

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Die Rolle der erythrozytären NOS3 beim chronischen, myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschaden

Dissertation

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

vorgelegt von

Manuel Stern

2014

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

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Merx

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Suschek

Für Meine Familie

Auflistung der Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Merx, MW., Gorressen, S., van de Sandt, AM., Cortese, MM., Ohlig, J., Stern, M., Rassaf, T., Gödecke, A., Gladwin, MT., Kelm, M., (2014 Jan),
Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction.
Basic Research in Cardiology (Volume 109:398)

Zusammenfassung

Fragestellung und Ziele: Der Reperfusionsschaden beim akuten Myokardinfarkt mit konsekutiver linksventrikulärer Dysfunktion, gehört zu den weltweit führenden Ursachen für Krankheit und Sterblichkeit in den Industrienationen. Stickstoffmonoxid (NO) - unter anderem produziert von der endothelialen NO-Synthase (NOS3), spielt eine zentrale, kardioprotektive Rolle bei myokardialer Ischämie/Reperfusion. Zirkulierende Blutzellen, von denen Erythrozyten den größten Anteil darstellen, produzieren eine NOS3 (eryNOS) und stellen somit einen signifikanten Anteil am NO-Pool dar. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der eryNOS auf lokale und systemische Folgen beim chronischen Ischämie/Reperfusionsschaden zu analysieren.

Methodik: Es wurde Knochenmark von eNOS-Knock-out Mäusen (NOS3^{-/-}) in Wildtypen transplantiert. Es resultierten Chimäre mit deletierter eryNOS und intakter endothelialer NOS (BC-/EC+). Zur Kontrolle wurden die (BC-/EC+) mit Wildtypen, die eine intakte endotheliale und erythrozytäre NOS aufwiesen (BC+/EC+), verglichen. Nach 60-minütiger Ischämie-Induktion, bei geschlossenem Thorax im „*Closed Chest*“ Modell und einer 3-wöchigen Reperusionsphase, wurden linksventrikuläre Pumpfunktion, arterieller Blutdruck, Differentialblutbild, Infarktgröße, linksventrikuläres *Remodeling* sowie Erythrozytenverformbarkeit in beiden Gruppen analysiert.

Ergebnisse und Diskussion: Eine Deletion der erythrozytären NOS führte bei der Versuchstiergruppe (BC-/EC+) zu einer aggravierten Myokardschädigung durch Ischämie. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (BC+/EC+) war der Infarkt vergrößert und ging mit einer reduzierten linksventrikulären Pumpfunktion einher. Ohne eryNOS zeigte sich ein verstärktes negatives *Remodeling* mit erhöhter Einlagerung von Kollagen I und III im Infarktareal im Vergleich zur Kontrollgruppe. Neben den lokalen myokardialen Auswirkungen zeigte sich bei Betrachtung der systemischen Parameter eine verminderte Erythrozytenverformbarkeit bei den Tieren mit deletierter eryNOS im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Differentialblutbildern nach 3-wöchiger Reperfusion, konnte nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerungen: Im Rahmen des Ischämie/ Reperfusionsschadens nach akuter myokardialer Ischämie spielt die erythrozytäre NOS eine protektive Rolle. Die Modulation der erythrozytären NOS3-Aktivität könnte ein zukünftiger Ansatzpunkt in der Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. Neue Diagnostik zur Quantifizierung der erythrozytären NOS, die pharmakologische Modulation aber auch Gentherapien, welche die Aktivität der eryNOS beeinflussen sowie eine Verbesserung der Anämie Diagnostik und Therapie, die einen konstanten zirkulierenden eryNOS/ NO-Pool gewährleisten, stellen viel versprechende neue Therapieansätze dar und sind interessante Ausblicke für zukünftige Forschungen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	LV	linksventrikulär
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>	LVDP	Linksventrikulärer Druck
Ach	Acetylcholin	MAPK	Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen
AOX	Aldehydoxidase	MCV	mittleres Erythrozytenvolumen
ATP	Adenosintriphosphat	MethHb	Methämoglobin
BC	<i>blood cell</i> / Blutzelle	min	Minuten
BH₄	Tetrahydrobiopterin	MIP	Makrophagen Inflammation Protein
BL	<i>Baseline</i>	mg	Miligramm
bp	Basenpaare	ml	Mililiter
bpm	<i>beats per minute</i> / Schläge in der Minute	mm	Milimeter
BSA	Bovines Serumalbumin	mmHg	Milimeter-Quecksilbersäule
bzw.	beziehungsweise	MMP	Matrix Metalloproteinasen
Ca²⁺	Kalzium	mPa	Milipascal
Cal	Calmodulin	mtNOS	mitochondriale NOS
CAT	<i>cationic amino acid</i>	mV	Milivolt
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	MW	Mittelwert
cm	Zentimeter	n.s.	nicht signifikant
cm²	Quadratzentimeter	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
DAB	3,3 Diaminobenzidin	NF	<i>nuclear factor</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure	nm	Nanometer
dP/dt_{max}	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit	nNOS	neuronale NOS
dP/dt_{min}	maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit	NO	Stickstoffmonoxid
EC	<i>endothel cell</i> / Endothelzelle	NOS	Stickstoffmonoxid Synthase
EDRF	<i>Endothelium Derived Relaxing Factor</i>	O₂	Sauerstoff
EDV	enddiastolisches Volumen	O₂⁻	Superoxid
EF	Ejektionsfraktion	P_{max}	maximaler Druck
EKG	Elektrokardiogramm	P_{min}	minimaler Druck

eNOS	endotheliale NOS	Pa	Pascal
EPO	Erythropoetin	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
eryNOS	erythrozytäre NOS	PCR	Polymerase Kettenreaktion
ESV	endsystolisches Volumen	PKG	Proteinkinase G
EVB	Erythrozytenverteilungsbreite	PTCA	Perkutane transluminale coronare Angioplastie
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	PVP	Polyvinylpyrrolidon
Fe²⁺	Eisen	RDW	<i>red blood cell distribution width</i>
FMN	Flavinmononukleotid	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
g	Gramm	rpm	<i>rounds per minute / Umdrehungen die Minute</i>
gDNS	genomische DNS	RT	Raumtemperatur
GVHD	<i>graft versus host</i> Reaktion	s.c.	subkutan
Gy	Gray	SD	Standardabweichung
h	Stunde	sec	Sekunden
H₂O₂	Wasserstoffperoxid	SEM	Standardfehler
Hb	Hämoglobin	SOX	Sulfidoxidase
HbO₂	oxygenierten Hämoglobin	SV	Schlagvolumen
HIF	<i>hypoxia-inducible-factor</i>	TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Hkt	Hämatokrit	UV	Ultraviolett
IE	Internationale Einheit	VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
i.p.	intraperitoneal	VEGF	<i>vascular endothel growth factor</i>
I/R	Ischämie Reperfusion	VSMC	<i>vascular smooth muscle cells</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>	WT	Wildtyp
IL-1	Interleukin 1	XOR	Xanthinoxidase
IF	infarziertes Areal	Zn	Zink
iNOS	induzierbare NOS	µg	Mikrogramm
KG	Körpergewicht	µl	Mikroliter
kg	Kilogramm	µm	Mikrometer
KHK	koronare Herzkrankheit	°C	Grad Celsius
l	Liter		
LAD	<i>left anterior descending/ proximale linke Koronararterie</i>		
L-NMMA	L-NG-monomethyl Arginin Ziträt		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden	1
1.2 Linksventrikuläres <i>Remodeling</i> nach I/R	4
1.3 Kardiovaskuläre Auswirkungen von Anämie	6
1.4 Die Erythrozytenverteilungsbreite (EVB)	7
1.5 Stickstoffmonoxid	8
1.5.1 NO Synthese	9
1.5.2 Erythrozytäre NO-Synthase.....	12
1.6 Haemodynamische Effekte von NO	15
1.7 Einfluss von NO auf I/R-Schaden und linksventrikuläres <i>Remodeling</i>.....	16
2 Ziele der Arbeit.....	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Versuchstiere	20
3.2 Narkotika und Analgesie.....	22
3.2.1 Injektionsanästhetika S-Ketamin und Xylazin.....	22
3.2.2 Inhalationsanästhetikum Isofluran	23
3.2.3 Postoperative Analgesierung mittels Buprenorphin.....	23
3.3 Herstellung der Mäuse-Chimären	23
3.3.1 Bestrahlung.....	23
3.3.2 Aufbereitung des Spenderknochenmarks	24
3.3.3 Knochenmarktransplantation	25
3.4 Übersicht des Versuchsablaufs	26
3.5 Das Ischämie/ Reperfusionsmodell: Das <i>Closed Chest</i> Modell.....	27
3.5.1 Voroperation (Anlage der Ligatur bei geöffneten Thorax)	27
3.5.1.1 Versuchsaufbau	27
3.5.1.2 Thorakotomie	28
3.5.2 Ischämie Induktion.....	31
3.5.2.1 Versuchsaufbau.....	31
3.5.2.2 Versuchsdurchführung.....	32
3.5.2.3 Auswertung	33
3.6 Echokardiografie	34
3.6.1 Versuchsaufbau.....	34
3.6.2 Ablauf der echokardiografischen Untersuchung.....	35
3.6.3 Auswertung.....	37
3.7 Invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten <i>Arteria carotis communis</i>	37
3.7.1 Versuchsaufbau.....	37
3.7.2 Präparation der rechten <i>Arteria carotis communis</i> und Versuchsdurchführung	37
3.8 Invasive Messung hämodynamischer Parameter im linken Ventrikel.....	40

3.9 Bestimmung der Erythrozyten – Verformbarkeit mittels <i>Laser-assisted-optical rotational cell</i> Analysator (LORCA) <i>in vitro</i>	41
3.10 Differentialblutbild	43
3.11 Histologie	43
3.11.1 Organentnahme und Vorbereitung	43
3.11.2 Entwässerung und Einbettung	44
3.11.3 Schneiden	44
3.11.4 Entparaffinierung	44
3.11.5 Färben	44
3.11.5.1 Gomori's One Step Trichrome Färbung	44
3.11.5.1.1 Auswertung der Myokardinfarktgröße	46
3.11.5.1.2 Ermittlung des Kollagengehalts	46
3.11.5.2 Kollagentypisierung	46
3.12 Nachweis des <i>knock-out</i> Allels nach Knochenmarktransplantation	48
3.12.1 Isolation genomischer DNS aus dem Blut der Chimäre	48
3.12.2 Isolation genomischer DNS aus der Schwanzspitze der Chimäre	49
3.12.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNS	50
3.12.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
3.12.5 Gelelektrophorese	51
3.13 Statistische Analyse der Messergebnisse	52
4 Ergebnisse	53
4.1 Ergebnisse der Genotypisierung aus Schwanzspitze und Vollblut der verwendeten Chimären	53
4.2 Histologische und immunhistologische Ergebnisse	54
4.2.1 Infarktgrößenbestimmung und Kollagengehalt	54
4.2.2 Kollagentypisierung	55
4.3 Nicht-invasive Druck-Volumen Messung mittels Echokardiografie	56
4.3.1 Auswurfraction (ejection fraction, EF)	57
4.3.2 Endsystolisches Volumen (ESV)	59
4.3.3 Enddiastolisches Volumen (EDV)	61
4.4 Invasive Druck-Volumen Messung mittels Millar-Katheter	63
4.4.1 Mittlerer arterieller Druck in der Aorta	63
4.4.2 Druckwerte des linken Ventrikels	64
4.4.2.1 Linksventrikulärer Druck (LVDP)	65
4.4.2.2 Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max})	66
4.4.2.3 Maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit (dp/dt_{min})	67
4.5 Verformbarkeit der Erythrozyten	68
4.6 Differentialblutbild nach 3 Wochen Reperfusion	69
5 Diskussion	71
5.1 Evaluation der Methodik vor Ablauf der Ischämie Induktion	72
5.2 Der lokale myokardiale Einfluss der eryNOS auf den chronischen I/R Schaden	73
5.3 Der systemische Einfluss der eryNOS auf den chronischen I/R Schaden	77
6 Klinische Schlussfolgerungen	81
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	82

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABB. 1: NOS KATALYSIERTER NO-SYNTHESEWEG.....	10
ABB. 2: EINFLÜSSE VON NO AUF I/R SCHADEN UND LINKSVENTRIKULÄRES <i>REMODELING</i>	18
ABB. 3: ENDOTHEL- UND BLUTZELLEN DER CHIMÄRE BC-/EC+.....	21
ABB. 4: ZEITLICHER ABLAUF DER KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION UND ANSCHLIEßENDER REKONVALESCENZ PHASE VON SECHS WOCHEN	25
ABB. 5: ÜBERSICHT DES VERSUCHSABLAUFS.....	27
ABB. 6: ANLAGE DER LAD LIGATUR.....	30
ABB. 7: VERSUCHSAUFBAU ISCHÄMIE-INDUKTION.....	31
ABB. 8: ISCHÄMIE INDUKTION	32
ABB. 9: ZEITLICHER VERLAUF DER EKG-VERÄNDERUNGEN WÄHREND DES VERSUCHS	33
ABB. 10: TISCHPOSITION UND AUFNAHMEN IM PARASTERNALEN LANGACHSENSCHNITT	35
ABB. 11: TISCHPOSITION UND PULSWELLEN-DOPPLER AUFNAHME DER AORTENKLAPPE IM SUPRASTERNALEN FENSTER	36
ABB. 12: DARSTELLUNG DES ARTERIELLEN BLUTDRUCKSIGNALS WÄHREND DER BASELINE	38
ABB. 13: PRÄPARATION DER RECHTEN <i>A. CAROTIS COMMUNIS</i> UND EINFÜHREN DES MILLAR KATHETERS ZUR INVASIVEN ARTERIELLEN BLUTDRUCKMESSUNG.	39
ABB. 14: DARSTELLUNG DER HÄMODYNAMISCHEN PARAMETER IM LINKEN VENTRIKEL ALS PRESSURE/TIME-GRAPH UND PRESSURE-VOLUME-LOOP VOR UND WÄHREND APPLIKATION VON NORADRENALIN	40
ABB. 15: LORCA-MESSUNG	42
ABB. 16: DARSTELLUNG DER GOMORI'S ONE STEP TRICHROME FÄRBUNG NACH 3 WOCHEN POST ISCHÄMIE	45
ABB. 17: TYPISCHES BANDENMUSTER IN DER GELELEKTROPHORESE ZUM NACHWEIS DES <i>KNOCK-OUT</i> ALLELS IM BLUT NACH KNOCHENMARKSTRANSPLANTATION	51
ABB. 18: INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG MITTELS GOMORI'S ONE STEP TRICHROME NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	54
ABB. 19: KOLLAGENGEGHALT IM INFARZIERTEM MYOKARD NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	55
ABB. 20: KOLLAGENTYPISIERUNG NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	56
ABB. 21: AUSWURFFRAKTION BASAL UND NACH 3 WOCHEN REPERFUSION.....	57
ABB. 22: AUSWURFFRAKTION IM VERLAUF 24 H BIS ZU 3 WOCHEN POST ISCHÄMIE	58
ABB. 23: ENDSYSTOLISCHES VOLUMEN BASAL UND 3 WOCHEN POST ISCHÄMIE.....	60
ABB. 24: ENDSYSTOLISCHES VOLUMEN IM VERLAUF 24H BIS ZU 3 WOCHEN POST ISCHÄMIE	61
ABB. 25: ENDDIASTOLISCHES VOLUMEN IM VERLAUF 24H BIS ZU 3 WOCHEN POST ISCHÄMIE	62
ABB. 26: ENDDIASTOLISCHES VOLUMEN BASAL UND NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	63
ABB. 27: MITTLERER ARTERIELLER DRUCK NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	64
ABB. 28: LINKSVENTRIKULÄRER DRUCK NACH 3 WOCHEN REPERFUSION.....	65
ABB. 29: MAXIMALE DRUCKANSTIEGSGESCHWINDIGKEIT DER HERZMUSKULATUR NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	66
ABB. 30: MAXIMALE ERSCHLAFUNGSGESCHWINDIGKEIT DER HERZMUSKULATUR NACH 3 WOCHEN REPERFUSION	67
ABB. 31: VERFORMBARKEIT DER ERYTHROZYTEN BASAL UND NACH 3 WOCHEN REPERFUSION.....	68
ABB. 32: DIFFERENTIALBLUTBILD BASAL UND NACH 3 WOCHEN REPERFUSION.....	70
TABELLE 1: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN CHIMÄRGRUPPEN.....	21
TABELLE 2: VERWENDETE ANTIKÖRPER ZUM NACHWEIS VON KOLLAGEN I, III UND IV IM INFARZIERTEM MYOKARD	47
TABELLE 3: PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTI-KÖRPER VERDÜNNUNGSSCHEMA ZUR TYPISIERUNG VON KOLLAGEN I, III UND IV	47
TABELLE 4: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE.....	51

1 Einleitung

1.1 Der myokardiale Reperfusionsschaden

Herz-Kreislaufkrankungen sind, laut statistischem Bundesamt (Stand 2011), mit 40,2 % vor Karzinomen die führende Todesursache in Deutschland. Nach Angaben der WHO sterben 12,8 % der Weltbevölkerung an den akuten und chronischen Folgen von Herz-Kreislaufkrankungen (Stand 2011). Der akute Myokardinfarkt mit konsekutiver linksventrikulärer Dysfunktion und linksventrikulären *Remodeling* ist der führende Grund für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Entscheidend für das *Outcome* bzw. das Überleben ist das Zeitintervall bis zur geeigneten Therapie („*time is muscle*“) [1]. Heutzutage stehen vier Therapiestrategien zur Auswahl: 1. Allgemeinmaßnahmen, 2. Reperfusionstherapie, 3. Prophylaxe einer Rethrombose und 4. die Therapie von Komplikationen. Die frühzeitige und erfolgreiche Rekanalisation ist beim Herzinfarkt die Therapie der Wahl. Für die Reperfusionstherapie haben sich drei Methoden etabliert: Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), die Thrombolyse oder der Bypass. Eine Herausforderung ist hierbei, dass die Reperfusion selbst myokardiale Schäden hervorruft [2, 3]. Zu den potentiellen Folgeschäden, die unter dem Begriff Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) zusammengefasst werden, zählen Nekrose, myokardiales *Stunning*, Arrhythmien, Dysfunktion des Endothels und „*no reflow*“ Phänomene [4].

Als Ischämie bezeichnet man eine aufgehobene oder pathologisch verminderte Gewebsperfusion durch arterielles Blut. Man kann sie in Ausmaß und Dauer weiter unterteilen. Beim Ausmaß einer Ischämie unterscheidet man zwischen einer relativen, mit ungenügendem Blutfluss und einer absoluten Ischämie, die durch eine aufgehobene Durchblutung gekennzeichnet ist. Bei der Dauer unterscheidet man zwischen einer vorübergehenden (passageren) Ischämie, die vom Gewebe toleriert wird und einer kritischen Ischämie, die zur Nekrose des Gewebes führt. Irreversibler myokardialer Schaden tritt 20 Minuten nach Okklusion ohne ausreichende Kollateralisierung auf [5]. Der Schaden breitet sich von subendokardial nach subepikardial aus. Dies hängt von dem höheren

1 Einleitung

subendokardialen Sauerstoffverbrauch und der Umverteilung des kollateralen Flusses auf die äußeren Schichten ab. Durch die gestörte oxidative Phosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) ist das betroffene gesamte Subendokard nach einer Stunde Okklusion irreversibel geschädigt [6]. Die Aktivität der ATP-abhängigen Na^+/K^+ Pumpe nimmt ab [7, 8] und reduziert dadurch die $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Transporter [9]. In Folge kommt es zu einer Kalziumüberladung, die zu einer strukturellen Desorganisation und letztendlich zum nekrotischen Untergang der Zelle führt [8-10]. Neben der Kalzium-Überlastung sind auch Thrombozyten [11, 12] und das Renin-Angiotensin-System [13-15] am I/R-Schaden beteiligt. Darüber hinaus fördern Adhäsionsmoleküle und Chemokine einen proinflammatorischen Zustand [7, 9, 10]. Innerhalb der ersten 20 Minuten bis einer Stunde post Ischämie ist das Myokardgewebe in der Lage, durch adaptive Schutzmechanismen, irreversible Schäden abzuwenden [6]. Der Energie-Haushalt wird im anaeroben Zustand durch Fettsäuren aufrechterhalten. Gleichzeitig wird die Glukose-Aufnahme im Gewebe erhöht und die kardiale Inotropie reduziert. Des Weiteren fungiert Myoglobin als Sauerstoffspeicher [16]. Der transmurale Fortschritt des Infarkts ist nach circa 4-6 Stunden nach Okklusion abgeschlossen [6]. Dieser Vorgang kann, durch Komorbiditäten die den O_2 -Verbrauch oder Konsum erhöhen, beschleunigt werden. Beispiele hierfür sind Tachykardie, arterielle Hypotension sowie Anämie. Im Gegensatz dazu können repetitive Ischämien oder Angina vor einer irreversiblen Okklusion den myokardialen Schaden, durch Präkonditionierung, verringern [17].

Die Reperfusion dient der Wiederherstellung der Perfusion und damit der Wiedereinführung von Sauerstoff in verschlossenen Gefäßen zur Verhinderung ischämiebedingter Folgeschäden und Nekrosen. Andererseits entstehen durch die Wiederherstellung des Blutflusses im betroffenen Gewebe Sauerstoffradikale (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxid (O_2^-). Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom „Sauerstoff-Paradoxon“ [7]. Sie beschädigen die Zelle direkt und indirekt über eine Vielzahl von Mechanismen. ROS bewirkt eine Permeabilitätserhöhung der Mitochondrien [18], Protein- und Lipidperoxidation [7], Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen sowie Oxidation der DNS [19]. ROS werden durch die Superoxid-Dismutase und Katalase neutralisiert/abgebaut [20]. Im Rahmen der Ischämie/Reperfusion kann die Überproduktion von ROS nicht mehr abgepuffert werden und es entstehen die oben genannten Folgeschäden [6,

1 Einleitung

21-24]. Indirekt interagieren ROS, im Rahmen der Fenton-Reaktion, mit NO, Fettsäuren oder freiem Eisen. Dies führt oft zur Bildung von zytotoxischen Substanzen wie Peroxynitrit sowie Peroxyl-Radikale und Hydroxylradikale [18]. Des Weiteren verstärkt ROS die entzündliche Reaktion durch Hochregulation von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Im Gegensatz zur schädlichen Rolle von ROS in der akuten Phase der Reperfusion beeinflussen diese positiv den chronischen Verlauf sowie permanente Ischämie. ROS steigern die Angiogenese durch Aktivierung des *vascular endothel growth factor* (VEGF) und *hypoxia-inducible factor* (HIF) [25, 26]. Außerdem werden Proliferation und Differenzierung von *vascular smooth muscle cells* (VSMC), die essentiell für den Gefäßumbau sind, durch ROS beeinflusst [25, 26].

Den Reperfusionsschaden kann man in eine akute/frühe und späte/chronische Phase unterteilen. Innerhalb der ersten fünf Minuten der Reperfusion wird das Endothel dysfunktional und die NO-Bildung vermindert sich [27]. In Folge dessen ist die Vasorelaxation als Antwort auf Endothel-abhängige Vasodilatoren nach I/R eingeschränkt [28, 29]. Im Verlauf kommt es nach 20 Minuten zu einer gesteigerten Leukozyten Adhäsion an das dysfunktionale Endothel. Neutrophile ändern ihre Form in freibewegliche, bipolar konfigurierte Zellen, die in das Endothel transmigrieren und es durch die Freisetzung von Proteasen, Zytokine, Leukotriene und ROS weiter schädigen [30]. Die mikrovaskuläre Dysfunktion kann so schwerwiegend sein, das eine Reperfusion nicht mehr angemessen erfolgen kann. Dies wird als „*no-reflow*“ Phänomen bezeichnet und ist mit folgenschweren Komplikationen nach Reperfusion verknüpft [31]. Todesfälle sind in diesem Zusammenhang möglich [32, 33]. Eine frühe Reperfusion ist mit *Stunning* des Myokards und LV-Dysfunktion assoziiert [23, 24]. Der späte Reperfusionsschaden ist durch die anhaltende endotheliale Dysfunktion bis zu zwölf Wochen post Reperfusion gekennzeichnet [28, 34, 35].

Trotz all dieser Komplikation ist eine zeitnahe, erfolgreiche Reperfusion, für ein verbessertes *Outcome* des Patienten, die Therapie der Wahl. Ziel der Forschung ist es, kardioprotektive Strategien zu entwickeln, um den I/R-Schaden mit Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu reduzieren und die Rehabilitation zu verbessern [36, 37]. Die Modulation der NO-Bioverfügbarkeit könnte einen wertvollen Ansatz in der Kardioprotektion darstellen.

1.2 Linksventrikuläres *Remodeling* nach I/R

Linksventrikuläres *Remodeling* kam 1985 durch die Studien von Pfeffer *et al.* erstmalig in den klinischen Fokus [38]. Post-Infarkt *Remodeling* wurde 1990 als akute und chronische Veränderungen in ventrikulärer Topografie nach Infarkt beschrieben [39]. Kardiales *Remodeling* wird im klinischen Kontext heutzutage als Veränderungen der molekularen, zellulären und interstitiellen Ventrikelstrukturen als Antwort auf hämodynamisches Volumen, neurohumorale Stimuli und/oder myokardialen Stress verstanden [40]. Unter myokardialen Stress wird jede Form der kardialen Belastung/ Verletzung gezählt. Beispiele sind arterielle Hypertonie, idiopathische dilatative Kardiomyopathie, Myokarditis, Vitien und die Myokardischämie. *Remodeling* kann während des Wachstums physiologisch oder aber nach Myokardinfarkt, arterielle Hypertonie und Vitien pathologisch sein [41]. Physiologisches *Remodeling* sind kompensatorische Veränderungen des Ventrikels aufgrund von physiologischen Stimuli, wie beispielsweise Training und Schwangerschaft. Das pathologische *Remodeling* wird in drei Pathogenesen unterteilt. Es kann durch Volumenüberlastung (Vitien), Druckbelastung (arterielle Hypertonie, Aortenstenose) oder nach myokardialen Stress auftreten. Volumenüberlastung führt zu einer ekzentrischen linksventrikulären Hypertrophie [42]. Ekzentrische Hypertrophie ist mit erhöhter kardialer Masse und Ventrikelvolumenzunahme assoziiert. Die Wanddicke kann unverändert, vergrößert oder verkleinert sein, Sarkomere werden hintereinander hinzugefügt und Kardiomyozyten verlängern sich. Drucküberlastung führt zu konzentrischen linksventrikulären *Remodeling* mit oder ohne Erhöhung der myokardialen Masse [42]. Konzentrische Hypertrophie ist mit Wandverdickung charakterisiert und führt zu einem vermehrten parallelen Einbau von Sarkomeren und vergrößerten Kardiomyozyten. Pathologisches *Remodeling* nach I/R führt zu kombinierter, konzentrischer und ekzentrischer Hypertrophie. Durch Ischämie kommt es zu nekrotischen und apoptotischen Verlust von Myozyten, welche im infarzierten Gewebe durch Ventrikelwandverdünnung und Dilatation kompensiert wird [43]. Die Wandverdünnung resultiert durch Myozyten-Bewegung welche als „*slippage*“ bekannt ist [44]. Im nicht infarzierten Myokard entwickeln die Kardiomyozyten eine kompensatorische, ekzentrische Hypertrophie, die dazu führt, dass der Ventrikel weniger elliptisch sondern verstärkt eine sphärische Form annimmt [45]. Diese

1 Einleitung

adaptive Hypertrophie ist anfangs erwünscht und kompensiert das infarzierte Gewebe. Im Verlauf entwickelt sich jedoch durch die dauerhafte erhöhte Wandspannung ein verstärkter Sauerstoffbedarf, der nicht mehr durch das Myokard kompensiert werden kann [46]. Dieser *miss-match* zwischen linksventrikulären Volumen und Wanddicke führt zu erhöhtem Wandstress mit verminderter subendokardialer Perfusion und verminderter linksventrikulärer Pumpfunktion die in eine Herzinsuffizienz mit fulminantem Verlauf endet.

Alternativ wird *Remodeling* als adaptiv oder maladaptiv beschrieben [47]. Ein adaptives *Remodeling* geht mit einer konzentrischen Hypertrophie und physiologischer linksventrikulärer Pumpfunktion einher. Jeder kompensatorischer Prozess kann sich potentiell zu maladaptiven *Remodeling* entwickeln [48]. Maladaptives *Remodeling* ist mit ekzentrischer Hypertrophie assoziiert die in Herzinsuffizienz mündet. Neben der Qualität kann man zusätzlich den zeitlichen Verlauf des *Remodeling* in eine akute und chronische Phase unterteilen. In der akuten Phase wird im Rahmen der I/R eine verstärkte Inflammation aktiviert, die mit erhöhter Freisetzung von ROS und Zytokinen einhergeht. Je stärker die Inflammation ausgeprägt ist, desto größer ist der resultierende Infarkt mit konsekutivem maladaptiven *Remodeling*. In der chronischen Phase wird das ischämische Gewebe in eine fibröse Narbe umgewandelt. Hierbei spielt die Regulation der Kollagensynthese eine essentielle Rolle. Kollagen wird durch interstitielle Fibroblasten synthetisiert und durch Kollagenasen, wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), degradiert. Die MMPs sind proteolytische Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix umbauen. Einige Studien konnten nachweisen, dass der Abbau der extrazellulären Matrix durch MMPs, speziell MMP-9, die Pathogenese einiger kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise Atherosklerose, Herzinsuffizienz, Kardiomyopathie und Myokardinfarkt, beeinflusst [49]. MMPs sind inaktiv im Myokard präsent und werden nach myokardialer Ischämie aktiviert [50]. In Tierversuchen ging eine verstärkte Expression von MMPs mit einer erhöhten Herzinsuffizienzrate einher [51]. Jede Art von *Remodeling* kann potentiell zur Herzinsuffizienz führen und das *Outcome* wesentlich beeinflussen [52]. Eines der größten Herausforderungen der heutigen Kardiologie ist die Prävention der Herzinsuffizienz. Die Modulation der NO-Bioverfügbarkeit bietet viel versprechende Therapieoptionen.

1.3 Kardiovaskuläre Auswirkungen von Anämie

Anämie ist ein Zustand mit verminderten Hämoglobingehalt (Hb), alternativ zu einem niedrigen Anteil der Erythrozyten am Blutvolumen (Hämatokrit (Hkt)). Es gibt unterschiedliche Definitionen für Anämie. Die geläufigste ist die Definition laut WHO: Man spricht von einer Anämie bei Männern mit Hb <13g/dl und Hb <12g/dl bei Frauen. 9 % der adulten Weltbevölkerung haben nach dieser Eingrenzung eine Anämie. Anämie ist ein bekannter Risikofaktor für die Prognose von Herzinfarkt und Herzinsuffizienz [53]. Der Hb-Wert bei der Präsentation eines STEMI's sagt kardiovaskuläre Ereignisse unabhängig voraus [54]. Ein niedriger Hb-Wert verstärkt, durch erniedrigten Sauerstoff-Transport, den transmuralen Infarkt nach koronarem Verschluss. Des Weiteren zeigte eine Metaanalyse aus 34 publizierten klinischen Studien eine Prävalenz von Anämie von etwa 37 % bei Patienten mit Herzinsuffizienz [55]. In der COMET (*Carvedilol or Metoprolol European Trial*) und Val-Heft- (*Valsartan in Heart Failure Trial*) Studie zeigte sich bei herzinsuffizienten Patienten eine hohe Anämie-Neuerkrankungsrate von etwa 15,5 % [56, 57]. Niedrige Hb-Werte sind mit schweren Symptomen, reduzierter Belastbarkeit und erhöhter Mortalität assoziiert [55, 58]. Anämische Patienten leiden oft unter Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Belastungsdyspnoe, Schwindel und Tachykardie. Eine gängige Einteilung der unterschiedlichen Anämieätiologien richtet sich nach Bildungsstörung, gesteigertem Erythrozytenabbau, Erythrozytenverlust und Verteilungsstörung. Generell gibt es mehrere Ursachen für Anämie bei Herzinsuffizienz. Die häufigsten Anämien sind Verdünnungsanämie aufgrund von Volumenüberlastung, Eisenmangelanämie, Anämie aufgrund chronischer Erkrankungen und renale Anämie [59]. Mit bis zu 20 % ist Eisenmangel, mit assoziierter mikrozytärer hypochromer Anämie einer der häufigsten Gründe [60], dicht gefolgt von chronischen Entzündungsreaktionen die mit Herzinsuffizienz und Eisenmangel einhergehen [61]. Im Rahmen der Inflammation sind unter anderem die Zytokine *tumor- nekrose-faktor-alpha* (TNF- α), Interleukin-1 und Interleukin-6 erhöht und führen zu einer verstärkten Eisenspeicherung im retikuloendothelialen System, wodurch die Eisenmangel Anämie gefördert wird [62, 63]. Speziell TNF- α und Interleukin-6 inhibieren die Hämatopoese. Sie inhibieren die Proliferation von erythrozytären Progenitorzellen im Knochenmark und die renale Produktion von

Erythropoetin (EPO), durch Aktivierung vom *nuklear faktor-κB* (NF-κB) sowie dem GATA-bindenden Protein GATA 2 [64]. Interleukin 6 stimuliert die Produktion von Hepcidin in der Leber, welches die duodenale Eisenresorption und die Generierung von Ferroprotein hemmt und somit Eisenmangel verstärkt [62]. Ein weiterer Mechanismus für Anämie bei herzinsuffizienten Patienten ist die verringerte EPO-Produktion, aufgrund renaler Dysfunktion [65]. 30-60 % der herzinsuffizienten Patienten haben gleichzeitig eine Anämie aufgrund einer chronischen Niereninsuffizienz. Es ist anzumerken, dass es des Weiteren eine iatrogene Ursache für Anämie bei Herzversagen gibt. Die nach aktuellen *Guidelines* empfohlene Gabe von ACE-Hemmern führt zu einem Hämoglobinabfall von bis zu 0,3 g/dl [66]. Die Erythropoese wird durch Abfall von Angiotensin II, medullär und renal reduziert [61].

