das Filtrationssystem überführt.

Erythrozytäres endogenes NO: Um den Einfluss der erythrozytären NOS-Aktivität auf die Erythrozytenverformbarkeit zu untersuchen, wurden die Blutproben mit L-Arginin (3 mmol/l) und HBSS-Puffer als Kontrolle 30 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Parallel dazu wurde das Vollblut mit L-NNA (3 mmol/l) und L-NNA in Kombination mit einer sich wiederholenden (5 min-Intervalle) Gabe von OxyHb (0,1 mmol/l) als NO-Fänger inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Blutproben aufgearbeitet und schließlich die Erythrozytenverformbarkeit bestimmt (siehe Kapitel 2.1.).

b. Ex vivo Untersuchungen

eNOS^{-/-}-Maus: Die Untersuchungen wurden an Blut von eNOS defizienten Mäusen (eNOS^{-/-}) im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen (WT-Mäuse) durchgeführt. Die verwendeten Tiere basierten auf dem C57BL/6 Stamm⁶⁴. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität gezüchtet. Die Blutentnahme wurde in Kapitel 2.1. und das Verfahren zur Filtration in Kapitel 2.5.2. beschrieben. Es wurden jeweils 4 WT- und eNOS^{-/-} Mäuse untersucht.

2.6. Kontrollversuche zur Erythrozytenverformbarkeits-Untersuchung

2.6.1. Osmolarität

Die Plasma-Osmolarität wurde mittels eines Semi Micro Osmometers (Knauer, Berlin, Deutschland) bestimmt. Es wurden 150 µl humanes Plasma von inkubiertem humanem Blut (NO-Donatoren, L-Arginin, L-NNA und OxyHb) in einer 3-fach Bestimmung vermessen (siehe Kapitel 2.1.).

2.6.2. pH-Wert

Der pH-Wert des Plasmas wurde mittels eines pH-Meters (WTW pH522, Weilheim, Deutschland) bestimmt. 2,5 ml humanes Plasma aus mit NO-Donatoren, L-Arginin, L-NNA und OxyHb inkubiertem humanem Blut wurden mittels 3-fach Bestimmung vermessen (siehe Kapitel 2.1.).

2.6.3. Mikroskopische Untersuchung der Erythrozyten

Die Form der Erythrozyten wurde lichtmikroskopisch untersucht. Es wurden Mikroskope (Nikon, Deutschland) verwendet, an die eine Digitalkamera angeschlossen war. Die Aufnahmen wurden mittels eines PC (Software Lucia, Deutschland) bearbeitet und als Grafikdateien gespeichert.

2.7. Statistische Analysen

Alle statistischen Daten wurden, wenn nicht anders angezeigt, als Mittelwerte \pm Standardfehler (MW \pm SEM) angegeben. Gruppenmittelwerte wurden durch den t-Test nach Student analysiert. Als statistisch relevant galt ein p-Wert $< 0,05$. Zur Analyse diente das Computerprogramm SPSS® 11.0 für Windows.

Die graphische Darstellung der Daten und die lineare Regression wurden mit Hilfe des Computerprogramms MicroCal Origin® (Version 7.0, MicroCal Software Inc., Northhampton, MA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von NO auf die Aggregabilität von Erythrozyten

Exogenes NO:

Nach Vorinkubation von Vollblut mit exogenem NO (GSNO 200 nmol/l) wurde die Erythrozytenaggregation sowohl bei Stillstand (M) als auch bei einer Scherrate von 3^{-s} (M1) im Vergleich zur Kontrolle gehemmt: GSNO: $6,02 \pm 0,02$ (bei M) und $8,64 \pm 0,2$ (bei M1), Kontrolle: $10,02 \pm 0,5$ (M) und $13,06 \pm 0,12$ (M1) (Abbildung 4). Nach Inkubation mit ansteigender NO-Konzentration (exogene Zugabe einer NO-Lösung) wurde die Erythrozytenaggregabilität im Vergleich zur Kontrolle gehemmt (Abbildung 5).

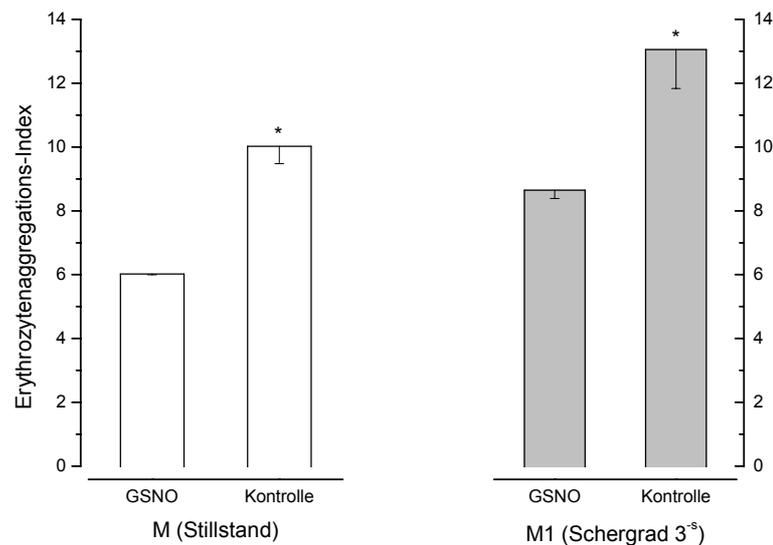


Abbildung 4: Einfluss von GSNO auf die Erythrozytenaggregabilität. Der Erythrozytenaggregations-Index im Stillstand (M) und bei Scherrad 3^{-s} (M1) wurde nach 1 Stunde Inkubation mit GSNO gemessen ($n=3$, $p<0,05$).

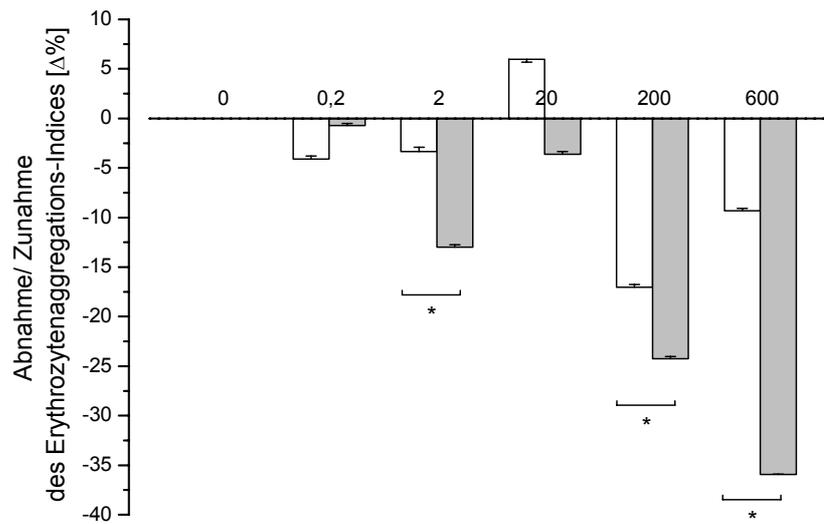


Abbildung 5: Aggregabilität humaner Erythrozyten nach NO-Inkubation. Die Balken stellen die Abnahme bzw. Zunahme der Aggregation nach NO-Inkubation (■) gegen basale Aggregation dar. Die zunehmende NO-Konzentration wurde mit adäquatem Volumen NaCl (□), entsprechend dem Volumen der inkubierten NO-Lösung, kontrolliert. * zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an (n=3, p<0,05).

Erythrozytäres endogenes NO:

Nach Vorinkubation von Vollblut mit L-Arginin, L-NNA, OxyHb oder Puffer wurde die Aggregation bei beiden Einstellungen des Aggregometers gemessen (M, M1). Der Erythrozytenaggregations-Index ergab keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

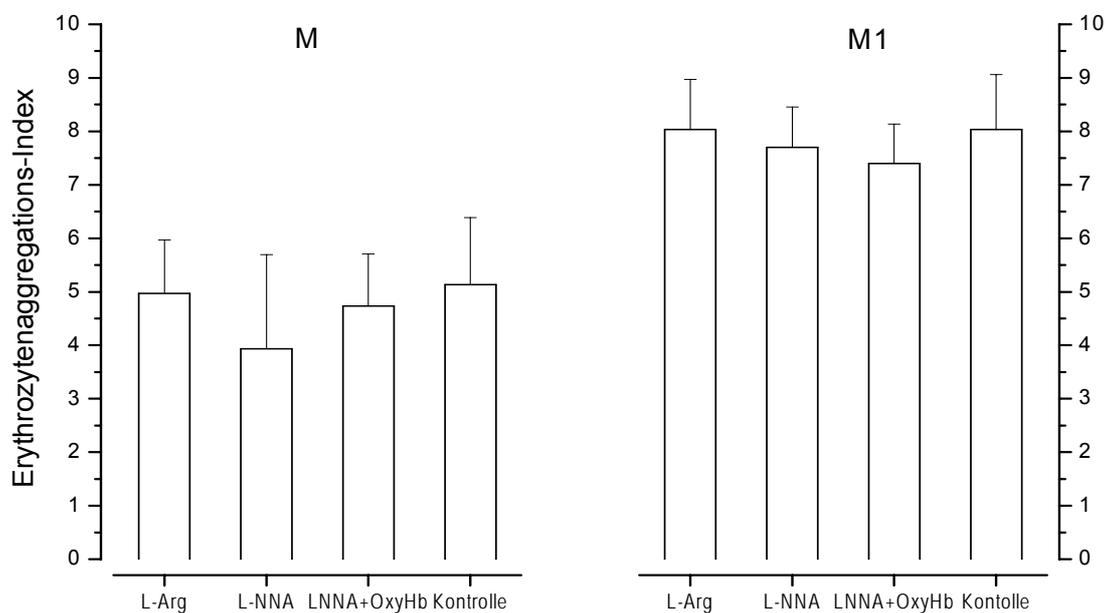


Abbildung 6: Inkubation mit dem NOS-Substrat L-Arginin, dem NOS-Inhibitor L-NNA und zusätzlich dem NO-Abfänger OxyHb auf die Erythrozytenaggregabilität. Der Erythrozytenaggregations-Index im Stillstand (M) und bei Schergrad 3^{-s} (M1) wurde nach 30 min Inkubation gemessen (n=3, p>0,05).

3.2. Einfluss von NO auf die Thrombozytenaggregabilität

Eine Stimulation der erythrozytären NOS mit L-Arginin hemmte die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten. Eine Inhibition der erythrozytären NOS durch L-NNA steigerte die Thrombozytenaggregation im Vergleich zur Aggregation unter Kontroll-Bedingungen (PBS: $0,5 \pm 0,5\%$, $p > 0,05$); L-Arginin: $-6,9 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$; L-NNA: $6,2 \pm 0,8\%$, $p < 0,05$) ($n=17$) (Abbildung 7). Wurden Thrombozyten ohne Erythrozyten mit L-Arginin oder L-NNA inkubiert, traten keine Veränderungen der Thrombozytenaggregation auf ($n=4$) (nicht dargestellt). Die Inkubation mit dem NO-Donator (SIN-1-HCl $1 \mu\text{mol/l}$) hemmte die Thrombozytenaggregation um 23% und wurde als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 7B). Die direkte Inkubation von L-Arginin, L-NNA oder Puffer mit PRP zeigte keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenaggregation.

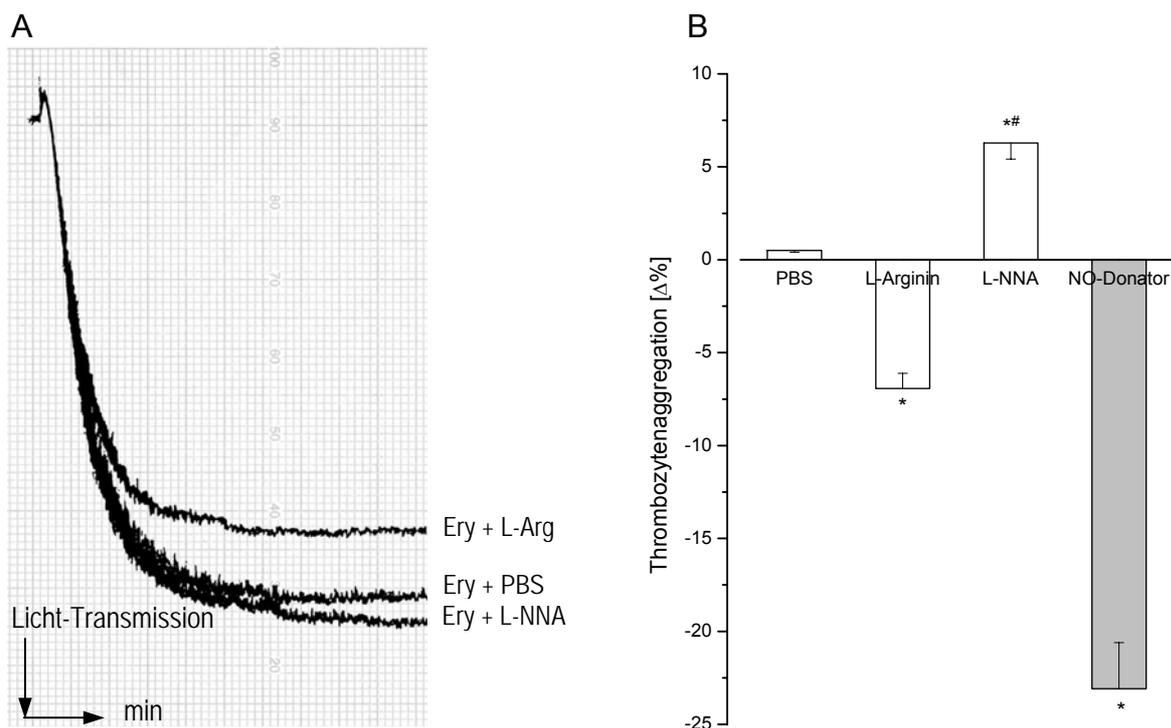


Abbildung 7: **A:** Thrombozytenaggregation im PRP nach der Vollblutinkubation mit PBS, L-Arginin und L-NNA. Die Veränderung der Thrombozytenaggregation nach Zugabe von PBS (Kontrollprobe) bezieht sich auf die unbehandelte, vor der Inkubation vermessene Probe, die Veränderungen in den anderen Inkubationsansätzen auf die Kontrollprobe. **B:** Die Zunahme bzw. Abnahme der Thrombozytenaggregation wurde als $\Delta\%$ dargestellt ($n=17$). Inkubation des PRP mit NO-Donator diente als Positivkontrolle (\blacksquare) ($n=3$). $p < 0,05$, * zeigt die Signifikanz zur Kontrolle an, # zur Inkubation mit L-Arginin.

3.3. Einfluss von NO auf die Plasma- und Vollblutviskosität

Die Plasnaviskosität wurde nach Plasmaseparation des mit L-Arginin, L-NNA, und OxyHb vorinkubierten Vollblutes gemessen. Die Plasnaviskosität war in allen 3 Ansätzen nicht signifikant unterschiedlich. Die Vollblutviskosität wurde nach Vorinkubation mit L-Arginin, L-NNA, NO-Donator und Kontrollpuffer gemessen und zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 8).

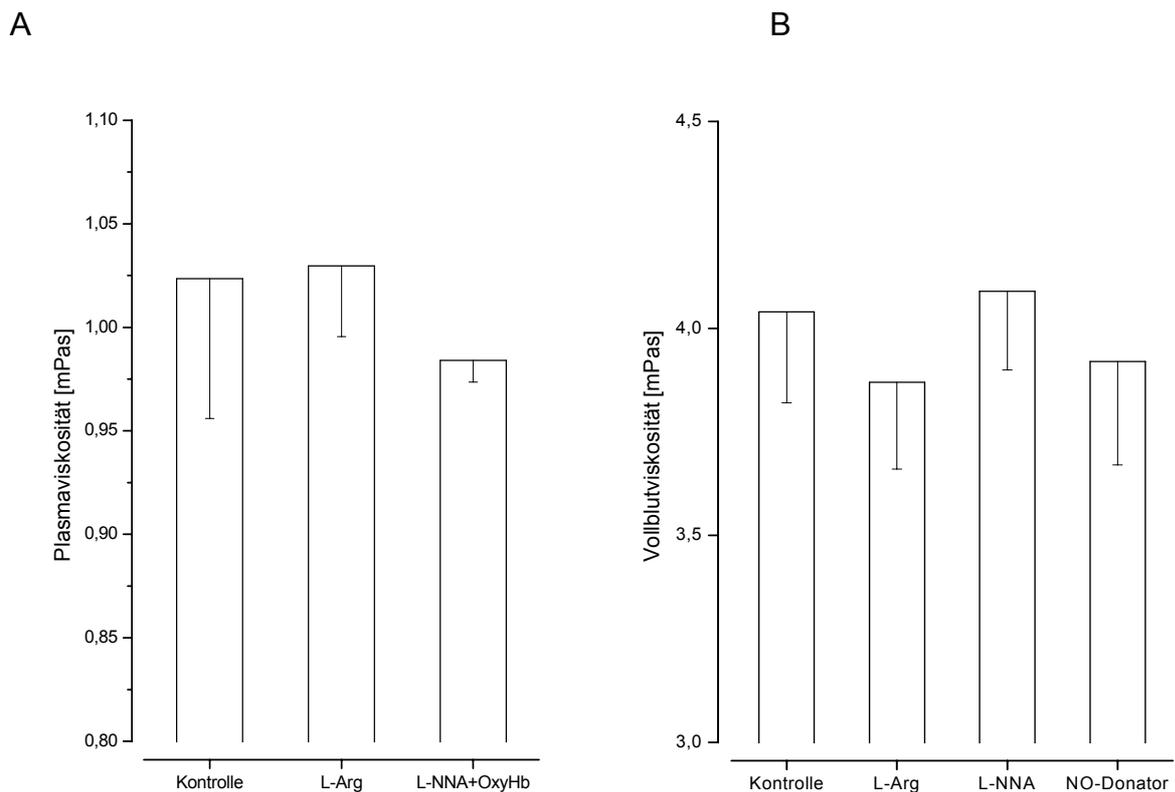


Abbildung 8: Plasma- (A) und Vollblutviskosität (B) nach Vollblut-Vorinkubation mit L-Arginin, L-NNA, OxyHb, NO-Donator bzw. Puffer als Kontrolle (n=3). Die Werte sind nicht signifikant unterschiedlich, $p > 0,05$, und befinden sich unterhalb des Normbereiches.

3.4. Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mittels „Filtrationsassay“

3.4.1. Methodeneigenschaften der vorhandenen Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit

Die Erythrozytenverformbarkeit des humanen Blutes wurde mittels eines Filterassays mit einer Porengröße von 5 µm und einem Vakuumdruck von 20 cmH₂O untersucht. Die Flussgeschwindigkeit lag durchschnittlich bei 0,63±0,03 ml/min. Die Variationskoeffizienten der 3-fach Bestimmungen lagen zwischen 12 und 20% (siehe Tabelle 1).

Bei diesem Versuchsansatz wurden der Hämatokrit und die Leukozytenzahl mitgemessen. Der Hämatokrit und die Leukozytenzahl lagen im Normbereich (Hämatokrit: 36-48% und Leukozytenzahl: 4.000–11.000/µl). Der Hämatokrit korrelierte signifikant mit der Flussgeschwindigkeit. Bei niedrigem Hämatokrit passierte das Blut den Filter schneller ($r = -0,84$, $p < 0,05$) (Abbildung 9).

Tabelle 1: Die Blutflussrate ermittelt mit der Methode nach Reid et al., (1976) (n=6), Hämatokrit (Hkt) und Leukozytenzahl aus Vollblut von gesunden Probanden. Es wurde jeweils eine 3-fach Bestimmung durchgeführt.

Proband n-Zahl	MW±SD (ml/min)	VK (%)	Hkt (%)	Leukozytenzahl (x1000/µl)	Zeitaufwand pro 3-fach Bestimmung (min)	Druckschwankung (mmH ₂ O)
1	0,67±0,09	14	38	6,8	10	2 - 5
2	0,55±0,07	12	47	7,2	8	2-3
3	0,62±0,10	16	47	8,3	11	2-3
4	0,78±0,16	20	36	9,1	9	3-5
5	0,54±0,07	13	45	7,5	10	2-3
6	0,59±0,07	12	42	6,5	12	2-4

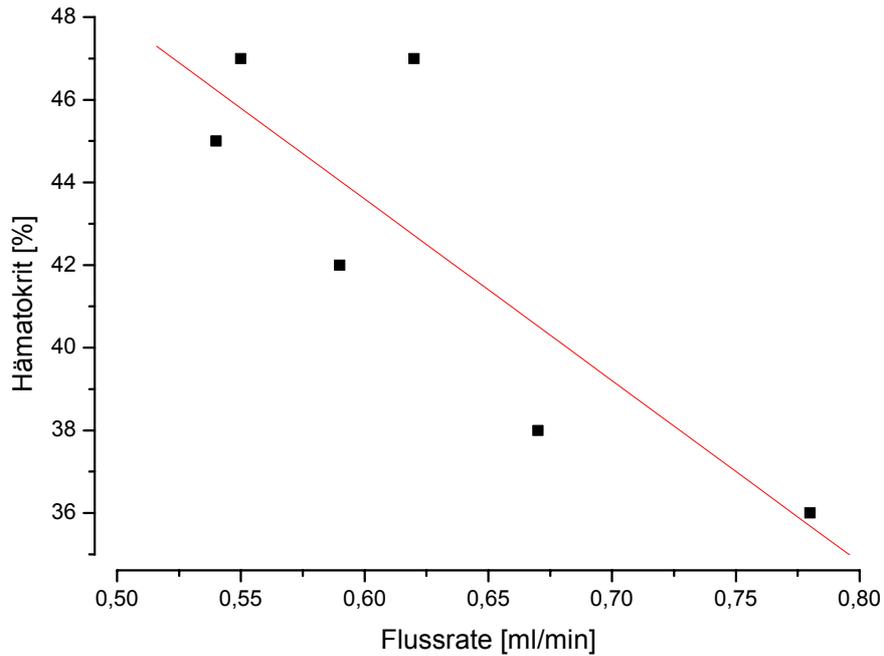


Abbildung 9: Die Korrelation zwischen Hämatokrit und Blutfluss durch den Filter. Es wurde Vollblut von gesunden Probanden vermessen (n=6). Der Hämatokrit beeinflusste die Flussrate signifikant ($p < 0,05$, $r = -0,84$).

Die bei dem Vorversuch ermittelten technischen Eigenschaften der Apparatur und Durchführungsparameter wurden in Tabelle 2 zusammengefasst. Durch die in dieser Tabelle geschilderten Eigenschaften der Methode konnte unter anderem der Variationskoeffizient der Bestimmungen (zwischen 12 und 20%, siehe Tabelle 1) nachgewiesen werden. Die Probenzusammensetzung (Zellzahl) und die Konstanz des Unterdrucks (beeinflusst durch Vakuum, Luftreservoir und Filtratreservoir) beeinflussen maßgeblich die Reproduzierbarkeit der Methode.

Tabelle 2: Charakteristik und Kommentare zur Durchführung des Filtrationsassays nach Reid et al., (1976)

Parameter	Eigenschaften	Kommentare
Probenapplikation	1 ml Spritze ohne Kanüle und Stempel	-
Membranfilter	Polycarbonat 13 mm Durchmesser 5 µm Porengröße	-
Proben	Vollblut	Hämatokrit und Leukozytenzahl waren unterschiedlich von Proband zu Proband (siehe Tabelle 1). Die Erythrozyten- und Leukozytenzahl beeinflussen das Filtrationsverhalten von Vollblut ⁶⁵ .
Vakuum (Unterdruck)	20 cmH ₂ O	Die Regulation des Druckes ist über einen Peleusball gesteuert. Die Druckregulation erwies sich als schwierig.
Luftreservoir	Es gab keine Volumenangabe in der Literatur.	Wenn die Verbindung zwischen Filter und Vakuumsystem angelegt wurde, senkte sich der Meniskus der Wassersäule. Dieses resultierte in bis zu 5 mm Unterdruckschwankung.
Filtratreservoir	Filtratreservoir wurde nach einigen Versuchen mit Filtrat überfüllt.	Das überfüllte Reservoir verursachte eine Volumenänderung des Vakuumsraums und somit Druckschwankungen. Die Entleerung des Reservoirs bedingte den Abbau des kompletten Filtersystems.
Zahl der Messung	1-fach Bestimmung	Die Messungen konnten lediglich nacheinander und nach Aufbau einer neuen Filtereinheit durchgeführt werden. Die 3-fach Bestimmung einer Probe war mit einer Zeitverzögerung von 8-12 min durchzuführen.

3.4.2. Etablierung der modifizierten Filtrationsmethode zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit (Spezifität des Assays)

Folgende Unterschiede konnten im Vergleich zu dem in Kapitel 2.1. beschriebenen Aufbau festgestellt werden:

- Die Regulierung des Drucks wurde über die Vakuumpumpe vereinfacht, so konnte der Druck stabiler gehalten werden.
- Der am System anliegende Unterdruck wurde konstant gehalten:
 - Die Druckschwankungen wurden durch die Vergrößerung des Luftreservoirs (5 l) vermindert.
 - Das Filtratreservoir wurde an eine Filtratleitung zum Abfallgefäß angeschlossen, das Reservoir konnte einfach entleert werden und die Füllhöhe minimal bleiben.
- Drei an dem System parallel anliegende Gefäße für die Filterhalter ermöglichten eine zügige 3-fach Bestimmung, die den Abstand der Einzelmessungen um das ca. 2-fache verringerten und den Gesamtzeitaufwand erniedrigten.

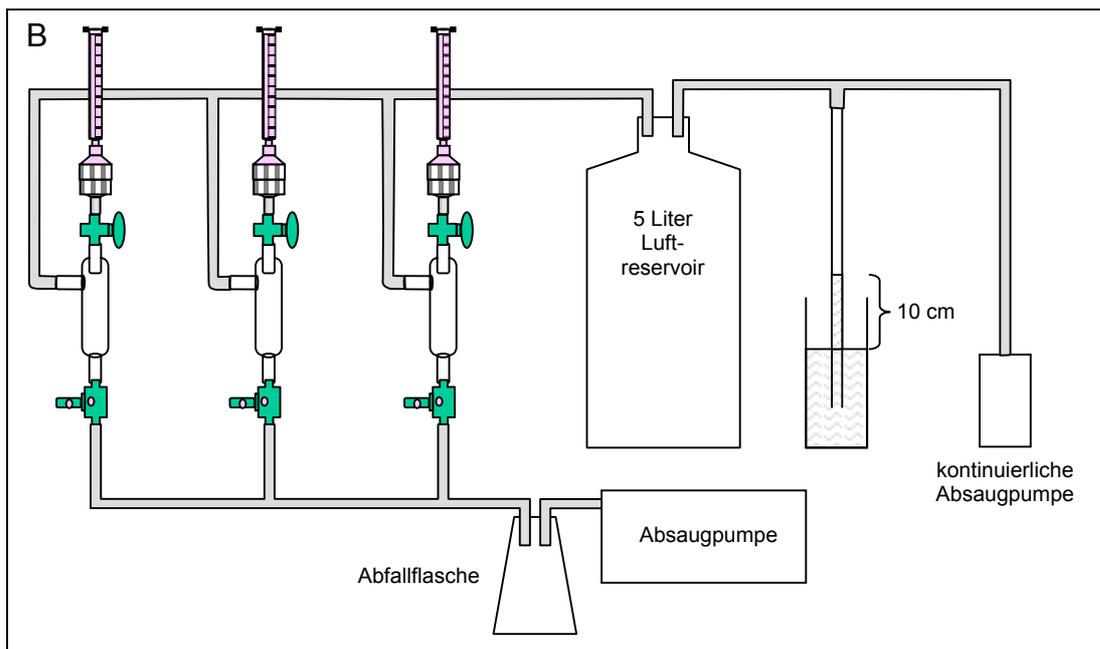
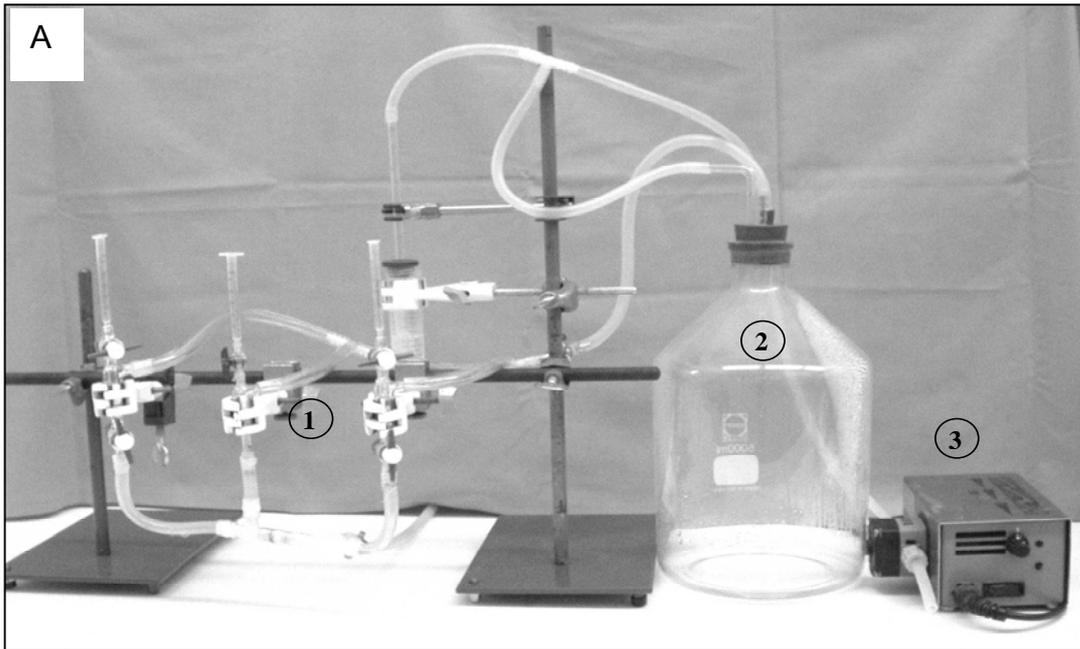


Abbildung 10: A: Darstellung des modifizierten Filtrationsassays. Die technischen Veränderungen wurden nummeriert:

1. Die drei Filtratreservoirs sind parallel mit dem Vakuumsystem und der Filtratleitung des Abfallsystems verbunden.
2. Das Luftreservoir besteht aus einem 5 Liter Glasgefäß
3. Eine kontinuierliche Vakuumpumpe ist angeschlossen.

B: Schematischer Aufbau mit drei parallelen Messverfahren, kontinuierlicher Vakuumpumpe und Abfallsystem.

Die Erythrozytenverformbarkeit wurde mit dem neu aufgebauten Filtrationssystem gemessen. Hierbei wurden der Zeitaufwand pro 3-fach Bestimmung und die Druckschwankung (während des Anlegens des Vakuumsystems) notiert. Das Ergebnis wurde in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Durchführung der Messung der Erythrozytenverformbarkeit mit dem neuen Aufbau (n=3). Der Zeitaufwand pro 3-fach Bestimmung und Druckschwankung wurde beobachtet.

Proband n-Zahl	MW±SD (ml/min)	VK (%)	Hkt (%)	Leukozytenzahl (x1000/µl)	Zeitaufwand pro 3-fach Bestimmung (min)	Druck- schwankung (mmH ₂ O)
1	0,39±0,09	22	40	8,1	5	0-1
2	0,47±0,09	20	43	7	6	0-1
3	0,52±0,09	18	36	6,5	6	1-2

Unabhängig vom Aufbau des Assays wurde die Probenaufarbeitung verändert. Reid et al. filtrierten 1976 Vollblut. Jedoch beeinflussen die Leukozytenzahl sowie die Erythrozytenzahl (siehe oben) das Ergebnis der Filtration⁶⁵. Zur Entfernung der Leukozyten erfolgte eine Separation der Erythrozyten wie in Kapitel 2.1. beschrieben. Die Reinheit des Erythrozytensediments wurde durch Lichtmikroskopie, FACS-Analyse (Beckman Coulter Epics XL, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und Zellzählung (Beckman Coulter Counter, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) kontrolliert. Es wurde eine Reinheit der Erythrozyten von ≥99% erreicht.

Das durch diese Separationsmethode entstandene Erythrozytensediment (siehe Kapitel 2.1.) hatte einen Hämatokrit von 84%. Um den für die Filtration optimalen Hämatokrit herauszufinden, wurde dieses Sediment mit Puffer auf den gewünschten Hämatokrit exakt verdünnt (Abbildung 11).