1.4 Die Erythrozytenverteilungsbreite (EVB)

Im klinischen Alltag wird die Verformbarkeit der Erythrozyten als Erythrozytenverteilungsbreite (EVB) mittels Durchflusszytometrie bestimmt und in Prozent angegeben (englisch: *Red Blood Cell Distribution Width* (RDW)). Sie quantifiziert die Heterogenität der einzelnen Größen von zirkulierenden Erythrozyten und ist abhängig von Durchmesser und Dicke. Man berechnet die RDW aus der Standardabweichung des Volumens (SV) der Erythrozyten und dem Mittelwert des Erythrozytenvolumens (MCV): $EVB (\%) = (S_V * 100) \div MCV$.

Die Größenverteilung der Durchmesser entspricht einer normalverteilten Gauss-Glockenkurve, die in diesem Zusammenhang als Price-Jones-Kurve bekannt ist. Der Referenzbereich liegt zwischen 11,5 und 14,5 %. Erhöhte Werte sind mit einer Vielzahl von physiologischen Auswirkungen und Krankheiten assoziiert, wohingegen erniedrigte Werte ohne klinische Relevanz zu sein scheinen. Generell wurde für erhöhte RDW-Werte ein erhöhtes Mortalitätsrisiko in der Allgemeinbevölkerung nachgewiesen [67-71]. In mehreren klinischen Studien zeigte sich die RDW als zuverlässiger Vorhersagewert für Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Erkrankungen wie KHK [72-80], Arteriosklerose [81], akuter sowie chronischer Herzinsuffizienz [81-91], ischämischer Schlaganfall [92], Lungenembolie [93], pulmonalerarterieller Hypertonie [94, 95], Metabolisches

Syndrom [96], Auftreten einer Anämie innerhalb der nächsten sechs Monate bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz [97], progressive Mikroalbuminurie mit akutem Nierenversagen [98, 99] sowie schlechteres *Outcome* schwerkranker und verletzter Menschen [100-103]. Vielmehr wurden Übereinstimmungen zwischen erhöhten RDW-Werten und verstärkter Intima-Media Dicke im Rahmen von arterieller Hypertonie gleichfalls erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrucke bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz nachgewiesen [104, 105].

Die RDW ist ein kostengünstiger, schnell zu erfassender Parameter, der nicht nur für die Anämie-Differentialdiagnostik sondern auch ein zuverlässiger Prognosefaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen zu sein scheint. Die biologischen Zusammenhänge werden im Verlauf dieser Arbeit weiter diskutiert. NO hat direkten Einfluss auf die RDW durch Modulation der Membranfluidität und Verformbarkeit von Erythrozyten [106]. Modifikation der NO-Bioverfügbarkeit als Therapieansatz zur Verbesserung der RDW-Parameter könnte sich positiv auf das klinische *Outcome* von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen auswirken.

1.5 Stickstoffmonoxid

Im kardiovaskulären System übernimmt Stickstoffmonoxid (NO) wichtige Funktionen. Die ersten nachgewiesenen therapeutischen Erfahrungen mit NO und seiner Metaboliten wurden 1867 von Brunton im Rahmen der Angina Pectoris Behandlung mit Nitraten gemacht. 1980 stellten Robert F. Furchgott *et al.* fest, dass Acetylcholin seine relaxierende Wirkung auf das Endothel von Hasenaorta ausüben kann, wenn das Endothel unbeschädigt ist [107]. Daraus entstand die These, dass Acetylcholin im intakten Endothel einen vasorelaxierenden Stoff freisetzt, der als *Endothelium Derived Relaxing Factor* (EDRF) bezeichnet wurde [108]. Im Verlauf wurde nachgewiesen dass EDRF, NO entspricht [109, 110]. NO ist ein kleines zweiatomiges Radikal, das unterschiedliche Prozesse reguliert. Radikale sind daran bestrebt schnell mit anderen Atomen oder Molekülen zu reagieren, um einen Partner für ihr ungepaartes Elektron zu finden. Daher ist ihre Halbwertszeit in der Regel sehr kurz (< 1 Sekunde). Dagegen hat NO eine außergewöhnlich lange Halbwertszeit von 2-3 Sekunden in biologischen Systemen und von etwa 400 Sekunden (bei einer Konzentration von 1 μM) in reinem Wasser

[111]. Durch die hydrophoben Eigenschaften kann dieses gelöste, elektrisch neutrale Gas schnell durch Lipidmembranen ins Zellinnere diffundieren und über die Aktivierung von intrazellulären Rezeptoren die Zelle innerhalb weniger Sekunden oder Minuten verändern. NO diffundiert schnell aus der Zelle und kann in biologischen Systemen etwa 200 µm diffundieren [112]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde NO nachgesagt das einzige Radikal zu sein, das sich als extrazellulärer Messenger eignet.

Stickstoffmonoxid wird im kardiovaskulären System mit einer Vielzahl an physiologischen aber auch pathologischen Prozessen in Verbindung gebracht [113]. Es nimmt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung von kardialen Funktionen ein, reguliert den Gefäßtonus und steuert essenzielle Funktionen im Nerven- und Immunsystem.

1.5.1 NO Synthese

Unter physiologischen Bedingungen wird NO sauerstoffabhängig aus Isoformen der NO-Synthase (NOS) katalysiert. Scherstress in Gefäßen und erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration sind natürliche Stimuli für die NO-Produktion und führen zu einer vermehrten Genexpression der NOS [114]. Die Genexpression von NOS wird prä- und posttranskriptionell durch NO reguliert [115]. Zusätzlich inhibiert NO, per negativem Feedback direkt die NOS.

In einer Fünf-Elektronen-Oxidation mit den Kofaktoren Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Häm und molekularem Sauerstoff entsteht aus der Aminosäure L-Arginin, NO sowie L-Citrullin und zwei Wassermoleküle als Koprodukte [116]. NOS sind in ihrer ursprünglichen Form homodimere Oxidoreduktasen. Eine Häm-enhaltende Oxygenase-Domäne und eine Flavin-enhaltene Reduktase-Domäne. Die Zugabe der Kofaktoren führt über eine Calmodulin-Domäne zur Bildung eines Dimers, welches ein Zink-Atom komplexiert (siehe Abb. 1).

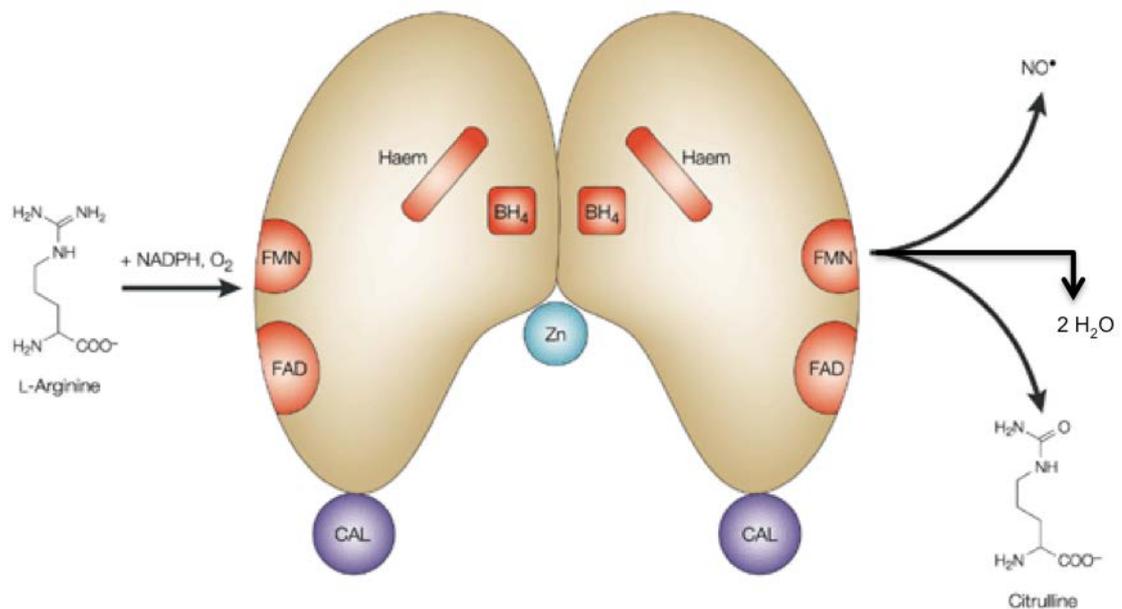


Abb. 1: NOS katalysierter NO-Syntheseweg (modifiziert nach [117]). Durch den Einfluss der Kofaktoren Flavinmononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Häm und Calmodulin (Cal) entsteht das aktivierte NOS Dimer das Zink (Zn) komplexiert und die Reaktion von L-Arginin mit (NADPH) und Sauerstoff (O₂) zu Citrullin, 2 H₂O und NO katalysiert.

Am Anfang der Reaktion stellen die Reduktase-Domäne der NOS durch Oxidation von NADPH Elektronen bereit, die für die Hydroxylierung von Arginin zum kurzlebigen Zwischenprodukt N-Hydroxy-L-Arginin benötigt werden. Die Elektronen werden über Flavinnukleotide zur Oxygenasedomäne transportiert [118]. Im Anschluss wird Fe²⁺ oxidiert und molekularer Sauerstoff reduziert, damit ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert und das andere auf Arginin übertragen werden kann. Es folgt die NADPH-abhängige Oxidation von Nw-Hydroxy-L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und L-Citrullin. Hierfür wird BH₄ und molekularer Sauerstoff benötigt. Die Rolle von BH₄ wird zurzeit kontrovers diskutiert, da die benötigten Reduktionsäquivalente bereits durch NADPH bereitgestellt werden. Es könnte als Stabilisator des Homodimers oder aber als allosterischer Faktor fungieren [119, 120].

Es sind drei Hauptformen der NOS bekannt [121, 122]. Für jedes der drei Isoformen sind *knock-out* Modelle etabliert worden [123-127]. Typ 1, die neuronale NOS (nNOS) wird hauptsächlich in Neuronen im Gehirn und im autonomen Nervensystem exprimiert. Die Expression der Typ 2, induzierbare NOS (iNOS), kann im Zuge eines inflammatorischen Prozesses *de novo* in Immunzellen

1 Einleitung

synthetisiert werden [128]. Typ 3, die endotheliale NOS (eNOS), ist in Endothelzellen lokalisiert. Alle drei Isoformen sind im Myokard präsent. Die nNOS befindet sich im kardialen Leitungsgewebe, in kardialen Neuronen und im sarkoplasmatischen Retikulum von Myozyten. iNOS wird von allen Zellen als Antwort auf entzündliche Zytokine synthetisiert und die eNOS ist im koronaren Endothel, im Endokard, im Sarkolemm sowie in der T-Tubuli Membran von kardialen Myozyten vorhanden. In Gegensatz zur iNOS sind nNOS und eNOS konstitutive NOS-Isoformen deren Aktivität funktionell von intrazellulärem Calcium abhängt [129]. Calcium stimuliert Calmodulin, welches reversibel an die konstitutiven NOS-Isoformen bindet [130]. Calmodulin bindet als prosthetische Gruppe irreversibel an die iNOS und hält diese aktiv [131]. Die iNOS kann deswegen bereits bei niedrigen Calciumspiegeln, via Transkription, aktiviert werden.

Heutzutage sind zusätzliche NOS-Isoformen in Blutzellen bekannt. Respektive befindet sich in B- und T-Lymphozyten eNOS [132], in Thrombozyten eNOS, nNOS und iNOS [133-135], in Eosinophilen eNOS und iNOS [136], in Makrophagen iNOS [137] und in Erythrozyten (eNOS) (siehe 1.4.2). In Mitochondrien lässt sich noch eine zusätzlich NOS-Isoform (mtNOS) nachweisen. Sie ist in der inneren Mitochondrien-Membran lokalisiert und beeinflusst die Atmungskette und das mitochondriale Membranpotential [138, 139].

Eine verringerte Aktivität oder Fehlfunktion der NOS, speziell der eNOS, begünstigt die Entstehung einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen. Besonders hervorzuheben ist die Entstehung von Gefäßerkrankungen mit endothelialer Dysfunktion wie beispielsweise Arteriosklerose [140, 141], arterielle Hypertonie [142], sowie I/R-Schaden [143, 144]. Darüber hinaus wird das ventrikuläre *Remodeling* im Rahmen von kardialer Hypertrophie und Herzinsuffizienz negativ beeinflusst und geht mit einer verstärkten kardialen Fibrose einher [145, 146]. Im Mittelpunkt steht hierbei das Phänomen der „NOS-Entkoppelung“. Unter oxidativem Stress sowie Mangel der Kofaktoren wird NOS in ein inaktives Monomer umgewandelt [147] und der Elektronentransfer entkoppelt. Es resultiert eine erhöhte Menge an destruktiven Superoxiden, die in Verbindung mit NO zu Peroxynitrit weiterreagieren und dadurch die NO-Konzentration reduzieren [148]. Dadurch wird der oxidative Stress im Endothel

weiter gefördert, der den Blutgefäßen weiter schadet. Aufgrund dieser Doppelfunktion haben Förstermann *et al.* die NOS als ein janusköpfiges Enzym deklariert [149]. Vor diesem Hintergrund ist eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit und verminderte NOS-Entkoppelung anzustreben.

Unter hypoxischen Bedingungen mit niedrigem pH findet die NO-Synthese unabhängig von NOS statt [150-153]. Dies ist unter anderem bei Erkrankungen wie dem Herzinfarkt, pulmonaler Hypertonie sowie beim ischämischen Schlaganfall von Bedeutung. Außerhalb der Zelle wird NO in Verbindung mit Wasser zu Nitrat bzw. mit Sauerstoff zu Nitrit umgewandelt. Nitrit kann von Erythrozyten aufgenommen und durch oxygeniertes Hämoglobin und Myoglobin zu Nitrat oxidiert werden. Entlang eines physiologischen Sauerstoffgradienten kann Nitrit über die Reaktion mit desoxygenierten Hämproteinen (Hämoglobin im Blut sowie Myoglobin im Herzmuskel und Gewäßwänden) zu NO umgewandelt werden [154-159]. Eine Klasse von Molybdän komplexierenden Enzymen, zu denen die Aldehydoxidase (AOX), die Sulfidoxidase (SOX) und die Xanthinoxidase (XOR) zählen, katalysieren gleichfalls die Reduktion von Nitrit und Nitrat zu NO [160]. Vor allem die XOR scheint in diesem Zusammenhang einen entscheidenden Beitrag zur NO-Bioverfügbarkeit, unter hypoxisch-azidotischen Bedingungen, bei pulmonaler Hypertonie, I/R-Schaden und Arteriosklerose zu leisten [161-163]. Der Nitrit-Nitrat-Stoffwechsel dient somit der Stabilisierung der zirkulierenden NO-Menge im Blut und Gewebe, die der verminderten NO-Bioverfügbarkeit bei NOS-Entkoppelung entgegenwirkt. Therapieoptionen, die NO-Bioverfügbarkeit unter hypoxisch-azidotischen erhöhen, sind vorzuziehen. Der Nitrit-Nitrat-Stoffwechsel bietet hierfür interessante Aspekte für zukünftige Forschungen.

1.5.2 Erythrozytäre NO-Synthase

Erythrozyten sind zellorganellfreie Blutzellen mit einem Durchmesser zwischen 6-8 μm und einer Dicke von etwa 2 μm [164]. Sie sind primär als Sauerstofftransporter bekannt und bestehen zu 66 % aus Hämoglobin. Hämoglobin selbst ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, die jeweils eine

1 Einleitung

Hämgruppe tragen. An die Häm-Eisen Gruppe kann, abhängig vom Sauerstoffpartialdruck, Sauerstoff reversibel gebunden werden.

Lange Zeit war die Rolle von Erythrozyten im NO-Metabolismus mehrdeutig. Sie wurden als NO-speichernde, transportierende und abbauende Blutbestandteile, teilweise als „NO-Falle“, betrachtet [165-167]. Endothelial gebildetes NO kann durch Reaktion mit oxygenierten Hämoglobin (HbO₂) respektive durch die Bindung an desoxygenierten Hämoglobin inaktiviert werden. NO reagiert mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin (MetHb) und Nitrat [168, 169]. Ein Teil von NO kann mit dem Eisen der Hämgruppe des Desoxyhämoglobin Nitrosylhämoglobin und durch eine Bindung an das Cystein der β-Hämoglobinkette Nitrosohämoglobin bilden, welche innerhalb der Erythrozyten NO transportieren und die NO-Bioverfügbarkeit regulieren [170-174]. Basierend auf der Hypothese von Jia *et al.* kommt Hämoglobin in zwei verschiedenen Strukturen vor, die R-Form (mit hoher O₂-Affinität) und T-Form (mit niedriger O₂-Affinität) [175]. Ähnlich wie der Sauerstofftransport, binden Erythrozyten in der Lunge NO und geben es in der Peripherie mit vasorelaxierendem Effekt ab [176]. Die R-Form bedingt entsprechend ein Abfangen von NO, während die T-Form eine Abgabe begünstigt [175, 177, 178].

In den letzten Jahren ist eine neue Sichtweise für die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus hinzugekommen. Deliconstatinos *et al.* (1995) beschrieben eine aktive NO-Synthese in Erythrozyten durch eine lokalisierte NOS (eryNOS) [179]. 2006 charakterisierte die Arbeitsgruppe Kleinbongard *et al.* am eNOS-Knock-Out Mausmodell, die eryNOS erstmalig als eNOS-ähnliches Protein, dass in der Plasmamembran lokalisiert ist und eine ähnliche Aktivität aufweist (eryNOS: 0,3 pmol/pg/min vs. eNOS: 0,7 pmol/pg/min) [180]. Die eryNOS gehört zu den konstitutiven NOS-Isoformen. Sie wird durch erhöhte Ca²⁺-Spiegel sowie Phosphorylierung an Serin 177 stimuliert und kann durch den NOS-Inhibitor L-NG-monomethyl Arginin Ziträt (L-NMMA) gehemmt werden [180-184]. Gleichfalls werden die Kofaktoren für die Katalyse von NO benötigt [179]. Ferner scheint die eryNOS aufgrund fehlender Zellorganellen wie Nukleus, Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum, im Vergleich zur eNOS, unabhängig von einigen Regulationsmechanismen zu sein [185]. Die eryNOS hat einen erhöhten L-Arginin Transport durch eine verstärkte Expression des *cationic amino acid*

1 Einleitung

transporter (CAT1)-Transporters [186]. L-Arginin ist nicht nur für die NO-Bioverfügbarkeit essentiell, es spielt auch eine entscheidende Rolle in der Hämatopoese. L-Arginin steuert die Proliferation und Differenzierung von roten Blutkörperchen [187]. Acetylcholin ist ein bekannter eNOS Aktivator auf Endothelzellen [188]. Der Acetylcholinrezeptor wurde im Blut auf Lymphozyten und Erythrozyten nachgewiesen [189, 190]. Acetylcholin behandelte Erythrozyten zeigten eine verminderte Akkumulierung sowie verstärkte Verformung und Nitrat/Nitrit Konzentrationen [191, 192].

Die eryNOS stellt einen bedeutenden Anteil an der basalen, vaskulären NO-Bioverfügbarkeit dar. Sie spielt eine wesentliche Rolle in der Perfusion der Mikrozirkulation. Zum mikrozirkulatorischen Gefäßsystem zählen Gefäße mit einem Durchmesser unter 150 µm [193]. Arteriolen sind mit 4-10 µm deutlich kleiner als der Standarddurchmesser von Erythrozyten mit etwas 7,5 µm [194]. Für die Durchblutung im Bereich der Mikrozirkulation sind Erythrozytenaggregation und Verformbarkeit essentiell [195, 196]. Unter Aggregation versteht man das Anlagern der Erythrozyten zu „Geldrollen“, die eine axiale Zellströmung im mikrozirkulatorischen Gefäßen gewährleistet [195]. Nichtsdestotrotz ist eine erhöhte Aggregationsneigung bei einer Vielzahl von Krankheiten, wie Diabetes mellitus, koronare Herzkrankheit (KHK), Dyslipidämie und Sichelzellanämie nachgewiesen worden [197, 198]. Die Verformbarkeit beschreibt die Fähigkeit der Elongation in der longitudinalen Achse von Erythrozyten [199]. Durch Spektrinverknüpfungen auf der Innenseite der erythrozytären Phospholipid-Doppelschicht können Erythrozyten bis zu 250 % ihrer Ursprungslänge gedehnt werden [200]. Es konnte bereits *in vitro* und *in vivo* eine erhöhte NO-abhängige Verformbarkeit nachgewiesen werden [201-204]. Ferner konnten Grau *et al.* *ex vivo* eine NO-abhängige verstärkte S-Nitrosylierung der Spektrinverknüpfungen nachweisen, die für die für eine erhöhte Plastizität verantwortlich war [205].

Zusammenfassend vermindert NO die Aggregationsneigung der Erythrozyten und verbessert die Membranfluidität sowie die Verformbarkeit [106, 206]. Angesichts dessen stellt durch die eryNOS produzierte NO eine herausragende Rolle in der Regulation der mikrozirkulatorischen NO-Bioverfügbarkeit und der damit verbundenen Kardio- und Vasoprotektion dar.

1.6 Haemodynamische Effekte von NO

Stickstoffmonoxid hat viele vasoprotektive Eigenschaften. Zu ihnen zählt unter anderem die katecholaminrefraktäre, calciumabhängige Vasorelaxation durch Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (*smooth muscle cells*) [207, 208]. Dies geschieht im Wesentlichen durch zwei Prozesse. NO induziert die lösliche Guanylatcylcase, die wiederum die intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht [209]. cGMP aktiviert die Proteinkinase-G (PKG), die zu einer Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und infolgedessen zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt [210-212]. NO führt auch zu einer Aktivierung von vaskulären Kaliumkanälen. Es kommt in Folge des vermehrten Kaliumausstromes zu einer Hyperpolarisation der Gefäßzelle, die zum Schluss von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen führt [213]. Neben den vasodilatativen Effekten von NO konnte *in vitro* ein p21 abhängiger, reversibler Wachstumsstopp der glatten Gefäßmuskulatur beobachtet werden [214-217]. Eine geringere Migration von glatten Muskelzellen geht mit weniger Arteriosklerose und neointimale Hyperplasie einher [218]. Gleichzeitig fördert NO die Angiogenese indem es das Wachstum von Endothelzellen verstärkt [219, 220].

Ein weiterer vasoprotektiver Effekt von NO ist der Einfluss auf die Hämostase. Erhöhte NO-Spiegel gehen mit verringerter Thrombozyten Adhäsion am dysfunktionalen Endothel einher [221, 222]. Es ist ein potenter Plättchenaggregationshemmer, der mit einer signifikanten Reduktion von Thrombose innerhalb des Gefäßlumens einhergeht [223, 224]. Neben den antithrombotischen Eigenschaften besitzt NO antiinflammatorische Attribute, die für Vaso- und Kardioprotektion von großer Bedeutung sind. Stickstoffmonoxid hemmt die Leukozytenmigration- und adhäsion sowie die anschließende inflammatorische Antwort am dysfunktionalen Gefäßendothel durch Erhöhung von P- und E-Selektine und Reduktion von VCAM-1 und ICAM-1 [225-227].

1.7 Einfluss von NO auf I/R-Schaden und linksventrikuläres *Remodeling*

Stickstoffmonoxid spielt eine essentielle Rolle in der Kardioprotektion nach Ischämie/ Reperfusion und linksventrikulären *Remodeling* [228]. NO-Gabe während Ischämieinduktion ist mit einem verringerten myokardialen Reperfusionsschaden assoziiert [229]. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass NO kardioprotektiv ist. Im Folgenden wird auf einige protektive Modifikationen durch NO eingegangen. NO fungiert während Ischämie/Reperfusion als Antioxidanz. Es fängt freie Radikale ab und vermindert die Produktion von ROS durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette [230-232]. Eine gesteigerte ROS Bildung induziert die Bildung von Peroxynitrit und hat negativen Einfluss auf das *Remodeling* durch Induktion von MMPs [233]. Eines der zentralen kardioprotektiven Ziele bei I/R Schaden mit linksventrikulären *Remodeling* ist die Verringerung der inflammatorischen Reaktion auf den I/R Schaden, um schädliche Einflüsse von Myozyten, Apoptose/ Nekrose und der Leukozyteninfiltration zu vermindern. Neben der Hemmung der Neutrophilen Infiltration sind eine Vielzahl von weiteren antiinflammatorischen Eigenschaften von NO bekannt, die den Reperfusionsschaden und das linksventrikuläre *Remodeling* nach I/R vermindern. Zu denen zählt der antizytokine, antiapoptotische, antichemokine und antiadhäsive Einfluss von NO der folgend genauer betrachtet wird. Die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α ist unter NO-Gabe verringert [234-236]. TNF- α induziert das Ansammeln von Neutrophilen und Makrophagen sowie die Produktion weiterer Zytokine [234, 237]. IL-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin welches schädliche Auswirkungen auf den I/R Schaden hat [238]. Ein weiterer antichemokiner Einfluss ist die Hemmung der Makrophagen Inflammation Proteine MIP-1 und MIP-2, die Neutrophile anlocken [237, 239]. Inflammationsreduzierender Effekt von NO ist die Inhibition von Zelladhäsionsmolekülen (CAMs), wie *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1* (E-selectin) und *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) sowie von P-Selektin [27, 240-242]. Zelladhäsionsmoleküle werden durch Zytokine und Chemokine aktiviert und sind für das Leukozyten-Rolling und Verknüpfung am Endothel essentiell. Auf molekulargenetischer Ebene wurden diverse protektive Effekte von NO

nachgewiesen. Es moduliert durch Nitrosylation die mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAPKs), die als Bindeglied zwischen Umwelteinfluss und Zellantwort fungieren [243]. Sie sind verantwortlich für die Genexpression und Proteinproduktion, welche die Proliferation, Zelldifferenzierung, Überleben und Untergang der Zelle bestimmen [244]. Es wird vermutet, dass MAPKs die Inflammation verstärken und eine Hemmung der MAPKs den Reperfusionsschaden verringern könnte [245]. Neben den MAPKs inhibiert NO die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1, welche eine entscheidende Rolle beim I/R Schaden spielen [246-249]. NF- κ B wird durch Zytokine aktiviert und reguliert Gene, die für Inflammation, Apoptose und Zelladhäsion wichtig sind, beispielsweise iNOS, TNF- α und IL-1 [245, 250-252]. NO hemmt NF- κ B durch die Induktion des Gegenspielers I κ B- α [249]. AP-1 wird gleichfalls durch Zytokine aktiviert und induziert Apoptose [253]. NO kann, abhängig von der Konzentration, pro- oder antiapoptotisch wirken. Geringe NO-Konzentration scheinen die Expression vom Apoptose induzierbaren Gen p53 und Caspase zu vermindern und das Apoptose protektive Hitze-Schock-Protein 70 (HSP70) zu erhöhen [254-258]. Dagegen führen hohe Konzentrationen von NO zu Apoptose und Nekrose der Zellen [259]. NO hat des Weiteren positiven Einfluss auf das linksventrikuläre *Remodeling*. Die Expression von MMP-9 wird durch posttranskriptionale Mechanismen kontrolliert zu denen der mRNA Stabilisierungsfaktor HuR zählt. Akool *et al.* konnten nachweisen, dass NO die Expression von HuR vermindert und damit weniger MMP-9 gebildet wird [260]. Eine Zusammenfassung der Einflüsse von NO auf den I/R Schaden und das linksventrikuläre *Remodeling* ist in Abb. 2 dargestellt.

Eine Modulation der NO-Bioverfügbarkeit stellt aussichtsreiche Therapieoptionen dar, um die kardioprotektiven Effekte von NO bei Patienten mit Myokardinfarkt und linksventrikulären *Remodeling* mit Herzinsuffizienz effektiv einsetzen zu können. Der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die NO-Synthese durch die eryNOS ist eine viel versprechende Möglichkeit, um den Einfluss von NO therapiewirksamer anwenden zu können und das *Outcome* von Patienten nach ischämischem Myokardinfarkt und mit Herzinsuffizienz potentiell zu verbessern.

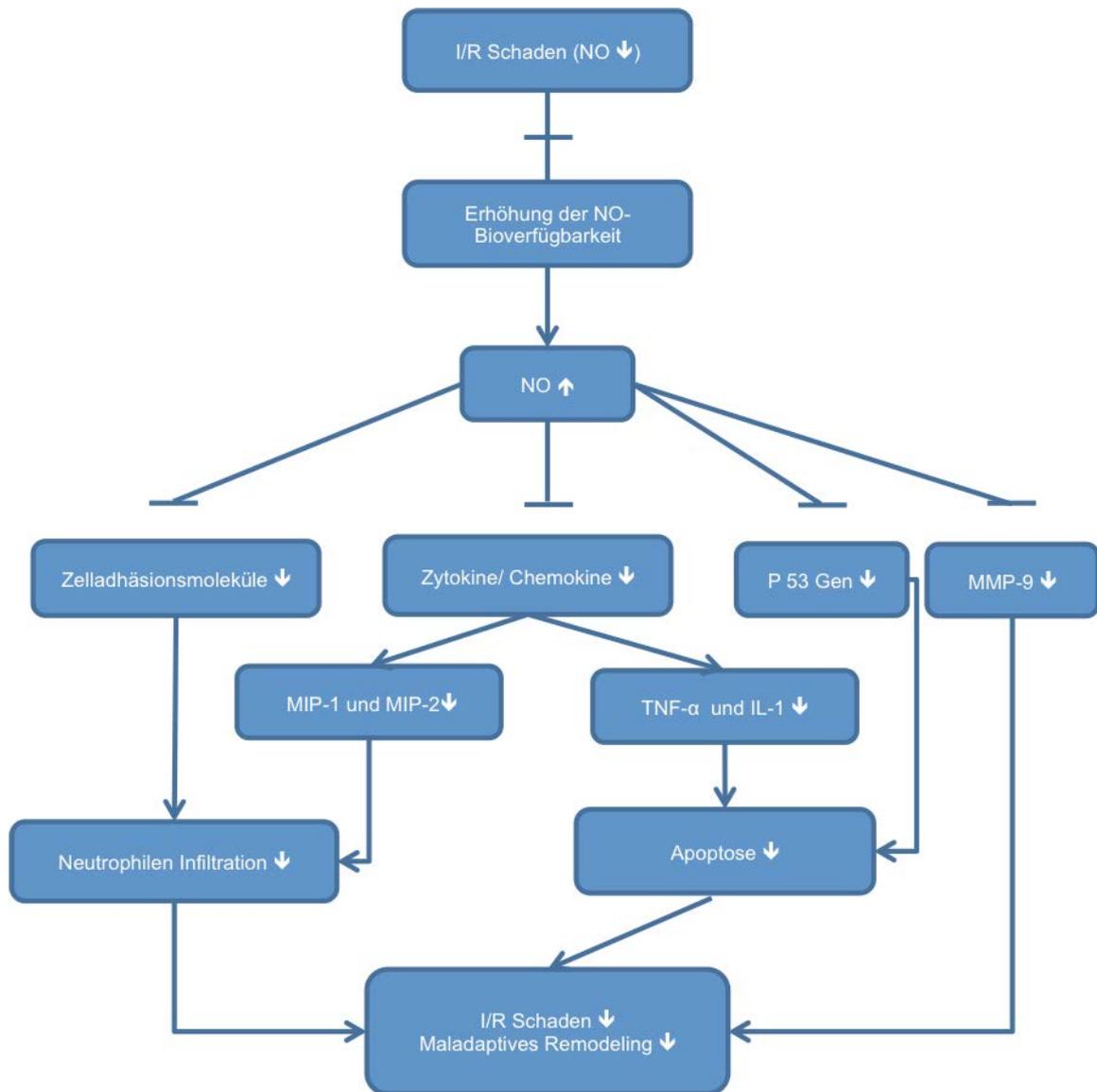


Abb. 2: Einflüsse von NO auf I/R Schaden und linksventrikuläres *Remodeling*. Modifiziert nach [261]. Eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit geht mit einer verminderten Expression/ Produktion von Zelladhäsionsmolekülen, Zytokinen/Chemokinen, MMP-9 und p53 Gene einher. Es resultiert eine abgeschwächte Entzündungsreaktion mit verringerter neutrophiler Infiltration und Apoptoserate, welche einen wesentlichen Anteil am I/R Schaden und maladaptiven *Remodeling* ausmachen. Zusammenfassend ist eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit mit verringerten I/R Schaden und maladaptiven *Remodeling* assoziiert.

2 Ziele der Arbeit

NO ist relevant für Kardio- und Vasoprotektion nach akutem Myokardinfarkt. Es hat positiven Einfluss auf den Ischämie/ Reperfusionsschaden und den darauf folgenden konsekutiven linksventrikulären Remodelingprozess. NO wird abgesehen von den drei Hauptisoformen eNOS, iNOS und nNOS auch von der eryNOS synthetisiert. Ziel dieser Arbeit ist es, die Relevanz der erythrozytären NOS im Vergleich zur endothelialen NOS auf das chronische *Remodeling* nach Ischämie Reperfusion im murinen I/R-Modell zu analysieren.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Wie wirkt sich eine Deletion der erythrozytären NOS auf lokale myokardiale Veränderungen im Rahmen des chronischen I/R Schadens aus? Welchen Einfluss hat erythrozytär synthetisiertes NO auf die linksventrikuläre Pumpfunktion, Infarktgröße und Qualität des *Remodeling*?
- 2) Wie wirkt sich eine Deletion der erythrozytären NOS auf systemische Veränderungen im Rahmen des chronischen I/R Schadens aus? Welchen Einfluss hat erythrozytär synthetisiertes NO auf den arteriellen Blutdruck, das Differentialblutbild und die Erythrozytenverformbarkeit?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Mäuse der Zuchtreihe eNOS^{-/-} (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase) (C57BL/6.129/Ola-eNOStm) [126] und Wildtyp-Mäuse der Reihe C57BL/6 verwendet. Der Tierversuchsantrag lief unter dem Aktenzeichen 9.93.2.10.35.07.312 mit T/O Nummer O47/90 bzw. O24/11, Projektname: „Die Rolle der erythrozytären NO-Synthase für die vaskuläre Homöostase“.

Im Gegensatz zu den Wildtypen besitzen eNOS^{-/-}-Mäuse keine endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 22-30 g, das Mindestalter lag zum Transplantationsbeginn bei acht Wochen. Unterbringung und Pflege sowie Räumlichkeiten und Personal wurden von der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die medizinische Versorgung erfolgte durch den Versuchsleiter mit Unterstützung von Veterinärmedizinerinnen des Instituts für Versuchstierkunde. Die Versuchstiere wurden in Gruppen in vorgeschriebenen Käfigen (Typ3) auf Holzgranulat untergebracht. Die Raumtemperatur wurde konstant bei 19-21°C bei einer durchschnittlichen Luftfeuchtigkeit von 50-60 % gehalten. Es bestand ein zwölf Stunden Tag/Nacht-Zyklus mit jeweils einer halbstündigen bis einstündigen Dämmerungsphase. Futter und Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*. Die Bestrahlung der Wildtyp- und eNOS^{-/-}-Mäuse wurde im Alter von acht Wochen durchgeführt. 24 Stunden später erfolgte die Knochenmarktransplantation entweder von einer Wildtyp- oder eNOS^{-/-}-Maus. Daraus ergaben sich für dieses Versuchsmodell zwei chimäre Gruppen. Wildtyp-Mäuse, denen Wildtyp-Knochenmark transplantiert wurde (im Folgenden als BC+/EC+ bezeichnet) und Wildtyp-Mäuse die eNOS^{-/-} Knochenmark erhalten haben (im Folgenden als BC-/EC+ bezeichnet). Beide Versuchsgruppen inklusive Charakteristika sind in Tabelle 1 und Abb. 3 zusammengefasst.

3 Material und Methoden

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chimärgruppen.

Empfänger	Spender	Merkmale der Chimäre	Bezeichnung der Chimäre
Wildtyp C57BL/6	Wildtyp C57BL/6	Endotheliale Zellen (EC) und Blutzellen (BC) besitzen eine eNOS	BC+/EC+
Wildtyp C57BL/6	eNOS ^{-/-} C57BL/6	Endotheliale Zellen (EC) besitzen eine eNOS; Blutzellen (BC) besitzen keine eNOS	BC-/EC+

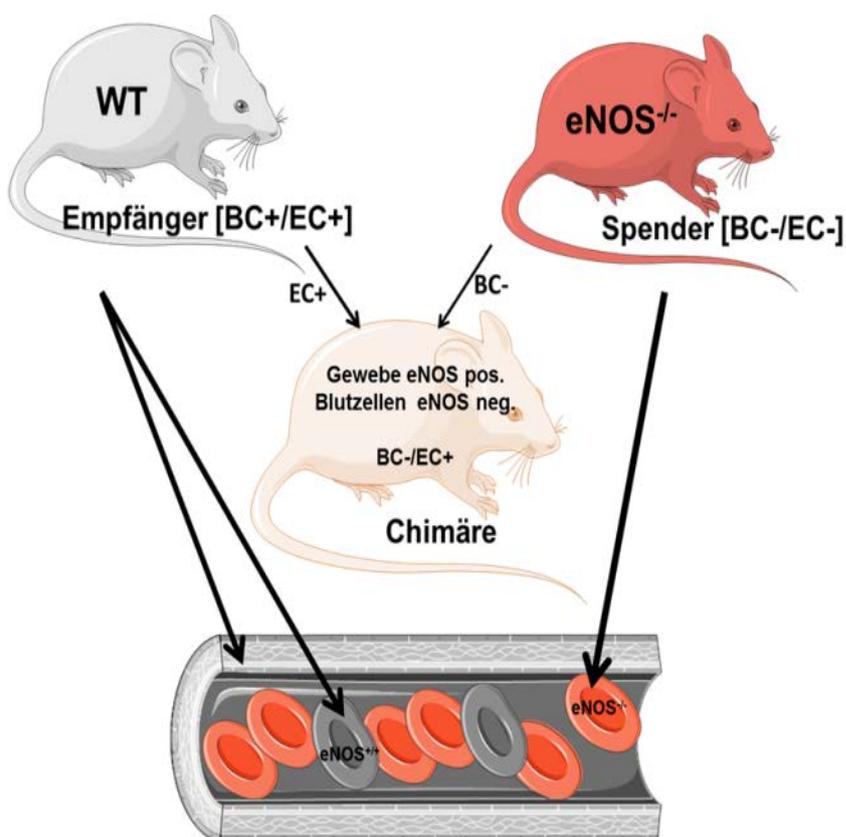


Abb. 3: Endothel- und Blutzellen der Chimäre BC-/EC+. Die entsprechende Kontrollgruppe BC+/EC+ zeigte keinen genetischen Unterschied zum Wildtyp.

3.2 Narkotika und Analgesie

3.2.1 Injektionsanästhetika S-Ketamin und Xylazin

Esketaminhydrochlorid (Ketanest S, Parke-Davis, Pfizer; 45 µg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2 % Bayer; 10 µg/kg KG) sind beides Anästhetika, Analgetika und Muskelrelaxantien im Tiermodell [262]. Beide Anästhetika wurden intraperitoneal bei der Voroperation und Ischämie-Induktion appliziert. S-Ketamin besitzt einen komplexen Wirkmechanismus an verschiedenen Rezeptoren. Es ist ein nicht-kompetitiver Antagonist am NMDA-Rezeptor, einem Subtyp des Glutamatrezeptors. Des Weiteren wirkt es agonisierend auf Opiatrezeptoren. Außerdem wird Ketamin ein systemischer Einfluss auf die cholinerge und monoaminerge Übertragung zugesprochen. Ketamin führt zu einer „dissoziativen Anästhesie“ die sich als katalepsie-ähnlicher Zustand mit Bewusstseinsverlust, Analgesie, Atemdepression und Amnesie darstellt. Durch die Hemmung der peripheren Wiederaufnahme von Katecholaminen, wirkt Ketamin, als einziges intravenöses Anästhetikum, stimulierend auf das kardiovaskuläre System. Es steigert die Herzfrequenz und den Blutdruck um 20-30% [263].

Xylazinhydrochlorid wird häufig in Kombination mit Esketaminhydrochlorid in der Tiermedizin benutzt. Als α_2 - Agonist hat es eine sedative, analgesierende und muskelrelaxierende Wirkung. Durch die Kombination wird eine verbesserte Muskelrelaxation mit verlängerter Analgesie erreicht, wobei die α_2 - agonisierende Wirkkomponente von Xylazin zu negativ chronotropen und inotropen Effekten führt [264]. S-Ketamin in Kombination mit Xylazin führt nur zu einer leichten Atemdepression. Daher ist eine Intubation und Beatmung der Versuchstiere nicht zwingend notwendig [262].

3.2.2 Inhalationsanästhetikum Isofluran

Isofluran ist ein klares, farbloses, weder brennbar noch explosives Inhalationsanästhetikum. Neben der ausgeprägt analgesierenden Wirkung verursacht Isofluran, durch Vagusstimulation, negative chronotrope und inotrope Effekte am Herzen sowie Atemdepression [263]. Zur Untersuchung von kardialen Funktionsparametern mittels Echokardiografie im Tiermodell, hat sich Isofluran als besser geeignetes Anästhetikum gegenüber Urethan, Ketamin-Xylazin oder Pentobarbital-Natrium durchgesetzt. Dieses Inhalationsanästhetikum führt nur zu schwachen Veränderungen in der Hämodynamik [265] und im Gegensatz zu Ketamin-Xylazin zu einer geringer ausgeprägten Kardiodepression [266].

3.2.3 Postoperative Analgesierung mittels Buprenorphin

Die Versuchstiere wurden postoperativ mit Buprenorphin analgesiert (0,05-0,1 mg/kg, s.c.). Das stark und lang wirksame Analgetikum wirkt über eine hohe Bindungsaffinität an verschiedenen Opiatrezeptoren im zentralen Nervensystem [267].

3.3 Herstellung der Mäuse-Chimären

3.3.1 Bestrahlung

Versuchstiere, die eine Knochenmarkspende erhielten, wurden 24 Stunden vorher hyperfraktioniert bestrahlt. Dadurch wurde das Knochenmark des Empfängers zerstört und somit konnte gewährleistet werden, dass die Blutzellproduktion auf dem Spenderknochenmark basierte. Dazu wurden jeweils bis zu zehn Mäuse in einen Plastikkäfig mit den Abmessungen Breite 23 cm x Höhe 4 cm x Tiefe 21 cm gesetzt. Diese Käfige waren noch in einzelne Kammern mit der Größe 3 x 10 cm unterteilt, sodass eine gleichmäßige Dosierung sichergestellt werden konnte. Die Feldgröße betrug 32 x 32 cm². Der Käfig wurde mittig in einem Abstand von 80 cm zum Isozentrum gestellt. Oberhalb und unterhalb des Käfigs wurde eine 1 cm

3 Material und Methoden

dicke Styrodurplatte gelegt. Die Dosisberechnung wurde mit der effektiven Fläche („Mauskörper“) mit 2,5 x 4,0 cm und einer Dosierungstiefe von 3,0 cm kalkuliert. Die Versuchstiere wurden nach einem Intervall von 4 Stunden zweimal mit 3,25 Gy behandelt, sodass sich daraus eine Gesamtbestrahlung von 6,5 Gy ergab. Zuerst wurden die Tiere anterior zu posterior mit 3,25 Gy (Gantry 0°) und anschließend posterior zu anterior mit 3,25 Gy (Gantry 180°) behandelt (siehe Abb. 4). Um die Versuchstiere vor einer Infektion zu schützen, bekamen die Mäuse nach der ersten Bestrahlung mit 24 % Borgal (1 ml/l; Sulfadoxinum 200 mg, Trimethoprimum 40 mg) versetztes Wasser *ad libitum*. Diese Antibiotikagabe wurde drei Wochen nach Knochenmarktransplantation eingestellt. Um eine Beeinflussung der nachfolgenden Versuche durch Antibiotikagabe auszuschließen, wurde den Tieren zusätzlich eine weitere Rekonvaleszenzzeit von drei Wochen eingeräumt (Gesamtrekonvaleszenzzeit sechs Wochen) (siehe Abb. 4).

3.3.2 Aufbereitung des Spenderknochenmarks

Die Knochenmarkstransplantation erfolgte 24 Stunden nach der Bestrahlung der Empfängermäuse (siehe Abb. 4). Pro zehn Empfängertiere wurde das Knochenmark einer Spendermaus genutzt. Dazu wurde das Spendertier mit Ketamin (100 mg/kg BW) und Xylazin (10 mg/kg BW) anästhesiert und bei ausreichender Narkosetiefe, die durch Kneifen in Schwanzwurzel („*tail pitch*“) und Pfoten überprüft worden ist, auf dem Operationstisch mit Klebstreifen fixiert. Die Instrumente sowie das Abdomen und die Hinterläufe wurden mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Das Knochenmark musste aus Tibia und Femur isoliert und gereinigt werden. Der Eingriff begann mit der Entfernung der Haut an den Beinen und Abdomen. Die Ober- und Unterschenkelknochen mussten anschließend gewebefrei präpariert und von den Gelenken abgetrennt werden. Es folgte die Spülung der Knochen mittels einer mit 20 ml PBS gefüllten Spritze, welche zusätzlich mit einem 0,22 µm Sterifilter (Millipor) und einer 27G Nadel versehen war. Das aus den Knochen gelöste PBS/Zell-Gemisch, wurde in einem 50 ml Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt. Die nachfolgenden Aufbereitungsschritte erfolgten an einer Sterilbank. Um das PBS/Zell-Gemisch von Verunreinigungen zu

3 Material und Methoden

befreien, wurde es gründlich resuspendiert, und danach über ein 40 µm Filtersieb (BD) gegeben. Danach wurde es für zehn Minuten bei 300 xg (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml PBS zu Zellzahlbestimmung weiterverwendet. Daraus wurde ein Aliquot (20 µl) zur Zellzahlbestimmung entnommen und die restliche Zellsuspension erneut zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit 1 ml PBS gemischt und zu 100 µl aliquotiert. Ziel der Aufbereitung des Spenderknochenmarks war eine Zellzahl von 10 Mio./100µl pro Empfängertier. Ein Wert von weniger als 2 Mio./100 µl Zellen pro Empfängertier hätte keine erfolgreiche Transplantation gewährleisten können.

3.3.3 Knochenmarkstransplantation

100 µl der gereinigten Knochenmarkszellen wurden jeder Empfängermaus mittels intrakardialer Injektion verabreicht. Die Maus wurde zunächst mit Isofluran tief narkotisiert. Nach Kontrolle einer suffizienten Narkose erfolgte die luftblasenfreie Applikation der Zellsuspension mit Hilfe einer Omnican F30G Kanüle (Braun). Eine erfolgreiche intrakardiale Punktion ist mittels Aspiration einer geringen Menge Blut vor und nach Applikation überprüft worden.

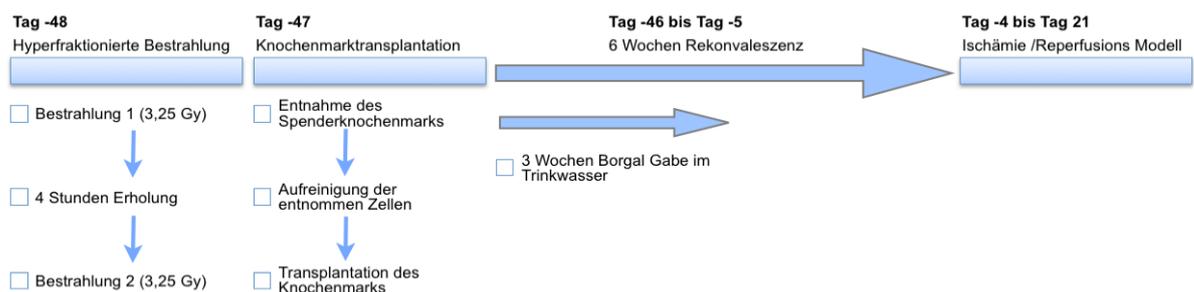


Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Knochenmarkstransplantation und anschließender Rekonvaleszenz Phase von sechs Wochen. Es folgte das unter 2.5 beschriebene Ischämie/Reperfusion-Modell

3.4 Übersicht des Versuchsablaufs

Die Versuchstage der BC+/EC+ und BC-/EC+ Kerngruppen waren Tag-5, Tag-4, Tag-3, Tag 0 (Ischämie Induktion), Tag 1, Tag 4, Tag 7, Tag 14 und Tag 21 (siehe Abb. 5). In jeder Versuchsreihe wurden die Mäuse fünf Tage vor der Ischämie-Induktion mittels Echokardiografie (siehe 3.6) untersucht und Basalwerte (Baselinewerte) erhoben. Eine nicht ausreichende linksventrikuläre (LV) Funktion führte direkt zum Ausschluss des Versuchstiers. Am Tag-4 folgte die Voroperation des Ischämie-/ Reperusionsmodells mit der Anlage der Ligatur (siehe 3.5.1). Um eine durch die Voroperation ausgelöste Ischämie beziehungsweise veränderte LV-Funktion auszuschließen, wurden die Mäuse 24 h nach dem Eingriff (Tag-3) erneut echokardiografiert und bei schlechter LV-Funktion ausgeschlossen. Nach drei Tagen Rekonvaleszenz war die 60-minütige Ischämie (Tag 0) durch Zuziehen der LAD, unter EKG-Kontrolle durchgeführt worden (siehe 3.5.2). Im Anschluss erfolgte die echokardiografische Charakterisierung des *Remodelings* nach 24 h, 4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen post Ischämie. Nach drei Wochen wurden bei den Mäusen die hämodynamischen Parameter in der rechten *Arteria carotis communis* und im linken Ventrikel mit Hilfe eines Druck-Volumenkatheter (Firma Millar) aufgezeichnet (siehe 3.7). Im Fokus standen das Protokollieren des mittleren arteriellen Blutdrucks, sowie der linksventrikulären Druckwerte als Baseline und nach Noradrenalin Gabe. Dazu wurde der Druck-Volumenkatheter über die rechte *arteria carotis communis* in den linken Ventrikel des Herzens vorgeschoben (siehe 3.8). Zum Ende des Versuchs wurden Blut, sowie die Mausherzen entnommen und für hämorheologische bzw. histologische, sowie immunhistologische Untersuchungen weiterverwendet (siehe 3.9; 3.10; 3.11).

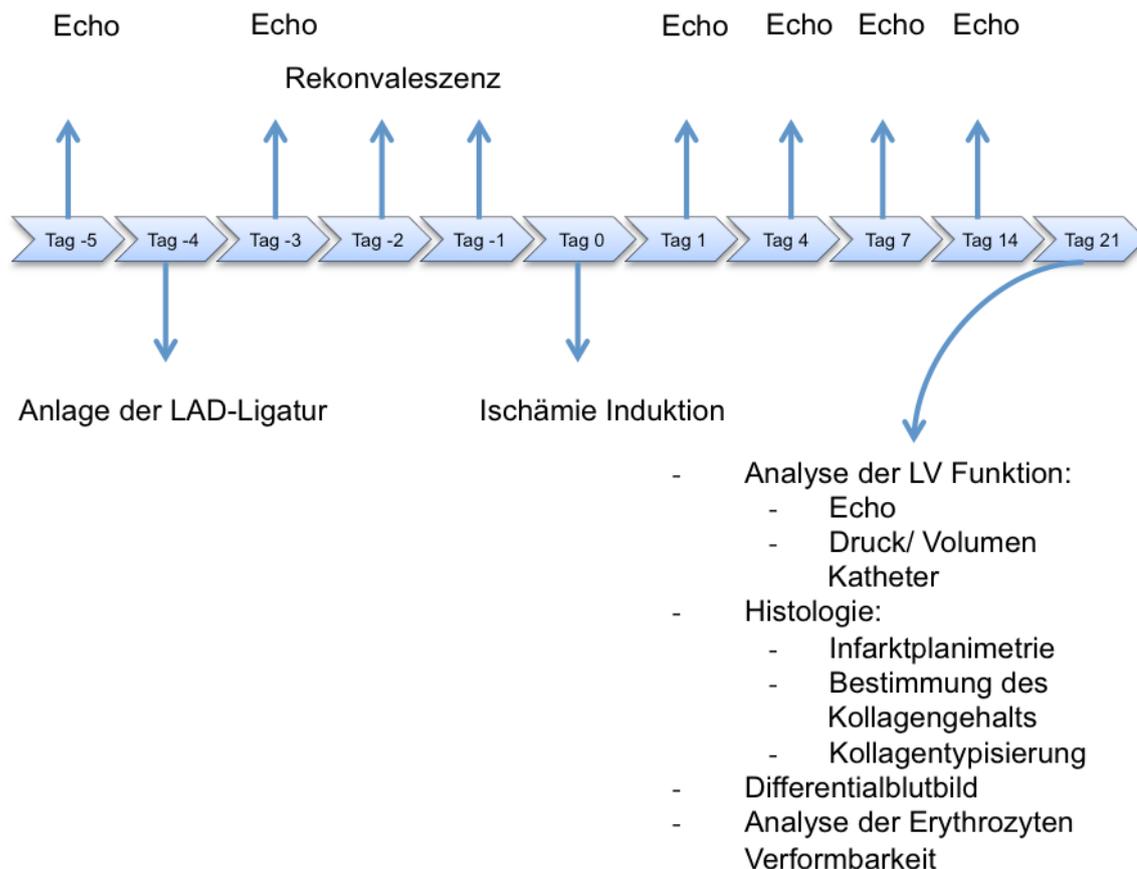


Abb. 5: Übersicht des Versuchsablaufs

3.5 Das Ischämie/ Reperusionsmodell: Das *Closed Chest* Modell

3.5.1 Voroperation (Anlage der Ligatur bei geöffneten Thorax)

3.5.1.1 Versuchsaufbau

Obligatorisch vor jedem invasiven Eingriff war eine gewichtsadaptierte Anästhesie. Die Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin (100 mg/kg BW) und Xylazin (10 mg/kg BW) anästhesiert. Die Effektivität der Anästhesie wurde durch Kneifen in die Schwanzwurzel („tail pitch“) und in die Pfoten überprüft. Waren die Schmerzreflexe erfolgreich ausgeschaltet, folgte die Rasur der linken Thoraxhälfte und die Intubation der Mäuse mittels einer peripheren Venenverweilkanüle (20G; BBraun). Um Verletzungen der Trachea zu vermeiden wurde ein gekürzter und abgerundeter Mandrin verwendet. Der Kopf der anästhesierten Maus wurde in einer vorgefertigten Intubationsvorrichtung (UNO

3 Material und Methoden

BV) rekliniert. Mittels einer Kaltlichtquelle (KL1500LCD; Leica), welche von außen auf Höhe der Epiglottis lokalisiert war, wurde die Zunge mit einer Pinzette beiseitegeschoben und tracheal intubiert. Die Kontrolle der korrekten Lage des Tubus erfolgte durch sanfte Ausschläge des Volumeters an der angeschlossenen Beatmungsmaschine. Danach wurde die Maus auf einem magnetischen Operationstisch an ihren Extremitäten mit Klebestreifen fixiert. Die Schnauze ragte in eine Verneblungsmaschine, wodurch die Narkose durch eine Mischung aus Raumluft, Sauerstoff (1/3 100 %iger Sauerstoff und 2/3 Raumluft) und 2 Vol% Isofluran (Forene, Abbott GmbH) aufrechterhalten werden konnte. Das Tidalvolumen betrug 200 µl mit einer Atemfrequenz von 140 Atemzügen/min. Um ein Abkühlen der Maus während des Eingriffs zu verhindern, wurde die Temperatur durch eine elektrische Heizplatte unter dem Operationstisch konstant bei 37°C gehalten. Abschließend zur Operationsvorbereitung folgte die Desinfektion der rasierten, linken Thoraxhälfte mittels Jodlösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma).

3.5.1.2 Thorakotomie

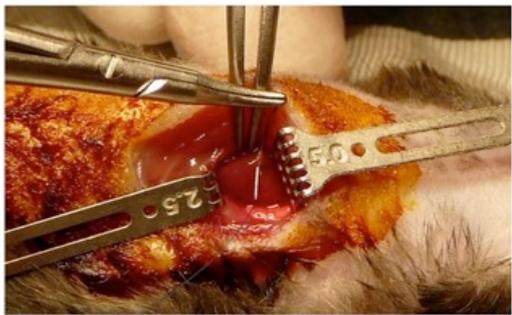
Der circa 1 cm lange Hautschnitt wurde, unter Zuhilfenahme einer chirurgischen Hautschere, im 3. Intercostalraum (ICR) parallel zum Verlauf der Rippen gesetzt. Unter dem Operationsmikroskop (MZ9.5; Leica) begann man mit der Präparation der LAD (*left anterior descending artery, Ramus interventricularis anterior*). Zuerst wurden dafür zwei für Kleintiere angefertigte Rippenretraktoren (Größe 2.5 und 5.0), unter Zug, an beide Schnittländer gesetzt. Die 3. und 4. Rippe waren dadurch besser zu erkennen und der Platz des Operationsgebietes wurde vergrößert. Mit einer Mikroschere erfolgte das vorsichtige Durchtrennen der *Mm. intercostales*, was den Blick auf das Perikard gewährte. Bei diesem Schritt ist darauf zu achten den linken Lungenflügel oder die *Arteria thoracica interna* nicht zu verletzen. Das Mausperikard wurde dann mit der Mikroschere eröffnet, und um die LAD besser darstellen zu können, wurde das schlagende Herz nach links luxiert. Die präparierte LAD wurde mit einem Faden der Stärke 7-0 (Prolene®) unterstoichen. Dazu wurde eine U-förmig gebogene Nadel verwendet, die 1 mm kaudal des linken Herzohrs unterhalb der Bifurkation der LAD und des *ramus*

3 Material und Methoden

diagonalis hindurch gestochen wurde. Danach wurde die Nadel vom Faden abgeschnitten und beide Enden durch einen circa 0,1 cm dicken, in Ethanol gehärteten, Polyethylen-Ring (PE-10) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm, durchgeführt. Es wurde eine Schlaufe um die LAD gelegt, auf der ein PE-10 Bolzen locker auflag. Die korrekte Lage des Fadens konnte durch kurzzeitiges Zuziehen überprüft werden. Ein Erblassen der Herzspitze deutet auf eine korrekte Lage des Ligaturfadens hin. Die Fadenenden wurden anschließend mit einer Kaltnadel (Größe 3) durch die Thoraxwand kanuliert, die Enden verknotet und subkutan in eine Hauttasche versteckt. Hierbei war zu beachten, dass dies ohne Zug auf die Fäden durchgeführt wurde, da ansonsten unfreiwillig eine vorzeitige Ischämie ausgelöst worden wäre. Danach erfolgte das Schließen der Operationswunde. Die dritte und vierte Rippe, sowie die Muskellücke im *musculus pectoralis major* wurden mit Seidenfaden (Ethicon, PERMA-Hand, Seide, 4-0) in Einzelknopfnähten adaptiert. Einem Alveolenkollaps bei der Thoraxeröffnung wurde mit einem *Recruitment*-Manöver von 1–2 Sekunden auf Beatmungsdrücke von 30 mmHg entgegengewirkt. Zum Schluss wurde die OP mit der Hautnaht (Ethicon, PERMA-Hand Seide, 4-0) und einer wiederholten Hautdesinfektion beendet. Während der Hautnaht wurde die Anästhesie langsam ausgeglichen und nach Einsetzen der Spontanatmung bekamen die Versuchstiere 100 % Sauerstoff über Maskenbeatmung. Sobald die Reflexe der Maus wieder vorhanden waren wurde sie zügig extubiert. Zur Kreislaufstabilisierung und um das Aufwachen so stressfrei wie möglich für die Mäuse gestalten zu können, wurden die Versuchstiere abschließend in einen, mit Rotlicht aufgewärmten Käfig, gelegt.

Eine OP dauerte in der Regel zwischen 25-30 Minuten. Fünf Tage wurden die Tiere postoperativ beobachtet. Zur postoperativen Analgesierung wurde alle 6-8 Stunden Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg, s.c.) appliziert. Nachfolgend sind einzelne Schritte der Voroperation in Abb. 6 dargestellt.

3 Material und Methoden



Blick auf den geöffneten Thorax



Unterstechung der LAD (left anterior descending artery) mittels einer Rundnadel



Platzierter Ligaturfaden



Ligaturschleufe



Die zusammen geknoteten Fadenenden werden in eine, zuvor präparierte subkutane Tasche, versteckt. Es folgt das Vernähen der Muskellücke und die Hautnaht

Abb. 6: Anlage der LAD Ligatur

3.5.2 Ischämie Induktion

3.5.2.1 Versuchsaufbau

Die Ischämie-Induktion wurde vier Tage nach Anlage der Ligatur durchgeführt. Hierzu wurden die Versuchstiere einer 60-minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen. Die Narkose der Mäuse wurde in einer Inhalations-Narkosekammer eingeleitet. Diese Kammer wurde im Anschluss mit Sauerstoff angereicherter Raumluft (1/3 100%iger Sauerstoff und 2/3 Raumluft) geflutet. Bei tiefer Narkose wurden die Tiere auf einem beheizten (37°C) und magnetischen Operationstisch in Rückenlage an ihren Extremitäten mit Klebeband fixiert und über eine Beatmungsmaske mit einem Gemisch aus 2,0 Vol% Isofluran, Sauerstoff und Raumluft (1/3 100%iger Sauerstoff und 2/3 Raumluft) ventiliert worden. Zur Schmerzstillung wurde den Tieren mit Isofluraneinleitung Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg, s.c.) intraoperativ appliziert, damit eine Schmerzfreiheit während der Isofluran-Narkose und nach Abfluten der Narkose sichergestellt war. Zum Monitoring der Narkose als auch der Ischämie ist zusätzlich ein 3-Kanal-EKG (ECG, Hugo Sachs Apparatus) an den Extremitäten abgeleitet worden (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Versuchsaufbau Ischämie-Induktion [268]. Linke Seite: Skizze, rechte Seite: Fotografie

3.5.2.2 Versuchsdurchführung

Auf Höhe der Hautnaht wurde die Haut mittels Jodlösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma) desinfiziert. Die Naht wurde unter Zuhilfenahme einer Mikroschere eröffnet und die in der Hauttasche eingenähten Fadenenden vorsichtig entfaltet. Bei geschlossener Thoraxhöhle und unter EKG-Kontrolle folgte die Fixierung der beiden Fadenenden an zwei Magnetstempeln, jeweils links und rechts von der

Maus. Durch langsames, entgegengesetztes Drehen an den Stempeln wurde das Herz an die Thoraxwand gehoben und die intrathorakale Ligaturschleife zog sich

zusammen. Das führte zu einer Komprimierung der LAD, die sich im EKG durch eine sofortige ST-Streckenerhebung zeigte (siehe Abb. 8). Diese EKG-Veränderung war die Erfolgskontrolle des Versuchs [268] und es folgte eine Aufrechterhaltung der Ischämie über 60 Minuten. Nach einer Stunde wurde die Ischämie durch Durchschneiden der Fäden beendet. Dies war an abnehmende ST-Streckenerhebungen

zu erkennen. Die Haut wurde abschließend mit (5/0) Prolene (Ethicon) verschlossen. In der Aufwachphase wurden die Tiere mit

100 % Sauerstoff beatmet und bei Wiedererlangen des Bewusstseins, in einen mit Rotlicht, aufgewärmten Käfig gelegt.

Die postoperative Beobachtung der Versuchstiere erfolgte über 24 Stunden in denen alle 6-8 Stunden Buprenorphin (0,05,0,1 mg/kg, s.c.) verabreicht wurde. Während der 3-wöchigen Reperfusionphase folgten echokardiografische Kontrollen (3.6). Nach Ablauf der 3 Wochen wurden Blutdruckmessungen mittels

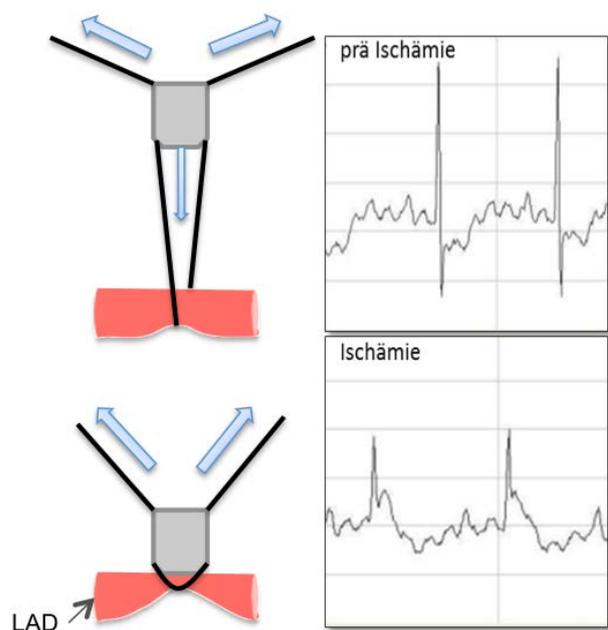


Abb. 8: Ischämie Induktion

Linke Seite: Grafische Darstellung der Ischämie Induktion bei geschlossenem Thorax. Rechte Seite: Darstellung eines abgeleiteten EKGs vor und nach Induktion der Ischämie. Eine ausreichende Komprimierung der LAD zeigte sich in ST-Streckenerhebungen im EKG.