Um eine weitere Optimierung des Systems zu erreichen, wurden zusätzliche Modifikationen des Assays durchgeführt. In Vorversuchen wurden verschiedene Filtergrößen (Durchmesser, Porengröße) ausgetestet. Hierbei zeigte die Filtermembran mit 5 µm Porengröße und einem Durchmesser von 13 mm die stabilsten Ergebnisse. Weiterhin wurden der Einfluss des Hämatokrits sowie der des angelegten Unterdruckes untersucht. Ein eingestellter Hämatokrit von 35% sowie ein Unterdruck von 10 cmH₂O zeigten hierbei den niedrigsten Variationskoeffizienten. Die Linearität unterschiedlicher Hämatokritwerte mit einem angelegten Unterdruck von 20 cmH₂O betrug $r = -0,95578$ ($p < 0,05$). Der durch die Modifikation konstante Unterdruck von 10 cmH₂O konnte die Linearität verbessern ($r = -0,99861$; $p < 0,01$; Abbildung 11). In einem weiteren Schritt wurde die Aufarbeitung mit autologem Plasma und Puffer verglichen. Nach Einstellung eines Hämatokrits von 35% war der Variationskoeffizient der Flussrate mit Puffer $< 10\%$ und mit Plasma $> 10\%$.

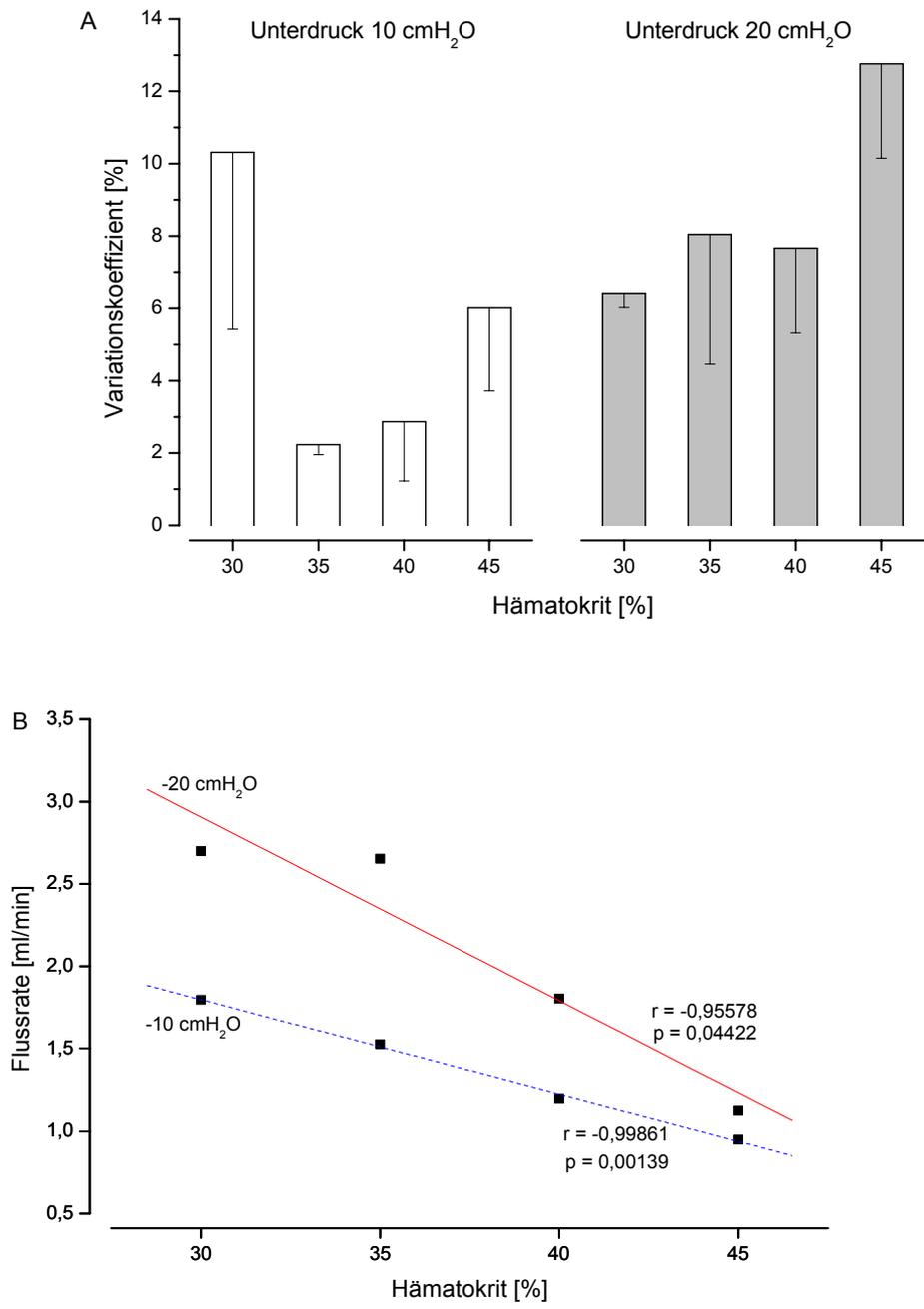


Abbildung 11: Humanes Blut wurde mit unterschiedlichem Hämatokrit und unterschiedlichem Unterdruck filtriert (n=3). Das Ergebnis ist angegeben als Mittelwert des Variationskoeffizienten einer 3-fach Bestimmung (A) sowie die Flussrate in Beziehung zum Hämatokrit (B).

Diese Filtrationsmethode kann sowohl für humanes Blut als auch für murines Blut verwendet werden. Die Blutentnahme bei Mäusen ergibt nur eine geringe Menge Blut (ca. 500-700 µl), die für die bisher entwickelte Methode jedoch nicht ausreicht. Diese Proben wurden sodann direkt aus dem Vollblut auf einen niedrigeren Hämatokrit verdünnt. Für die Herstellung dieses Ansatzes galt der Verdünnungsfaktor aus der Formel:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = \frac{\text{Gewünschter Hämatokrit (\%)}}{\text{ursprünglicher Hämatokrit (\%)}}$$

Verschieden eingestellte Hämatokritwerte des murinen Blutes wurden durch einen Filter mit einer Porengröße von 3 µm und einem Vakuum von 10 cmH₂O untersucht. Bei einem Hämatokrit von 45% (unverdünntes Blut) und von 25% (mit Puffer verdünnt) konnten die Proben den Filter nicht passieren, während die Blutprobe mit einem Hämatokrit von 5% (mit Puffer verdünnt) passieren konnte (Abbildung 12).

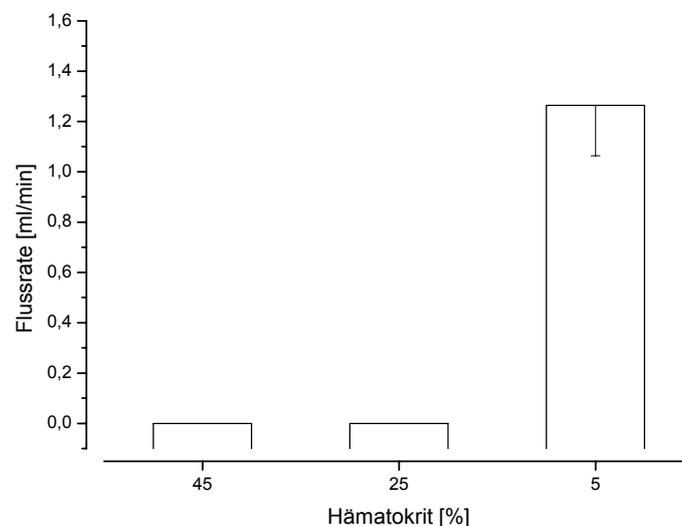


Abbildung 12: Die Erythrozytenverformbarkeit von murinem Blut wurde mittels Filtration gemessen (n=3). Es konnten nur die Erythrozyten aus der Probe mit einem Hämatokrit von 5% den Filter mit der Porengröße von 3 µm passieren. Der Variationskoeffizient ist <10%.

3.4.3. Spezifität und Reproduzierbarkeit der neu etablierten Methode

Die im Kapitel 3.4.2. beschriebenen Modifizierungen des Filtrationsassays zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit führten letztendlich zur Etablierung einer neuen Methode mit folgenden Eigenschaften:

- Humane Probe: Gewaschenes Blut mit Hämatokrit von 35% (mit Puffer angesetzt)
- Murine Probe: Verdünntes Blut mit Hämatokrit von 5% (mit Puffer verdünnt)
- Porengröße des Filters: 5 μm für humane und 3 μm für murine Probe
- Vakuumsystem mit dem Unterdruck von 10 cmH_2O .

Spezifität:

Um zu überprüfen, ob der modifizierte Filtrationsassay verwendbar ist, wurden Blutproben mit Glutardialdehyd inkubiert und dann filtriert ⁶⁶. Hierbei nahm die Erythrozytenverformbarkeit mit steigender Konzentration von Glutardialdehyd ab (bis zu 67,8%). Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass Pentoxifyllin die Erythrozytenverformbarkeit verbessert ^{16;67}. Bei humanen Proben nahm die Verformbarkeit nach Inkubation mit Pentoxifyllin leicht zu (16%) (Abbildung 13).

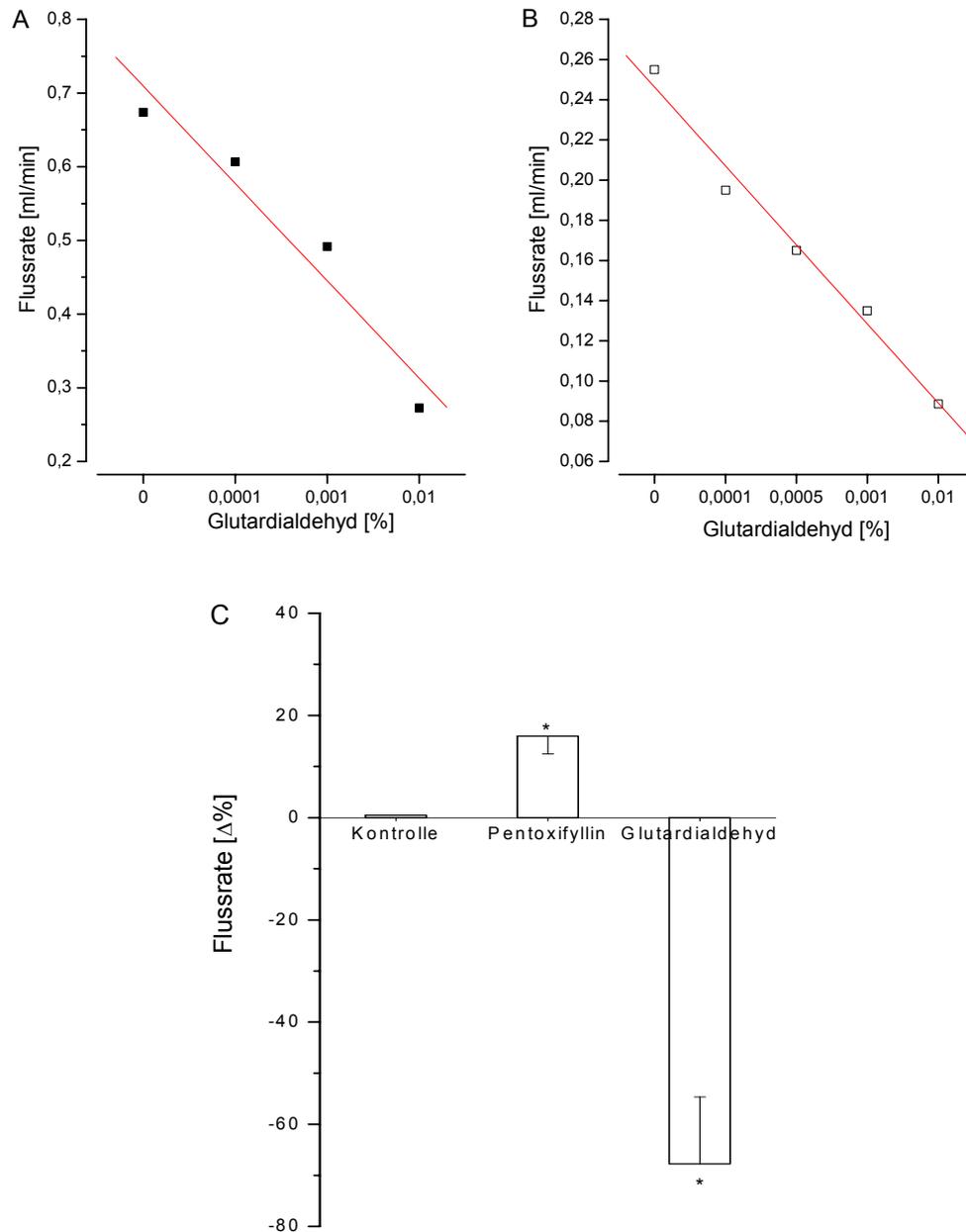


Abbildung 13: Inkubation von Blutproben mit Glutaraldehyd in unterschiedlichen Konzentrationen. Sowohl humaner als auch muriner Blutfluss sind linear bei der Durchführung der Filtration. **A:** Humane gewaschene Erythrozyten, Hämatokrit 35% und 5 μm Filterporengröße ($r=-0,96749$; $n=4$; $p<0,05$). **B:** Murines Vollblut mit Puffer verdünnt, Hämatokrit 5% und Filterporengröße 3 μm ($r=-0,99134$; $n=5$; $p<0,001$). **C:** Die Erythrozytenverformbarkeit nahm nach der Inkubation mit Pentoxifyllin (2 mg/ml) zu, während sie nach Glutaraldehyd (0,01%) abnahm. Die Flussrate wurde als $\Delta\%$ gegeben, $n=3$, $*(p<0,05)$ im Vergleich zur Kontrolle (Pufferlösung).

Reproduzierbarkeit:

Intra-Observer-Reproduzierbarkeit: Das Blut eines Probanden wurde in 3 Aliquots separiert und mittels Puffer auf einen Hämatokrit von 35% verdünnt. Anschließend wurde die Erythrozytenverformbarkeit von einem Untersucher gemessen. Der Variationskoeffizient der 3-fach Bestimmung und der 3 Aliquots bei einem Probanden war < 10% (n=3).

Inter-Observer-Reproduzierbarkeit: Das Blut eines Probanden wurde in 3 Aliquots separiert, mittels Puffer auf einen Hämatokrit von 35% verdünnt und die Erythrozytenverformbarkeit von 3 unterschiedlichen Untersuchern bestimmt. Der Variationskoeffizient der von 3 Beobachtern gemessenen Werte lag bei < 10% (n=3).

Zusammenfassung der Modifikationen:

Tabelle 4: Zusammenfassung des modifizierten Filtrationsassays zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit.

Charakteristika	Reid et al. (1976)	Modifizierte Methode	
		Human	Murin
Probe	humanes Vollblut	reine humane Erythrozyten, auf Hkt 35% mit Puffer angesetzt	verdünntes Vollblut, auf Hkt 5% mit Puffer verdünnt
VK	12-20	< 10	< 10
Unterdruck	20 cmH ₂ O	10 cmH ₂ O	10 cmH ₂ O
Porengröße der Filter	5 µm	5 µm	3 µm
Durchmesser der Filter	13 mm	13 mm	13 mm
Zeitaufwand pro 3-fach Bestimmung [min]	8-12	5-6	5-6

3.4.4. Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit

Exogenes NO:

Die basale Erythrozytenverformbarkeit von 3 gesunden Probanden betrug $0,63 \pm 0,03$ ml/min. Durch eine Vorbehandlung mit NO-Donatoren stieg die Erythrozytenverformbarkeit auf $0,77 \pm 0,08$ (nach 600 nmol/l GSNO) und auf $0,7 \pm 0,04$ ml/min (nach 2 μ mol/l NO-Lösung). Nach Zugabe von 0,1 mmol/l OxyHb nahm die Erythrozytenverformbarkeit auf $0,53 \pm 0,03$ ml/min ab. Im Vergleich zur Kontrolle war die Erythrozytenverformbarkeit nach Zugabe von NO-Donatoren erhöht (GSNO: 19%; NO-Lösung: 9%), nach Zugabe von OxyHb reduziert (16%) (Abbildung 14).

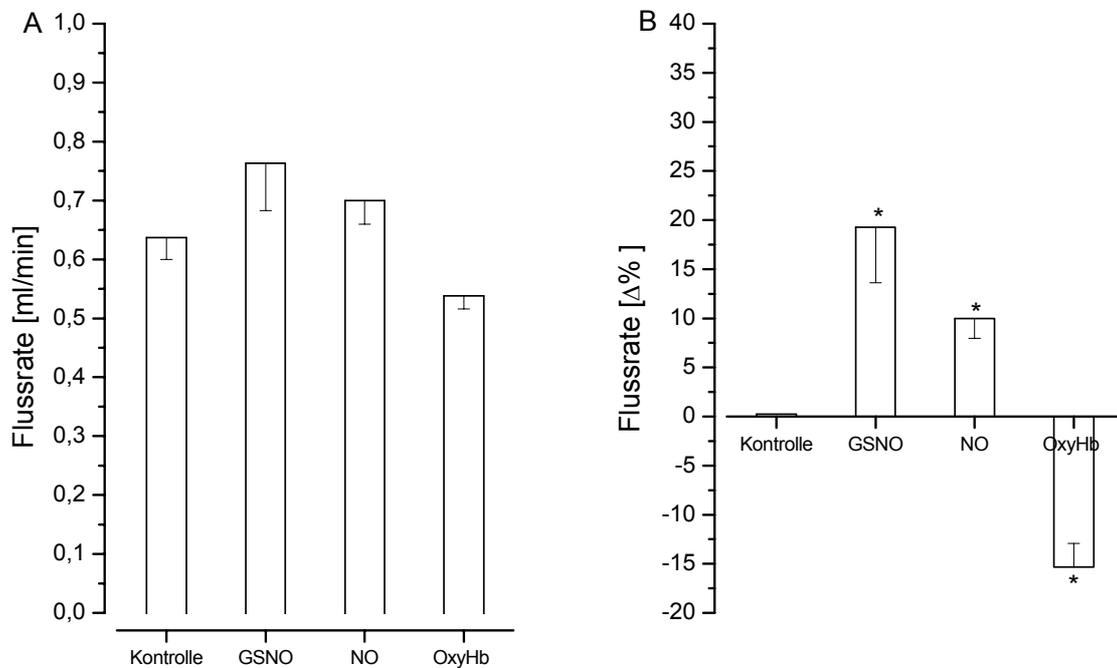


Abbildung 14: **A:** Die Vorbehandlung mit NO-Donatoren (GSNO und NO-Lösung) konnte bei humanem Blut die Flussrate steigern, während die Zugabe von externem OxyHb diese erniedrigte. **B:** Die Flussrate wurde als $\Delta\%$ im Vergleich zur Kontrolle mit Puffer dargestellt. $n=3$, $p<0,05$.

Erythrozytäres endogenes NO:

Die Inkubation mit L-Arginin erhöhte die Flussrate auf 26,5% im Vergleich zur Kontrolle. Die Inhibition der erythrozytären NOS durch L-NNA verringerte die Flussrate um 38,5%. Diese Veränderungen (Erhöhung und Verringerung) waren statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die zusätzliche Addition eines NO-Fängers (OxyHb) zum L-NNA verhinderte nahezu vollständig (75%) den Durchtritt der Erythrozyten durch die Filterporen ($p < 0,001$) (Abbildung 15).

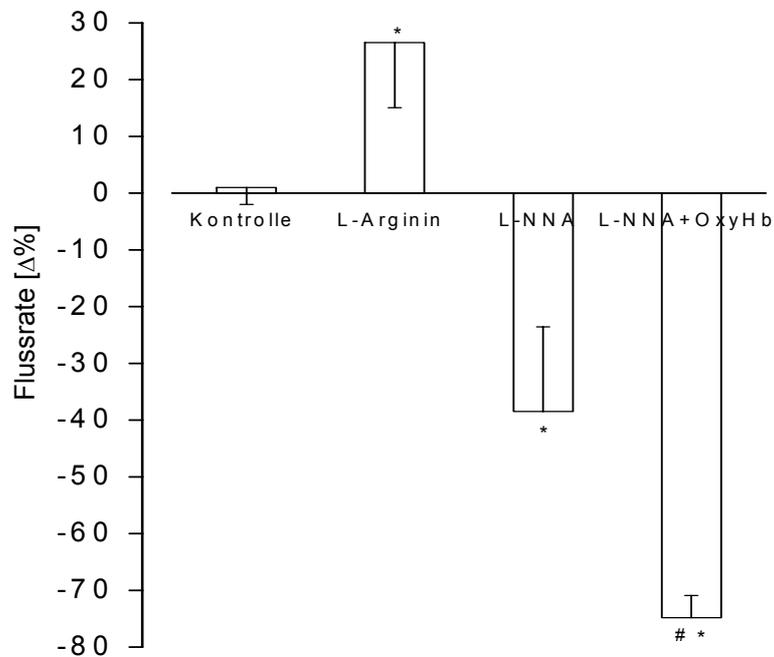


Abbildung 15: Die Unterschiede zwischen Kontrolle und zunehmender oder abnehmender Flussrate wurden als $\Delta\%$ dargestellt ($n=7$, $p < 0,05$), * signifikant zur Kontrolle, # signifikant zu L-NNA ($p < 0,001$).

Erythrozytenverformbarkeit von murinem Blut:

Murines Blut wurde mit dem in Kapitel 2.1. beschriebenen Protokoll untersucht. Die Flussrate von 4 WT-Mäusen und 4 eNOS^{-/-}-Mäusen betrug $0,7 \pm 0,3$ ml/min und $0,39 \pm 0,1$ ml/min; $p > 0,05$ (Abbildung 16). Die Messung fand unter gleichen Bedingungen (RT, Geschlecht) statt.

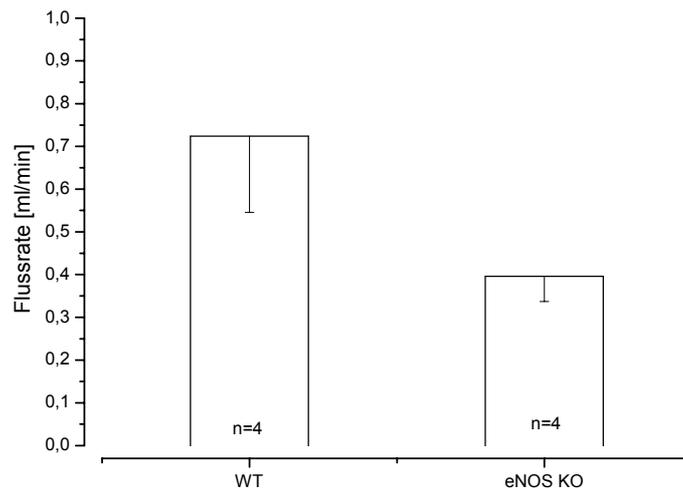


Abbildung 16: Die Flussrate von murinem Blut (WT und eNOS^{-/-} mit einem Hämatokrit von 5% wurde bestimmt (n=4, $p > 0,05$).

3.4.5. Kontrollversuch zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit

Die Osmolarität und der pH-Wert waren nach unterschiedlicher Inkubation im Normbereich. Die Osmolarität lag zwischen 292,5-294,3 mOsmol/l (Abbildung 17A; normaler Bereich für humanes Plasma: 280-300 mOsmol/l). Die Unterschiede waren nicht signifikant.

Die pH-Werte desselben Inkubationsansatzes lagen zwischen 7,5-7,6. Es lag keine statistische Signifikanz vor (Abbildung 17B).

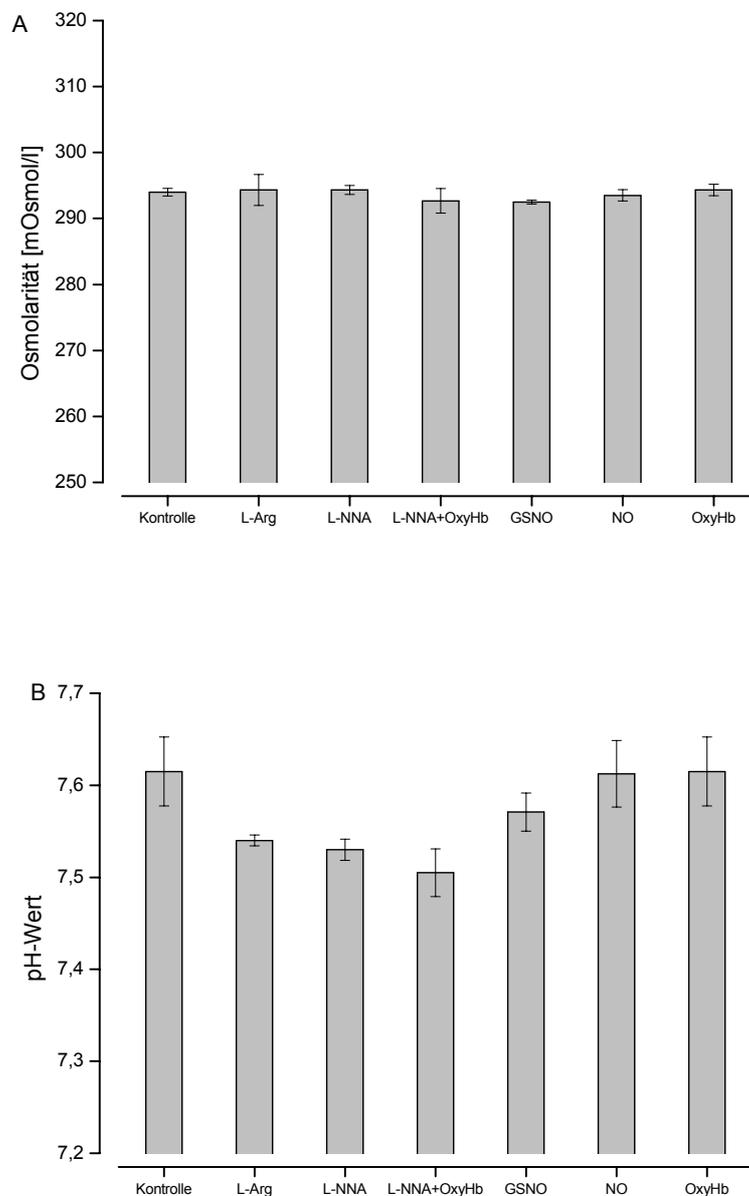


Abbildung 17: Die Osmolarität (A) und der pH-Wert (B) des Plasmas waren bei den unterschiedlichen Inkubationsansätzen kaum verändert (n=3, p>0,05).

Um eine Fragmentierung oder Zerstörung sowie Veränderungen der Form der Erythrozyten zu kontrollieren, wurde vor und nach Inkubation mit Puffer, L-Arginin, L-NNA, L-NNA + OxyHb, und GSNO sowie Filterpassage je ein Ausstrich angefertigt. Die Form der Erythrozyten war unverändert (Abbildung 18).

Vor der Filtration

Nach der Filtration

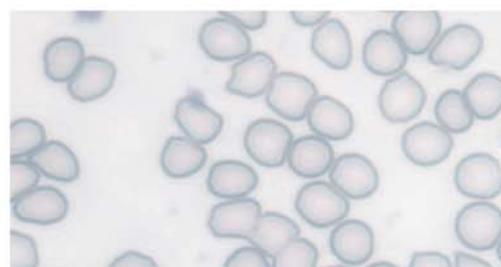
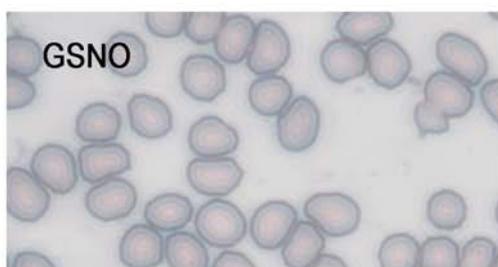
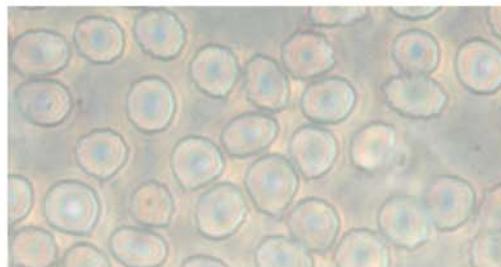
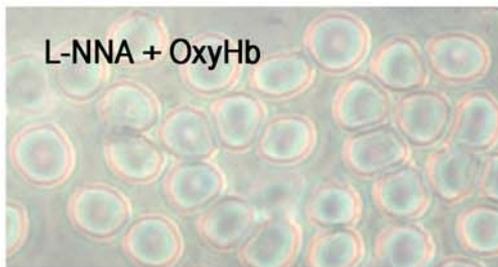
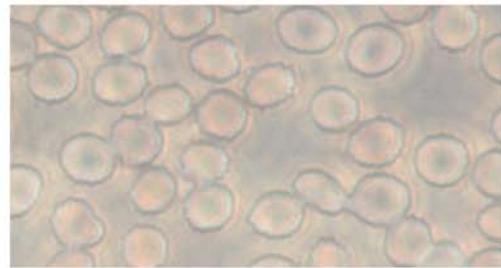
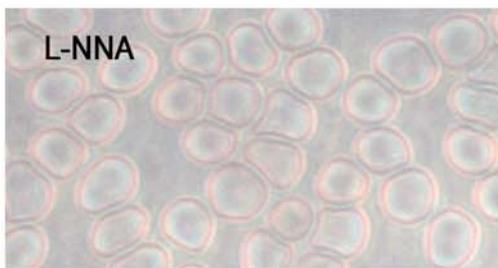
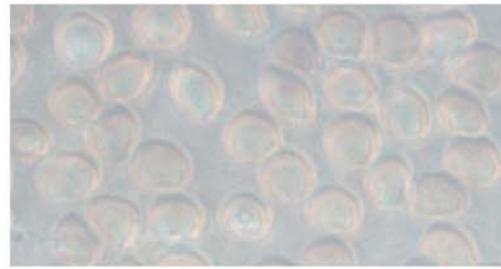
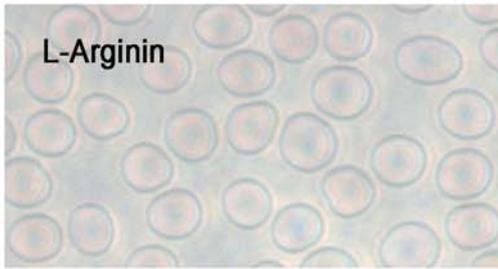
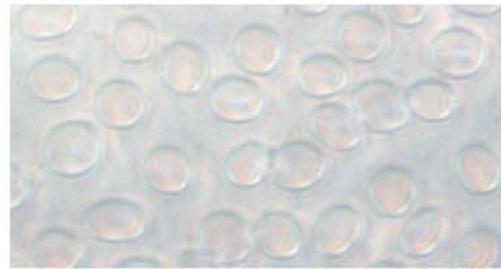
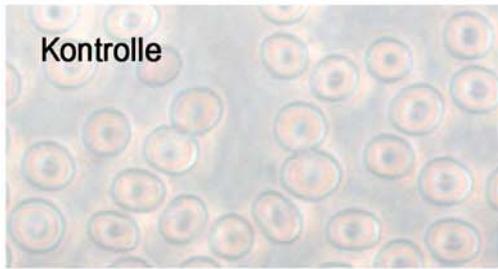


Abbildung 18: Form der Erythrozyten vor und nach Filtration. Es sind keine relevanten Veränderungen, insbesondere keine Erythrozytenfragmente zu sehen.

4. Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die Methoden zur Bestimmung der rheologischen Eigenschaften des Blutes diskutiert. Nachfolgend werden diese mit den in dieser Arbeit verwendeten bzw. etablierten Methoden verglichen. Im Weiteren wird der Einfluss von NO auf die rheologischen Parameter des Blutes diskutiert und letztendlich auf dessen physiologische- und pathologische Relevanz eingegangen.