3 Material und Methoden

einem 1.4 F Millar Druck-Volumen-Katheter (SPR-839, Millar Instrument, Houston, Texas) (siehe 3.7; 3.8) und im Anschluss wurden hämorheologische bzw. histologische sowie immunhistologische Untersuchungen durchgeführt (siehe 3.9; 3.10; 3.11).

Als Kontrollgruppe wurden Sham-Tiere operiert. Die Mäuse hatten dieselbe Voroperation, nur wurde bei Ihnen keine Ischämie ausgelöst. Die Fäden lagen bei der 60 minütigen Operation ohne Zug aus der Hauttasche heraus. Es kam weder zu ST-Streckenveränderungen, noch waren ischämietypische Veränderungen in den darauf folgenden Versuchen zu erkennen.

3.5.2.3 Auswertung

Im Fokus standen die ST-Streckenveränderungen, die in Millivolt (mV) von der Nulllinie bis zur Spitze der T-Welle gemessen wurden. Aufgrund der hohen Herzfrequenzen gab es, keine konstanten ST-Strecken. Deshalb wurden die ST-Veränderungen bis zur T-Welle als Annäherung an die ST-Strecke verglichen. Die ST-Streckenerhebung (rote Kreise) mit anschließender Rückbildung in der Reperfusionphase (schwarzer Kreis) ist in nachfolgender Abb. 9 dargestellt.

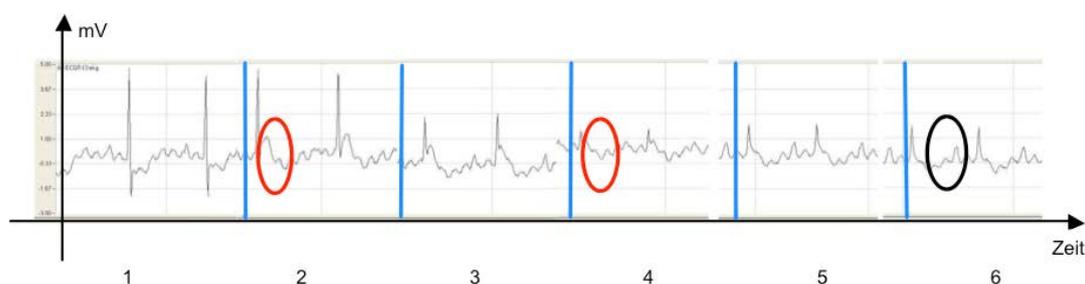


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der EKG-Veränderungen während des Versuchs, (1) Baseline, (2) Ischämiedauer 2 Sekunden, (3) Ischämiedauer 10 Sekunden, (4) Ischämiedauer 53 Minuten, (5) 35 Sekunden Reperfusion, (6) 4:23 Minuten Reperfusion. Rote Kreis: ST-Streckenerhebungen, Schwarzer Kreis: abnehmende ST-Streckenerhebungen

3.6 Echokardiografie

3.6.1 Versuchsaufbau

Die nicht invasive LV-Funktionsanalyse wurde mittels eines hochauflösenden Ultraschallgerätes und eines 18-38 MHz Schallkopfes (MS400, Vevo2100, Visual Sonics Inc.) durchgeführt. Vor der Untersuchung wurden die Mäuse in einer Inhalations-Narkosekammer mit einem Gemisch aus 3 Vol% Isofluran und Sauerstoff sediert. Die Anästhesie wurde während des Versuchs mit einer Mischung aus 1-1,5 Vol% Isofluran und 100 % Sauerstoff über eine Atemmaske aufrechterhalten. Zur sicheren Fixierung der Maus sind die Extremitäten, mit Hilfe von Klebestreifen und Kontaktgel, an die in den Tisch integrierten EKG-Kontakt-Pads befestigt und abschließend, zum Temperaturmonitoring, wurde eine Rektalsonde vorsichtig mit Schmiermittel in die Maus eingeführt. Dadurch konnte die Herzfrequenz, die Temperatur und durch Drucksensoren auf dem Tisch, die Atmung kontinuierlich beobachtet werden. Die durchschnittliche Herzfrequenz betrug 400 bis 550 *beats per minute* (bpm) und die Atemfrequenz belief sich im Schnitt auf 80-120 Atemzügen pro Minute. Die Körpertemperatur wurde mit Hilfe des beheizbaren Untersuchungstisches und dem vorgewärmten Ultraschallgel (Aquasonic 100 Gel, Parker Laboratories, Fairfield, NJ) bei circa 37-37,5°C gehalten. Das Monitoring war für die sichere Aufrechterhaltung der Anästhesie sehr wichtig, da anhand der Vitalzeichen festgestellt werden konnte, wann eine Maus mehr oder weniger Sedierung benötigte. Um schallschattenfreie Bilder gewährleisten zu können, mussten die Mäuse vor Applikation des blasenfreien Schallgels noch auf der Thoraxvorderseite grob rasiert und danach mit Enthaarungsgel (Veet; Reckitt Benckisier) enthaart werden. Eine echokardiografische Untersuchung dauerte in der Regel zwischen 15-30 Minuten pro Tier. Im chronischen Modell wurden die Mäuse präoperativ als Baseline und postoperativ im Verlauf 24 h, 4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen und nach 3 Wochen Reperfusion echokardiografisch verglichen.

3.6.2 Ablauf der echokardiografischen Untersuchung

Bei jeder Ultraschalluntersuchung wurden folgende drei Achsen nacheinander dargestellt: 1. parasternaler Langachsenschnitt, 2. parasternaler Kurzachsenschnitt, 3. suprasternales Fenster.

1. parasternaler Langachsenschnitt

Die echokardiografische Untersuchung begann mit der Darstellung der parasternal, langen Achse. Für die optimale Einstellung wurde der Untersuchungstisch etwas nach links gekippt und der Schallkopf sagittal mit Ausrichtung auf die rechte Schulter mit Schallgel aufgesetzt. In dieser Längsachse wurde zuerst ein Cine-Loop im B-Mode aufgenommen, wobei darauf zu achten war, dass nicht übermäßig Papillarmuskel oder eine verdeckte Herzspitze in der Aufnahme abgebildet wurde (siehe Abb. 10). Danach folgte aus diesem B-Mode, eine M-Mode Cine-Loop Erfassung in Ventrikelmitte der linken Kammer auf Höhe der Papillarmuskeln.

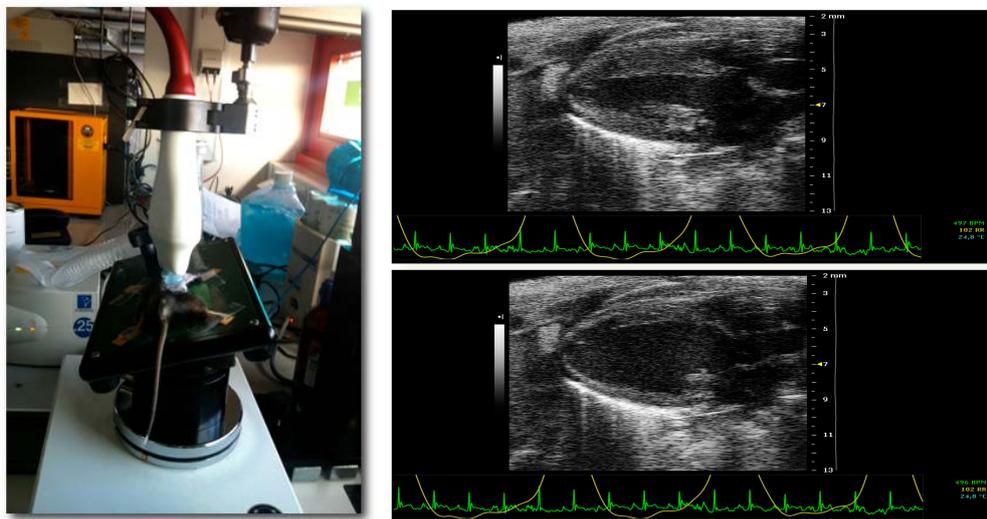


Abb. 10: Tischposition (links) und Aufnahmen (rechts) im parasternalen Langachsenschnitt (rechts oben: Aufnahme in Systole; rechts unten: Aufnahme in Diastole).

2. parasternaler Kurzachsenschnitt

Um die parasternal kurze Achse generieren zu können, wurde aus der parasternal langen Achse, bei fixierten Tisch, der Schallkopf um 90° im Uhrzeigersinn, in Projektion auf die linke Schulter, gedreht. Dargestellt wurde die Transversalebene der Ventrikelmitte der linken Kammer. Es folgte die Cine-Loop Akquirierung der Herzmitte im B- und M-Mode, sowie der Basis und des Apex im B-Mode. Dazu wurde der Untersuchungstisch mit Hilfe der Mikroschraube in der Längsachse von der Mitte ausgehend, nach herzbasal, sowie herzapikal verschoben. Hierbei war zu beachten, dass die Basis möglichst nah unter der Mitralklappe aufgenommen wurde und apikal so weit wie sichtbar, nach distal ging. Aus den drei Cine-Loop Einstellungen im B-Mode und der Längsmessungen aus der parasternal langen Achse ließ sich anschließend mit der Vevo 2100 Software das Volumen nach Simpson berechnen.

3. suprasternales Fenster

Der Untersuchungstisch wurde waagrecht gestellt und circa 45° nach kaudal gekippt, sodass der Kopf der Maus hoch gestellt lag. Um die *aorta ascendens* mit Aortenklappe charakterisieren zu können, wurde der Schallkopf sagittal, nach vorne gekippt und mit Schallgel auf die rechte Schulter der Maus aufgesetzt (siehe Abb. 11). Hierbei sollte der Schalldruck nach Möglichkeit mit wenig Druck positioniert werden, da sonst die Aorta sehr leicht abgeklemmt werden könnte. Es wurde ein Pulswellen-Doppler, in der Nähe der Aortenklappe, in der *aorta ascendens* gemessen.

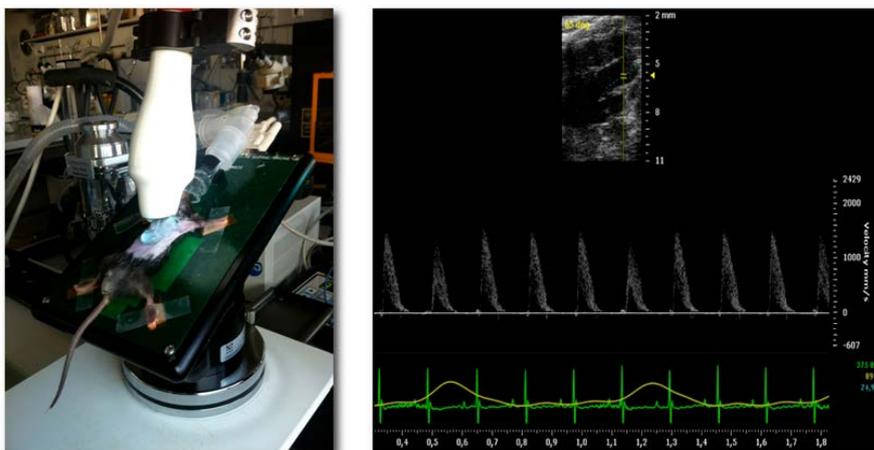


Abb. 11: Tischposition (links) und Pulswellen-Doppler Aufnahme der Aortenklappe im suprasternalen Fenster (rechts).

3.6.3 Auswertung

Die echokardiografische Untersuchung ermöglichte das Auswerten der LV-Auswurffraktion (EF), Schlagvolumen (SV), Enddiastolischen (EDV) als auch endsystolischen Volumina (ESV).

3.7 Invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten *Arteria carotis communis*

Die invasive arterielle Blutdruckmessung in der rechten *A. carotis communis* wurde nach 3 Wochen Reperfusion bei der BC+/EC+, BC-/EC+ und Sham-Gruppe durchgeführt. Diese drei Gruppen wurden nach ihren mittleren Blutdruckwerten miteinander verglichen.

3.7.1 Versuchsaufbau

Bei der invasiven Blutdruckmessung wurde gewichtsadaptiert Ketamin (100 mg/kg BW) und Xylazin (10 mg/kg BW) intraperitoneal als Anästhetikum appliziert. Eine Intubation war bei diesem Eingriff nicht nötig. Bei suffizienter Narkose wurden die Versuchstiere auf einem Magnetisch und auf einen 37°C erwärmten Operationstisch auf den Rücken liegend, an Schwanz und Extremitäten mit Klebestreifen fixiert positioniert. Der Hals wurde rasiert und mit Jodlösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma) desinfiziert.

3.7.2 Präparation der rechten *Arteria carotis communis* und Versuchsdurchführung

Der Eingriff begann mit einem 2 cm, von kranial nach kaudal, langen Hautschnitt, der auf der rechten Seite des Halses auf Höhe des Kehlkopfes mittels einer gebogenen, chirurgischen Schere (FST 14075- 11) zu setzen war. Anschließend wurden stumpf, mit Hilfe einer gebogenen Mikropinzette (Aesculap BD333R), die Hautenden zurückgezogen. Um die rechte *A. carotis communis* sauber

3 Material und Methoden

präparieren zu können, sind die nachfolgenden Schritte unter einem Lichtmikroskop (Leica MZ9-5) durchgeführt worden. Mit Hilfe von zwei gebogenen Mikropinzetten wurde vorsichtig unter der Haut die Muskelfaszie auseinander gezogen und die geraden Halsmuskeln mobilisiert. Die Trachea und die circa 2mm lateral gelegen Gefäßnervenscheide, in der sich die *A. carotis communis*, die *vena jugularis* und der *nervus vagus* befinden lagen frei. Im nächsten Schritt wurde die *A. carotis communis* circa 2 cm bis zur Bifurkation dargestellt. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass der *n. vagus* nicht verletzt wurde. Danach wurde mit einem 5-0 Seidenfaden (Serag Wiesner) eine leicht gespannte Ligatur unmittelbar kaudal der Bifurkation gelegt. Circa 1-2 cm kaudal der Ligatur wurde das Gefäß mittels eines Gefäßclips (Micro-serrenfines FST#18055-04) abgeklemmt. Dadurch entstand eine von der Blutzirkulation ausgeschaltete Gefäßstelle, in die unter Zuhilfenahme einer geraden Sprungschere (FST 15003-8) ein kleines Loch geschnitten werden konnte. Danach wurde über diese Öffnung der Druck/Volumen Katheter SPR-839 (Millar Instruments, Inc.) in die Arterie eingeführt und mit einer Fadenligatur (5-0 Seide) fixiert. Durch anschließendes Lösen der Gefäßklemme, konnte der Katheter in den Blutstrom geleitet werden. Es folgte mittels der Software IOX2 (EMKA) die Aufzeichnung von P_{\max} (maximaler Druck) und P_{\min} (minimaler Druck) als Parameter für den systolischen und diastolischen Blutdruck (siehe Abb. 12). Abb. 13 zeigt die einzelnen Schritte des Eingriffs.

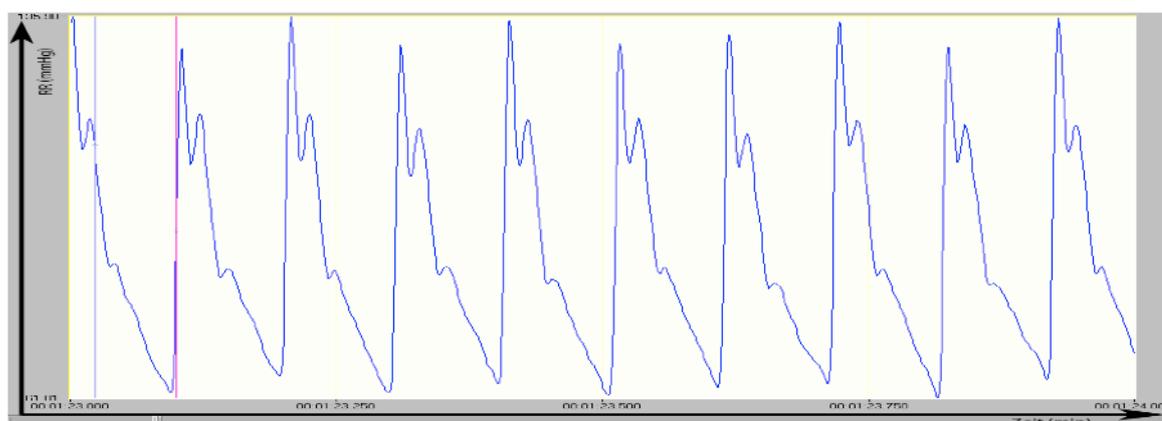


Abb. 12: Darstellung des arteriellen Blutdrucksignals während der Baseline (1 Minute).

3 Material und Methoden

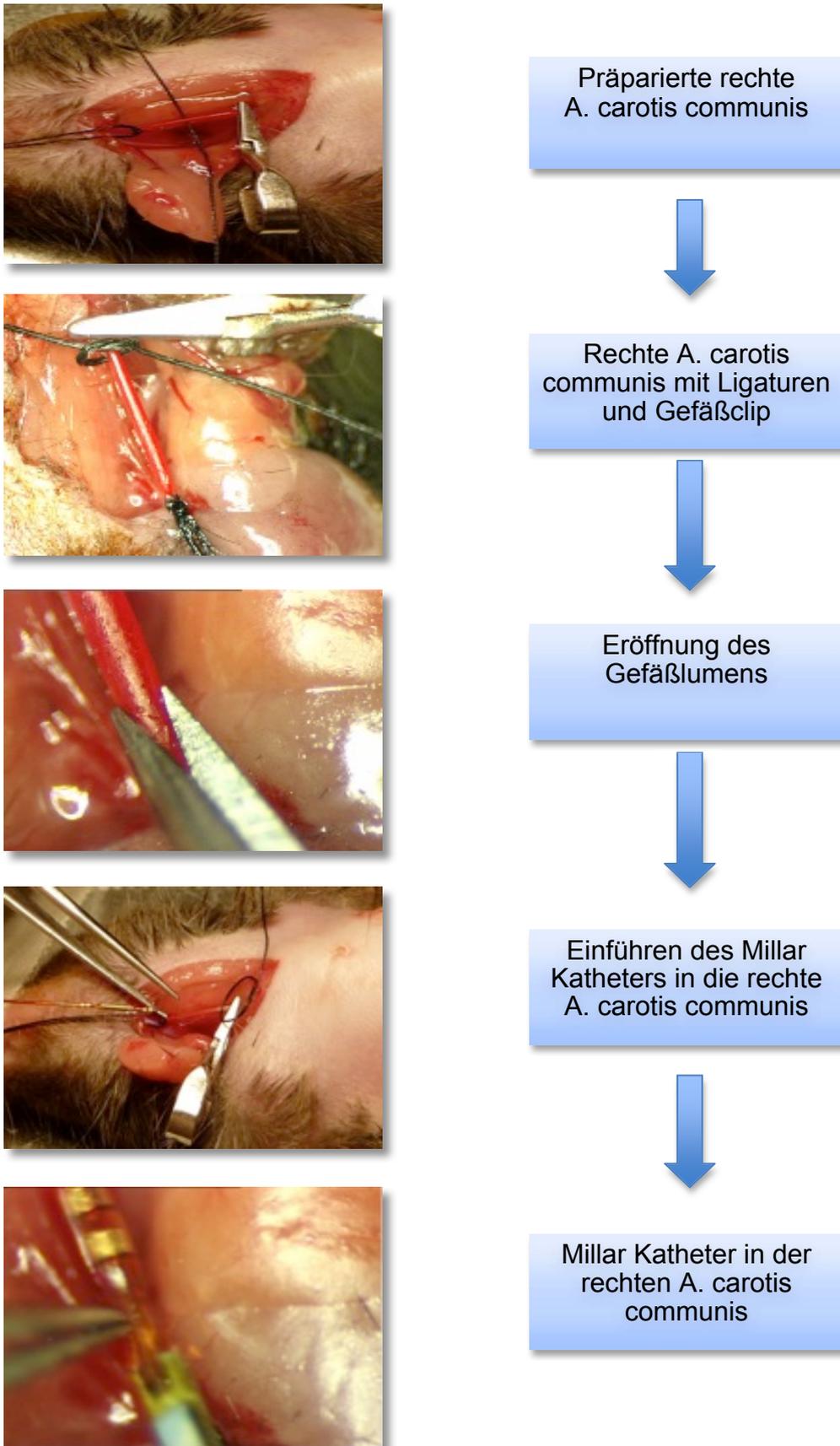


Abb. 13: Präparation der rechten *A. carotis communis* und Einführen des Millar Katheters zur invasiven arteriellen Blutdruckmessung.

3.8 Invasive Messung hämodynamischer Parameter im linken Ventrikel

Im Anschluss an die intraarterielle Blutdruckmessung erfolgte die invasive Messung hämodynamischer Parameter im linken Ventrikel vor und während Applikation von Noradrenalin.

Das Katecholamin Noradrenalin gehört zur Gruppe der direkt wirksamen Sympathomimetika. Es wirkt systemisch auf α -Adrenorezeptoren und stimuliert schwach β_1 -Rezeptoren. Unter Gabe von Noradrenalin kommt es zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion (α -Rezeptor getriggert) mit reflektorischer Herzfrequenzabnahme. Dieser Effekt wird durch Stimulation von Pressorezeptoren mit nachfolgender Vagusstimulation vermittelt. Die Vasokonstriktion führt zum einem Anstieg des totalen peripheren Widerstandes wodurch die Nachlast (*Afterload*) und der damit verbundene myokardiale Sauerstoffverbrauch ansteigen. Zusammenfassend sind die β_1 -Effekte (positiv chronotrop, dromotrop, bathmotrop, inotrop) der α -Wirkkomponente unterlegen. Dosisabhängig kann es zu Myokardischämie und exzessiven Blutdruckanstieg mit reflektorischer Bradykardie kommen [263].

Der in *A. carotis communis* verbliebene Katheter musste zur invasiven Messung in den linken Ventrikel vorgeschoben werden. Zeitgleich ist beim Vorschieben die kaudale Mikroklemme entfernt worden. Unter Kontrolle des Druck-Volumen Diagramms sowie Druck-Zeit Kurve wurde der Katheter vorsichtig vorgeschoben bis dieser sich im linken Ventrikel befand. Abb. 14 zeigt die typischen hämodynamischen Kurven die im man im linken Ventrikel ableiten konnte.

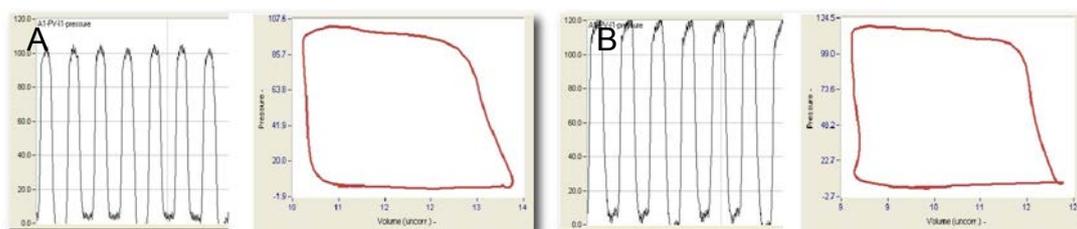


Abb. 14: Darstellung der hämodynamischen Parameter im linken Ventrikel als pressure/time-Graph und pressure-volume-loop vor (A) und während (B) Applikation von Noradrenalin. Durch die Applikation von Katecholaminen resultieren höhere Blutdruckamplituden und die geleistete Druck-Volumen-Arbeit nimmt zu.

Die Daten wurden gleichfalls mittels IOX2-Software kontinuierlich über den vollständigen Untersuchungszeitraum erhoben. Es sind folgende Parameter unter 1-minütiger Baseline und anschließender intraperitonealer Applikation von Katecholaminen (Noradrenalin) per Perfusor (0,040 µg/g KG i.p. pro Minute) über 12 Minuten erhoben worden:

- linksventrikulärer Druck (LVDP)
- die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur (dP/dt_{\max} in mmHg/sec)
- die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur (dP/dt_{\min} in mmHg/sec); { dP/dt stellt den Differentialquotient Druck (p) nach Zeit (t) dar}

3.9 Bestimmung der Erythrozyten – Verformbarkeit mittels *Laser-assisted-optical rotational cell Analysator (LORCA) in vitro*

Die Fließeigenschaften des Mausblutes wurden mittels LORCA getestet. Dabei stand bei dem angewandten Protokoll speziell die Erythrozyten-Verformbarkeit (Ektazytometrie) im Mittelpunkt des Versuchs. Im Vorfeld der Untersuchung wurde mittels Herzpunktion basal als auch nach 3 Wochen Reperfusion den Versuchstieren 50 µl Vollblut entnommen, welches bei 4°C bis zur Messung aufbewahrt wurde. Hierbei sollte eine Lagerung über 1,5 Stunden vermieden werden. 25 µl Vollblut wurden in 5 ml einer auf 37°C vorgewärmten 30 mPa*s PVP (Polyvinylpyrrolidon) Lösung (Mechatronics) pipettiert und suspendiert (1:200 Verdünnung).

Das LORCA-Messsystem bestand aus einem thermoregulierten Zylinder-System (37°C), einem Stufenmotor, einem 5 mW Helium Laser und einer an einem Computer angeschlossenen Videokamera (siehe links). Zur Probenanalyse wurde eine 1 ml dünne Schicht der Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Erythrozyten-Suspension in den äußeren, rotierenden Glaszylinder (Cup) blasenfrei pipettiert. Im Zentrum des Cups befand sich ein statischer Metallzylinder (Bob). Die Rotation des äußeren Zylinders (Cup) verursachte eine Deformation (Elongation) der Erythrozyten. Der Laser wurde nicht direkt auf die Erythrozyten im Glaszylinder gerichtet, sondern durch einen im Bob befindlichen Spiegel indirekt auf die Blutprobe reflektiert. Demzufolge änderte sich mit steigender Scherrate das resultierende

3 Material und Methoden

Streuungsmuster (Diffraktionsmuster), das auf eine hinter dem Glaszylinder stehende Projektionsmembran, projiziert wurde.

Das Diffraktionsmuster ist bei ruhenden Erythrozyten rund und wird elliptisch sobald Scherkräfte auf die Zellen einwirken und eine Formveränderung verursachen [269]. Um einen Unterschied der beiden Zell-Radii vor und nach der Zentrifugation darstellen zu können, war die Projektionsmembran mit einer Millimeter-Kalibrationsleiste versehen worden. Die Verformbarkeit wurde von 50 Aufnahmen aus beiden Radii der Elongationsindices mit der jeweiligen Standardabweichung im Computer kalkuliert. Die Berechnung der Elongationsindizes erfolgte mittels nachstehender Formel: $EI = \frac{A-B}{A+B}$. Bei neun verschiedenen Scherraten (0,3, 0,47, 0,72, 1,12, 1,73, 2,68, 4,16, 6,45, und 10 Pa (Pascal)) wurde der Elongationsindex gemessen und als Verformbarkeitskurve grafisch abgebildet (siehe Abb. 15 rechts).

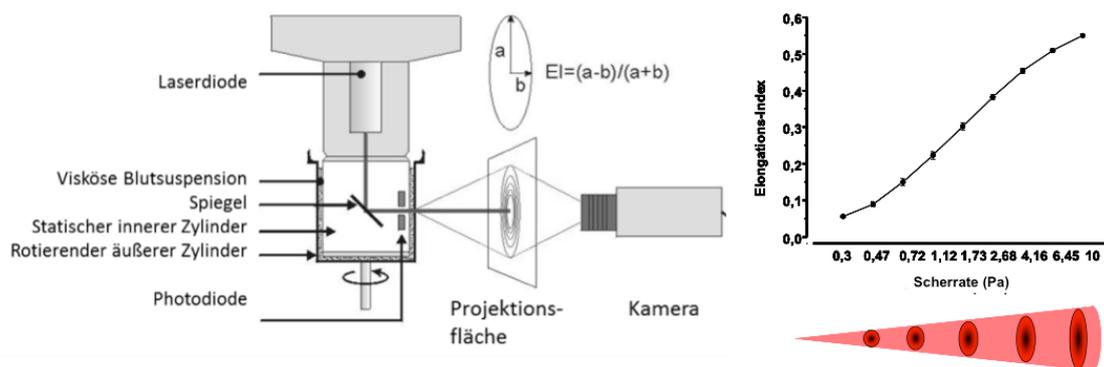


Abb. 15: LORCA-Messung; Linke Seite: Schematische Darstellung der LORCA-Meßeinheit; Rechte Seite: Typischer sigmoidaler Verlauf der Kurve bei Auftragung des korrespondierenden Elongationsindex gegen eine steigende Scherrate.

3.10 Differentialblutbild

Zur Anfertigung eines Differentialblutbildes wurde den Versuchstieren unter tiefer Narkose, basal als auch nach 3 Wochen Reperfusion, 12 µl intrakardiales Blut mittels Herzpunktion entnommen. Das 3fach-Differentialblutbild wurde unter Zuhilfenahme des Hämatologie-Analyser VetABC CLASSIC (scil animal care company GmbH scil, Deutschland) nach Herstellerangaben ausgewertet. Neben der Bestimmung von Erythrozyten, Thrombozyten, Gesamtleukozyten, Hämoglobin und Erythrozytenindices bestand auch die Möglichkeit die Gesamtleukozyten in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten zu differenzieren.

3.11 Histologie

3.11.1 Organentnahme und Vorbereitung

Die Mäuse wurden mit Ketamin (100 mg/kg KG) und Xalazin (10 mg/kg KG) i.p. narkotisiert und anschließend mit 1000 IE Heparin (Ratiopharm) i.p antikoaguliert. Danach erfolgten die Thorakotomie und das Durchspülen der Organe mit PBS. Vor dem Spülvorgang wurde unter dem Mikroskop (Leica MZ9-5) ein kleiner Schnitt in den rechten Vorhof des Mauserzes gesetzt. Dann bediente man sich einer Kanüle mit einem Durchmesser von 0,5 mm x 16mm (25G, BD Eclipse,USA9) die in die *aorta abdominalis* eingeführt worden ist. Es wurde mit einer Pumpe (Ismatic, Hugo Sachs Apparatus) mit der Flow Rate 15,78 solange gespült, bis ein deutliches Verblassen der Organe zu erkennen war. Das deutete darauf hin, dass die Organe jetzt frei von Blutzellen waren. Die gespülten Organe wurden aus der Maus entnommen und für die Histologie für 24 h bei 4°C in 4 % phosphatgepufferten Formalin fixiert, um eine bestmögliche Strukturhaltung zu gewährleisten.

3.11.2 Entwässerung und Einbettung

Die mit Formalin angereicherten Organe wurden vor dem Schneiden mit PBS gespült. Danach folgte die Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe. Hierbei wurden die Organe 1x 1 h in 70 % Isopropanol, 2x 1 h 96 % Isopropanol, und 3x 1 h 100 % Isopropanol und ins Intermedium Xylol für 2x 45 min und 1x 1 h gelegt. Der verbliebene Alkohol wurde dadurch verdrängt und das Gewebe konnte in Paraffin für 1x 45 min und 2x 1 h, unter Vakuum, eingebettet werden. Das Einbetten erfolgte mittels eines Einbettautomaten von Leica (ASP 200S).

3.11.3 Schneiden

Die eingebetteten Organe wurden in 3-5 µm dicke Schnitte an einem Leica jung 2030 Rotation Mikrotom geschnitten und auf, mit Silikon beschichteten, Super Frost Plus Objektträger (Menzel Gläser, Thermo Fisher Scientific, Braunschweig) gezogen. Danach wurden die Schnitte bei 37°C für 45 min getrocknet.

3.11.4 Entparaffinierung

Die Schnitte mussten vor der jeweiligen Färbung vom Paraffin gelöst werden. Dies erfolgte für 2x 15 min. in Xylol. Danach folgte eine Rehydrierung der Schnitte über eine absteigende Alkoholreihe von 2x 5 min. 100 % Isopropanol, 1x 5 min. 96 % Isopropanol, 1x 5 min. 80 % Isopropanol, 1x 5 min. 70 % Isopropanol und zuletzt 1x 5 min. PBS oder destilliertes Wasser.