4.1. Methode zur rheologischen Untersuchung

Blut besteht aus zwei Komponenten: Plasma und Blutzellen. Die beiden Komponenten haben eigene Charakteristika und Bestandteile. Wie andere Flüssigkeiten hat das Blut alle Eigenschaften einer Flüssigkeit, wie z.B. die Viskosität. Die Blutviskosität wird sowohl durch den Anteil der zellulären Bestandteile (Hämatokrit), die erythrozytäre Verformbarkeit sowie Aggregation und dem Proteingehalt des Plasmas beeinflusst ⁶⁸. In Niedrigflussarealen ist die Viskosität eine völlig andere als in Hochflussarealen, da der lokale Hämatokrit maßgeblich durch die Gefäßgröße und den Blutstrom sowie auch die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten selbst festgelegt wird (Erythrozytenverformbarkeit und -aggregation). Somit stellt die Messung der Blutviskosität die Summe aller rheologischen Eigenschaften des Blutes dar; sie kann jedoch keine Aussage über die einzelnen Determinanten liefern. Bei der Vermessung der Blutviskosität sollten grundsätzlich alle Einflussfaktoren mit in Erwägung gezogen werden. Die Blut-/Plasmaviskosität kann über drei verschiedene Messprinzipien ⁶⁹⁻⁷¹ bestimmt werden:

1. Die Kapillare: Die Flussrate der Probe durch einen Kapillarschlauch wird bestimmt.
2. Das rotationale Viskosimeter: Die Probe wird mit einem Koaxialzylinder oder durch großflächige Schaufeln zur Rotation gebracht, der Widerstand der Probe wird mit einem Transducer bestimmt.
3. Das Kegel-Platten-Viskosimeter: Das Prinzip ist dem rotationalen Viskosimeter ähnlich, auch hier liegt die Probe zwischen einem Kegel und einer Platte. Ein Beispiel für ein kommerziell erhältliches Viskosimeter ist das Kapillarschlauch-Viskosimeter (KSV-6, Rheomed GmbH, Heppenheim, Deutschland). Da das Plasma eine entscheidende Determinante für die Vollblutrheologie ist, wurde neben der Vollblutviskosität und der Erythrozytenverformbarkeit/-aggregation die Plasmaviskosität vermessen ⁷².

Erythrozyten stellen den größten Teil der zirkulierenden Blutzellen dar. Beim Fließverhalten des Blutes spielen die Erythrozyten durch ihre Aggregationsneigung eine entscheidende Rolle. Dies kann besondere Relevanz bei einer gestörten Mikrozirkulation haben. Eine schnelle und zuverlässige Erfassung der Erythrozytenaggregation ist daher von Interesse. Die Erythrozytenaggregation kann mittels verschiedener Methoden bestimmt werden: 1. Die direkte mikroskopische Beobachtung, 2. die Erythrozytensedimentationsrate (z.B. nach Westergren) und 3. die optische Messung über ein Rheoskop (z.B. Myrenne Aggregometer). Die direkte Beobachtung mittels eines Mikroskops ist relativ unsensitiv, da die Auswertung sehr abhängig von der Objektivität des Beobachters ist. Die Westergren-Methode, nach der man antikoaguliertes Blut 2 Stunden in einem Glasrohr stehen lässt, beinhaltet eine einfache Durchführung, ist jedoch zeitaufwändig und sehr empfindlich für Bewegungsartefakte. Wegen seiner Einfachheit und Schnelligkeit wird das Myrenne-Aggregometer sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Routine eingesetzt. Die Messung ist einfach, automatisiert, reproduzierbar^{58;59;73} und mit kleinen Probenvolumina (30 µl pro 1-fach Bestimmung) durchzuführen.

Thrombozyten stellen den Teil der Blutzellen dar, der für die hämostaseologischen Mechanismen wichtig ist. Plättchenfunktionstests werden häufig zur Erkennung einer angeborenen oder erworbenen Thrombozytenfunktionsstörung und zur Erfassung einer gesteigerten Plättchenaktivierung, die mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen kann, verwendet. Es gibt mehrere Verfahren, mit denen die Plättchenfunktion gemessen werden kann. Der Plättchenadhäsions-Assay misst die Adhäsion der Thrombozyten, ist jedoch zeitraubend und umständlich. Dem am häufigsten verwendeten Plättchenfunktionstest liegt die Plättchenaggregation zugrunde. Dieses Verfahren wurde 1963 von Born et al. entwickelt⁶⁰. Es gibt zwei Geräte für dieses entsprechende Verfahren: 1. Das PFA-100 (Platelet Function Analyzer) misst die Verschlusszeit der Messkassette durch aggregierende Plättchen im Vollblut⁷⁴ und 2. ein optisches Aggregometer (Chronolog-Aggregometer), das die Lichtdurchlässigkeit der mit Kollagen oder ADP stimulierten plättchenhaltigen Probe vermisst⁶⁰. Das Ergebnis des PFA-100 ist durch Hämatokrit- und Thrombozytenzahl-Schwankungen fehleranfällig. Deshalb wird der Plättchenfunktionstest mittels Chronolog am häufigsten verwendet, der durch die genannten Parameter weitgehend unbeeinflusst in der Bestimmung bleibt⁷⁵.

4.2. Verbesserung des Filtrationsassays zur Untersuchung der Erythrozytenverformbarkeit

Die Erythrozytenverformbarkeit ist definiert als die Fähigkeit der Zellen, sich durch Scherkraft zu verformen^{19;76}. Diese findet in großen Gefäßen sowie auch im kapillären Bereich der Gefäße statt. In der Mikrozirkulation (siehe Kapitel 1.) ist die Verformbarkeit der Erythrozyten die maßgebliche Voraussetzung für den Blutfluss⁷².

Zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit werden unterschiedliche Messmethoden verwendet: die Mikroaspiration, das Laserdiffraktometer und die Mikrofiltration (Filtrationsassay). Das Laserdiffraktometer spiegelt die Scherkraft-induzierte Verformbarkeit wider (der *in vivo* Situation - Blutfluss - ähnlich), während die Filtration und Mikropipettenaspiration den Zustand in der Mikrozirkulation reflektieren. Bei der Mikroaspiration wird eine Mikropipette verwendet, deren Öffnung (3-6 µm) kleiner als der Erythrozytendurchmesser ist. Ein einzelner Erythrozyt wird durch die Pipette angesaugt und mit Hilfe eines Elektronenmikroskops beobachtet. Der angesaugte Teil der Zelle wird vermessen und die Verformbarkeit mit Hilfe einer Software berechnet⁷⁷. Das Laserdiffraktometer misst die Elongation der Erythrozyten, die durch Scherkraft induziert wird, und durch die ein Laserstrahl reflektiert wird. Die Untersuchung zur Erythrozytenverformbarkeit mittels Laserdiffraktometer (auch Ektazytometrie genannt) und Mikroaspiration ist im Vergleich zur Mikrofiltration sehr kostspielig in der Anschaffung und der Anwendung. Der Filtrationsassay als Messmethode zur Erythrozytenverformbarkeit wurde 1964 erstmals von Nicolau beschrieben⁷⁸. In den folgenden Jahren wurde diese Methode durch zahlreiche Modifikationen weiterentwickelt. Eine entscheidende Entwicklung wurde 1976 von Reid et al. beschrieben⁶¹. Im Vergleich zu den anderen Methoden, wird der Filtrationsassay häufig in der Forschung eingesetzt⁷². Die Verformbarkeitsbestimmung mittels Filtration hat den entscheidenden Vorteil, dass diese Methode die *in vivo* Situation am ehesten widerspiegelt⁶⁹. Allerdings zeigt die bislang beschriebene Filtrationsmethode auch einige Schwachstellen: Reid et al. verwendeten Vollblut. Die Blutzellen in 1 µl Vollblut sind wie folgt verteilt: 4.000.000 bis 5.000.000 Erythrozyten, 4.000 bis 11.000 Leukozyten und 150.000 bis 450.000 Thrombozyten, d.h. die zu untersuchenden Erythrozyten sind durch andere Blutzellen „kontaminiert“. Besonders die Leukozyten beeinflussen die Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit durch eine Verstopfung der Membranporen⁷⁹. Die intraindividuell unterschiedliche Leukozytenzahl beeinflusst somit das Ergebnis der

Filtrationsmethode⁶⁵. Für den Filtrationsassay sollte die Leukozytenkontamination (Leukozytenreste nach Separation) maximal $0,025 \times 10^9/l = 25$ Leukozyten/ μl sein^{9;80}. Um die Leukozytenzahl im Vollblut zu verringern, wurden bisher verschiedene Verfahren angewendet. Das Vollblut kann mittels eines Filters aus Baumwolle (*Gossypium barbadense*) oder Synthetik gewaschen werden⁸⁰. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen analog zu präliminären Ergebnissen⁶⁶, dass gewaschene Erythrozyten im Vergleich zu Vollblut zu einer besseren Reproduzierbarkeit bei der Anwendung der Filtrationsmethode führen (siehe Kapitel 3.4.2.).

Neben dem diskutierten Einfluss der Verunreinigung der Erythrozyten durch Leukozyten beeinflusst des Weiteren der intraindividuelle Hämatokrit des Vollblutes die Blutdurchflussgeschwindigkeit im Filtrationsassay⁸¹. Der Einfluss des Hämatokrits wird häufig in der Literatur rechnerisch korrigiert, indem man diesen mit der Flussrate multipliziert und einen Index errechnet⁸¹. Diese Berechnung stellt jedoch keine akzeptable Alternative für die erfolgte Korrektur des Hämatokrits bei der Probenaufarbeitung dar.

Außer der Leukozytenzahl und dem Hämatokrit kann die Viskosität des Plasmas die Filtrationsverfahren beeinflussen^{25;82} (siehe Kapitel 3.4.2.). Die Viskosität selbst ist abhängig vom Plasmaproteingehalt⁶⁸. Des Weiteren ist beschrieben, dass der vollständige Entzug des plasmatischen Albumins eine artifizielle Kerbe in den Erythrozyten verursacht. Die Zugabe von Albumin nach dem Waschen soll die physiologische Form der Erythrozyten erhalten⁸³. Ob die nicht physiologische Kerbung der Erythrozyten tatsächlich durch Albuminmangel verursacht wird oder ein methodisches Artefakt ist, das durch den Kontakt zwischen Erythrozyten und Glas entsteht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert⁶⁶.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss auf das Filtrationsergebnis durch den Hämatokrit ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.4.2.). Zusätzlich wurden nur hochreine Erythrozyten (erlangt durch eine spezielle Separation⁸⁴: Reinheit von mindestens 99,9%) verwendet (siehe Kapitel 3.4.2.). Dieses Verfahren der Probenaufarbeitung konnte letztendlich direkt drei verschiedene, oben genannte, die Sensitivität verringernde Einfluss-Faktoren minimieren: 1. „Kontamination“ durch Leukozyten⁷⁹, 2. intraindividuell verschiedener Hämatokrit⁸¹ und 3. intraindividuelle Plasnaviskosität²⁵.

Neben der veränderten Probenaufarbeitung (Verwendung reiner Erythrozyten und Einstellung auf den gleichen Hämatokrit) wurden weitere essentielle Nachteile des Filtrationsassays (siehe Kapitel 3.4.1., 3.4.2.) aufgehoben, indem das Drucksystem stabilisiert und eine „Mehrfachprobenvermessung“ verwirklicht wurde. Durch den stabilisierten Unterdruck und den Einsatz von drei parallelen Filterhaltern wurde die Messung im Vergleich zu der ursprünglichen Methode um den Faktor 2 beschleunigt. Additiv hierzu wurde der Variationskoeffizient der Messung signifikant verringert (bis zu 10fach) (siehe Kapitel 3.4.2.). Die technischen Verbesserungen lassen eine 3-fach Bestimmung bei vermindertem Variationskoeffizienten und einer zusätzlichen Zeiteinsparung zu.

Die gezielte Verwendung eines geeigneten Antikoagulans erscheint wichtig für die Messung mittels Filtration. Es ist bekannt, dass Heparin zu einer Mikroaggregation führen kann; der Effekt auf die Filtrationsergebnisse ist jedoch widersprüchlich ⁸⁵. EDTA ist ein Chelatbildner für Ca^{2+} und wird ebenfalls als Antikoagulans verwendet. Jedoch ist Ca^{2+} ein Kofaktor der NOS, dessen Einfluss auf die Verformbarkeit der Erythrozyten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden soll. Dadurch könnte die Verwendung von EDTA zu verfälschten Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurde Hirudin verwendet. Ein Einfluss von Hirudin auf die Messung der erythrozytären Verformbarkeit ist nicht bekannt.

Als Positivkontrolle und zur Einschätzung der Verwendbarkeit der modifizierten Methode wurde Glutardialdehyd zu den aufgearbeiteten Blutproben gegeben ⁶⁶. Glutardialdehyd wirkt unter anderem als „cross-linker“ der Membranproteine ^{14;62;63}. Die Kontrolluntersuchungen zum Einfluss des pH-Wertes, der Osmolarität und der Zellformen vor und nach Passage durch den Filter zeigten für alle verwendeten Versuchsprotokolle keine physiologischen Veränderungen der gemessenen Parameter. Somit können diese als mögliche, zur Verfälschung der Ergebnisse führende Parameter ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 3.4.2.).

Die in dieser Arbeit etablierte modifizierte Methode sowie die optimierte Probenaufarbeitung schließen die endogenen (Leukozytenkontamination, unterschiedlicher Hämatokrit, und die Plasmaviskosität) und exogenen Faktoren (bedingt durch den Versuchsaufbau: Antikoagulans, Stimulans, Inhibitor) als Einflussfaktoren auf die Messung der Erythrozytenverformbarkeit aus.

4.3. Regulation der Erythrozytenverformbarkeit

Die Erythrozytenverformbarkeit ist sowohl von intrinsischen als auch extrinsischen Faktoren der Erythrozyten abhängig. Intrinsische Faktoren sind die zytoplasmatische Viskosität, die Eigenschaften der Membran und die Zellgeometrie (das Verhältnis der Oberfläche zum Volumen der Zellen) ^{15;19;68}. Die intrazelluläre Viskosität wird hauptsächlich durch intrazelluläres Hämoglobin bestimmt. Die viskoelastischen Eigenschaften der Membran werden maßgeblich durch die Struktur des unterhalb der Erythrozytenmembran gelegenen Zytoskeletts, das an mehreren Stellen mit der Membran verbunden ist, beeinflusst. Zu den extrinsischen Faktoren gehören die Scherkräfte, die auf die Oberfläche der Zellen wirken. Die Scherkraft selbst ist das Produkt aus Plasmaviskosität und Scherrate ⁶⁸.

Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, auf und in der unterschiedliche Proteine verankert sind. Angenommen wird, dass das Protein AE-1 (anion exchange-1, engl.) und die Proteine Glykophorin A und C mit intrazellulären Proteinen als Zytoskelett die Verformbarkeit und Membranstabilität gewährleisten (siehe Abb.19). Spektrin ist bis zu 250% seiner ursprünglichen Länge dehnbar und bis zu 40% kontrahierbar ^{86;87}. Am anderen Ende des Spektrins liegt das Protein 4.1, das vertikal mit Glykophorin C verbunden ist ^{14;88}. Dieses komplizierte Zusammenspiel der Proteine ist maßgeblich an den Mechanismen der Verformbarkeit beteiligt. Eine elektrische Ladung über den Anioneneinstrom (Cl^- oder HCO_3^-) könnte Glykophorin A und C assoziieren, wodurch Spektrin in der unteren Ebene kontrahiert ⁴. Oonishi et al. erweiterten 1997 die bislang postulierten Regulationsmechanismen der Verformbarkeit ¹⁵. Die Regulation soll zusätzlich von Ca^{2+} und cAMP abhängig sein. Hierdurch wird die Interaktion von Kinasen und/oder Phosphatasen gefördert, die zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Proteine führen können ¹⁵. Im Gegensatz hierzu haben Tsuda et al., (2000) postuliert, dass die Verformbarkeit der Erythrozytenmembran durch den cGMP-Stoffwechselweg reguliert wird ¹⁶ (Näheres siehe Kapitel 4.4.).