3.11.5 Färben

3.11.5.1 Gomori's One Step Trichrome Färbung

Mit Hilfe der Gomori's One Step Trichrome Färbung konnte die Größe des infarzierten Gewebes quantifiziert werden. Die Trichrome Färbung diente zur Darstellung von Muskelfasern, Zytoplasma und Kollagen. Im Schnitt stellten sich

3 Material und Methoden

die Muskelfasern/Cytoplasma rot, das Kollagengewebe blau, die Nucleoli blau/schwarz und die Erythrozyten rot dar (siehe Abb. 16). Es handelt sich hierbei

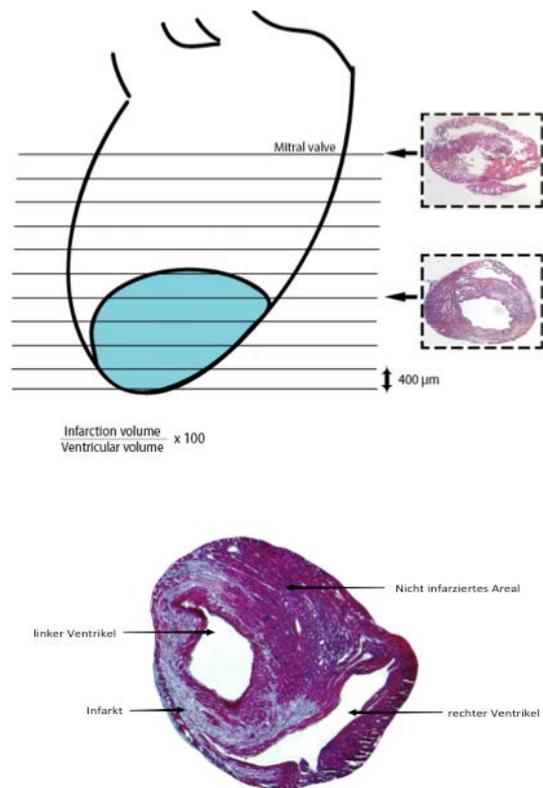


Abb. 16: Darstellung der Gomori's One Step Trichrome Färbung nach 3 Wochen post Ischämie. Im Abstand von etwa 400µm wurden die Herzen in 10, 3-5µm dicke Schnitte unterteilt und gefärbt. Der größte Anteil des Infarktes war in den apikalen Abschnitten nachzuweisen. Der Infarkt/ der Kollagenanteil stellte sich in der Färbung blau dar.

um eine Dreifachfärbung die aus folgenden drei Komponenten besteht: Chromotrope 2R, Anilinblau und Phosphorwolframsäure. Chromotrope 2R ist ein azider Farbstoff der entsprechend Zellplasmaproteine und Muskulatur anfärbt. Anilinblau ist auch ein saurer Farbstoff der zusammen mit der letzten Komponente, der Phosphorwolframsäure, das Bindegewebe anfärbt. Zur besseren Unterscheidung der Gewebekomponenten wurde im Anschluss Essigsäure verwendet. Vor der Simultan Behandlung sind die Schnitte entparaffiniert und danach für 15min. bei 58°C in Bouins Solution gebeizt worden. Die Bouins Solution ist eine Mischung aus Formaldehyd und Essigsäure, die eine bessere Differenzierung zwischen Bindegewebe und Muskelfasern ermöglichte. Die Lösung erniedrigt den pH-Wert der Proteine was zu einer

besseren Strukturierung der Zellkerne führt. Der nächste Schritt war eine 5 minütige Zellkernfärbung in Weigerts Eisen Hämatoxylin A und B (Verhältnis 1:1, Sigma). Anschließend wurden die Schnitte für 5min in Leitungswasser gespült und für 25 min in die Gomori's Farblösung (0,1281 mmol/l Chromotrope 2R; 0,00566 mmol/l Anilinblau; 166,5 mmol/l Eisessig; 0,00277mmol/l Phosphorwolframsäure) eingelegt. Danach folgte die Differenzierung in 1 % Essigsäure für 2x 2 min. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte ab 70 % Isopropanol über eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 2 min 70 %, 1x 2 min 96 %, 2x 5 min. 100 % Isopropanol) schonend dehydriert und in Xylol für 2x 5 min. überführt um abschließend mit Vitro Clud (R.Langensbruck) eingedeckt zu werden.

3.11.5.1.1 Auswertung der Myokardinfarktgröße

Die Gomori's gefärbten Schnitte wurden am Leica DM 4000 M Lichtmikroskop mit einer 250-fachen Vergrößerung in 4-6 Quadranten mikrospiert und digital gespeichert. Mit Hilfe eines Imaging Programmes (Diskus) konnte die Planimetrie an den Schnitten durchgeführt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Anfärbung der Infarktzone war eine manuelle Unterscheidung zwischen infarzierten Areal (INF), gesamt-ischämischen Gewebe (area at risk + INF) und vitalen Gewebe möglich. Das Programm berechnete die eingegrenzten Flächen, in Pixel oder mm², sodass das Verhältnis zum gesamten vitalen und Infarktgewebe in Prozent kalkulieren werden konnte.

3.11.5.1.2 Ermittlung des Kollagengehalts

An den Gomori's gefärbten Präparaten konnte der Kollagengehalt bestimmt werden. Dazu wurde jeder Schnitt in zehn Blickfeldern an einem Leica Mikroskop DM 4000 M in 400-facher Vergrößerung mikroskopiert und als JPEG digital gespeichert. Die Bilder wurden anschließend mit der Software Image J analysiert. Hierbei wurde über die Eigenschaft der Intensität eine prozentuale rot-blau Abstufung im Vergleich zum gesamten Blickfeld berechnet.

3.11.5.2 Kollagentypisierung

Zur Differenzierung der Kollagene I, III und IV im Infarktgewebe wurden die Schnitte über ein indirekt immunhistologisches Verfahren angefärbt. Dafür wurden die Präparate nach dem Entparaffinieren als erstes 5 min in PBS gestellt. Danach erfolgte die Demaskierung für 20 min bei 900 Watt in einer Mikrowelle (Bosch), in 700ml Citrat-Puffer. Der Citrat-Puffer war ein Gemisch aus 12,6 ml einer Lösung A (2.101 g Citronensäure auf 100 ml destilliertes Wasser), 57,7 ml einer Lösung B (14,7 g Natriumcitrat auf 500 ml destilliertes Wasser), 350 µl Tween®20 und 630 ml destilliertes Wasser. Nachdem die Schnitte handwarm abgekühlt waren, wurden diese für 5 min in frischen PBS gereinigt. Die Proben wurden anschließend mit einem Dako Pen umkreist. Als nächstes wurden die Schnitte in

3 Material und Methoden

eine Dunkelkammer gelegt sowie die Positiv- und Negativprobe eines Objektträgers jeweils für 5 min mit einer 3 % H₂O₂-Lösung inkubiert. Die H₂O₂-Lösung diente der Deaktivierung der endogenen Peroxidase. Es folgte die einstündige Inkubation mit einer Blockierlösung bei Raumtemperatur, um hydrophobe Wechselwirkungen zu reduzieren (Verminderung des Hintergrundes). Die Blockierlösung wurde nach folgendem Mischverhältnis zusammengesetzt: 12 ml PBS + 1 % BSA, 6 Tropfen Stammlösung (Normal-Serum), 48 Tropfen Avidin.

Auf die Positivproben wurden jeweils 50 µl verdünnte Primärantikörperlösung (siehe Tabelle 2) gegeben.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zum Nachweis von Kollagen I, III und IV im infarzierten Myokard

Antikörper	Bestellnummer/ Herkunft	Demaskierung
rabbit polyclonal IgG Kollagen I	# 292 (abcam,UK)	Citrat Puffer, 20 min bei 96-99°C
rabbit polyclonal IgG Kollagen III	# ab7778 (abcam,UK)	Citrat Puffer, 20 min bei 96-99°C
rabbit polyclonal IgG Kollagen IV	# ab19808 (abcam,UK)	Citrat Puffer, 20 min bei 96-99°C

Basierend auf Vorversuchen sind die Primär- und Sekundärantikörper, je nach Kollagen auf diese Weise (siehe Tabelle 3) verdünnt worden:

Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper Verdünnungsschema zur Typisierung von Kollagen I, III und IV

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Kollagen I	1 : 200	1 : 500
Kollagen III	1 : 500	1 : 500
Kollagen IV	1 : 500	1 : 500

Die Schnitte wurden über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C gelagert. Weiterhin wurden die Proben, nachdem sie wieder Raumtemperatur erreicht haben, gründlich mit frischen PBS gewaschen und 50 µl Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Kaninchen Meerrettich-Peroxidase konjugierter IgG Antikörper (Ziege, Polyclonal, Abbiotec,

3 Material und Methoden

252237) angewendet. Dieser wurde in einer Verdünnungslösung (6 ml PBS + 12 Tropfen Normalserum) verdünnt. Der Sekundärantikörper wurde 1 h inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit frischen PBS für 5min. gereinigt. Es folgte die Entwicklung des Farb-Substratkomplexes auf den Proben. Dazu wurde eine DAB (3,3 Diaminobenzidin, Vector Laboratoris)-Lösung verwendet (10 ml destilliertes Wasser, 4 Tropfen H₂O₂, 4 Tropfen Puffer, 8 Tropfen DAB).

Nach vollständiger Farbentwicklung wurde die Reaktion mittels PBS gestoppt. Abschließend wurden die Proben über eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 2 min 70 %, 1x 2 min. 96 %, 2x 5 min. 100 % Isopropanol) dehydriert und nach 2x 5 min. Xylol mit Vitro Clud (R.Langenbrick) eingedeckt.

Die Schnitte wurde unter einem Leica Mikroskop (DM 4000) dokumentiert und je nach Intensität visuell in die Kategorien 1 (leicht) - 4 (sehr stark) eingeteilt.

3.12 Nachweis des *knock-out* Allels nach Knochenmarktransplantation

Nach einer erfolgreichen Transplantation musste nachgewiesen werden ob das Knochenmark von den Donorstammzellen oder autochthonen Zellen stammte. Es bestand die Möglichkeit, dass die autochthonen Zellen der Empfängermaus die letale Gamma-Strahlendosis überlebt hatten und sich wieder vermehrten. Ein Überleben der Maus war kein ausreichender Beweis. Deshalb wurde nach Abschluss aller Versuche die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des *knock-out* Allels im Gewebe (1-2 mm Schwanzspitze) und im Blut der Chimäre mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

3.12.1 Isolation genomischer DNS aus dem Blut der Chimäre

Die Isolation der genomischen DNS aus dem Blut der Chimären wurde unter der Zuhilfenahme des Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) nach Herstellerangaben ausgeführt. Die Versuchstiere wurden zunächst mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin (100 mg/kg BW) und Xylazin (10 mg/kg BW) narkotisiert. Bei suffizienter Narkose wurde durch eine Herzpunktion 100 µl

intrakardiales Blut abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Im weiteren Verlauf wurde den Herstellerangaben gefolgt.

3.12.2 Isolation genomischer DNS aus der Schwanzspitze der Chimäre

Neben der Isolation aus intrakardialem Vollblut wurde zur Bestimmung des Genotyps DNS aus der Schwanzspitze der Empfängertiere gewonnen. Es wurde unter Narkose ein 1-2 mm langes Schwanzstück entfernt und bei -20°C in einem 1,5 ml großen Reaktionsgefäß (Eppendorf) aufbewahrt. Zur Isolation der genomischen DNS wurde die Schwanzspitze in 600 µl TNES Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 % SDS) und 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) (Applichem) über Nacht bei 55°C (leicht schüttelnd) inkubiert. Als nächstes wurde die Probe bei 14.000 rpm für 5 min (RT) zentrifugiert. Die obere Phase wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und mit 700 µl PCI-Lösung überschichtet. Die Suspension wurde geschüttelt und erneut bei 14.000 rpm für 5 min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde zusammen mit 1000 µl 100 %iges Ethanol (RT) in ein neues 1,5 ml großes Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und nach wiederholtem mixen wiederholt für 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das gDNS Pellet mit 1000 µl 70 %igen Ethanol (-20°C) gewaschen. Diese Suspension wurde erneut bei 14.000 rpm (RT) für 5 min zentrifugiert und der Überstand wurde gleichfalls vorsichtig abgenommen. Es folgte die Trocknung der DNS mittels SpeedVac. Danach wurde die gDNS, je nach Größe des Pellets, in 100-200 µl TE Puffer (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen und bis zur vollständigen Lösung bei 65°C 15 min inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde die gelöste gDNS, bis zur weiteren Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese, bei -20°C gelagert.

3.12.3 Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNS

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNS aus Blut und Schwanzgewebe erfolgte mittels Nanodrop 1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific) laut Herstellerangaben. Das Nanodrop 1000 Spektralphotometer ermöglichte die genaue sowie reproduzierbare Messung der DNS-Konzentration in einem Probenvolumen von 2 µl bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Formel zur Berechnung der Konzentration lautete: $OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 = \text{DNS-Konzentration in ng/}\mu\text{l}$. Das Nanodrop 1000 Spektralphotometer konnte das volle Spektrum (220-750 nm) differenzieren. Deshalb konnte durch die Berechnung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm die Reinheit der DNS beurteilt werden. Eine "reine" DNS hatte ein Verhältnis von 1,8. Ein niedrigeres Verhältnis hätte auf Protein-, Phenol- oder andere Verunreinigungen hingewiesen, die nahe 280 nm bzw. 230 nm absorbieren. Die Reinheit der DNS hatte große Bedeutung für die nachfolgende Polymerase-Kettenreaktion, welche durch Verunreinigungen hätte gestört werden können.

3.12.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das transgene DNS-Konstrukt wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion nachgewiesen. Es wurden GoTaq[®], DNS Polymerase, Tag Polymerase (Promega), PCR Nucleotid Mix (Promega) sowie die in Tabelle 4 aufgelisteten Oligonukleotide verwendet. Die Kombination der Oligonukleotide WTeNOS-1 und WTeNOS-2 ergab ein 250 bp langes Produkt, wohingegen die Kombination eNOSKO-a und eNOSKO-b ein Produkt von 380 bp (Basenpaare) darstellte. Die Reaktionsansätze wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und der Mastercycler gradient (Eppendorf) diente der Amplifikation.

Das Herstellerprotokoll der Polymerase wurde in folgenden Punkten auf die verwendeten Oligonukleotide und das zu amplifizierende Produkt angepasst. Pro Zyklus erfolgte die initiale Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden, die Hybridisierung der Oligonukleotide bei 55°C für 45 Sekunden und die Elongation bei 72°C für 1:15 Minuten. Es wurden insgesamt 32 Zyklen durchlaufen.

Tabelle 4: verwendete Oligonukleotide

Name des Oligonukleotides	Sequenz
eNOSKO-a	CCA ATG AAC AGA CGC TGG G
eNOSKO-b	GCG GAA TGT GAG TCC GAA A
WTeNOS-1	ACA AGT CCT CAC CGC CTT TT
WTeNOS-2	ACA TCG CC CAG ACA AAC A

3.12.5 Gelelektrophorese

10 µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen AgaroseGel aufgetragen und mit 1x TBE- Puffer (Biorad) bei etwa 1 mv für eine Stunde elektrophoretisch getrennt. Bei Verwendung des grünen GoTaq[®] war eine Versetzung des Reaktionsansatzes mit Probenpuffer nicht notwendig. Da die nativen DNS-Fragmente nativ nicht sichtbar waren, wurden sie mittels Ethidiumbromid (10 mg/ml, Biorad) oder RedSafe Nucleid Staining Acid Solution (iNtRON Biotechnology, Korea) gefärbt. Der RedSafe Farbstoff wurde nach Herstellerangaben angewendet. Bei Verwendung von Ethidiumbromid zur Anfärbung der DNS-Fragmente wurde dies in einer Konzentration von 50 µg/ml verwendet. Nach 10 minütiger Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden die DNS-Fragmente unter Zuhilfenahme eines UV-Transluminators (302 nm) mit integrierter Geldokumentationseinheit analysiert. Abb. 17 zeigt ein typisches Bandenmuster im Trägermedium, welches zum Nachweis des knock-out Allels nach einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation diente.

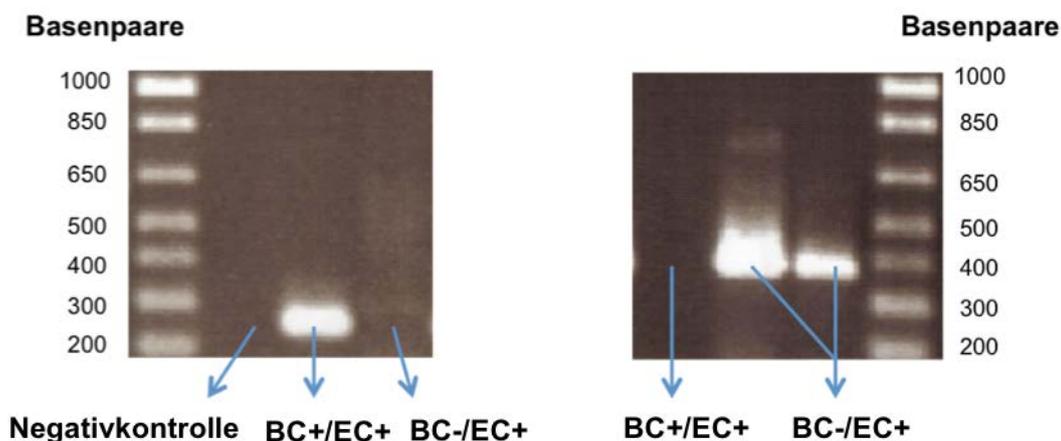


Abb. 17: Typisches Bandenmuster in der Gelelektrophorese zum Nachweis des *knock-out* Allels im Blut nach Knochenmarktransplantation. Die DNS der Kontrolltiere BC+/EC+ entsprach 250 Basenpaare und der Chimären der Gruppe BC-/EC+ 380 Basenpaare.

3.13 Statistische Analyse der Messergebnisse

Aus den Einzeldaten wurden die Mittelwerte (MW) und die zugehörigen Standardfehler (SEM) berechnet. Für den Vergleich der Mittelwerte aus zwei verschiedenen Versuchstiergruppen wurde, unter der Voraussetzung der Normalverteilung der Messwerte, der „Student's t-Test“ oder Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben angewandt. Für den Vergleich der Mittelwerte aus mehr als zwei verschiedenen Versuchsgruppen wurde nach Testung der Normalverteilung eine Ein-Weg-Anova mit anschließendem Bonferroni Test oder Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Posttest angewandt. Normalverteilte Mittelwerte, welche von zwei Faktoren abhängig waren, wurden mit einer Zwei-Wege-Anova analysiert. Zur Signifikanztestung wurde als Signifikanzindikator ein p-Wert $\leq 0,05$ festgelegt. Hieraus folgt das ein p-Wert unter $< 0,05$ als signifikant betrachtet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Genotypisierung aus Schwanzspitze und Vollblut der verwendeten Chimären

Nach einer erfolgreichen Transplantation musste nachgewiesen werden, ob das Knochenmark von den Donorstammzellen oder autochtonen Zellen stammte. Es bestand die Möglichkeit, dass die autochtonen Zellen der Empfängermaus die letale Gamma-Strahlendosis überlebt hatten und sich wieder vermehrten. Ein Überleben der Maus war kein ausreichender Beweis. Deshalb wurde nach Abschluss aller Versuche die Anwesenheit bzw. Abwesenheit des *knock-out* Allels im Gewebe (1-2 mm Schwanzspitze) und im Blut der Chimäre mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

Die genomische DNS der Kontrollgruppe BC+/EC+ zeigte weder im Schwanzgewebe noch in den Blutzellen das Auftreten des Knock-out Allels. Erwartungsgemäß konnte nur das Wildtyp-Allel nachgewiesen werden. Bei den Chimären der Gruppe BC-/EC+ war im Schwanzgewebe kein *Knock-out*-Allel nachzuweisen, welches erwartungsgemäß in gDNS der Blutzellen zu finden war. Alle Tiere aus der BC-/EC+ Gruppe zeigten geringe Spuren des Wildtyp-Allels aus den Empfängerzellen (siehe 3.12).

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Chimären der Gruppe BC-/EC+ basal hellblau und nach 3 Wochen Reperfusion dunkelblau dargestellt. Die Basalwerte der Kontrollgruppe BC+/EC+ sind hellgrau und 3 Wochen post Ischämie dunkelgrau abgebildet.

4.2 Histologische und immunhistologische Ergebnisse

4.2.1 Infarktgrößenbestimmung und Kollagengehalt

Im Anschluss an den I/R Versuch und einer 3 wöchigen Reperfusionphase wurden die Infarktgrößen mittels Gomori's One Step Trichrome Färbung (siehe 2.11.5.1) erfasst. Die Infarktausdehnung, angegeben als prozentualer Anteil des linken Ventrikels, war in der BC-/EC+ -Gruppe ($19.45 \pm 1,492\%$) nach 3 Wochen post Ischämie signifikant höher (** $p < 0,01$) als bei der BC+/EC+-Vergleichsgruppe mit $13.81 \pm 0,7400\%$ (siehe Abb. 18).

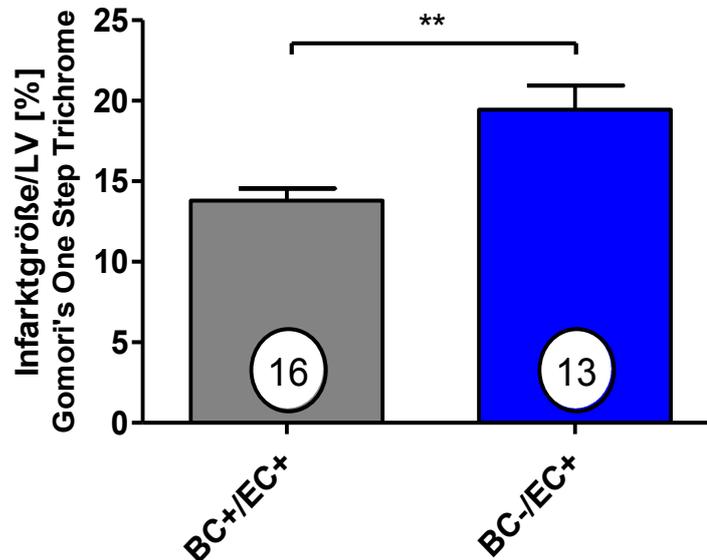


Abb. 18: Infarktgrößenbestimmung mittels Gomori's One Step Trichrome nach 3 Wochen Reperfusion. Die Chimäre der Gruppe BC+/EC+ zeigten signifikant vergrößerte Infarkte im Vergleich zu den Tieren der Gruppe BC-/EC+ (Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0,01$, parametrisch getestet).

Neben der prozentualen Infarktgrößenbestimmung wurde in beiden Kerngruppen der Kollagengehalt im infarzierten Gewebe mit Hilfe der Gomori's One Step Trichrome Färbung und anschließender Auswertung mittels Image J ermittelt (siehe 3.11.5.1.2). Bei der BC+/EC+ Gruppe betrug der Kollagenanteil im infarzierten Myokard $15.90 \pm 0,4802\%$ wohingegen die BC-/EC+ Gruppe erwartungsgemäß eine signifikant erhöhte Kollageneinlagerung zeigte ($20.22 \pm 0,08296\%$; *** $p < 0,001$) (siehe Abb. 19).

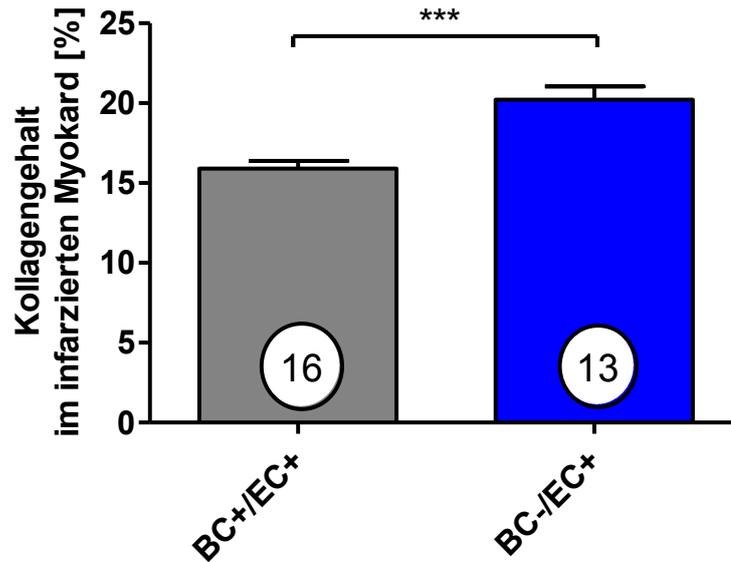


Abb. 19: Kollagengehalt im infarzierten Myokard nach 3 Wochen Reperfusion. Die Tiere der Gruppe BC+/EC- zeigten einen signifikant erhöhten Kollagenanteil im infarzierten Gewebe im Vergleich zur Tieren der Gruppe BC+/EC+ (Mittelwert +/- SEM; ***p < 0,001, parametrisch getestet).

4.2.2 Kollagentypisierung

Zusätzlich zur Infarktgrößenbestimmung und dem Kollagenanteil im infarzierten Myokard wurden die Kollagenfasern mittels Immunhistochemie 3 Wochen post Ischämie typisiert (siehe 3.11.5.2). Es wurden die Kollagene I, III und IV im infarzierten Myokardgewebe des linken Ventrikels in den beiden Versuchstiergruppen verglichen. Hierbei wurde die Intensität der Kollagenanfärbung visuell in die Kategorien 1 (leicht) bis 4 (sehr stark) eingeteilt. Das Kollagen I wurde von den BC-/EC+ Mäusen stärker (Kategorie 3) als von den BC+/EC+ Chimären eingebaut (Kategorie 2). Die BC+/EC+ Tiere hatten eine leichte (Kategorie 1) Einlagerung von Kollagen III wohingegen die BC-/EC+ Tiere dieses Kollagen nach I/R erhöht aufwiesen. Zusammenfassend zeigten die BC-/EC+ Chimäre eine verstärkte Einlagerung von Kollagen I und III (Kategorie 3) im Vergleich zu den BC-/EC+ Mäusen (Kollagen I: Kategorie 2; Kollagen III: Kategorie 1). Kollagen IV wurde von beiden Stämmen gleich stark eingelagert (Kategorie 4).

Die nachfolgende Abb. 20 zeigt ausgewählte Schnitte der immunohistochemischen Färbung.

4 Ergebnisse

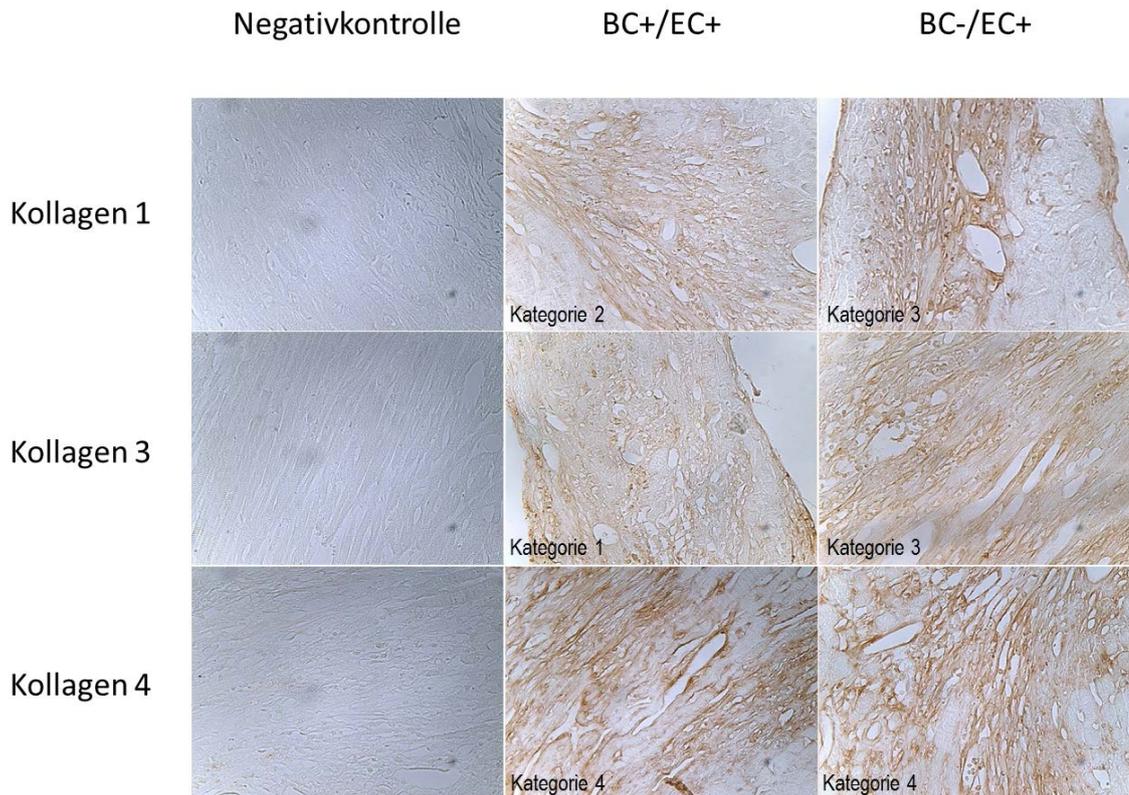


Abb. 20: Kollagentypisierung nach 3 Wochen Reperfusion. Dargestellt sind Negativkontrollen sowie der Nachweis von Kollagen I, III und IV im Myokardgewebe der Versuchstiergruppe BC-/EC+ und BC+/EC+. BC-/EC+ zeigten verstärkte Einlagerung von Kollagen I und III im Vergleich zu den Kontrolltieren BC+/EC+. In beiden Gruppen wurde Kollagen IV gleich stark eingelagert.

4.3 Nicht-invasive Druck-Volumen Messung mittels Echokardiografie

Zur Analyse der myokardialen Funktion und *Remodeling* wurden folgende Parameter vor der Ischämie-Induktion (Baseline, BL) sowie im Verlauf 24 Stunden, 4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen post Ischämie mittels Echokardiografie erhoben: Auswurffraktion (%), Endsystolisches Volumen (μl), Enddiastolisches Volumen (μl).

Die Daten nach 3 Wochen Reperfusion standen im Mittelpunkt der Versuche. Herzfrequenz und Herzzeitvolumen unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen über den Zeitverlauf von 3 Wochen nicht signifikant.

4.3.1 Auswurffraktion (ejection fraction, EF)

Vor der Anlage der Ligatur waren die Baseline-Werte der Auswurffraktion in beiden Tiergruppen etwa gleich. Erwartungsgemäß hatte sich die *ejection fraction* im Vergleich zur Baseline signifikant, in beiden Gruppen zu allen Versuchszeitpunkten post Ischämie, verschlechtert. Nach 3 Wochen Reperfusion war die EF bei beiden Gruppen signifikant schlechter als im Vergleich zu der jeweiligen Baseline (BC-/EC+: basal 62.35 ± 0.87 vs. 3 Wochen post Ischämie 41.26 ± 3.39 BC+/EC+: basal 61.70 ± 1.01 % vs. 3 Wochen post Ischämie 48.81 ± 1.70 %; *** $p < 0.001$)(siehe Abb. 21).

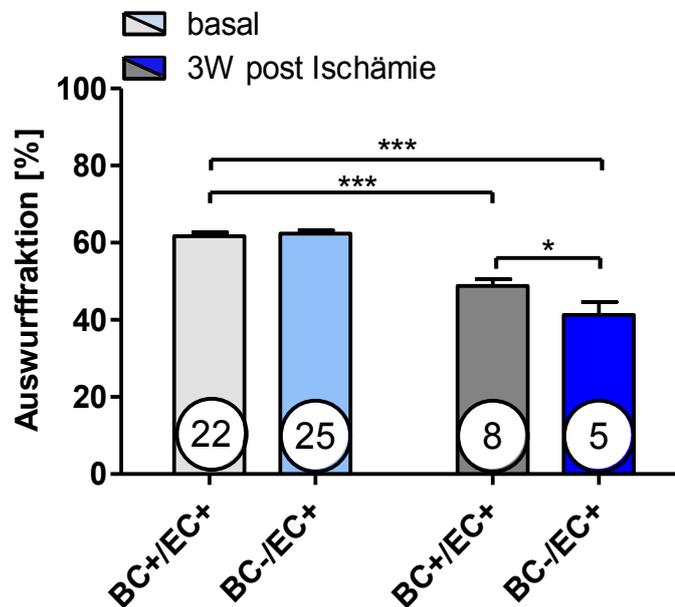


Abb. 21: Auswurffraktion basal und nach 3 Wochen Reperfusion. Die Versuchstiergruppe BC-/EC+ zeigte eine signifikant erniedrigte Auswurffraktion im Vergleich zu den Kontrolltieren BC+/EC+ nach 3 Wochen Reperfusion. Die Auswurffraktion hatte sich in beiden Gruppen im Vergleich zu den Basalwerten signifikant verringert (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

Wie aus Abb. 22 zu entnehmen, zeigten die Chimären der Gruppe BC-/EC+ eine zunehmende Verringerung der Auswurffraktion über den Verlauf von 3 Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe BC+/EC+. Bereits 24 Stunden post Ischämie war eine Tendenz zu einer geringeren Ejektionsfraktion in der BC-/EC+ Gruppe nachzuweisen. Nach 4 Tagen Reperfusion war eine signifikante Verschlechterung der BC-/EC+ EF im Vergleich zu den BC+/EC+ Tieren (BC+/EC+: 54.12 ± 2.20 % vs. BC-/EC+: 38.7 ± 4.60 %; * $p < 0.05$) zu erkennen. Zum Zeitpunkt 1 Woche und

4 Ergebnisse

2 Wochen post Ischämie kam es zu einer leichten Stabilisierung der EF bei den Mäusen der Gruppe BC-/EC+, die allerdings zum finalen Untersuchungstermin nach 3 Wochen Reperfusion in eine signifikant erniedrigte Auswurffraktion mündete (BC+/EC+: $28.81 \pm 1.72\%$ vs. BC-/EC+ $36.38 \pm 3.0\%$; * $p < 0.5$). Des Weiteren konnte nach 3 Wochen Reperfusion eine erniedrigte Auswurffraktion mit $26.38 \pm 3.00\%$ gegenüber der 24 h post Ischämie gemessenen Auswurffraktion ($46.34 \pm 2.10\%$) bei den Chimären der Gruppe BC+/EC+ festgestellt werden (* $p < 0.05$). Bei den Kontrolltieren der Gruppe BC+/EC+ konnte dieser Unterschied nicht nachgewiesen werden (24 h: $52.03 \pm 1.99\%$ vs. 3 Wochen post Ischämie: $48.81 \pm 1.72\%$; n.s.).