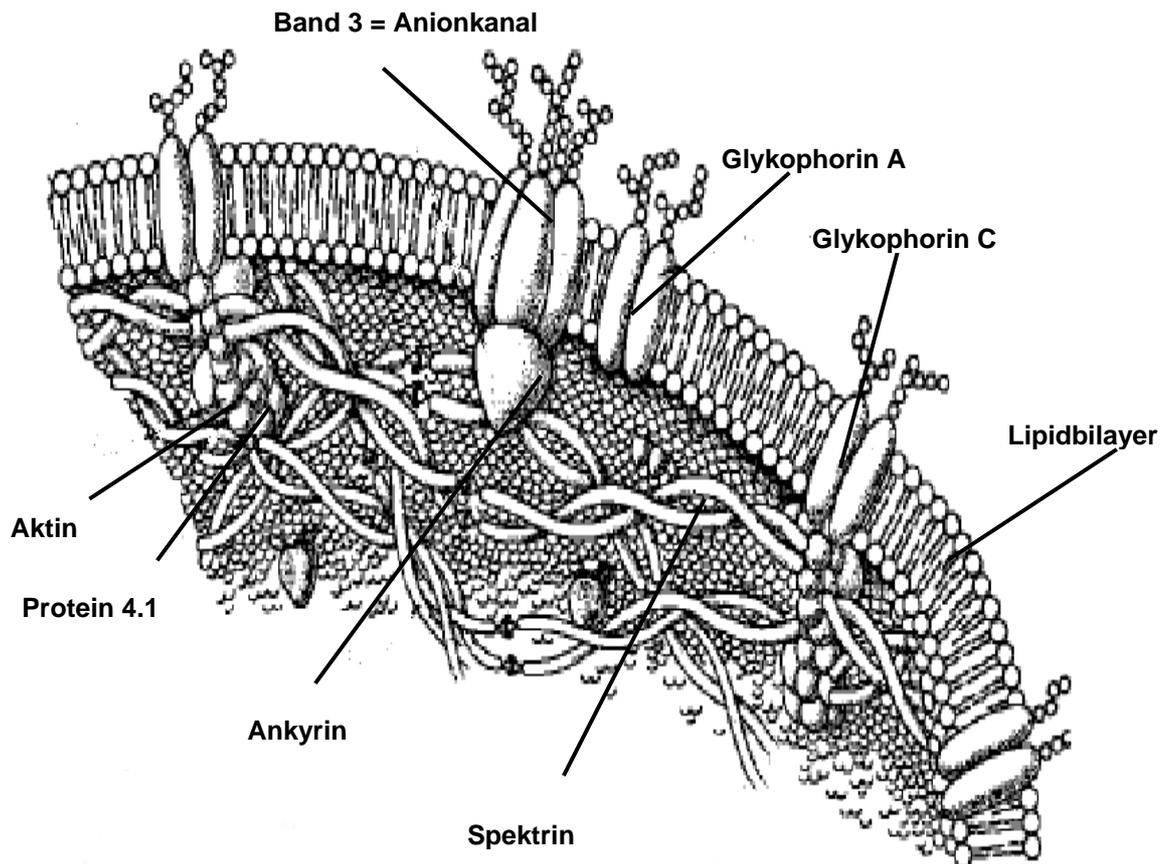


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Membran eines Erythrozyten. Diese besteht hauptsächlich aus einem Lipidbilayer, in dem das Band 3 Protein (auch als Anionenkanal bekannt) und Glykophorine verankert sind, diese sind wiederum mit dem unterliegenden Zytoskelett durch Aktin, Ankyrin, Protein 4.1. verbunden. Diese Verbindungen spielen eine entscheidende Rolle bei dem einzigartigen Mechanismus der Erythrozytenverformbarkeit.

Eine andere außergewöhnliche Membraneigenschaft der Erythrozyten ist die Membranfluidität. Dies ist die Fließeigenschaft der Membran insbesondere in der Lipid-Doppelschicht-Ebene. Die Fließeigenschaft wird durch die Lipid-Peroxidation, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und die Freiheit der Mobilität der Membrankomponenten beeinflusst⁸⁹. Die Hauptfunktion der Fluidität der Membran ist die Permeabilität für den Austausch physiologisch relevanter Substanzen. Vermutet wird, dass die Membranfluidität bei der Regulation der Verformbarkeit großen Einfluss nimmt^{16;90}. Direkte Mechanismen dieser Beeinflussung werden kontrovers diskutiert⁹¹.

4.4. NO und Hämorheologie

Eine positive Wirkung von NO auf die Homöostase bedingt durch eine Hemmung der Erythrozytenaggregation wurde beschrieben. 1999 berichteten Starzyk et al. eine Abnahme der Aggregabilität der Erythrozyten *ex vivo* nach Infusion exogenen NOs (SIN-1-HCl), das bedeutet, dass durch exogenes NO die Aggregationsneigung der Erythrozyten aufgehoben werden kann. An murinem Blut konnte *in vivo* nach Infusion eines NOS-Inhibitors (L-NAME) sowohl eine verschlechterte Erythrozytenaggregabilität als auch -verformbarkeit nachgewiesen werden. Wird der NO-Mangel durch Zugabe von exogenem NO aufgehoben, ist die verminderte Verformbarkeit als auch erhöhte Aggregationsneigung reversibel⁴⁰. Unter physiologischen Bedingungen scheint die Erythrozytenaggregation durch NO in einem Circulus vitiosus reguliert zu werden. Einerseits beeinflusst NO die Aggregation, andererseits kann wiederum die Aggregation die NO-Produktion beeinflussen. Die Erythrozytenaggregation kann den Gefäßtonus durch die Modulation der NO-Synthese beeinträchtigen. Die Erythrozytenaggregation führt zu axialer Migration der Aggregate durch den Plasmasaum zu den Endothelzellen; dadurch verringert sich die Viskosität des Blutes in der Nähe der Gefäßwand im Vergleich zur Lumenmitte⁹². Infolgedessen ist die Scherkraft verringert, wodurch die NO-Produktion abnimmt^{93;94}.

Die Wirkung von NO auf die Thrombozytenaktivität ist in der Literatur häufig diskutiert. Sowohl exogenes NO als auch endogenes NO aus dem Endothel verringert die Aggregation von Thrombozyten und deren Adhäsion am vaskulären Endothelium^{38;42;95;96}. NO stimuliert die in Thrombozyten lokalisierte lösliche Guanylatzyklase (sGC). Dadurch steigt die cGMP (cyclic guanosine monophosphate, engl.) Konzentration im Plasma. Dieser Konzentrationsanstieg korreliert mit der Inhibition der Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP oder Kollagen. Auch bei der Zelladhäsion konnte dieser Einfluss auf den Endothelzell-Monolayer *in vitro* nachgewiesen werden⁴². Das cGMP vermindert die Bindung zwischen Fibrinogen und Thrombozyten über Glykoproteine (GP) und dem GPIIb/IIIa-Rezeptor⁹⁷. Außerdem wird vermutet, dass NO die Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptors vermindert⁹⁸.

Nach oben diskutierter Etablierung der modifizierten Filtrationsmethode wurde diese verwendet, um den Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit zu

untersuchen. Bekannt war, dass NO zu einer Verbesserung der Erythrozytenverformbarkeit führen kann. Allerdings wurde von Starzyk et al., (1999) eine NO-Infusion *in vivo* verwendet ⁴⁰, bei der möglicherweise auch andere Einflussfaktoren eine Rolle gespielt haben könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogenes NO die Verformbarkeit verbessert (siehe Kapitel 3.4.4., Abbildung 14). Dabei zeigt sich der entscheidende Einfluss von NO auf die basale Verformbarkeit von Erythrozyten. Durch Zugabe von Oxyhämoglobin, einem NO-Abfänger (NO-scavenger, engl.), sinkt die Flussrate um 16%. Dies könnte erklären, dass bei Krankheiten mit niedrigem NO-Spiegel, z.B. der endothelialen Dysfunktion ^{99;100} oder Sichelzellenanämie ¹⁰¹⁻¹⁰³, es zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation kommt. Der Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit konnte in der Vergangenheit und in der vorliegenden Arbeit deutlich gezeigt werden ^{16;39;40;90;104;105}, jedoch blieb das entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Verhältnis unklar. Mesquita et al. zeigten 2002 einen biphasischen Einfluss von NO auf die Funktion und Struktur der Membran ¹⁰⁶. Unter normalen Bedingungen diffundiert NO in einer Konzentration von 100 nmol/l in das Plasma. Die Zugabe von 100 nmol/l NO verbesserte die Verformbarkeit, jedoch verschlechterte sich diese, wenn NO bis zu 1 mmol/l gesteigert wurde. Eine stark erhöhte NO-Konzentration unter *in vivo* Bedingungen tritt im Rahmen einer Sepsis auf (siehe Kapitel 1.). Bei an Sepsis erkrankten Patienten konnte eine reduzierte Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen werden, die zu einem Gefäßverschluss führte ^{50;107}. Durch eine Zusammenfassung der Literatur ergibt sich ein interessantes Verhältnis zwischen der endogenen NO-Konzentration (unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen) und der Erythrozytenverformbarkeit (Abbildung 20).

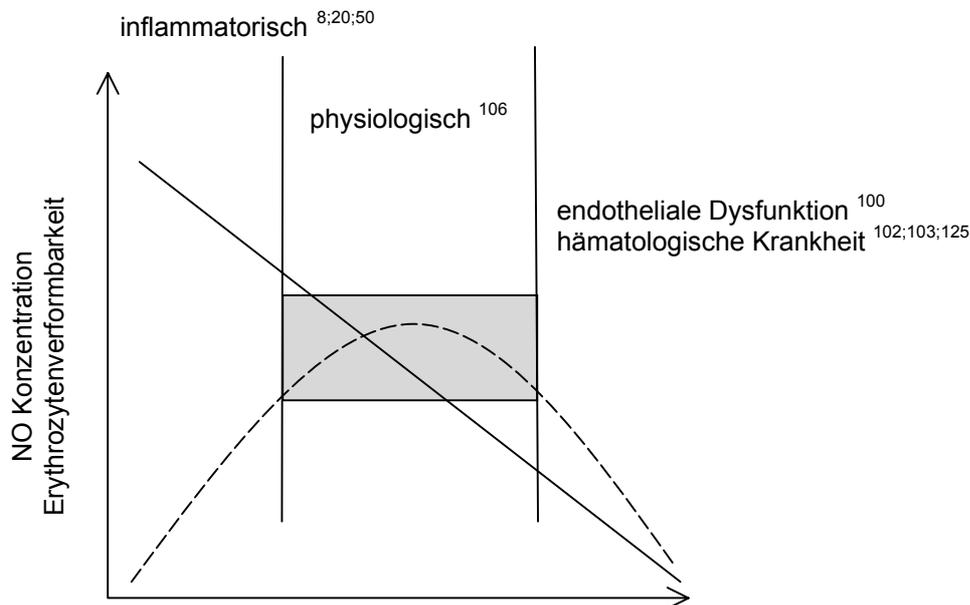


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Erythrozytenverformbarkeit und NO-Konzentration *in vivo*. Unter inflammatorischen Bedingung z.B. Sepsis, ist die Konzentration von NO (—) im Plasma sehr hoch; dies geht gleichzeitig mit verschlechterter Verformbarkeit (---) der Erythrozyten einher. Im Gegensatz dazu, konnte bei einigen Erkrankungen, bei denen der NO-Spiegel pathologisch verringert ist, ebenfalls eine verschlechterte Verformbarkeit der Erythrozyten nachgewiesen werden. Im physiologischen Zustand und somit im physiologischen Normbereich (grau markiert) der NO-Konzentration im Blut ist die Erythrozytenverformbarkeit optimal.

Einige theoretische Modelle über die Wirkung von NO auf die Regulation der Erythrozytenmembran sind in der Literatur diskutiert. In Erythrozyten befindet sich die GC. Dieses Enzym liegt entweder membrangebunden oder gelöst im Zytoplasma vor. Definiert ist die sGC auch als NO-sensitive Guanylatzyklase. Durch NO kann die sGC ihre katalytische Aktivität bis zu 200fach steigern¹⁰⁸. Tsuda et al. haben 2000 postuliert, dass NO und cGMP die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Kinetik beeinflussen¹⁶. Eine andere Theorie beschreibt, dass ein 240 kDa Protein, welches mit einem cGMP-medierte Kationenkanal assoziiert ist, mit dem Spektrin der Erythrozyten interagieren kann²². Die Lokalisation des Proteins in Erythrozyten ist unklar. cGMP spielt auch bei dem Na^+/H^+ -Ionenaustausch eine Rolle¹⁰⁹. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Mechanismen für die Erythrozytenverformbarkeit bedeutend sind.

Im Gegensatz zu der „cGMP-Theorie“ haben einige Arbeiten gezeigt, dass die Membranregulation unabhängig von dem cGMP-Stoffwechselweg ist. Korbut et al. erklärten 2002, der NO-Effekt auf die Verformbarkeit findet direkt über einen Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanal statt, - unabhängig vom cGMP ¹¹⁰. Oonishi et al. postulierten 1997 eine cAMP-abhängige Regulation der Erythrozytenverformbarkeit ¹⁵. Jedoch wird in dieser Arbeit kein Zusammenhang mit NO diskutiert.

4.5. „Erythrozytäre“ NOS: Eine physiologisch relevante NO-Quelle?

Für das humane Kreislaufsystem wurde bisher beschrieben, dass NO unter physiologischen Bedingungen lediglich aus Endothelzellen stammt. Erythrozyten wurden lange Zeit aufgrund einer Inaktivierung des endothelial gebildeten NOs durch die Reaktion mit Hämoglobin nur als NO-abfangende Zellen betrachtet. Nach einer Oxygenierung des Hämoglobins bildet sich durch eine Nitrosierungsreaktion von NO an das Cys-93 der β -Kette des Hämoglobins S-nitroso-Hämoglobin ³⁶. Durch eine induzierte Instabilität des Hämoglobins wird NO abgespalten, was in einer Dilatation der Blutgefäße resultieren und Einfluss auf die Thrombozytenaggregabilität nehmen kann ^{111;112}. Wie das im Erythrozyten an Hämoglobin gebundene NO in das zellumgebende Plasma gelangt, konnte lange nicht geklärt werden. Ein in der Erythrozytenmembran lokalisierter AE1-Transporter soll NO über verschiedene Bindungen ins extrazelluläre Medium überführen ¹¹³. Rassaf, et al. konnten 2003 zusätzlich nachweisen, dass NO nicht nur lokal wirkt, sondern auch im Plasma transportiert werden kann und im gesamten Kreislauf aktiv ist ⁵⁶. Das von Erythrozyten freigesetzte NO stammt eventuell nicht ausschließlich aus den NO-Speichern.

Erst kürzlich wurde nachhaltig bewiesen, dass Erythrozyten die endotheliale NOS translatieren ^{53;114}. Jubelin und Gierman behaupteten 1996, dass Erythrozyten eventuell eine iNOS und eNOS translatieren und diese NO synthetisieren ^{52;53;115}. Ferner konnte ein aktiver L-Arginin-Stoffwechselweg in Erythrozyten nachgewiesen werden, welcher die Thrombozytenfunktion beeinflussen kann ⁵⁴. Der Nachweis einer NOS im Erythrozyten wird jedoch kontrovers diskutiert. Während Jubelin und Gierman 1996 den Nachweis einer iNOS und eNOS erbrachten ⁵², konnten Chen und Mehta 1998 eine eNOS, aber keine iNOS detektieren ⁵⁴. Des Weiteren wird postuliert, dass die NOS in Erythrozyten inaktiv ist ⁵¹ oder die Aktivität abhängig vom Reifungsstadium der Zellen sein könnte ¹¹⁶. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe

konnte jedoch eindeutig eine aktive, durch biochemische, proteinbiochemische, und molekularbiologische Nachweismethoden detektierte eNOS-Isoform in Erythrozyten nachgewiesen werden⁸⁴.

Die physiologische Relevanz des NOs in und aus Erythrozyten wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass nach Stimulation der erythrozytären NOS die Verformbarkeit der Erythrozyten im Vergleich zur basalen Verformbarkeit bis zu 25% verbessert war (siehe Kapitel 3.4.4., Abbildung 15). Wurde die erythrozytäre NO-Synthese durch einen NOS-Inhibitor ausgeschlossen und Oxyhämoglobin als NO-Abfänger hinzugegeben, konnte die Verformbarkeit nahezu vollständig aufgehoben werden. Das bedeutet, NO aus Erythrozyten wirkt intrinsisch auf die Regulation der physiologischen Membranfunktion. In dieser Arbeit konnte der Nachweis der endothelialen Isoform erhärtet werden: Die Filtrationsrate des Blutes von eNOS^{-/-}-Mäusen war geringer als die der WT-Kontrolltiere.

Dieser Effekt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur in Bezug auf die Verformbarkeit, sondern auch auf die Aggregation der Erythrozyten untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, betreffend die Abhängigkeit der Erythrozytenaggregabilität von der erythrozytären NO-Synthese (siehe Kapitel 3.1.), decken sich weitgehend mit den in der Literatur beschriebenen. Die *in vitro* Zugabe eines NOS-Inhibitors (L-NAME) zu den Erythrozyten hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Erythrozytenaggregabilität¹¹⁷. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass *in vitro* appliziertes exogenes NO die Erythrozytenaggregabilität konzentrationsabhängig verringerte (siehe Kapitel 3.1., Abbildung 4). Die zur signifikanten Verringerung der Aggregabilität notwendige NO-Menge überstieg jedoch die erythrozytär synthetisierte Konzentration um den Faktor 10. Somit könnte postuliert werden, dass endogenes - unter physiologischen Bedingungen synthetisiertes - NO keinen Anteil an der Aggregation der Erythrozyten hat.

Die Wirkung von erythrozytärem NO auf benachbarte Zellen konnte gezeigt werden. Zu Vollblut gegebenes L-Arginin inhibierte die Thrombozytenaggregabilität um 7%. In Kontrolluntersuchungen konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Einfluss der Thrombozyten-NOS auf die Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.). Die Aktivität der in Thrombozyten und Leukozyten befindlichen NOS

wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Anzunehmen ist, dass nur in aktiven bzw. stimulierten Zellen (z.B. stimuliert durch Entzündungsprozesse oder Gerinnungskaskade) die NOS stimuliert ist^{44;46;49}. Somit ist der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis, dass das die Thrombozytenaggregation beeinflussende NO lediglich aus Erythrozyten kommt, im Einklang mit der aktuellen Literatur⁵⁴.

Der intrinsische Effekt von erythrozytärem NO auf die Erythrozytenmembran (Verformbarkeit und Aggregabilität) sowie auch der extrinsische, auf benachbarte Zellen (Thrombozyten) bezogene Effekt wurden bislang diskutiert. Dennoch wird die Rheologie des Blutes nicht ausschließlich durch die Blutzellen bestimmt. Die Blutviskosität ist eine weitere rheologische Determinante, die die meisten rheologischen Eigenschaften beinhaltet oder maßgeblich durch diese beeinflusst wird. Die Blutviskosität ist abhängig von der Plasmapviskosität, welche sich relativ stabil im Vergleich zur gesamten Blutviskosität darstellt. Bei Vorliegen eines extrem hohen Hämatokrits ist das Blut deutlich visköser. Dennoch überleben Menschen, die in den Bergen leben oder an Polyzythemia vera erkrankt sind bzw. durch Erythropoetinabusus einen bis zu 2-fach erhöhten Hämatokrit aufweisen. Das Herzkreislauf-System kann diese extremen Bedingungen durch Verbesserung der Erythrozytenverformbarkeit adaptieren¹¹⁸. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der erythrozytären NOS auf Plasma- und Vollblutviskosität nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3., Abbildung 8). Walter et al. konnten 2000 eine Veränderung der Blutviskosität durch Zugabe von L- und D-Arginin, L-AME, L-NNA, Lysin und Glutaminsäure nachweisen. Eine hohe Konzentration dieser Aminosäure reduziert die Blutviskosität bei niedriger Schererate, welche primär durch die Erythrozytenaggregation determiniert ist, unabhängig von der NOS-Aktivität⁷⁰. Da die Vollblutviskosität auch durch die Erythrozytenverformbarkeit beeinflusst wird, sollte nach Stimulation oder Inhibition der NOS die Viskosität verändert sein. In vorliegender Arbeit konnte jedoch keine Veränderung der Blutviskosität gemessen werden. Somit könnte angenommen werden, dass die Filtration sensitiver ist, da diese nur durch die Erythrozytenverformbarkeit determiniert wird. Die Vollblutviskosität wird jedoch durch weitere Parameter bestimmt (siehe oben).

4.6. Relevanz der NO-abhängigen Modifikation der rheologischen Parameter - Ausblick zur therapeutischen Relevanz -

Für die Mikrozirkulation sind die rheologischen Parameter (physiologische und pathologische) besonders wichtig. Die Blutviskosität verändert sich abhängig vom Durchmesser des Blutgefäßes ²¹. Die normale Viskosität setzt eine gesunde endotheliale Oberflächenschicht voraus. Veränderungen in der Plasmazusammensetzung, z.B. durch artifizielle Infusion, können zur Änderung dieser Endothelzellschicht führen und letztendlich infolgedessen zu Störungen der Perfusion im Gewebe führen ¹¹⁹. In der Mikrozirkulation ist die eNOS-Aktivität geringer als in größeren Gefäßen ⁵⁵. Jedoch ist der NO-Verbrauch mutmaßlich vergleichbar in der Makro- und Mikrozirkulation. Die Fähigkeit der Erythrozyten, selbst NO zu produzieren, könnte diese Lücke - im Besonderen im pathologischen Bereich ¹²⁰ - schließen. Eine Störung der Viskosität und der Erythrozytenaggregation kann den Krankheitszustand verschlimmern. Beim nephrotischen Syndrom z.B. kann eine Thromboembolie entstehen ¹²¹, d.h. die Veränderungen der rheologischen Parameter können den Zustand einer Krankheit widerspiegeln. Eine erhöhte Erythrozytenaggregation ist prognostisch relevant für das Erkennen der Aspirinresistenz ¹²². Bei Sepsis-Patienten ist die Erythrozytenverformbarkeit reduziert ²⁰, bei Trauma-Patienten kann eine Verschlechterung der Verformbarkeit eine Komplikation (Infektion) voraussagen ¹²³. Im Rahmen eines Koronarsyndroms kann die Beobachtung der rheologischen Parameter die Effektivität der Behandlung unterstützen. Das Ergebnis eines Thrombozytenaggregationstests zeigte eine insuffiziente Therapie und leitete in einigen Fällen die folgende Prävention ein ²⁷.

Eine mögliche therapeutische Relevanz der erythrozytären NOS ist offen. Es gibt viele Krankheiten, bei denen NO, die Erythrozyten und weitere hämorheologische Parameter eine Rolle spielen. Bei der Sichelzellenanämie nimmt NO eine kompensatorische Rolle durch die Erhaltung des Gefäßtonus und Verhinderung der Thrombozytenaggregation ein. Obwohl die Erythrozyten von Sichelzellen (HbS) als NO-Abfänger schwächer sind, reicht die Interaktion mit dem Endothel, um die Dilatation zu verhindern ¹²⁴. Hier scheint die therapeutische Maßnahme, die NO-Verfügbarkeit durch exogenes NO oder durch Induktion der

NOS-Expression zu erhöhen, bedeutungsvoll ¹²⁵. Bei der durch *Plasmodium falciparum* ausgelösten Malaria, kann NO die Zytoadhärenz von infizierten Erythrozyten auf Endothelzellen modifizieren. Der NOS-Inhibitor (L-NAME) kann die Zytoadhärenz mittelbar durch P-Selektin induzieren ¹²⁶.

5. Zusammenfassung

Die Erythrozytenverformbarkeit sowie eine geringe Vollblut- und Plasmaviskosität sind Voraussetzung für die physiologische, mikrovaskuläre Passage. Vaskuläres Stickstoffmonoxid (NO) reguliert neben dem Gefäßtonus insbesondere auch Interaktionen zwischen Blutzellen und dem Endothel; es unterdrückt die Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Neueste Untersuchungen belegen eindeutig eine aktive NO-Synthese in Erythrozyten. Die Bedeutung hämatogenen NOs für hämorheologische Parameter wurde bisher unzureichend untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses erythrozytär gebildeten NOs auf hämorheologische Parameter: 1. Eine Modifizierung der aus der Literatur beschriebenen Filtrationsmethode, um die Erythrozytenverformbarkeit zu bestimmen. 2. Untersuchung des Einflusses des hämatogenen NOs auf die unterschiedlichen Blutzellen und die Viskosität des Blutes.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es wurde eine Filtrationsmethode entwickelt, die eine reproduzierbare und schnelle Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit gewährleistet. Der Variationskoeffizient konnte im Vergleich zu bisher verfügbaren Methoden halbiert werden, die Intra- und Inter-Observervariabilität ist gering.
2. Die Erythrozytenverformbarkeit ist im Bereich der physiologischen NO-Konzentration fein zu regulieren, die erythrozytäre NOS ist an dieser Regulation maßgeblich beteiligt.
3. Die Erythrozytenaggregation sowie die Vollblut- und Plasmaviskosität können lediglich durch supraphysiologische NO-Konzentrationen modifiziert werden, eine Stimulation oder Inhibition der erythrozytären NO-Synthese zeigt keine relevanten Unterschiede der rheologischen Parameter.
4. Die erythrozytäre NO-Synthese nimmt nicht nur Einfluss auf die Erythrozyten selbst. Durch Stimulation der erythrozytären NOS konnte eine verringerte Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden.

Die erythrozytäre NO-Bildung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der rheologischen Eigenschaften des Blutes. Sie verbessert die Erythrozytenverformbarkeit und hemmt die Thrombozytenaggregation. Diese Mechanismen können eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie und Therapie mikrovaskulärer Erkrankungen spielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*. 2001;104:735-740.
2. Engst R et al. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 259. Auflage. 2002. de Gruyter, Berlin.
3. Struijker-Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Essen H. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1992;10:S147-S156.
4. Vicaut E. Hypertension and the microcirculation: a brief overview of experimental studies. *J Hypertens Suppl*. 1992;10:S59-S68.
5. Klabunde RE. Effects of dipyridamole on postischemic vasodilation and extracellular adenosine. *Am J Physiol*. 1983;244:H273-H280.
6. Kuo L, Davis MJ, Chilian WM. Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. *Am J Physiol*. 1990;259:H1063-H1070.
7. Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuillez C, Luscher TF. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995;91:1314-1319.
8. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: Microvascular dysfunction in sepsis - hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*. 2003;7:359-373.
9. Stuart J. Erythrocyte rheology. *J Clin Pathol*. 1985;38:965-977.
10. Chien S. Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:177-192.
11. Chmiel H, Walitza E. On the rheology of blood and synovial fluids. 1980. Research Studies Press, Chichester.
12. Gregory TR. Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome*. 2000;43:895-901.
13. Lewis SM. Reference ranges and normal values. In: Dacie & Lewis Practical Haematology. Lewis SM, Bain BJ, Bates I, eds. 2001. Churchill Livingstone, Edinburgh.
14. Van Dort HM, Knowles DW, Chasis JA, Lee G, Mohandas N, Low PS. Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem*. 2001;276:46968-46974.
15. Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N. Regulation of red blood cell filterability by Ca^{2+} influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol*. 1997;273:c1828-c1834.
16. Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y. Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275:946-954.

17. Modi DN, Merchant MA. In vitro effects of aspirin and salicylatr on erythrocyte: size and Na⁺/K⁺ ATPase activity. *Indian J Pharmacol.* 2003;35:27-31.
18. Bobrowska-Hagerstrand M, Hagerstrand H, Iglıc A. Membrane skeleton and red blood cell vesiculation at low pH. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1371:123-128.
19. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med.* 2003;29:1052-1061.
20. Baskurt OK, Gelmont D, Meiselman HJ. Red blood cell deformability in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:421-427.
21. Pries AR, Secomb TW. Rheology of the microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29:143-148.
22. Molday LL, Cook NJ, Kaupp UB, Molday RS. The cGMP-gated cation channel of bovine rod photoreceptor cells is associated with a 240-kDa protein exhibiting immunochemical cross-reactivity with spectrin. *J Biol Chem.* 1990;265:18690-18695.
23. Caimi G, Canino B, Romano A, Catania A, Lo PR. Erythrocyte aggregation and erythrocyte membrane properties in type 2 diabetes mellitus and in vascular atherosclerotic disease. *Thromb Haemost.* 2000;83:516-517.
24. Schmid-Schonbein H, Rieger H, Gallasch G, Schachtner H. Pathological red cell aggregation (clump aggregation). Molecular and electrochemical factors. *Bibl Anat.* 1977;484-489.
25. Brooks DE, Evans EA. Rheology of blood cells. In: Clinical Hemorheology. Chien S, Dormandy J, Ernst E, Matrai A, eds. 1987. Martinus Nijhof, Dordrecht.
26. Alt E, Amann-Vesti BR, Madl C, Funk G, Koppensteiner R. Platelet aggregation and blood rheology in severe sepsis/septic shock: relation to the Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) score. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30:107-115.
27. Marton Z, Horvath B, Alexy T, Kesmarky G, Gyevnar Z, Czopf L, Habon T, Kovacs L, Papp E, Mezey B, Roth E, Juricskay I, Toth K. Follow-up of hemorheological parameters and platelet aggregation in patients with acute coronary syndromes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;29:81-94.
28. Moncada S, Higgs EA. The L-Arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.
29. Nathan CF, Xie Q-W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78:915-918.
30. Snyder SH, Bredt DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992;266 (5):68-77.
31. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3375-3378.
32. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
33. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med.* 1995;27:331-340.

34. Richter C, Ghafourifar P, Schweizer M, Laffranchi R. Nitric oxide and mitochondrial Ca^{2+} . *Biochem Soc Trans.* 1997;25:914-918.
35. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 1998;273:11038-11043.
36. Gross SS, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9967-9969.
37. Ignarro IJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Sci Am.* 1990;535-560.
38. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1987;92:639-646.
39. Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1577-H1584.
40. Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ. Effects of NO and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells on rats ex vivo and in vitro. *J Phys Pharm.* 1999;50:629-637.
41. Radomski MW, Palmer RMJ. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2:1057-1058.
42. Radomski WM, Rees DD, Dutra A, Moncada S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1992;107:745-749.
43. Cha YJ, Chang EA, Kim CH. Effects of endothelial cell and mononuclear leukocytes on platelet aggregation. *Haematologia.* 2000;30:97-106.
44. Hickey M, Granger D. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions : studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand.* 2001;173:119-126.
45. Richter N, Petersson AS, Wennmalm A, Schimke I. Detection of an approximately 100 kD protein with strong immunoreactivity to antibodies specific for inducible nitric oxide synthase (iNOS) but without NOS activity in neutrophils of patients suffering from sepsis: results of a preliminary study. *Inflamm Res.* 1999;48:651-656.
46. Berkels R, Bertsch A, Zuther T, Dhein S, Stockklauser K, Rösen P, Rösen R. Evidence for a NO synthase in porcine platelets which is stimulated during activation / aggregation. *Eur J Haematol.* 1997;58:307-313.
47. Zhou Q, Hellermann GR, Solomonson LP. Nitric oxide release from resting human platelets. *Thromb Res.* 1995;77:87-96.
48. Malinski T, Radomski MW, Taha Z, Moncada S. Direct electronical measurement of nitric oxide released from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;194:960-965.
49. Sase K, Michel T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life Sci.* 1995;57:2049-2055.

50. Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis GC. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2848-H2856.
51. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang Y-B, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med*. 2000;135:444-451.
52. Jubelin BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens*. 1996;9:1214-1219.
53. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N, Gogas J. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 1995;15:1435-1446.
54. Chen LY, Mehta JL. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998;32:57-61.
55. Teichert A-M, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB, Phillips MJ, Marsden PA. In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1352-H1361.
56. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer B-E, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest*. 2002;109:1241-1248.
57. Feelisch M, Kubitzek D, Werringloer J. The oxyhemoglobin assay. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler JS, eds. 1996. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
58. Rampling MW, Whittingstall P. A comparison of five methods for estimating red cell aggregation. *Klin Wochenschr*. 1986;64:1084-1088.
59. Schmid-Schönbein H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H. New hemorheological techniques for the routine laboratory. *Clin Hemorheol*. 1983;3:93-95.
60. Born GV, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963;168:178-195.
61. Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL. A simple method for measuring erythrocyte deformability. *J Clin Pathol*. 1976;29:855-858.
62. Baskurt OK. Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology*. 1996;33:169-179.
63. Arevalo F, Bellelli A, Brancaccio A, Ippoliti R, Lendaro E, Brunori M. Biochemical and rheodynamic properties of red blood cells crosslinked with glutaraldehyde. *Biotechnol Appl Biochem*. 1992;16:195-200.
64. Godecke A, Decking UK, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon HJ, Godecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998;82:186-194.
65. Alderman MJ, Ridge A, Morley AA, Ryall RG, Walsh JA. Effect of total leucocyte count in whole blood filterability in patients with peripheral vascular disease. *J Clin Pathol*. 1981;34:163-166.