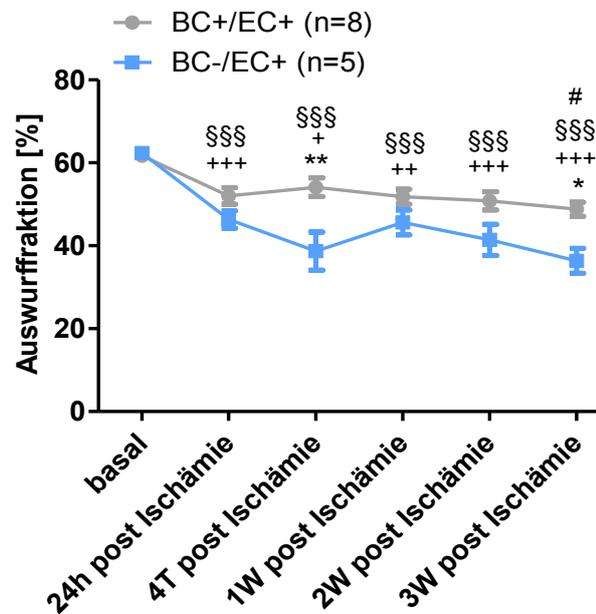


Abb. 22: Auswurffraktion im Verlauf 24 h bis zu 3 Wochen post Ischämie. Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ zeigten signifikant erniedrigte Auswurffraktion nach 4 Tagen und 3 Wochen post Ischämie. Beide Gruppen zeigten eine signifikant erniedrigte Auswurffraktion nach 24 h, 4 Tagen, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen post Ischämie im Vergleich zu den basalen Werten. Die Auswurffraktion 3 Wochen post Ischämie der Versuchstiergruppe BC-/EC+ war im Vergleich zu 24h post Ischämie signifikant erniedrigt (Mittelwert +/- SEM; BC+/EC+ vs. BC-/EC+: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, BC+/EC+ basal vs. 24 h, 4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen: + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$, BC-/EC+ basal vs. 24 h, 4Tage, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen: §§§ $p < 0,001$, BC-/EC+ 24h vs. 3 Wochen: # $p < 0,05$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.3.2 Endsystolisches Volumen (ESV)

Das endsystolische Volumen war basal in beiden Gruppen homogen (siehe Abb. 24). Abb. 23 zeigt das endsystolische Volumen im Verlauf 24 h bis zu 3 Wochen post Ischämie. Bei den BC+/EC+ Tieren vergrößerte sich das linksventrikuläre Volumen nach 24 Stunden post Ischämie signifikant im Vergleich zur Baseline (basal: 24h: $25.13 \pm 0.94 \mu\text{l}$ vs. $33.99 \pm 2.49 \mu\text{l}$; $**p < 0.01$). Nach 4 Tagen und 1 Woche pendelten sich die Volumendaten dieser Gruppe auf nicht kennzeichnende Werte ein. Zu den beiden letzten Versuchszeitpunkten nach 2 (basal: 24h: $25.13 \pm 0.94 \mu\text{l}$ vs. 2 Wochen post Ischämie $33.40 \pm 2.86 \mu\text{l}$; $*p < 0.05$) sowie 3 Wochen (basal: 24 h: $25.13 \pm 0.94 \mu\text{l}$ vs. $33.57 \pm 2.18 \mu\text{l}$; $**p < 0.01$) war erneut eine zunehmende signifikante Verschlechterung des endsystolischen Volumens im Vergleich zur Baseline zu beobachten.

Die BC-/EC+ Mäuse zeigten zwar auch eine leichte Verbesserung zum Zeitpunkt 1 Woche auf, hatten jedoch zu allen Versuchszeitpunkten post Ischämie ein signifikant vergrößertes endsystolisches Volumen im Vergleich zum basalen Volumen von $25.10 \pm 1.24 \mu\text{l}$ (24h: $39.10 \pm 2.19 \mu\text{l}$; $***p < 0.001$; 4 Tage: $44.80 \pm 5.21 \mu\text{l}$; $***p < 0.001$; 1 Woche: $38.86 \pm 2.64 \mu\text{l}$; $**p < 0.01$; 2 Wochen: $51.66 \pm 7.77 \mu\text{l}$; $***p < 0.001$; 3 Wochen: $53.22 \pm 5.93 \mu\text{l}$; $***p < 0.001$). Zusätzlich konnte in der gleichen Gruppe (BC-/EC+) eine signifikante Vergrößerung des endsystolischen Volumens nach 2 Wochen von $51.66 \pm 7.77 \mu\text{l}$ bzw. nach 3 Wochen von $53.22 \pm 5.92 \mu\text{l}$ im Vergleich zu den Volumendaten nach 24 h ($39.10 \pm 2.19 \mu\text{l}$; $**p < 0.01$) bzw. 1 Woche ($44.80 \pm 5.21 \mu\text{l}$; $**p < 0.01$) festgestellt werden.

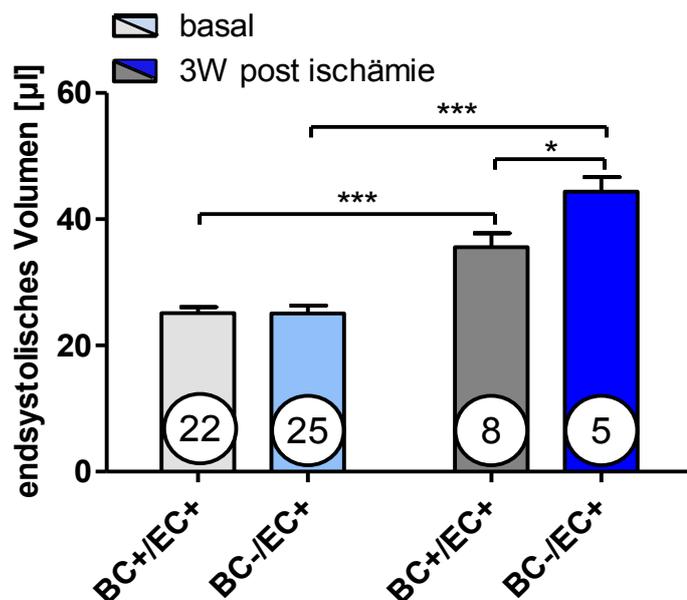


Abb. 23: Endsystolisches Volumen basal und 3 Wochen post Ischämie. Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ zeigten nach 3 Wochen post Ischämie ein vergrößertes endsystolisches Volumen im Vergleich zu den BC+/EC+ Kontrolltieren. Das endsystolische Volumen hat sich bei beiden Gruppen nach 3 Wochen Reperfusion im Vergleich zu den basalen Werten signifikant vergrößert (Mittelwert +/- SEM; *p < 0,05; **p < 0,01 getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

Ähnlich wie bei den EF-Daten zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Versuchsgruppen erst nach 4 Tagen (BC-/EC+: $44.80 \pm 5.21 \mu\text{l}$ vs. BC+/EC+ $29.52 \pm 1.76 \mu\text{l}$; *p < 0.05). Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ hatten ein signifikant vergrößertes endsystolisches Volumen als die BC+/EC+-Gruppe. Durch die bereits erwähnte Verbesserung der BC-/EC+ Tiere nach einer Woche, war der Unterschied kurzfristig nicht signifikant, endete aber zum Zeitpunkt 2 Wochen (BC-/EC+: $51.66 \pm 7.77 \mu\text{l}$ vs. BC+/EC+: $33.40 \pm 2.86 \mu\text{l}$; **p < 0.01) und 3 Wochen (BC-/EC+: $53.22 \pm 5.93 \mu\text{l}$ vs. BC+/EC+ $35.57 \pm 2.18 \mu\text{l}$; **p < 0.01) in einem deutlich vergrößerten endsystolischen Volumen als die BC+/EC+ Vergleichsgruppe.

Die Daten nach 3 Wochen post Ischämie in Abb. 24 zeigen die erwartungsgemäße Vergrößerung des endsystolischen Volumens im Vergleich zu den basalen Werten in beiden Versuchstiergruppen (BC+/EC+: basal $25.13 \pm 0.94 \mu\text{l}$ vs. 3 Wochen post Ischämie $35.57 \pm 2.18 \mu\text{l}$; BC-/EC+: basal $25.10 \pm 1.24 \mu\text{l}$ vs. 3 Wochen post Ischämie $44.38 \pm 2.30 \mu\text{l}$; ***p < 0.001). Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ zeigten mit 44.38 ein signifikant vergrößertes ESV nach 3 Wochen Reperfusion im Vergleich zu der Kontrollgruppe BC+/EC+ ($35.57 \pm 2.18 \mu\text{l}$; *p < 0.05).

4 Ergebnisse

Volumen entwickelten als die BC+/EC+ Vergleichsgruppe (BC-/EC+: $86.18 \pm 8.45 \mu\text{l}$ vs. BC+/EC+: $67.33 \pm 3.57 \mu\text{l}$; * $p < 0.05$). Dieser Unterschied war nach 3 Wochen nicht mehr prägnant. Die Kontrolltiere der Gruppe BC+/EC+ zeigten nach 3 Wochen Reperfusion keine signifikanten Veränderungen des enddiastolischen Volumens im Vergleich zu den basal erhobenen Werten (basal: $69.67 \pm 1.89 \mu\text{l}$ vs. 3 Wochen post Ischämie $69.13 \pm 2.59 \mu\text{l}$; n.s.) (siehe Abb. 25 und Abb. 26).

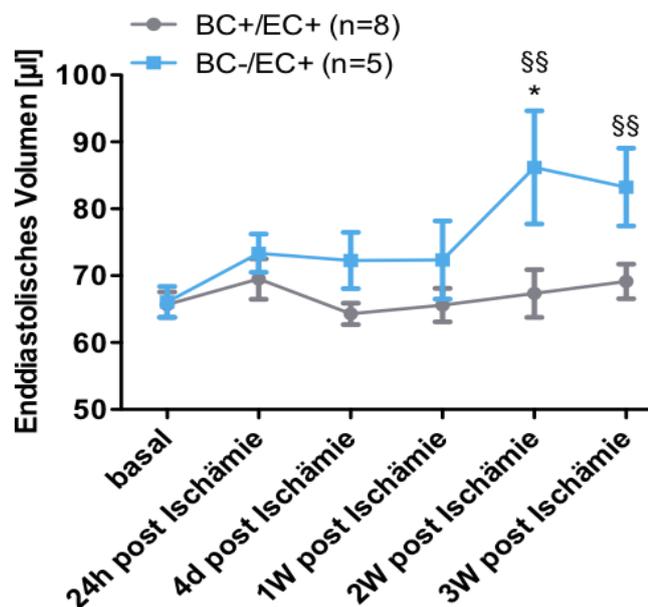


Abb. 25: Enddiastolisches Volumen im Verlauf 24h bis zu 3 Wochen post Ischämie. Die Versuchstiergruppe BC-/EC+ zeigte ein signifikant erhöhtes enddiastolisches Volumen nach 2 Wochen Reperfusion im Vergleich zu den Kontrolltieren BC+/EC+. Das enddiastolische Volumen war bei den Chimären der Gruppe BC-/EC+ nach 2 Wochen und 3 Wochen post Ischämie im Vergleich zu den basalen Werten signifikant erhöht (Mittelwert +/- SEM; BC+/EC+ vs. BC-/EC+: * $p < 0,05$, BC-/EC+ basal vs. 2 Wochen und 3 Wochen: §§ $p < 0,01$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

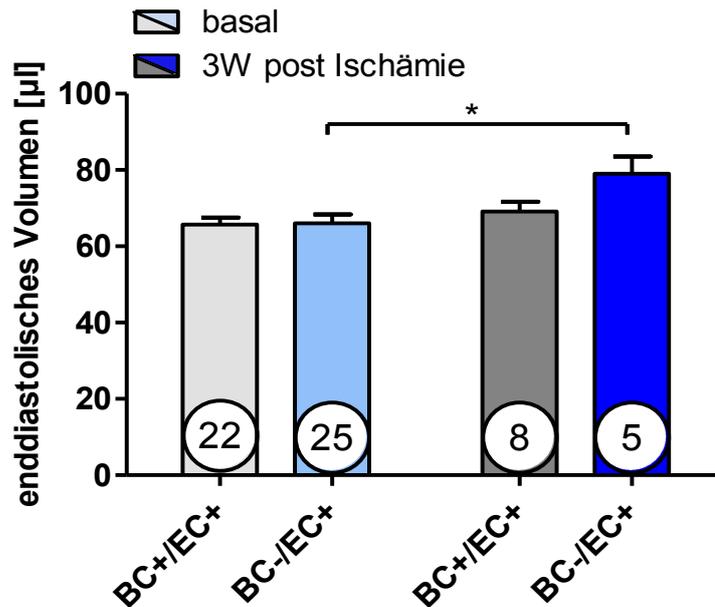


Abb. 26: Enddiastolisches Volumen basal und nach 3 Wochen Reperfusion. Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ zeigten nach 3 Wochen post Ischämie ein vergrößertes enddiastolisches Volumen im Vergleich zu den basalen Werten. (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.4 Invasive Druck-Volumen Messung mittels Millar-Katheter

4.4.1 Mittlerer arterieller Druck in der Aorta

Die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks wurde in der *Aorta ascendens* mittels eines Millar Druck/Volumen Katheters in der Aorta aufgezeichnet. Wie aus Abb. 27 zu entnehmen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen nach 3 Wochen Reperfusion. Die Chimären der Gruppe BC-/EC+ hatten eine signifikante Reduktion des mittleren Drucks im Vergleich zu den Tieren der Gruppe BC+/EC+ (BC-/EC+: 43.32 ± 2.47 mmHg vs BC+/EC+: 58.59 ± 1.73 mmHg; *** $p < 0,001$). Diese Erniedrigung des mittleren arteriellen Druckes zeigten Schein-operierte Chimäre der Gruppe BC-/EC+ mit 61.25 ± 2.87 mmHg (n=5) 3 Wochen post Ischämie nicht.

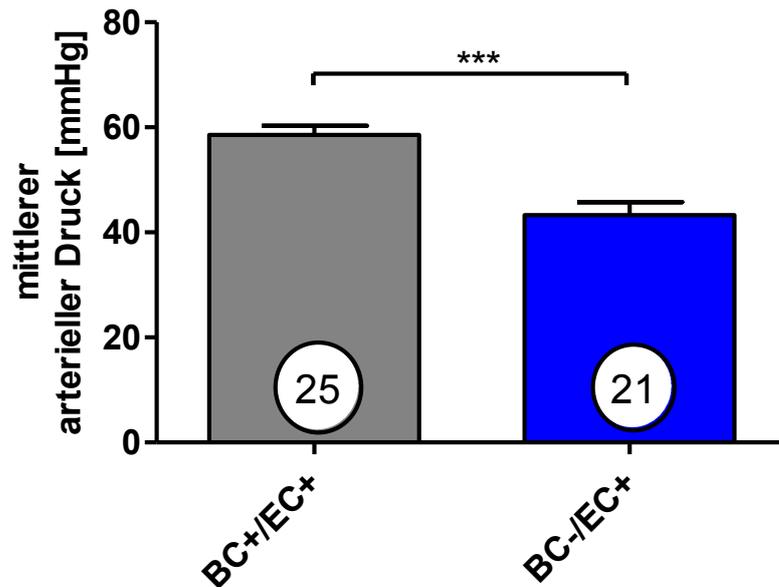


Abb. 27: Mittlerer arterieller Druck nach 3 Wochen Reperfusion. Die BC-/EC+ Versuchstiergruppe zeigte einen signifikant erniedrigten mittleren arteriellen Druck im Vergleich zu den Kontrolltieren BC+/EC+. (Mittelwert +/- SEM; *** $p < 0,001$, parametrisch getestet).

4.4.2 Druckwerte des linken Ventrikels

3 Wochen post Ischämie wurde in beiden Gruppen die LV-Funktion mittels Druck/Volumen Katheter untersucht. Bei der Erfassung der Druckwerte des linken Ventrikels standen folgende Messwerte im Fokus des Versuchs: linksventrikulärer Druck (LVDP in mmHg), maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur (dP/dt_{max} in mmHg/sec), maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit der Herzmuskulatur (dP/dt_{min} in mmHg/sec).

In beiden Versuchstiergruppen wurden die Ergebnisse nach 3 Wochen Reperfusion als Basalwert und nach Applikation von Katecholamin (Noradrenalin) erhoben.

4.4.2.1 Linksventrikulärer Druck (LVDP)

In Abb. 28 sind die Mittelwerte und Standardfehler des linksventrikulär entwickelten Druckes dargestellt. Beide Versuchstiergruppen zeigten bei Katecholamin-Gabe einen signifikanten Anstieg des linksventrikulären Druckes. Bei den BC+/EC+ Gruppe betrug dieser Anstieg 14.7% von 83.24 ± 3.187 mmHg auf 97.58 ± 2.108 mmHg ($***p < 0,001$) und die Chimären der Gruppe BC-/EC+ hatten einen augenscheinliches Wachstum von etwa 19.68 % ($67.47 \pm 1,77$ mmHg vs 84.00 ± 3.093 ; $***p < 0,001$). Bei den LVDP-Werten fiel des Weiteren auf, dass die BC-/EC+ Tiere basal nach 3 Wochen Reperfusion als auch nach Katecholamin Gabe signifikant niedrigere Drücke entwickelten als die BC+/EC+ Mäuse. Basal entwickelten die Chimären der Gruppe BC-/EC+ einen signifikant erniedrigten linksventrikulären Druck von 67.47 ± 1.77 mmHg im Vergleich zu den BC+/EC+ Kontrolltieren mit einem Druck von 83.24 ± 3.187 mmHg ($***p < 0.001$). Nach Noradrenalin Applikation blieb erwartungsgemäß dieser Unterschied signifikant (BC-/EC+: 84.00 ± 3.093 vs. mmHg BC+/EC+: 97.58 ± 2.108 mmHg; $***p < 0,001$)

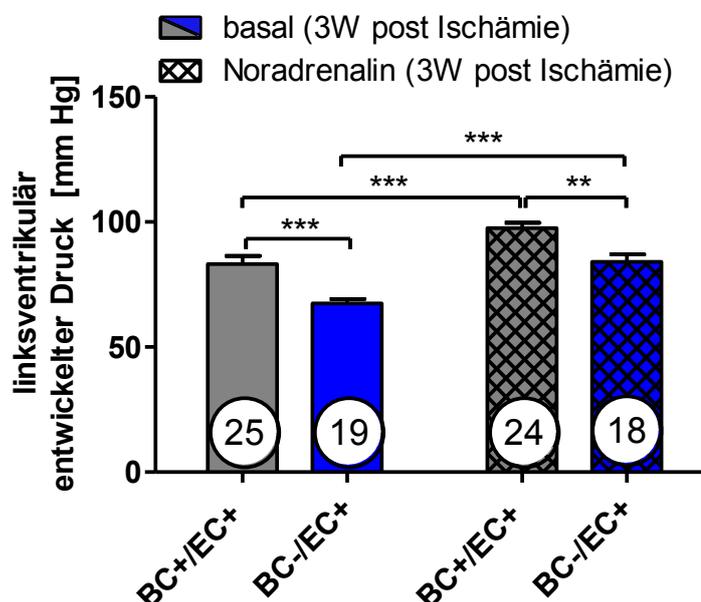


Abb. 28: Linksventrikulärer Druck nach 3 Wochen Reperfusion. Die Versuchstiergruppe BC-/EC+ zeigten signifikant erniedrigten linksventrikulären Druck basal als auch nach Katacholamingabe im Vergleich zu den Kontrolltieren BC+/EC+ nach 3 Wochen Reperfusion. Beide Gruppen zeigten nach Katecholamin-Gabe einen signifikanten erhöhten linksventrikulären Druck im Vergleich zu den basalen Werten (Mittelwert +/- SEM; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.4.2.2 Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max})

Nach 3 Wochen Reperfusion wurde in beiden Gruppen neben der LVDP die maximale Druckanstiegs- und Erschlaffungsgeschwindigkeit (3.4.2.3) als Basalwert und nach Katecholamin-Gabe Noradrenalin analysiert.

Die EC-/BC+ Versuchstiergruppe hatte basal eine signifikant schwächere Kontraktilität als die EC+/BC+ Vergleichsgruppe (BC-/EC+: 5933 ± 345 mmHg/s vs. BC+/EC+: 7485 ± 399 mmHg/s; * $p < 0.5$). Dieser Unterschied war nach Applikation von Noradrenalin nicht mehr kennzeichnend (BC-/EC+: 9054 ± 568 mmHg/s vs BC+/EC+: 10019 ± 452 mmHg/s). Nachweislich zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg der dP/dt_{max} nach Gabe von Katecholaminen (Noradrenalin) (BC-/EC+: basal 5933 ± 345 mmHg/s vs Noradrenalin 9054 ± 568 mmHg/s; BC+/EC+: basal 7485 ± 399 mmHg/s vs. Noradrenalin 10019 ± 452 mmHg/s; *** $p < 0.001$) (siehe Abb. 29).

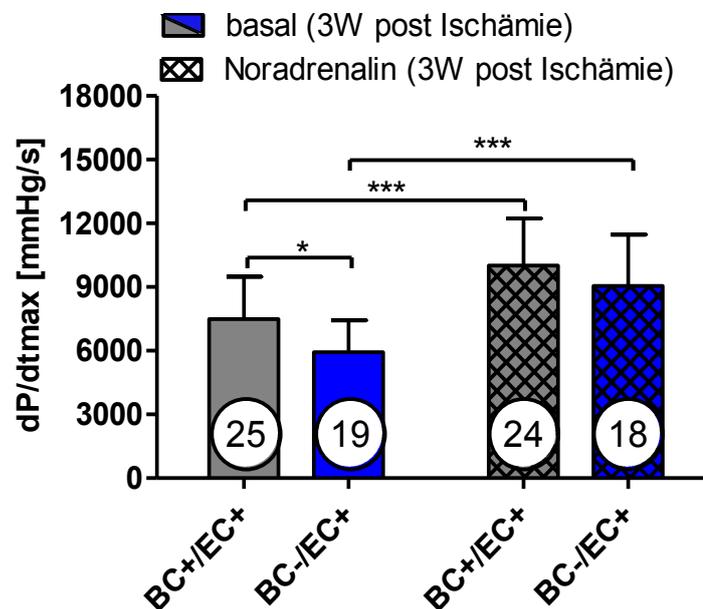


Abb. 29: Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) der Herzmuskulatur nach 3 Wochen Reperfusion. Chimäre der Gruppe BC-/EC+ zeigten signifikant erniedrigte maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Tieren der Gruppe BC+/EC+ nach 3 Wochen Reperfusion. Beide Gruppen zeigten nach Katecholamin-Gabe eine signifikante erhöhte maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im Vergleich zu den basalen Werten (Mittelwert +/- SEM; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.4.2.3 Maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit (dP/dt_{min})

Die Daten der maximalen Erschlaffungsgeschwindigkeit waren analog zu den LVDP- und dP/dt_{max} -Ergebnissen (siehe Abb. 30).

Auch hier hatten die Chimären der Gruppe BC-/EC+ Tieren 3 Woche post Ischämie mit -4242 ± 185 mmHg/s signifikant niedriger dP/dt_{min} im Vergleich zu den BC+/EC+ Mäusen (-5634 ± 234 mmHg/s; $***p < 0.001$). Im Gegensatz zu den dP/dt_{max} -Daten blieb dieser Unterschied auch nach Katcholamin-Gabe signifikant (BC-/EC+: -5856 ± 373 mmHg/s vs. BC+/EC+: -6734 ± 207 mmHg/s; $*p < 0.5$). Die BC-/EC+ Mäuse zeigten nach Noradrenalin-Applikation einen signifikanten Anstieg um etwa 27.56% im Vergleich zu den Basalwerten (-4242 ± 185 mmHg/s vs. -5856 ± 373 mmHg/s; $***p < 0.001$). Bei der BC-/EC+ Vergleichsgruppe betrug der signifikante Anstieg der maximalen Erschlaffungsgeschwindigkeit circa 16.34% von -5634 ± 234 mmHg/s auf -6734 ± 207 mmHg/s ($**p < 0.01$).

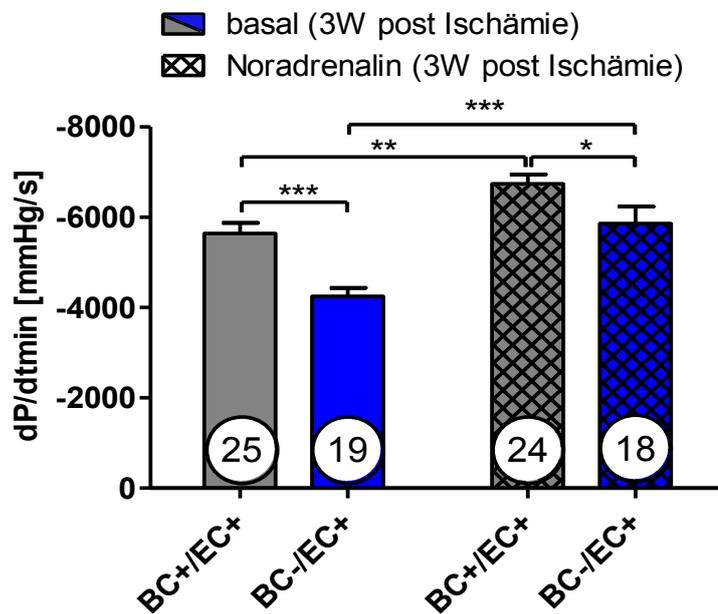


Abb. 30: Maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) der Herzmuskulatur nach 3 Wochen Reperfusion. Chimäre der Gruppe BC-/EC+ zeigten basal sowie auch nach Katecholamin-Gabe signifikant erniedrigte maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Tieren der Gruppe BC+/EC+ nach 3 Wochen Reperfusion. Beide Gruppen zeigten nach Katecholamin-Gabe eine signifikante erhöhte maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit im Vergleich zu den basalen Werten (Mittelwert \pm SEM; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.5 Verformbarkeit der Erythrozyten

Die Verformbarkeit der Erythrozyten der Chimären der Gruppe BC-/EC+ und der Vergleichsgruppe BC+/EC+ wurden bei einer Scherrate von 2,68 basal und 3 Wochen post Ischämie miteinander verglichen. Die resultierenden Elongationsindizes sind in nachfolgender Abb. 31 grafisch dargestellt.

Beide Gruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu der jeweiligen Baseline (BC+/EC+: basal 0.380 ± 0.014 vs. 3 Wochen post Ischämie 0.378 ± 0.004 ; BC-/EC+: basal 0.352 ± 0.007 vs. 3 Wochen post Ischämie 0.338 ± 0.017 ; * $p < 0.05$) (siehe Abb. 31). Es stellte sich heraus, dass bereits vor Einleitung der Ischämie die BC-/EC+ Tiere tendenziell eine eingeschränkte Verformbarkeit als die BC+/EC+ Mäuse aufwiesen. Nach 3 Wochen post Ischämie war die Verformbarkeit bei einer Scherrate von 2.68 des BC-/EC+ Blutes signifikant geringer als bei der BC+/EC+ Vergleichsgruppe (BC+/EC+: 0.383 ± 0.00 vs. BC-/EC+: 0.338 ± 0.017 ; * $p < 0.05$).

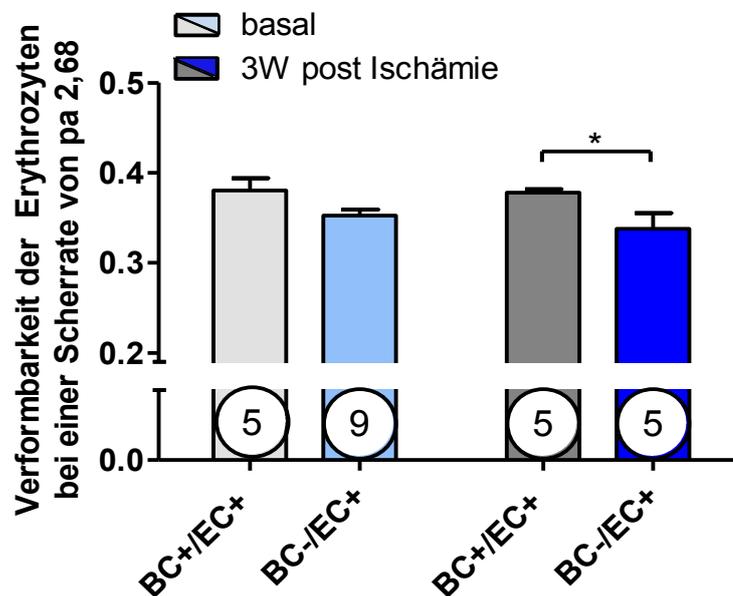


Abb. 31: Verformbarkeit der Erythrozyten basal und nach 3 Wochen Reperfusion. Die Chimäre der Gruppe BC-/EC+ zeigten eine signifikant erniedrigte Verformbarkeit der Erythrozyten im Vergleich zu der Kontrollgruppe BC+/EC+ (Mittelwert \pm SEM; * $p < 0,05$, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

4.6 Differentialblutbild nach 3 Wochen Reperfusion

In beiden Versuchstiergruppen wurde Vollblut entnommen und mittels VetABC CLASSIC (siehe Kap. 2.10) Differentialblutbilder erstellt. Besonderes war hierbei die Betrachtung der Leukozyten-, Erythrozyten-, Monozyten- und Lymphozytenzahl pro mm^3 Blut vor (basal) und 3 Wochen post Ischämie.

Thrombozyten- und Granulozyten-Spiegel waren in beiden Gruppen unauffällig. Wie aus Abb. 32 zu entnehmen ist zeigte sich weder basal noch nach drei Wochen Reperfusion eine signifikante Veränderung zwischen den BC+/EC+ und BC-/EC+ Tieren. Nach 3 Wochen Reperfusion zeigten beide Gruppen signifikant erhöhte Erythrozyten- (BC+/EC+: basal $8.09 \pm 0.13 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $10.08 \pm 0.18 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; BC-/EC+: basal $8.15 \pm 0.14 \cdot 10^6/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $9.92 \pm 0.30 \cdot 10^6/\text{mm}^3$; *** $p < 0.001$) und Leukozytenzahlen (BC+/EC+: basal $2.95 \pm 0.25 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $6.00 \pm 0.70 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; BC-/EC+: basal $0.974 \pm 0.074 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $6.93 \pm 0.97 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; *** $p < 0.001$) im Vergleich zu den basalen Ausgangswerten. Die angestiegene Leukozytenzahl war auch auf eine signifikante Erhöhung der Lymphozyten (BC+/EC+: basal $0.974 \pm 0.074 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $3.00 \pm 0.41 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; BC-/EC+: basal $1.364 \pm 0.20 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $3.85 \pm 0.62 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; *** $p < 0.001$) und Monozyten (BC+/EC+: basal $0.13 \pm 0.01 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $0.40 \pm 0.05 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; BC-/EC+: basal $0.193 \pm 0.02 \cdot 10^3/\text{mm}^3$ vs. 3 Wochen post Ischämie $0.51 \pm 0.07 \cdot 10^3/\text{mm}^3$; *** $p < 0.001$) zurückzuführen. Die Gruppen waren zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant unterschiedlich.