66. Kenny MW, Meakin M, Stuart J. Measurement of erythrocyte filterability using washed-erythrocyte and whole-blood methods. *Clin Hemorheol.* 1981;1:135-146.
67. Betticher DC, Keller H, Maly FE, Reinhart WH. The effect of endotoxin and tumour necrosis factor on erythrocyte and leucocyte deformability *in vitro*. *Br J Haematol.* 1993;83:130-137.
68. Chien S. Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest.* 1981;41:7-12.
69. Hardeman MR, Goedhart P, Breederveld D. Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear stress using a rotational viscometer. *Clin Chim Acta.* 1987;165:227-234.
70. Walter R, Mark M, Reinhart WH. Pharmacological concentrations of arginine influence human whole blood viscosity independent of nitric oxide synthase activity *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269:687-691.
71. Rim S, Leong-Poi H, Lindner J, Wei K, Fisher N, Kaul S. Decrease in coronary blood flow reserve during hyperlipidemia is secondary to an increase in blood viscosity. *Circulation.* 2001;104:2704-2709.
72. Bull BS, Chien S, Dormandy JA, Kiesewetter H, Lewis SM, Lowe GD, Meiselman HJ, Shohet SB, Stoltz JF, Stuart J, Teitel P. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol.* 1986;6:439-453.
73. Kiesewetter H, Radtke H, Schneider R, Mußler K, Scheffler A, Schmid-Schönbein H. Das Mini-Erythrozyten-Aggregometer: Ein neues Gerät zur schnellen Quantifizierung des Ausmaßes der Erythrozytenaggregation. *Biomed Tech.* 1982;27:209-213.
74. Salat A, Kroess S, Felfernig-Boehm D, Felfernig M, Fleck T, Schmidt D, Pulaki S, Mueller MR. Comparison of *in vitro* closure time (PFA-100) with whole blood electrical aggregometry and platelet surface antigen expression in healthy volunteers. *Thromb Res.* 2002;105:205-208.
75. Breddin HK, Harder S. Wertigkeit von Plättchenfunktionstests. *VASA.* 2003;32:123-129.
76. Brown CD, Zhao ZH, De Alvaro F, Chan S, Friedman EA. Correction of erythrocyte deformability defect in ALX-induced diabetic rabbits after treatment with aminoguanidine. *Diabetes.* 1993;42:590-593.
77. Maggakis-Kelemen C, Bork M, Kayser P, Biselli M, Artmann GM. Biological and mechanical quality of red blood cells cultured from human umbilical cord blood stem cells. *Med Biol Eng Comput.* 2003;41:350-356.
78. Nicolau CT, Teitel P, FOTINO M, Butoianu E, TAIGAR S. Alterations of erythrocyte plasticity in blood diseases. (A three years' clinical experience with the erythrocyte filtrability test (E.F.T.)). *Sangre (Barc).* 1964;10:282-288.
79. Chien S, Schmalzer EA, Lee MML, Impeluso T, Skalak R. Role of the white blood cells in filtration of blood cell suspension. *Biorheology.* 1983;20:11-27.
80. Stuart J, Stone PCW, Bareford D, Caldwell NM, Davies JE, Baar S. Evaluation of leucocyte removal methods for studies of erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol.* 1985;5:137-147.

81. Drummond MM, Lowe GD, Belch JJ, Barbenel JC, Forbes CD. An assessment of red cell deformability using a simple filtration method. *J Clin Pathol.* 1980;33:373-376.
82. Kikuchi Y. Transient increase in deformability of stressed red blood cells and role of plasma proteins. *Jpn J Physiol.* 1992;42:441.
83. Chien S. Final summary of the international symposium on filterability and red blood cell deformability. Conclusions. *Scand J Clin Invest.* 1981;41:321-324.
84. Kleinbongard P. Physiologische Relevanz des L-Arginin-NO-Stoffwechsels im Blut der Säugetiere. *Dissertation Fakultät Biologie der Ruhr-Universität Bochum.* 2003.
85. Lucas GS, Caldwell NM, Kenny MW, Meakin M, Aillaud MF, Billerey M, Juhan-Vague I, Stuart J. Effect of calcium-chelating and non-chelating anticoagulants on erythrocyte and leucocyte filterability. *Clin Hemorheol.* 1983;3:451-467.
86. Discher DE, Boal DH, Boey SK. Simulation of the erythrocyte at large deformation. II. Micropipette aspiration. *Biophys J.* 1998;75:1584-1597.
87. Lee JCM, Wong DT, Discher DE. Direct measurement of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton. *Biophys J.* 1999;77:853-864.
88. Beck KA, Nelson WJ. A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1404:153-160.
89. Hollan S. Membrane fluidity of blood cells. *Haematologia (Budap).* 1996;27:109-127.
90. Dorrance AM, Graham D, Dominiczak A, Fraser R. Inhibition of nitric oxide synthesis increases erythrocyte membrane fluidity and unsaturated fatty acid content. *Am J Hypertens.* 2000;13:1194-1202.
91. Cooper RA, Durocher JR, Leslie MH. Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia. *J Clin Invest.* 1977;60:115-121.
92. Baskurt OK, Yalcin O, Meiselman HJ. Hemorheology and vascular control mechanisms. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30:169-178.
93. Niebauer J, Cooke JP. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:1652-1660.
94. Baskurt OK, Yalcin O, Ozdem S, Armstrong JK, Meiselman HJ. Modulation of endothelial nitric oxide synthase expression by red blood cell aggregation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286:H222-H229.
95. Radomski WM, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;148:1482-1489.
96. Salas E, Moro MA, Askew S, Hodson HF, Butler AR, Radomski MW. Comparative pharmacology of analogues of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine on human platelets. *Br J Pharmacol.* 1994;112:1071-1076.
97. Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Böhler H, Motsch J, Martin E. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation.* 1998;97:1481-1487.

98. Keh D, Gerlach M, Kurer I, Seiler S, Kerner T, Falke KJ, Gerlach H. The effects of nitric oxide (NO) on platelet membrane receptor expression during activation with human alpha-thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7:615-624.
99. Kelm M, Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-Arginin-NO-Pathway. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:107-127.
100. Yedgar S, Koshkaryev A, Barshtein G. The red blood cell in vascular occlusion. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32:263-268.
101. Weiner DL, Hibberd PL, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA*. 2003;289:1136-1142.
102. Yoong WC, Tuck SM, Yardumian A. Red cell deformability in oral contraceptive pill users with sickle cell anaemia. *Br J Haematol*. 1999;104:868-870.
103. Eberhardt RT, McMahon L, Duffy SJ, Steinberg MH, Perrine SP, Loscalzo J, Coffman JD, Vita JA. Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels. *Am J Hematol*. 2003;74:104-111.
104. Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ. Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology*. 2004;41:79-89.
105. Korbut R, Gryglewski RJ. Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur J Pharmacol*. 1993;234:17-22.
106. Mesquita R, Picarra B, Saldanha C, Martins e Silva. Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties--an in vitro study. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2002;27:137-147.
107. Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Pikhova B, Hogg N, Patel RP. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood*. 2004;104:1375-1382.
108. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res*. 2003;93:96-105.
109. Petrov V, Lijnen P. Regulation of human erythrocyte Na⁺/H⁺ exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol*. 1994;271:C1556-C1564.
110. Korbut RA, Guzik TA, Madej J, Korbut R. Endothelial secretagogues and deformability of erythrocytes. *J Phys Pharm*. 2002;53:655-665.
111. Megson IL, Sogo N, Mazzein FA, Butler AR, Walton JC, Webb DJ. Inhibition of human platelet aggregation by novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol*. 2000;131:1398.
112. Pawloski J, Swaminathan R, Stamler J. Cell-free and erythrocytic S-Nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*. 1998;97:263-267.
113. Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature*. 2001;409:622-626.

114. Kang ES, Cates TB, Harper DN, Chiang TM, Myers LK, Acchiardo SR, Kimoto M. An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells. *Free Radic Res.* 2001;35:693-707.
115. Ghigo D, Todde R, Ginsburg H, Costamagna C, Gautret P, Bussolino F, Ulliers D, Giribaldi G, Deharo E, Gabrielli G, Pescarmona G, Bosia A. Erythrocyte stages of *Plasmodium falciparum* exhibit a high nitric oxide synthase (NOS) activity and release an NOS-inducing soluble factor. *J Exp Med.* 1995;182:677-688.
116. Mehta JL, Mehta P, Li D. Nitric oxide synthase in adult red blood cells: vestige of an earlier age or a biologically active enzyme? *J Lab Clin Med.* 2000;135:430-431.
117. Korbut RA, Madej J, Adamek-Guzik T, Korbut R. Secretory dysfunction of vascular endothelium limits the effect of angiotensin converting enzyme inhibitor quinapril on aggregation of erythrocytes in experimental hypertension. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54:397-408.
118. Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, Vogel O, Aulmann M, Frietsch T, Schmid-Schonbein H, Kuschinsky W, Gassmann M. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood.* 2003;102:2278-2284.
119. Pries AR, Secomb TW, Sperandio M, Gaehtgens P. Blood flow resistance during hemodilution: effect of plasma composition. *Cardiovasc Res.* 1998;37:225-235.
120. Lüscher TF. The endothelium and cardiovascular disease - a complex relation. *N Engl J Med.* 1994;330:1081-1083.
121. Böhler T, Linderkamp O, Leo A, Wingen AM, Schärer K. Increased aggregation with normal surface charge and deformability of red blood cells in children with nephrotic syndrome. *Clin Nephrol.* 1992;38:119-124.
122. Demiroglu H. Elevated erythrocyte aggregation as a predisposing factor to aspirin resistance. *Thromb Haemost.* 2003;90:157.
123. Langenfeld JE, Livingston DH, Machiedo GW. Red cell deformability is an early indicator of infection. *Surgery.* 1991;110:398-404.
124. Olmos L, Mombouli JV, Wasserstrum N, Vanhoutte PM. Ability of sickle cells to scavenge endothelium-derived nitric oxide is reduced. *Acta Pharmacol Sin.* 2002;23:967-973.
125. Gladwin MT, Schechter AN, Ognibene FP, Coles WA, Reiter CD, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Panza JA, Cannon III RO. Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation.* 2003;107:271-278.
126. Serirom S, Raharjo WH, Chotivanich K, Loareesuwan S, Kubes P, Ho M. Anti-adhesive effect of nitric oxide on *Plasmodium falciparum* cytoadherence under flow. *Am J Pathol.* 2003;162:1651-1660.

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich ganz herzlich dafür, dass ich meine ersten Schritte in der Forschung Kardiologischen Labor machen durfte. Neben der Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Überlassung des Themas sowie der Möglichkeit, bei ihm zu lernen, war es insbesondere die dauernde Unterstützung, die meinen Aufenthalt in Deutschland so erfreulich und lehrreich machte.

Herrn PD Dr. rer. nat. C.V. Suschek danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard bin ich zu größtem Dank verpflichtet. Ihre intensive tägliche Betreuung sowie dauernde Diskussionsbereitschaft haben meine Arbeit sowie Denkweise sehr geprägt. Neben der ganzen Forschung habe ich insbesondere von ihr gelernt, auch „nicht-wissenschaftliche“ Probleme – wie z.B. die Organisation einer Arbeitsgruppe – als Herausforderung zu sehen und zu lösen.

Herrn Dr. med. T. Jax danke ich für seine konstruktiven Ideen, seine Unterstützung sowie seine dauernde Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. med. T. Rassaf und Herrn Dr. med. T. Lauer bin ich für ihr kritisches Korrekturlesen zu Dank verpflichtet.

Fr. MTA S. Matern und Frau MTA G. Schoder danke ich sehr für die kontinuierliche Unterstützung beim Erlernen der Methoden im Labor sowie für ihre dauernde liebevolle und freundliche Art.

Mein außerordentlicher Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Kardiologischen Labors mit all seinen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern, insbesondere Fr. Dr. rer. nat. S. Kabanova, Fr. B. Ludolph, Fr. U. Hendgen-Cotta, Hr. P. Brouzos, Fr. BTA A. Kossack, Fr. MTA K. Lysaja.

Allen diesen Menschen danke ich für die warme und kreative Atmosphäre und für die Freundschaft. Ich werde Euch alle sehr vermissen!

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Ehefrau Putrika PR Gharini. Ihre dauernde Unterstützung sowie ihr stetiger Glaube an mich haben mir immer Rückhalt gegeben und mir auch in schweren Situationen sehr geholfen. Ich danke ihr dafür, dass sie immer für mich da ist.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Intan Fatah Kumara
Geburtsdatum: 30. Dezember 1971
Geschlecht: männlich
Geburtsort: Temanggung, Indonesien
Staatangehörigkeit: indonesisch
Familienstand: verheiratet

Schulischer Werdegang

1979 – 1985 Grundschule: SD Netral C Yogyakarta, Indonesien
1985 – 1988 Mittelstufe: SMP Negeri 5 Yogyakarta, Indonesien
1988 – 1991 Oberstufe: SMA Negeri 1 Yogyakarta, Indonesien

Hochschulausbildung

August 1991 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Gadjah Mada Universität, Yogyakarta, Indonesien
August 1996 Ärztliche Vorklinische Prüfung
September 1996 Beginn des klinischen Studiums
Februar 1999 Staatliche Ärztliche Prüfung

Organisatorische Erfahrungen

1994 – 1995 Vizevorsitzender des studentischen Erste-Hilfe-Teams
1994 – 1996 Mitglied der medizinischen Studentenvertretung
1989 – 1994 Vizevorsitzender der Pfadfindergruppe „Pramuka Saka Bhakti Husada“ in Yogyakarta (eine Gruppe, die für die Gesundheit des Volkes zuständig ist).

Berufliche Erfahrungen/ Weiterbildung

1999-2001 ärztliche Tätigkeit:
staatliche Krankenstation in Rongkop, Yogyakarta,
Arztpraxis der „Karunia Klinik“ in Yogyakarta,
Arztpraxis in der Klinik der Hochschule „STIE Yogyakarta“.

seit August 2000 Lehrtätigkeit an der Krankenpflegeschule der Medizinischen Fakultät, Gadjah Mada Universität, Yogyakarta, Indonesien

seit Januar 2002: Beginn der wissenschaftlichen Arbeit im Kardiologischen Labor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Betreuer: Prof. Dr. med. M. Kelm).

Publikationen

- T. Jax, P.Kleinbongard, **I. Kumara**, A. Dejam, H. Asgarouladi, A.-A. Weber, T. Lauer, M. Kelm. Biologische Relevanz einer NO-Bildung in humanen Erythrozyten. *Z Kardiol.* 2004;93 (Suppl 3): V1237
- I. Kumara**, P.Kleinbongard, T. Jax, G. Doemer, M. Kelm. Influence of nitric oxide on erythrocyte deformability. *In* Vascular NO: From Bench to Bedside – An International Symposium-, Hannover, März, 2004 (Abstract & Poster).
- I. Kumara**, P.Kleinbongard, G. Doemer, T. Jax, M. Kelm. Role of nitric oxide in erythrocyte deformability. *In* 1st Joint-French-German NO Meeting, Strasbourg, Oktober 2003 (Abstract & Poster).

Düsseldorf, im März 2005

Intan F. Kumara

Einfluss erythrozytär gebildeten Stickstoffmonoxids auf die Hämorheologie

- Intan Fatah Kumara -

Die Verformbarkeit der Erythrozyten sowie eine geringe Vollblut- und Plasmaviskosität sind eine Voraussetzung für die physiologische, mikrovaskuläre Passage. Vaskuläres Stickstoffmonoxid (NO) reguliert neben dem Gefäßtonus, insbesondere auch Interaktionen zwischen Blutzellen und dem Endothel, es unterdrückt die Adhäsion von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Neuste Untersuchungen belegen eindeutig eine aktive NO-Synthase in Erythrozyten. Die Bedeutung hämatogenen NOs für hämorheologische Parameter wurde bisher unzureichend untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses erythrozytär gebildeten NOs auf hämorheologische Parameter: 1. Eine Modifizierung der aus der Literatur beschriebenen Filtrationsmethode, um die Erythrozytenverformbarkeit zu bestimmen. 2. Einfluss des hämatogenen NOs auf die unterschiedlichen Blutzellen und die Viskosität des Blutes.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Es wurde eine Filtrationsmethode entwickelt, die eine reproduzierbare und schnelle Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit gewährleistet. Der Variationskoeffizient konnte im Vergleich zu bisher verfügbaren Methoden halbiert werden, die Intra- und Inter-Observervariabilität ist gering.
2. Die Verformbarkeit der Erythrozyten ist im Bereich der physiologischen NO-Konzentration fein zu regulieren, die erythrozytäre NO-Synthase ist an dieser Regulation maßgeblich beteiligt.
3. Die Erythrozytenaggregation sowie die Vollblut- und Plasmaviskosität können lediglich durch supraphysiologische NO-Konzentrationen modifiziert werden, eine Stimulation oder Inhibition der erythrozytären NO-Synthase zeigte keine relevanten Unterschiede der rheologischen Parameter.
4. Die erythrozytäre NO-Synthase nimmt nicht nur Einfluss auf die Erythrozyten selbst. Durch Stimulation der erythrozytären NOS konnte eine verringerte Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden.

Die erythrozytäre NO-Bildung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der rheologischen Eigenschaften des Blutes. Sie verbessert die Erythrozytenverformbarkeit und hemmt die Thrombozytenaggregation. Diese Mechanismen können eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie und Therapie mikrovaskulärer Erkrankungen spielen.

Düsseldorf, den _____

Prof. Dr. med. Malte Kelm