4 Ergebnisse

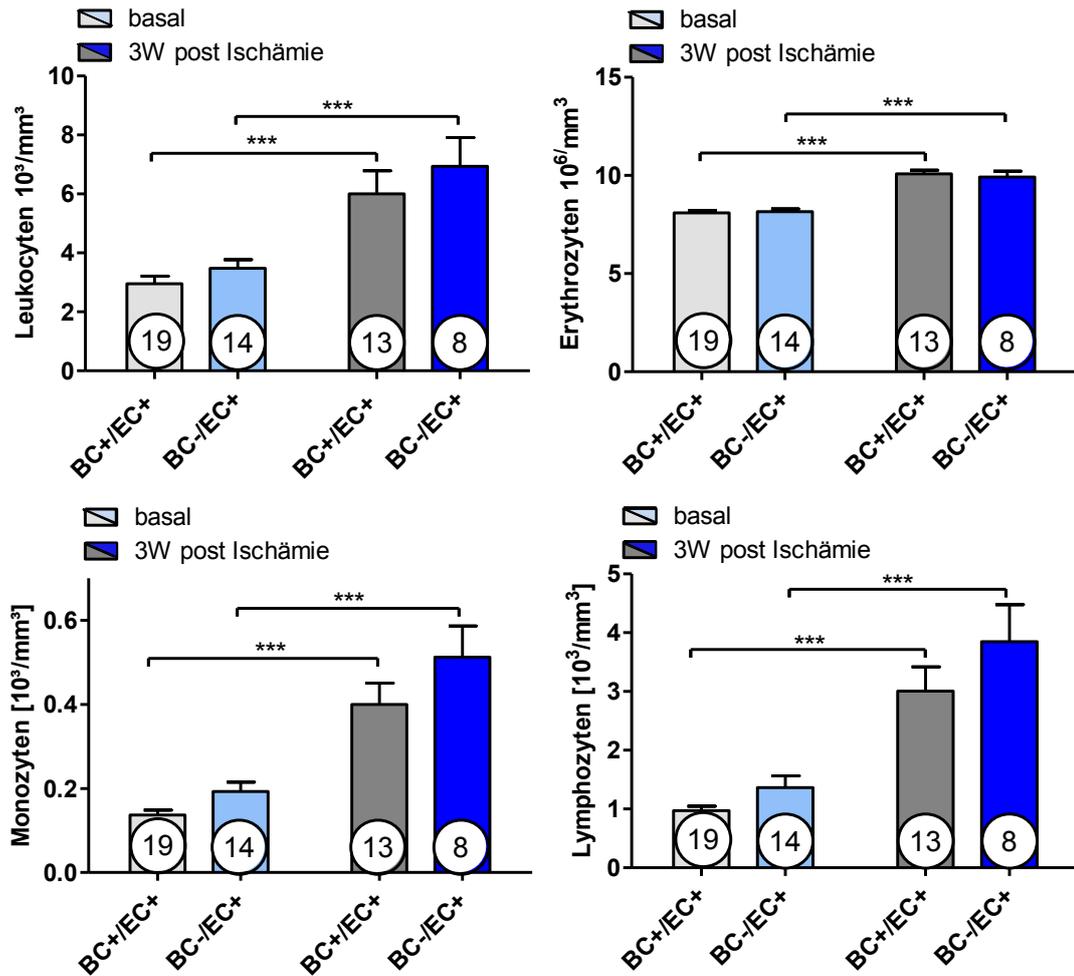


Abb. 32: Differentialblutbild basal und nach 3 Wochen Reperfusion. Beide Gruppen zeigten in Folge der I/R nach 3 Wochen signifikant erhöhte Leukozyten (Lymphozyten und Monozyten) und Erythrozyten im Vergleich zu den basalen Werten (Mittelwert +/- SEM; ***p<0,001, getestet mittels zweifaktorieller ANOVA).

5 Diskussion

Der akute Myokardinfarkt mit konsekutiver linksventrikulärer Dysfunktion und linksventrikulären *Remodeling* ist am häufigsten ursächlich für Morbidität und Mortalität in der kardiovaskulären Medizin. NOS3 synthetisiertes NO spielt eine kardio- und vasoprotektive Rolle beim myokardialen Ischämie-/ Reperfusionsschaden. NOS3 wurde auf einer Vielzahl von zirkulierenden Blutzellen nachgewiesen. Erythrozyten machen den größten Anteil davon aus [180] und spielen somit eine essentielle Rolle an der Modulation der NO-Bioverfügbarkeit.

Ziel dieser Arbeit war es die hämodynamischen und molekularbiologischen Auswirkungen der erythrozytären NOS auf den chronischen I/R-Schaden zu untersuchen. Der Nachweis wurde an chimären Mäusen erbracht. Hierzu wurde ein Mausmodell mit deletierter erythrozytärer NOS und intakter endothelialer NOS (BC-/EC+), mit einer Kontrollgruppe, welche eine intakte erythrozytäre und endotheliale NOS (BC+/EC+) aufwies, verglichen.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die erythrozytäre Stickstoffmonoxid Synthese:

1. reduziert die Infarktgröße
2. verbessert die Qualität des kardialen *Remodeling*
3. stabilisiert die linksventrikuläre Pumpfunktion
4. erhöht die Erythrozytenverformbarkeit

Im Folgenden soll zunächst auf die Methoden im Vorfeld der Ischämie Induktion eingegangen werden. Anschließend werden die einzelnen Ergebnisse 3 Wochen nach Ischämieinduktion diskutiert. Hieraus folgt die Analyse des klinischen Zusammenhanges zwischen der eryNOS und dem Einfluss auf lokale myokardiale und systemische Veränderungen.

5.1 Evaluation der Methodik vor Ablauf der Ischämie Induktion

Im Zentrum dieser Arbeit waren die Versuchsergebnisse, die im Verlauf der Ischämie-Induktion bei chimären Mäusen generiert wurden. Hierfür wurde das „*closed chest*“ Modell gewählt, welches eine Ischämie-Induktion bei geschlossenem Thorax ermöglichte. Neben der Ischämie-Induktion wurden die Versuchstiere keinem zusätzlichen Operationsstress ausgesetzt. Nachteilige Nebeneffekte, wie beispielsweise Wundinfekte nach Thorakotomie, wurden vermieden. Es konnten fokussiert Rückschlüsse auf inflammatorische Prozesse im Rahmen der Ischämie gezogen werden.

Die Versuchsreihe begann mit der Generierung der Chimären. Hierbei wurde Knochenmark der Empfängermäuse durch Bestrahlung zerstört und eNOS^{-/-} *Knock-Out* Spenderknochenmark transplantiert. Aufgrund desselben genetischen Hintergrundes (C57BL/6), konnte eine Abstoßungsreaktion, im Sinne einer *graft versus host* Reaktion (GVHD), vermieden werden. Durch die Transplantation entstanden transgene Mäuse mit deletierter Blutzell NOS und intakter endothelialer NOS, im Folgenden als BC-/EC+ bezeichnet. Aus diversen Publikationen ist bekannt, dass Blutzellen ein eNOS ähnliches Enzym produzieren. Sie ist in Thrombozyten [133-135], B- und T-Lymphozyten [132], Eosinophile [136], Neutrophile und Erythrozyten [180, 186] nachzuweisen. Neutrophile, welche 30-60 % der Leukozyten ausmachen, produzieren im unreifen Stadium eine eNOS. Eine NOS-Aktivität im reifen Zustand wird kontrovers diskutiert [270]. Neben Leukozyten und Thrombozyten stellen die Erythrozyten den weitaus größten Anteil an Blutzellen dar [180]. Phänotypische Veränderungen der BC-/EC+-Gruppe waren somit überwiegend auf die Deletion der erythrozytären NOS zurückzuführen, da die restliche Blutzell-NOS nur einen geringen Anteil darstellte.

Zwecks Detektion von Inflammation mit Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion, wurden vor jeder Versuchsreihe Chimäre und Kontrollgruppen gekennzeichnet und echokardiografisch sowie hämatologisch untersucht. Basal zeigten sich in den Differentialblutbildern weder bei der BC-/EC+ -Versuchsgruppe noch bei der BC+/EC+-Kontrollgruppen Zeichen einer Inflammation. Auffällig war eine nicht signifikante Erhöhung der Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten bei

der Versuchsgruppe mit deletierter eryNOS. Die Differentialblutbilder und echokardiografischen Daten vor Versuchsbeginn stimmten mit dem äußerlichen Erscheinungsbild überein. Beide Versuchstiergruppen zeigten keine Anzeichen einer Erkrankung, sodass von keiner Beeinflussung der Ergebnisse durch die Transplantation ausgegangen werden konnte.

Der Nachweis einer erfolgreichen Knochenmarktransplantation wurde bei allen Tieren nach jeder Versuchsreihe erbracht. Hierbei wurde das *knock-out* Allel nach Transplantation im Blut der Schwanzspitze bestätigt. Dazu wurde genomische Desoxyribonukleinsäure (gDNS) aus den Blutzellen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt und in der Gelelektrophorese nachgewiesen. Da Erythrozyten und Thrombozyten keinen Nukleus besitzen und die Produktion von eNOS in Neutrophilen nicht eindeutig geklärt ist [270], musste der Nachweis indirekt über Eosinophile und B- und T-Lymphozyten erbracht werden [132, 136]. Die chimäre Gruppe BC-/EC+ zeigte trotz letaler Strahlendosis Spuren von Empfängerzellen. Dafür kann es zwei Ursachen geben: 1. ist nicht auszuschließen, dass Empfängerzellen die Transplantation überlebt haben [271] und 2. könnten zum Zeitpunkt des Allel-Nachweises noch nicht alle Blutzellen vollständig durch das Spenderknochenmark ersetzt worden sein. T- und B-Lymphozyten zeigen die längsten Anpassungsmuster bis sie vollständig ersetzt werden [272]. Nach etwa 4-5 Wochen Rekonvaleszenz sind bis auf B- und T-Zellen alle myeloiden Blutzellen durch das Spenderknochenmark ersetzt [273]. Der Anteil der vom Empfängerknochenmark stammenden Zellen war nur sehr gering und entsprach anderen Transplantations-Studien [271, 272]. Die Streuung wurde bei der Erfassung der Daten berücksichtigt und stellte somit keinen Zweifel am Erfolg des Versuchsmodells dar.

5.2 Der lokale myokardiale Einfluss der eryNOS auf den chronischen I/R Schaden

Die Rolle der erythrozytären NO-Synthase bei chronischen I/R Schaden wurde nach einer 60 minütigen Ischämie mit einer darauf folgenden 3 wöchigen Reperfusionphase analysiert. Für die Dauer der Ischämie-Induktion sind in der Literatur verschiedene Zeitangaben publiziert. Häufig wird eine Ischämiedauer von

5 Diskussion

etwa 30 Minuten bevorzugt, um reversibel geschädigte Zellen im Myokard zu erhalten und sie auf Therapiemöglichkeiten hin zu untersuchen [274]. Durch die 60 minütige Ischämiedauer wurde der Anteil der irreversibel geschädigten Zellen erhöht und damit der Schwerpunkt auf die *Remodeling* Vorgänge nach I/R gelegt [275]. Im Fokus standen hierbei die Veränderungen der linksventrikulären Pumpfunktion im Verlauf von 24 Stunden, 4 Tagen, 1 Woche, 2 Wochen und 3 Wochen sowie Infarktgröße, Qualität des linksventrikulären *Remodeling*, arterieller Blutdruck und Erythrozytenverformbarkeit zum Zeitpunkt 3 Wochen nach Ischämie-Induktion.

Die histologische Auswertung zeigte signifikant vergrößerte Infarkte bei den Versuchstieren ohne eryNOS im Vergleich zur Kontrollgruppe mit intakter endothelialer und erythrozytärer NOS. In der frühen Reperfusionphase heften sich Neutrophile an das koronare Gefäßendothel und setzen proteolytische Enzyme und ROS frei [276, 277]. Je mehr Neutrophile aktiviert werden, desto größer ist der Infarkt. NO hemmt die Neutrophilenadhäsion [278], die Freisetzung von ROS und die Leukozytenakkumulation [279, 280], sodass die Vermutung der protektiven Rolle von eryNOS beim chronischen *Remodeling* bestätigt werden konnte.

Neben der Infarktgröße wurde auch die Qualität des *Remodeling* nach 3 Wochen Reperfusion betrachtet. Nach myokardialer Schädigung im Rahmen der Ischämie/Reperfusion kommt es zu reparativen Umbauvorgängen mit Ausbildung einer kollagenhaltigen Narbe. Nekrotische Myozyten werden durch Kollagen ersetzt. Kollagene der kardialen extrazellulären Matrix beeinflussen wesentlich die kardiale Struktur und Funktion. Den Hauptanteil an der extrazellulären kollagenen Matrix machen Typ I und III aus [281]. Typ IV befindet sich in der Basalmembran der Kardiomyozyten [281, 282]. Ein erhöhter Anteil an den Kollagenen I, II und IV ist mit negativem *Remodeling* und damit verbundener linksventrikulärer Dysfunktion assoziiert [283, 284]. Die Versuchstiergruppe mit deletierten eryNOS zeigte eine verstärkte Einlagerung von Kollagen I und III in der Infarktzone. Zusammenfassend kann aus den histologischen Ergebnissen postuliert werden, dass die erythrozytäre NOS einen signifikanten Beitrag an der NO-Bioverfügbarkeit leistet und nicht durch die endotheliale NOS kompensiert werden kann. Ohne eryNOS waren nicht nur die Infarkte signifikant vergrößert

5 Diskussion

sondern auch das negative linksventrikuläre *Remodeling* nach chronischem I/R Schaden.

Die Daten aus der Histologie konnten in den echokardiografischen Verlaufsdaten bestätigt werden. Analysiert wurden die Auswirkungen einer deletierten NOS im Rahmen des chronischen I/R Schadens auf die linksventrikuläre Funktion. Valide Parameter hierfür waren die Auswurffraktion (EF), endsystolisches (ESV) und enddiastolisches Volumen (EDV) im Verlauf 24 Stunden, 4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen und nach 3 Wochen post Ischämie. Nach Ischämie/ Reperfusion kommt es durch die Substitution von nekrotischen Kardiomyozyten durch Kollagen zu einem topografischen Umbau im infarzierten und nicht infarzierten Myokard. Dieses *Remodeling* hat wesentlichen Einfluss auf die Funktion des Ventrikels und die weitere Prognose. Es resultiert eine nicht kontraktile kollagenhaltige Narbe die mit einer diastolischen Dysfunktion und kompensatorischer Vergrößerung des Ventrikelvolumens einhergeht. Bei Patienten mit linksventrikulärer Dysfunktion sind EF, ESV und EDV potente Parameter für das klinische *Outcome* [285, 286]. EDV ist ein Indikator für die linksventrikuläre Größe und quantifiziert das Ausmaß des negativen kardialen *Remodeling* [287]. Bereits nach 24 Stunden war aufgrund von topografischen Umbauvorgängen und myokardialem *Stunning* [288], eine aussagekräftige Einschränkung beider Tiergruppen im Vergleich zur Baseline festzustellen. Die EF war bei den Tieren ohne eryNOS im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant nach 4 Tagen und 3 Wochen erniedrigt. Ähnliches zeigte sich bei der Betrachtung der ESV und EDV Daten. Das Histologische Bild wurde in den echokardiografischen Untersuchungen validiert. Ohne eryNOS resultierten signifikante vergrößerte ESV und EDV Daten zwischen beiden Gruppen nach 4 Tagen und 3 Wochen post Ischämie. Die eruierten Daten bestätigten das subjektive Bild während der echokardiografischen Untersuchung. Die Gruppe ohne eryNOS zeigte deutlichere linksventrikuläre Verformungen und erniedrigte Kontraktilität. Der kardiale Apex war viel stärker aufgebläht und die Wand war dünner als bei den Tieren mit intakter erythrozytärer und endothelialer NOS. Auffällig in beiden Gruppen war die Verbesserung der LV Funktion nach 4 Tagen auf die eine deutliche Verschlechterung nach 2 Wochen folgte. Das ist mit dem Übergang von der frühen post Infarkt Phase auf die späte Phase zu erklären. Die frühe Phase beginnt wenige Stunden nach der Ischämie und kann bis zu 2 Wochen andauern [289, 290]. Die frühe Phase ist mit unterschiedlichen

5 Diskussion

komplexen topografischen Veränderungen assoziiert. Durch den Einbau einer nicht kontraktiven Narbe in der Infarktzone verstärken sich Druck und Volumen im linken Ventrikel, was eine Volumenzunahme des linken Ventrikels zur Folge hat. Trotz eingeschränkter Kontraktilität kann in dieser Phase, durch den Frank-Starling Mechanismus ein relativ normales Herzminutenvolumen aufrecht erhalten werden [290], sodass postuliert werden kann, dass die frühe post Ischämie Phase positive Auswirkungen auf das Überleben nach ischämischen Myokardinfarkt hat. Ab dem Zeitpunkt 1-2 Wochen beginnt die späte post Infarkt Phase. Durch die andauernde verstärkte Volumenbelastung werden die Myozyten gedehnt und es resultiert ein ekzentrisch dilatierter Ventrikel. Die Sarkomerlänge verlängert sich über den Grenzwert von 2,6 μm , sodass Aktin und Myosin Filamente nicht mehr überlappen können. In Folge dessen nehmen die Spannungsentwicklung und die Kontraktion ab. Der Frank-Starling Mechanismus kann nicht mehr greifen und es kommt zu einer progressiven Ventrikeldilatation, was sich negativ auf das *Outcome* auswirkt. Die vorliegenden Daten bestätigen die Annahme, dass sich die erythrozytäre NOS kardioprotektiv auf die linksventrikuläre Funktion und das negative *Remodeling* mit konsekutiver Herzinsuffizienz in der späten Infarkt Phase auswirkt.

Der Goldstandard für die Erfassung der Parameter der linksventrikulären Pumpfunktion ist die invasive Druck-/Volumenmessung [287]. Es wurde der Einfluss der erythrozytären NOS auf den linksventrikulären Druck (LVDP) sowie die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität und die maximale Erschlaffungsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) als Indikator für die diastolische Funktion analysiert. Alle Parameter wurden nach 3 Wochen Reperfusion mit und ohne Gabe von Noradrenalin verglichen. Es zeigte sich bei allen drei Kenngrößen ein signifikanter protektiver Einfluss der eryNOS. Die Echokardiografie Daten konnten bestätigt werden. Es stellte sich heraus, dass ohne eryNOS ein verstärktes negatives *Remodeling* mit schlechterer Kontraktilität und verstärkter diastolischer Dysfunktion resultiert. Der signifikante Unterschied zwischen beiden Gruppen blieb nach Gabe von Noradrenalin nur bei der Betrachtung der Kontraktilität (LVDP und dP/dt_{max}) bestehen. Noradrenalin verengt die Widerstands- und Kapazitätsgefäße, sodass sich der *Afterload* erhöht. Ein erhöhter *Afterload* führt zu einer stärkeren Füllung in der darauf folgenden Diastole, die im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus die

Vorspannung der Sarkomere intensiviert und dadurch den Verlust der eryNOS in Teilen ausgleichen kann. Dennoch ist ein deutlicher Trend bei den Tieren ohne eryNOS zu erkennen. Bei der maximalen Erschlaffungszeit scheint das negative *Remodeling* nach 3 Wochen Reperfusion schon so weit fortgeschritten zu sein, dass Noradrenalin-Gabe die Deletion der eryNOS nicht mehr ausgleichen kann. Die diastolische Dysfunktion ist bei den Tieren ohne eryNOS im Vergleich zu der Kontrollgruppe schon zu weit fortgeschritten.

5.3 Der systemische Einfluss der eryNOS auf den chronischen I/R Schaden

Im Anschluss an die Analyse der Relevanz der erythrozytären NOS auf lokale myokardiale Veränderung nach Ischämie/ Reperfusion wurde der systemische Einfluss ausgewertet. Im Fokus standen in diesem Fall die Modulation des arteriellen Blutdruckes und des Differentialblutbildes.

Die Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes wurde in der *Aorta ascendens* mittels eines Millar Druck/Volumen Katheters in der Aorta aufgezeichnet. Sinngemäß korrelierten die Werte mit denen aus der LVDP Messung. Damit der linke Ventrikel Blut in den Körperkreislauf auswerfen kann, muss er den aortalen Druck übersteigen. Daraus folgte, dass eine Deletion der erythrozytären NOS mit einem signifikant erniedrigten mittleren arteriellen Druck assoziiert war, die nicht durch die endotheliale NOS alleine kompensiert werden konnte. Diese Feststellung unterstrich abermals die essentielle kardioprotektive Rolle, die eryNOS auf maladaptive *Remodeling* Prozesse mit assoziierter Herzinsuffizienz spielt. Die Chimären waren nach der Knochenmarktransplantation vor der Ischämie Induktion 6 Wochen rekonvaleszent. Zum Ausschluss einer Auswirkung der Erholungszeit auf den Blutdruck der Versuchstiergruppen wurden parallel schein-operierte, eryNOS deletierte Kontrollgruppen auf arterielle Blutdruckveränderungen kontrolliert. Sie durchliefen denselben Versuchsaufbau, exklusive Ischämie-Induktion. Die schein-operierten Tiere zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu der Versuchstiergruppe. Ein ausgeprägter Einfluss der Rekonvaleszenz auf den mittleren arteriellen Blutdruck konnte somit ausgeschlossen werden.

5 Diskussion

Ein systemischer Einfluss der eryNOS auf die zirkulierenden Blutzellen konnte bei der Analyse der Differentialblutbilder basal und nach 3 Wochen Reperfusion nicht signifikant detektiert werden. Zwischen beiden Versuchstiergruppen waren keine deutlichen Unterschiede in der Anzahl an Erythrozyten, Monozyten, Lymphozyten und Leukozyten nachzuweisen. Dennoch ist ein Einfluss der eryNOS nicht gänzlich ausgeschlossen. Bei beiden Tiergruppen ist eine signifikante Erhöhung der Blutzellen im Vergleich zu den Basalwerten zu erkennen. Eine Erhöhung der Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten ist durch die Inflammation im Rahmen der Ischämie-Induktion mit anschließendem *Remodeling* und mit dem Verbleib der intramyokardialen Naht zu erklären. Die Erhöhung der Erythrozytenzahl ist das Resultat der verlängerten Rekonvaleszenz nach Knochenmarktransplantation. Bei Betrachtung der Lymphozyten, Monozyten und Leukozyten zeichnet sich ein Trend ab. Nach 3 Wochen Reperfusion scheinen die Tiere mit deletierter erythrozytärer NOS eine stärkere inflammatorische Reaktion als die Kontrollgruppe zu zeigen. Da NO unter anderem die Leukozyten- und Monozytenadhäsion verringert [225, 291, 292], ist somit bei einer vergrößerten Bioverfügbarkeit von einer verringerten Inflammation auszugehen. Die eryNOS scheint in diesem Zusammenhang einen prägnanten Anteil an die NO-Bioverfügbarkeit zu leisten, der nicht alleine durch endotheliale NOS vollständig kompensiert werden kann.

Bei der Betrachtung der Modulation der Erythrozytenverformbarkeit, durch erythrozytäre NOS nach 3 Wochen Reperfusion, zeigte sich eine signifikant verminderte Plastizität bei den Tieren mit deletierter eryNOS im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Grund ist die insgesamt verminderte NO-Bioverfügbarkeit in der Gruppe mit deletierter eryNOS, die durch endotheliale NOS nicht ausreichend kompensiert werden kann. NO moduliert die Erythrozytenverformbarkeit [201-204] und ist damit essentiell für mikrozirkulatorische Hämodynamik und Metabolismus. Ein weiterer Grund könnte der erhöhte oxidative Stress bei den Versuchstieren mit deletierter eryNOS darstellen, da hohe ROS Belastung mit verminderter Erythrozytenverformbarkeit einhergeht [293]. Die Kontrollgruppe konnte aufgrund der verbesserten NO-Bioverfügbarkeit durch endotheliale und erythrozytäre NOS die Inflammation mit oxidativen Stress nach I/R besser kompensieren. Neben der Erythrozytenverformbarkeit spielt der oxidative Stress innerhalb der Erythrozyten noch eine weitere wichtige Rolle. Durch oxidativen Stress degenerieren die

5 Diskussion

Erythrozyten und werden zu „pro-oxidativen Geschossen“, die außerhalb des ischämisch-inflammatorisch geschädigten Gewebe ein oxidatives Mikromilieu begünstigen und dadurch Schäden an Gefäßen verursachen [294]. Die Expression der endothelialen NO-Synthase verringert sich je kleiner der Gefäßdurchmesser ist, sodass im Bereich der Arteriolen die eryNOS ein essentieller NO-Donor im mikrovaskulären Gefäßbett darstellt. Die NO Effekte auf die Erythrozytenverformbarkeit wurden lange als altersabhängiger NO Einfluss gesehen [295]. Das bedeutet, dass ältere Erythrozyten nicht mehr ausreichend auf den plastizitätsmodulierenden Einfluss von NO reagieren und in der Milz aussortiert werden. Die hämodynamische Rolle von eryNOS produzierten NO für die O₂ Versorgung im mikrozirkulatorischen Gefäßbett ist nur ein Teilaspekt. Die eryNOS ist in der Lage die vasprotektiven Eigenschaften lokal im mikrozirkulatorischen Milieu zu applizieren und dadurch Inflammation und Gefäßverschlüsse durch Thromben zu verhindern. Des Weiteren könnte es eine neue Therapieoption für Patienten, die unter einer symptomatischen Anämie leiden, darstellen. Es ist bekannt das Patienten nach myokardialer Ischämie und/oder Herzinsuffizienz eine schlechtere Prognose haben, wenn bei ihnen gleichzeitig eine Anämie nachgewiesen wird.

Anämie ist ein leicht identifizierbares Krankheitsbild, das wesentlich das *Outcome* sowie Morbidität und Mortalität von kardiovaskulären Krankheiten bestimmt. Eine erfolgreiche Anämie-Therapie verbessert den lokalen Sauerstofftransport, die körperliche Belastbarkeit und ist mit Reduktion des linksventrikulären *Remodelings* sowie verminderten myokardialen Schaden nach Ischämie assoziiert [296, 297]. Das Problem der effektiven Therapie, speziell bei herzinsuffizienten Patienten, ist noch nicht zufrieden stellend gelöst und Forschungsschwerpunkt zahlreicher klinischer Studien. Zur Auswahl stehen Bluttransfusionen, orale oder intravenöse Eisensubstitution und die Stimulierung der Erythropoese durch EPO-Präparate. Bluttransfusionen sind erst bei schweren Verläufen bei Patienten, mit hochgradiger Herzinsuffizienz oder starker symptomatischer Anämie (Hb < 7g/dl) Mittel der ersten Wahl. Häufig wird zunächst versucht mit oraler Eisensubstitution einen Therapieerfolg zu erreichen. Des Weiteren benötigt man hohe Mengen um die Eisenspeicher wieder aufzufüllen und die *Compliance* ist aufgrund häufiger (20-30 %) gastrointestinale Beschwerden verringert [298-300]. Intravenöse Eisentherapie war in der Vergangenheit häufig mit allergischen Reaktionen

5 Diskussion

verbunden. Die Ursache hierfür war der Dextran-Anteil in den Präparaten, der in neueren Wirkstoffen nicht mehr enthalten ist [301]. Therapie mit intravenöser Eisensubstitution zeigt viel versprechende Ansätze, aber es fehlen noch große randomisierte Studien um die Ergebnisse zu verifizieren. Die Gabe von EPO-Präparaten wie beispielsweise Darbepoetin alfa bei herzinsuffizienten Patienten hat nur eine schwache Evidenz der Klasse IIb. Sie wird bei niereninsuffizienten Patienten mit Anämie empfohlen [302]. EPO-Therapie ist nicht unproblematisch und geht aufgrund der Förderung der Erythropoese mit einer erhöhten Blutviskosität und assoziierten thromboembolischen Auswirkungen einher. Da diese Therapie durch Stimulierung der Erythropoese mit Eisenmangel einhergeht, wäre eine zusätzliche intravenöse Eisensubstitution eine logische Konsequenz, aber es fehlen noch valide Daten für eine Therapieempfehlung. Eine weitere viel versprechende Möglichkeit könnte die Modulation der NO-Bioverfügbarkeit der verbliebenen Erythrozyten bei anämischen Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten darstellen, da diese auch unter einer verminderten Erythrozyten-abhängigen NO-Bildung leiden. Man könnte die kardio- und vasoprotektiven Eigenschaften von NO nutzen und das thromboembolische Risiko minimieren.

6 Klinische Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte die protektive Rolle der erythrozytären NO-Synthase beim chronischen Reperfusionsschaden mit konsekutiven linksventrikulären *Remodeling* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden am murinen Mausmodell *in vivo* und *in vitro* erbracht. Hierbei ist anzumerken, dass tierexperimentiell erworbene Daten nicht immer äquivalent auf den Menschen übertragen werden können, da zwar eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen beiden Spezies besteht, jedoch beide Organismen unterschiedlich auf inflammatorische Reize reagieren [303]. Nichtsdestotrotz sind Maustierexperimente essentiell in der Erforschung von Krankheiten und Therapiemöglichkeiten. Die vorliegenden Daten unterstreichen die bisher gesammelten Erkenntnisse der eryNOS. Die Behandlung von ischämischen Myokardinfarkten mit konsekutivem *Remodeling* ist einer der Kerngebiete der modernen Kardiologie und eines der größten medizinischen Ziele der heutigen Medizin in den Industrienationen. Zur weiteren Erforschung der eryNOS sollten klinische *in vivo* Studien folgen, welche die Quantifizierung der eryNOS und den zirkulierenden NO-Pool im Fokus haben. So könnten NO-defiziente Patienten früher erkannt und therapiert werden und von einem besseren *Outcome* profitieren. Ein weiterer Punkt ist die Anämiediagnostik und Therapie weiter zu verbessern, um eine ausreichende Menge an zirkulierenden eryNOS gewährleisten zu können. Die Kombinationstherapie aus Erythropoetin und intravenösen Fe^{3+} stellt eine viel versprechende Therapieoption dar. Eine weitere Erfolg versprechende Möglichkeit könnte die Modulation der NO-Bioverfügbarkeit der verbliebenen Erythrozyten bei anämischen Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten sein, da diese auch unter einer verminderten Erythrozyten-abhängigen NO-Bildung leiden. Man könnte die kardio- und vasoprotektiven Eigenschaften von NO nutzen und das thromboembolische Risiko, einer EPO-Therapie, minimieren. Es wäre eine pharmakologische oder gentherapeutische Aktivitätsänderung denkbar. Des Weiteren wäre es interessant die Modulation der eryNOS aufgrund von *Lifestyle*-Veränderungen und Umwelteinflüssen zu analysieren und daraus abgeleitete Therapieoptionen anzubieten.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Van de Werf, F., et al., *Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology*. Eur Heart J, 2008. **29**(23): p. 2909-45.
2. Yellon, D.M. and G.F. Baxter, *Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?* Heart, 2000. **83**(4): p. 381-7.
3. Braunwald, E. and R.A. Kloner, *Myocardial reperfusion: a double-edged sword?* J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 1713-9.
4. Moens, A.L., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process*. Int J Cardiol, 2005. **100**(2): p. 179-90.
5. Meier, P., et al., *Beneficial effect of recruitable collaterals: a 10-year follow-up study in patients with stable coronary artery disease undergoing quantitative collateral measurements*. Circulation, 2007. **116**(9): p. 975-83.
6. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3158-67.
7. Eltzschig, H.K. and C.D. Collard, *Vascular ischaemia and reperfusion injury*. Br Med Bull, 2004. **70**: p. 71-86.
8. Maxwell, S.R. and G.Y. Lip, *Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options*. Int J Cardiol, 1997. **58**(2): p. 95-117.
9. Gourdin, M.J., B. Bree, and M. De Kock, *The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel*. Eur J Anaesthesiol, 2009. **26**(7): p. 537-47.
10. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
11. Davies, M.J., et al., *Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death*. Circulation, 1986. **73**(3): p. 418-27.
12. Xiao, C.Y., et al., *Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors*. Circulation, 2001. **104**(18): p. 2210-5.
13. Linz, W., et al., *Influence of the thromboxane synthetase inhibitor HOE 944, prostacyclin and indomethacin on reperfusion arrhythmias, cardiodynamics and metabolism in isolated ischemic rat hearts*. Biomed Biochim Acta, 1988. **47**(10-11): p. S23-6.
14. Pabla, R. and M.J. Curtis, *Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart*. Circ Res, 1995. **77**(5): p. 984-92.
15. Neves, L.A., et al., *Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts*. Braz J Med Biol Res, 1997. **30**(6): p. 801-9.
16. Merx, M.W., et al., *Myoglobin facilitates oxygen diffusion*. FASEB J, 2001. **15**(6): p. 1077-9.
17. Downey, J.M. and M.V. Cohen, *Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction*. Prog Cardiovasc Dis, 2006. **48**(5): p. 363-71.
18. Elahi, M.M., Y.X. Kong, and B.M. Matata, *Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease*. Oxid Med Cell Longev, 2009. **2**(5): p. 259-69.
19. Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1912-6.
20. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
21. Kloner, R.A. and R.B. Jennings, *Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1*. Circulation, 2001. **104**(24): p. 2981-9.
22. Przyklenk, K. and R.A. Kloner, *Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium"*. Circ Res, 1986. **58**(1): p. 148-56.
23. Bolli, R., *Mechanism of myocardial "stunning"*. Circulation, 1990. **82**(3): p. 723-38.
24. Bolli, R., et al., *Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury*. Circ Res, 1989. **65**(3): p. 607-22.

7 Literaturverzeichnis

25. Maulik, N., *Redox regulation of vascular angiogenesis*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(5): p. 783-4.
26. Maulik, N. and D.K. Das, *Redox signaling in vascular angiogenesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(8): p. 1047-60.
27. Lefer, A.M. and D.J. Lefer, *The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 743-51.
28. Tsao, P.S., et al., *Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat*. Circulation, 1990. **82**(4): p. 1402-12.
29. Mehta, J.L., et al., *Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion*. Circ Res, 1989. **64**(1): p. 43-54.
30. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
31. Ito, H., et al., *Myocardial perfusion patterns related to thrombolysis in myocardial infarction perfusion grades after coronary angioplasty in patients with acute anterior wall myocardial infarction*. Circulation, 1996. **93**(11): p. 1993-9.
32. Abbo, K.M., et al., *Features and outcome of no-reflow after percutaneous coronary intervention*. Am J Cardiol, 1995. **75**(12): p. 778-82.
33. Morishima, I., et al., *Clinical significance of no-reflow phenomenon observed on angiography after successful treatment of acute myocardial infarction with percutaneous transluminal coronary angioplasty*. Am Heart J, 1995. **130**(2): p. 239-43.
34. Kaeffer, N., et al., *Preconditioning prevents chronic reperfusion-induced coronary endothelial dysfunction in rats*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. H842-9.
35. Pearson, P.J., H.V. Schaff, and P.M. Vanhoutte, *Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries*. Circulation, 1990. **81**(6): p. 1921-7.
36. Ellis, S.G., et al., *Predictors of success for coronary angioplasty performed for acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 1988. **12**(6): p. 1407-15.
37. Ambrosio, G., et al., *Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury*. Circulation, 1986. **74**(6): p. 1424-33.
38. Pfeffer, J.M., M.A. Pfeffer, and E. Braunwald, *Influence of Chronic Captopril Therapy on the Infarcted Left-Ventricle of the Rat*. Circ Res, 1985. **57**(1): p. 84-95.
39. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular Remodeling after Myocardial-Infarction - Experimental-Observations and Clinical Implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-1172.
40. Cohn, J.N., et al., *Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(3): p. 569-582.
41. Sutton, M.G.S. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction - Pathophysiology and therapy*. Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-2988.
42. Ganau, A., et al., *Patterns of Left-Ventricular Hypertrophy and Geometric Remodeling in Essential-Hypertension*. Journal of the American College of Cardiology, 1992. **19**(7): p. 1550-1558.
43. Hutchins, G.M. and B.H. Bulkley, *Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction*. American Journal of Cardiology, 1978. **41**(7): p. 1127-32.
44. Weisman, H.F., et al., *Cellular Mechanisms of Myocardial Infarct Expansion*. Circulation, 1988. **78**(1): p. 186-201.
45. Douglas, P.S., et al., *Left-Ventricular Shape, Afterload and Survival in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy*. Journal of the American College of Cardiology, 1989. **13**(2): p. 311-315.
46. Pfeffer, J.M., et al., *Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction*. Am J Physiol, 1991. **260**(5 Pt 2): p. H1406-14.
47. Dorn, G.W., J. Robbins, and P.H. Sugden, *Phenotyping hypertrophy - Eschew obfuscation*. Circ Res, 2003. **92**(11): p. 1171-1175.
48. Opie, L.H., et al., *Controversies in Cardiology 4 - Controversies in ventricular remodelling*. Lancet, 2006. **367**(9507): p. 356-367.
49. Dollery, C.M., J.R. Mcewan, and A.M. Henney, *Matrix Metalloproteinases and Cardiovascular-Disease*. Circ Res, 1995. **77**(5): p. 863-868.
50. Cleutjens, J.P.M., et al., *Regulation of Collagen Degradation in the Rat Myocardium after Infarction*. J Mol Cell Cardiol, 1995. **27**(6): p. 1281-1292.

7 Literaturverzeichnis

51. Iwanaga, Y., et al., *Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats*. Journal of the American College of Cardiology, 2002. **39**(8): p. 1384-1391.
52. Massion, P.B. and J.L. Balligand, *Relevance of nitric oxide for myocardial remodeling*. Curr Heart Fail Rep, 2007. **4**(1): p. 18-25.
53. Nikolsky, E., et al., *Impact of anemia in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention - Analysis from the Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications (CADILLAC) Trial*. Journal of the American College of Cardiology, 2004. **44**(3): p. 547-553.
54. Sabatine, M.S., et al., *Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes*. Circulation, 2005. **111**(16): p. 2042-9.
55. Groenveld, H.F., et al., *Anemia and mortality in heart failure patients a systematic review and meta-analysis*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **52**(10): p. 818-27.
56. Komajda, M., et al., *The impact of new onset anaemia on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from COMET*. European Heart Journal, 2006. **27**(12): p. 1440-1446.
57. Anand, I.S., et al., *Anemia and change in hemoglobin over time related to mortality and morbidity in patients with chronic heart failure results - From Val-HeFT*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1121-1127.
58. Adams, K.F., Jr., et al., *Prospective evaluation of the association between hemoglobin concentration and quality of life in patients with heart failure*. American Heart Journal, 2009. **158**(6): p. 965-71.
59. von Haehling, S., et al., *Anemia in heart failure: an overview of current concepts*. Future Cardiol, 2011. **7**(1): p. 119-29.
60. Nanas, J.N., et al., *Etiology of anemia in patients with advanced heart failure*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **48**(12): p. 2485-2489.
61. Anand, I.S., *Anemia and chronic heart failure - Implications and treatment options*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **52**(7): p. 501-511.
62. Weiss, G. and L.T. Goodnough, *Anemia of chronic disease*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 1011-23.
63. Testa, M., et al., *Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension*. Journal of the American College of Cardiology, 1996. **28**(4): p. 964-971.
64. Dec, G.W., *Anemia and Iron Deficiency -- New Therapeutic Targets in Heart Failure?*. New England Journal of Medicine, 2009. **361**(25): p. 2475-2477.
65. Westenbrink, B.D., A.A. Voors, and D.J. van Veldhuisen, *Is anemia in chronic heart failure caused by iron deficiency?* Journal of the American College of Cardiology, 2007. **49**(23): p. 2301-2302.
66. Le Jemtel, T.H. and S. Arain, *Mediators of anemia in chronic heart failure*. Heart Fail Clin, 2010. **6**(3): p. 289-93.
67. Patel, K.V., et al., *Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults*. Arch Intern Med, 2009. **169**(5): p. 515-23.
68. Chen, P.C., et al., *Red blood cell distribution width and risk of cardiovascular events and mortality in a community cohort in Taiwan*. Am J Epidemiol, 2010. **171**(2): p. 214-20.
69. Perlstein, T.S., et al., *Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort*. Arch Intern Med, 2009. **169**(6): p. 588-94.
70. Means, R.T., Jr., *Higher red blood cell distribution width was associated with increased risk of mortality in adults > or =45 years of age*. Evid Based Med, 2009. **14**(5): p. 151.
71. Horne, B.D., et al., *Exceptional mortality prediction by risk scores from common laboratory tests*. Am J Med, 2009. **122**(6): p. 550-8.
72. Anderson, J.L., *Usefulness of a Complete Blood Count-Derived Risk Score to Predict Incident Mortality in Patients With Suspected Cardiovascular Disease (vol 99, pg 169, 2007)*. American Journal of Cardiology, 2012. **110**(4): p. 614-614.
73. Dabbah, S., et al., *Relation Between Red Cell Distribution Width and Clinical Outcomes After Acute Myocardial Infarction*. American Journal of Cardiology, 2010. **105**(3): p. 312-317.
74. Tonelli, M., et al., *Relation between red blood cell distribution width and cardiovascular event rate in people with coronary disease*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 163-168.
75. Poludasu, S., et al., *Red cell distribution width (RDW) as a predictor of long-term mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. Thrombosis and Haemostasis, 2009. **102**(3): p. 581-587.

7 Literaturverzeichnis

76. Cavusoglu, E., et al., *Relation between red blood cell distribution width (RDW) and all-cause mortality at two years in an unselected population referred for coronary angiography*. International Journal of Cardiology, 2010. **141**(2): p. 141-146.
77. Azab, B., et al., *Usefulness of Red Cell Distribution Width in Predicting All-Cause Long-Term Mortality after Non-ST-Elevation Myocardial Infarction*. Cardiology, 2011. **119**(2): p. 72-80.
78. Sangoi, M.B., et al., *Relation between red blood cell distribution width and mortality after acute myocardial infarction*. International Journal of Cardiology, 2011. **146**(2): p. 278-280.
79. Uyarel, H., et al., *Red cell distribution width as a novel prognostic marker in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction*. Coronary Artery Disease, 2011. **22**(3): p. 138-144.
80. Lappe, J.M., et al., *Red cell distribution width, C-reactive protein, the complete blood count, and mortality in patients with coronary disease and a normal comparison population*. Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(23-24): p. 2094-2099.
81. Ye, Z., C. Smith, and I.J. Kullo, *Usefulness of Red Cell Distribution Width to Predict Mortality in Patients With Peripheral Artery Disease*. American Journal of Cardiology, 2011. **107**(8): p. 1241-1245.
82. Felker, G.M., et al., *Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure - Data from the CHARM program and the Duke Databank*. Journal of the American College of Cardiology, 2007. **50**(1): p. 40-47.
83. Al-Najjar, Y., et al., *Red cell distribution width: an inexpensive and powerful prognostic marker in heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(12): p. 1155-1162.
84. Forhecz, Z., et al., *Red cell distribution width in heart failure: Prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state*. American Heart Journal, 2009. **158**(4): p. 659-666.
85. Jackson, C.E., et al., *Red cell distribution width has incremental prognostic value to B-type natriuretic peptide in acute heart failure*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(12): p. 1152-1154.
86. Pascual-Figal, D.A., et al., *Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients*. Eur J Heart Fail, 2009. **11**(9): p. 840-846.
87. Allen, L.A., et al., *Validation and Potential Mechanisms of Red Cell Distribution Width as a Prognostic Marker in Heart Failure*. J Card Fail, 2010. **16**(3): p. 230-238.
88. Forhecz, Z., et al., *Red cell distribution width: a powerful prognostic marker in heart failure*. Eur J Heart Fail, 2010. **12**(4): p. 415-415.
89. van Kimmenade, R.R.J., et al., *Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure*. Eur J Heart Fail, 2010. **12**(2): p. 129-136.
90. Jung, C., et al., *Red blood cell distribution width as useful tool to predict long-term mortality in patients with chronic heart failure*. International Journal of Cardiology, 2011. **152**(3): p. 417-418.
91. Zalawadiya, S.K., et al., *Red Cell Distribution Width and Mortality in Predominantly African-American Population With Decompensated Heart Failure*. J Card Fail, 2011. **17**(4): p. 292-298.
92. Ani, C. and B. Ovbiagele, *Elevated red blood cell distribution width predicts mortality in persons with known stroke*. J Neurol Sci, 2009. **277**(1-2): p. 103-8.
93. Zorlu, A., et al., *Usefulness of Admission Red Cell Distribution Width as a Predictor of Early Mortality in Patients With Acute Pulmonary Embolism*. American Journal of Cardiology, 2012. **109**(1): p. 128-134.
94. Rhodes, C.J., et al., *Red cell distribution width outperforms other potential circulating biomarkers in predicting survival in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Heart, 2011. **97**(13): p. 1054-1060.
95. Hampole, C.V., et al., *Usefulness of Red Cell Distribution Width as a Prognostic Marker in Pulmonary Hypertension*. American Journal of Cardiology, 2009. **104**(6): p. 868-872.
96. Sanchez-Chaparro, M.A., et al., *Higher red blood cell distribution width is associated with the metabolic syndrome: results of the Ibermutuamur Cardiovascular Risk assessment study*. Diabetes Care, 2010. **33**(3): p. e40.
97. Pascual-Figal, D.A., et al., *Red blood cell distribution width predicts new-onset anemia in heart failure patients*. International Journal of Cardiology, 2012. **160**(3): p. 196-200.
98. Afonso, L., et al., *Relationship between red cell distribution width and microalbuminuria: a population-based study of multiethnic representative US adults*. Nephron Clin Pract, 2011. **119**(4): p. c277-82.

7 Literaturverzeichnis

99. Oh, H.J., et al., *Red blood cell distribution width is an independent predictor of mortality in acute kidney injury patients treated with continuous renal replacement therapy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(2): p. 589-94.
100. Oh, H.J., et al., *Red blood cell distribution width is an independent predictor of mortality in acute kidney injury patients treated with continuous renal replacement therapy*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2012. **27**(2): p. 589-594.
101. Bazick, H.S., et al., *Red cell distribution width and all-cause mortality in critically ill patients*. *Critical Care Medicine*, 2011. **39**(8): p. 1913-1921.
102. Wang, F.L., et al., *Red cell distribution width as a novel predictor of mortality in ICU patients*. *Annals of Medicine*, 2011. **43**(1): p. 40-46.
103. Majercik, S., et al., *Red cell distribution width is predictive of mortality in trauma patients*. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 2013. **74**(4): p. 1021-1026.
104. Oh, J., et al., *Relation between red cell distribution width with echocardiographic parameters in patients with acute heart failure*. *J Card Fail*, 2009. **15**(6): p. 517-22.
105. Wen, Y., *High red blood cell distribution width is closely associated with risk of carotid artery atherosclerosis in patients with hypertension*. *Exp Clin Cardiol*, 2010. **15**(3): p. 37-40.
106. Bor-Kucukatay, M., et al., *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **284**(5): p. H1577-84.
107. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. *Nature*, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
108. Furchgott, R.F., *Introduction to EDRF research*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **22 Suppl 7**: p. S1-2.
109. Furchgott, R.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived relaxing and contracting factors*. *FASEB J*, 1989. **3**(9): p. 2007-18.
110. Ignarro, L.J., et al., *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9265-9.
111. Hakim, T.S., et al., *Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin*. *Physiol Meas*, 1996. **17**(4): p. 267-77.
112. Wood, J. and J. Garthwaite, *Models of the diffusional spread of nitric oxide: implications for neural nitric oxide signalling and its pharmacological properties*. *Neuropharmacology*, 1994. **33**(11): p. 1235-44.
113. Huang, B., et al., *TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword*. *Oncogene*, 2008. **27**(2): p. 218-24.
114. Dominiczak, A.F. and D.F. Bohr, *Nitric oxide and its putative role in hypertension*. *Hypertension*, 1995. **25**(6): p. 1202-11.
115. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(19): p. 13725-8.
116. Leone, A.M., et al., *Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(35): p. 23790-5.
117. Vallance, P. and J. Leiper, *Blocking NO synthesis: How, where and why?* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002. **1**(12): p. 939-950.
118. Stuehr, D.J., et al., *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(17): p. 7773-7.
119. Mayer, B., M. John, and E. Bohme, *Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin*. *FEBS Lett*, 1990. **277**(1-2): p. 215-9.
120. Baek, K.J., et al., *Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization, and role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(28): p. 21120-9.
121. Forstermann, U., et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. *Hypertension*, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
122. Nathan, C. and Q.W. Xie, *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. *Cell*, 1994. **78**(6): p. 915-8.
123. Laubach, V.E., et al., *Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(23): p. 10688-92.
124. Wei, X.Q., et al., *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. *Nature*, 1995. **375**(6530): p. 408-11.
125. MacMicking, J.D., et al., *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. *Cell*, 1995. **81**(4): p. 641-50.

7 Literaturverzeichnis

126. Godecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice*. *Circ Res*, 1998. **82**(2): p. 186-94.
127. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. *Nature*, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
128. Preiser, J.C., et al., *Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs*. *Nitric Oxide*, 2001. **5**(2): p. 208-11.
129. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
130. Schmidt, H.H., et al., *Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases*. *Cell Calcium*, 1992. **13**(6-7): p. 427-34.
131. Cho, H.J., et al., *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. *J Exp Med*, 1992. **176**(2): p. 599-604.
132. Reiling, N., et al., *Nitric oxide synthase: Expression of the endothelial, Ca²⁺/calmodulin-dependent in human B and T lymphocytes*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(3): p. 511-516.
133. Chen, L.Y. and J.L. Metha, *Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996. **27**(1): p. 154-158.
134. Sase, K. and T. Michel, *Expression of Constitutive Endothelial Nitric-Oxide Synthase in Human Blood-Platelets*. *Life Sci*, 1995. **57**(22): p. 2049-2055.
135. Mehta, J.L., et al., *Identification of Constitutive and Inducible Forms of Nitric-Oxide Synthase in Human Platelets*. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1995. **125**(3): p. 370-377.
136. Zanardo, R.C.O., et al., *Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(25): p. 14111-14114.
137. Uchizumi, H., et al., *A Stable L-Arginine-Dependent Relaxing Factor Released from Cytotoxic-Activated Macrophages*. *American Journal of Physiology*, 1993. **264**(5): p. H1472-H1477.
138. Ghafourifar, P. and C. Richter, *Mitochondrial nitric oxide synthase regulates mitochondrial matrix pH*. *Biol Chem*, 1999. **380**(7-8): p. 1025-8.
139. Gutsaeva, D.R., et al., *Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism*. *J Neurosci*, 2008. **28**(9): p. 2015-24.
140. Antoniades, C., et al., *Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inflammation*. *Circulation*, 2007. **116**(24): p. 2851-9.
141. Li, H. and U. Forstermann, *Prevention of atherosclerosis by interference with the vascular nitric oxide system*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(27): p. 3133-45.
142. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
143. Tiefenbacher, C.P., et al., *Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin*. *Circulation*, 1996. **94**(6): p. 1423-9.
144. Dumitrescu, C., et al., *Myocardial ischemia results in tetrahydrobiopterin (BH4) oxidation with impaired endothelial function ameliorated by BH4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(38): p. 15081-6.
145. Takimoto, E., et al., *Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1221-31.
146. Kazakov, A., et al., *Inhibition of endothelial nitric oxide synthase induces and enhances myocardial fibrosis*. *Cardiovasc Res*, 2013.
147. List, B.M., et al., *Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization*. *Biochem J*, 1997. **323** (Pt 1): p. 159-65.
148. Bartosz, G., *Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide*. *Acta Biochim Pol*, 1996. **43**(4): p. 645-59.
149. Forstermann, U., *Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal*. *Biol Chem*, 2006. **387**(12): p. 1521-33.
150. Li, H., et al., *Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24482-9.

7 Literaturverzeichnis

151. Godber, B.L., et al., *Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase*. J Biol Chem, 2000. **275**(11): p. 7757-63.
152. Li, H., et al., *Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase*. J Biol Chem, 2008. **283**(26): p. 17855-63.
153. Huang, Z., et al., *Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2099-107.
154. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1498-505.
155. Rassaf, T., et al., *Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function*. Circ Res, 2007. **100**(12): p. 1749-54.
156. Totzeck, M., et al., *Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation*. Circulation, 2012. **126**(3): p. 325-34.
157. Nagababu, E., et al., *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46349-56.
158. Shiva, S., et al., *Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 654-61.
159. Zweier, J.L., A. Samouilov, and P. Kuppusamy, *Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 250-62.
160. Maia, L.B. and J.J. Moura, *Nitrite reduction by xanthine oxidase family enzymes: a new class of nitrite reductases*. J Biol Inorg Chem, 2011. **16**(3): p. 443-60.
161. Baliga, R.S., et al., *Dietary nitrate ameliorates pulmonary hypertension: cytoprotective role for endothelial nitric oxide synthase and xanthine oxidoreductase*. Circulation, 2012. **125**(23): p. 2922-32.
162. Alef, M.J., E. Tzeng, and B.S. Zuckerbraun, *Nitric oxide and nitrite-based therapeutic opportunities in intimal hyperplasia*. Nitric Oxide, 2012. **26**(4): p. 285-94.
163. Tripatara, P., et al., *Nitrite-derived nitric oxide protects the rat kidney against ischemia/reperfusion injury in vivo: role for xanthine oxidoreductase*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(2): p. 570-80.
164. Evans, T.C. and D. Jehle, *The red blood cell distribution width*. J Emerg Med, 1991. **9 Suppl 1**: p. 71-4.
165. Doyle, M.P. and J.W. Hoekstra, *Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins*. J Inorg Biochem, 1981. **14**(4): p. 351-8.
166. Kelm, M., *Nitric oxide metabolism and breakdown*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 273-89.
167. Lancaster, J.R., Jr., *Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 8137-41.
168. Doyle, M.P. and J.W. Hoekstra, *Oxidation of Nitrogen-Oxides by Bound Dioxygen in Hemoproteins*. J Inorg Biochem, 1981. **14**(4): p. 351-358.
169. Recchia, F.A., T.R. Vogel, and T.H. Hintze, *NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2000. **279**(2): p. H852-H856.
170. Gladwin, M.T., et al., *Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11482-11487.
171. Stamler, J.S., et al., *Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2034-2037.
172. Hotchkiss, J.H., *Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate*. Am J Clin Nutr, 1988. **47**(1): p. 161-2.
173. Gross, S.S. and P. Lane, *Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 9967-9.
174. Gow, A.J. and J.S. Stamler, *Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions*. Nature, 1998. **391**(6663): p. 169-173.
175. Jia, L., et al., *S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control*. Nature, 1996. **380**(6571): p. 221-226.
176. Stamler, J.S., et al., *Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2034-7.
177. Gladwin, M.T., et al., *Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 496-500.
178. Singel, D.J. and J.S. Stamler, *Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: The role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin*. Annual Review of Physiology, 2005. **67**: p. 99-145.

7 Literaturverzeichnis

179. Deliconstantinos, G., et al., *Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients*. *Anticancer Res*, 1995. **15**(4): p. 1435-46.
180. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. *Blood*, 2006. **107**(7): p. 2943-51.
181. Chen, L.Y. and J.L. Mehta, *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**(1): p. 57-61.
182. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
183. Rosenkranz-Weiss, P., et al., *Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2236-43.
184. Fulton, D., J.P. Gratton, and W.C. Sessa, *Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough?* *J Pharmacol Exp Ther*, 2001. **299**(3): p. 818-24.
185. Bratosin, D., et al., *Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**(12): p. 1143-56.
186. Ozuyaman, B., et al., *RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects*. *Trends Mol Med*, 2008. **14**(7): p. 314-22.
187. Shima, Y., et al., *L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1352-6.
188. Kelm, M. and J. Schrader, *Control of coronary vascular tone by nitric oxide*. *Circ Res*, 1990. **66**(6): p. 1561-75.
189. Kawashima, K., et al., *Acetylcholine synthesis and muscarinic receptor subtype mRNA expression in T-lymphocytes*. *Life Sci*, 1998. **62**(17-18): p. 1701-5.
190. Tang, L.C., *Human erythrocyte as a model for investigating muscarinic agonists and antagonists*. *Gen Pharmacol*, 1991. **22**(3): p. 485-90.
191. Mesquita, R., et al., *Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2001. **25**(3-4): p. 153-63.
192. Carvalho, F.A., et al., *Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels*. *Journal of Applied Toxicology*, 2004. **24**(6): p. 419-427.
193. Levy, B.I., et al., *Microcirculation in hypertension - A new target for treatment?* *Circulation*, 2001. **104**(6): p. 735-740.
194. Gregory, T.R., *Nucleotypic effects without nuclei: Genome size and erythrocyte size in mammals*. *Genome*, 2000. **43**(5): p. 895-901.
195. Chien, S., *Filterability and other methods of approaching red cell deformability. Determinants of blood viscosity and red cell deformability*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1981. **156**: p. 7-12.
196. Chien, S., *Red cell deformability and its relevance to blood flow*. *Annu Rev Physiol*, 1987. **49**: p. 177-92.
197. Schmid-Schonbein, H., et al., *Pathological red cell aggregation (clump aggregation). Molecular and electrochemical factors*. *Bibl Anat*, 1977(16 Pt 2): p. 484-9.
198. MacRury, S.M., et al., *Increased red cell aggregation in diabetes mellitus: association with cardiovascular risk factors*. *Diabet Med*, 1993. **10**(1): p. 21-6.
199. Mohandas, N., J.A. Chasis, and S.B. Shohet, *The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape*. *Semin Hematol*, 1983. **20**(3): p. 225-42.
200. Lee, J.C.M., D.T. Wong, and D.E. Discher, *Direct measures of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton*. *Biophysical Journal*, 1999. **77**(2): p. 853-864.
201. Bor-Kucukatay, M., et al., *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2003. **284**(5): p. H1577-H1584.
202. Bor-Kucukatay, M., et al., *Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2000. **22**(4): p. 267-275.
203. Chen, K.J., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Hemorrhagic shock and nitric oxide release from erythrocytic nitric oxide synthase: A quantitative analysis*. *Microvascular Research*, 2009. **78**(1): p. 107-118.

7 Literaturverzeichnis

204. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. European Heart Journal, 2006. **27**: p. 127-127.
205. Grau, M., et al., *RBC-NOS-Dependent S-Nitrosylation of Cytoskeletal Proteins Improves RBC Deformability*. Plos One, 2013. **8**(2).
206. Starzyk, D., R. Korbut, and R.J. Gryglewski, *Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats ex vivo and in vitro*. Journal of Physiology and Pharmacology, 1999. **50**(4): p. 629-637.
207. Huang, P.L., *Mouse models of nitric oxide synthase deficiency*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11 Suppl 16**: p. S120-3.
208. Snyder, S.H. and D.S. Bredt, *Biological roles of nitric oxide*. Sci Am, 1992. **266**(5): p. 68-71, 74-7.
209. Arnold, W.P., et al., *Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(8): p. 3203-7.
210. Hofmann, F., *The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 1-4.
211. Ignarro, L.J., et al., *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates*. J Pharmacol Exp Ther, 1981. **218**(3): p. 739-49.
212. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. FASEB J, 1995. **9**(13): p. 1319-30.
213. Ko, E.A., et al., *Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells*. J Smooth Muscle Res, 2008. **44**(2): p. 65-81.
214. Sarkar, R., et al., *Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1810-8.
215. Ishida, A., et al., *Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(15): p. 10050-7.
216. Kibbe, M.R., et al., *Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression upregulates p21 and inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through p42/44 mitogen-activated protein kinase activation and independent of p53 and cyclic guanosine monophosphate*. J Vasc Surg, 2000. **31**(6): p. 1214-28.
217. Tanner, F.C., et al., *Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1982-9.
218. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
219. Guo, J.P., et al., *Mechanisms of vascular preservation by a novel NO donor following rat carotid artery intimal injury*. Am J Physiol, 1995. **269**(3 Pt 2): p. H1122-31.
220. Parenti, A., et al., *Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4220-6.
221. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
222. Yan, Z.Q., et al., *Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery*. Circ Res, 1996. **79**(1): p. 38-44.
223. de Graaf, J.C., et al., *Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions*. Circulation, 1992. **85**(6): p. 2284-90.
224. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(13): p. 5193-7.
225. Adams, M.R., et al., *L-arginine reduces human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial expression of cell adhesion molecules*. Circulation, 1997. **95**(3): p. 662-8.
226. Hickey, M.J., et al., *Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia*. FASEB J, 1997. **11**(12): p. 955-64.
227. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
228. Anaya-Prado, R., et al., *Ischemia/reperfusion injury*. J Surg Res, 2002. **105**(2): p. 248-58.

7 Literaturverzeichnis

229. Bolli, R., *Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(11): p. 1897-918.
230. Massoudy, P., B.F. Becker, and E. Gerlach, *Nitric-Oxide Accounts for Postischemic Cardioprotection Resulting from Angiotensin-Converting Enzyme-Inhibition - Indirect Evidence for a Radical Scavenger Effect in Isolated Guinea-Pig Heart*. J Cardiovasc Pharmacol, 1995. **25**(3): p. 440-447.
231. Moncada, S. and J.D. Erusalimsky, *Opinion - Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(3): p. 214-220.
232. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(11): p. 1440-1450.
233. Wang, W.J., G. Sawicki, and R. Schulz, *Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 165-174.
234. Rodriguez-Pena, A., et al., *Intrarenal administration of molsidomine, a molecule releasing nitric oxide, reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats*. American Journal of Transplantation, 2004. **4**(10): p. 1605-1613.
235. Anaya-Prado, R., et al., *Exogenous nitric oxide donor and related compounds protect against lung inflammatory response after hemorrhagic shock and resuscitation*. Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care, 2004. **57**(5): p. 980-988.
236. Franco-Gou, R., et al., *How ischaemic preconditioning protects small liver grafts*. Journal of Pathology, 2006. **208**(1): p. 62-73.
237. Appelberg, R., *Macrophage Inflammatory Proteins Mip-1 and Mip-2 Are Involved in T-Cell-Mediated Neutrophil Recruitment*. Journal of Leukocyte Biology, 1992. **52**(3): p. 303-306.
238. Suzuki, S. and L.H. Toledopereyra, *Interleukin-1 and Tumor-Necrosis-Factor Production as the Initial Stimulants of Liver Ischemia and Reperfusion Injury*. Journal of Surgical Research, 1994. **57**(2): p. 253-258.
239. Martinez-Mier, G., et al., *Exogenous nitric oxide downregulates MIP-2 and MIP-1alpha chemokines and MAPK p44/42 after ischemia and reperfusion of the rat kidney*. J Invest Surg, 2002. **15**(5): p. 287-96.
240. Decaterina, R., et al., *Nitric-Oxide Decreases Cytokine-Induced Endothelial Activation - Nitric-Oxide Selectively Reduces Endothelial Expression of Adhesion Molecules and Proinflammatory Cytokines*. Journal of Clinical Investigation, 1995. **96**(1): p. 60-68.
241. Waldow, T., et al., *Nitric oxide donor-induced persistent inhibition of cell adhesion protein expression and NFkappaB activation in endothelial cells*. Nitric Oxide, 2006. **15**(2): p. 103-13.
242. Martinez-Mier, G., et al., *P-selectin and chemokine response after liver ischemia and reperfusion*. J Am Coll Surg, 2000. **191**(4): p. 395-402.
243. Rakhit, R.D., et al., *Role of G proteins and modulation of p38 MAPK activation in the protection by nitric oxide against ischemia-reoxygenation injury*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(5): p. 995-1002.
244. Carreras, M.C. and J.J. Poderoso, *Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(5): p. C1569-80.
245. Toledo-Pereyra, L.H., et al., *Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion*. Exp Clin Transplant, 2004. **2**(1): p. 174-7.
246. Matthews, J.R., et al., *Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(12): p. 2236-42.
247. Tabuchi, A., et al., *Rapid attenuation of AP-1 transcriptional factors associated with nitric oxide (NO)-mediated neuronal cell death*. J Biol Chem, 1996. **271**(49): p. 31061-7.
248. Bogdan, C., *Nitric oxide and the regulation of gene expression*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 66-75.
249. Spiecker, M., et al., *Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 732-9.
250. Frangogiannis, N.G., *Chemokines in ischemia and reperfusion*. Thromb Haemost, 2007. **97**(5): p. 738-47.
251. von Knethen, A., D. Callsen, and B. Brune, *NF-kappaB and AP-1 activation by nitric oxide attenuated apoptotic cell death in RAW 264.7 macrophages*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(2): p. 361-72.
252. Kim, S.H., V.J. Johnson, and R.P. Sharma, *Mercury inhibits nitric oxide production but activates proinflammatory cytokine expression in murine macrophage: differential modulation of NF-kappaB and p38 MAPK signaling pathways*. Nitric Oxide, 2002. **7**(1): p. 67-74.

7 Literaturverzeichnis

253. Melino, G., et al., *Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation*. *Cancer Res*, 2000. **60**(9): p. 2377-83.
254. Boyd, C.S. and E. Cadenas, *Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis*. *Biological Chemistry*, 2002. **383**(3-4): p. 411-423.
255. Kim, Y.M., et al., *Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(2): p. 1402-1411.
256. Martinez-Mier, G., et al., *Nitric oxide diminishes apoptosis and p53 gene expression after renal ischemia and reperfusion injury*. *Transplantation*, 2000. **70**(10): p. 1431-1437.
257. Suenobu, N., et al., *Natriuretic peptides and nitric oxide induce endothelial apoptosis via a cGMP-dependent mechanism*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 1999. **19**(1): p. 140-146.
258. Taimor, G., B. Hofstaetter, and H.M. Piper, *Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia*. *Cardiovasc Res*, 2000. **45**(3): p. 588-594.
259. Uchiyama, T., et al., *Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes*. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. **34**(8): p. 1049-1061.
260. Akool, E.S., et al., *Nitric oxide increases the decay of matrix metalloproteinase 9 mRNA by inhibiting the expression of mRNA-stabilizing factor HuR*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(14): p. 4901-4916.
261. Phillips, L., et al., *Nitric Oxide Mechanism of Protection in Ischemia and Reperfusion Injury*. *Journal of Investigative Surgery*, 2009. **22**(1): p. 46-55.
262. Erhardt, W., et al., *A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate)*. *Res Exp Med (Berl)*, 1984. **184**(3): p. 159-69.
263. Karow T., L.-R.R., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 18. 2012: Dr. med. Thomas Karow (Eigenverlag).
264. Yang, X.P., et al., *Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(5 Pt 2): p. H1967-74.
265. Janssen, B.J., et al., *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(4): p. H1618-24.
266. Ishizaka, S., et al., *New technique for measurement of left ventricular pressure in conscious mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(3): p. H1208-15.
267. Blaha, M.D. and L.R. Leon, *Effects of indomethacin and buprenorphine analgesia on the postoperative recovery of mice*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2008. **47**(4): p. 8-19.
268. Nossuli, T.O., et al., *A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(4): p. H1049-55.
269. Pfafferoth, C. and E. Volger, *[The rheologic properties of blood. New findings from circulatory research]*. *Med Monatsschr Pharm*, 1985. **8**(7): p. 193-202.
270. Sethi, S. and M. Dikshit, *Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide*. *Thromb Res*, 2000. **100**(3): p. 223-47.
271. Duran-Struuck, R. and R.C. Dysko, *Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2009. **48**(1): p. 11-22.
272. Aparicio-Vergara, M., et al., *Bone marrow transplantation in mice as a tool for studying the role of hematopoietic cells in metabolic and cardiovascular diseases*. *Atherosclerosis*, 2010. **213**(2): p. 335-44.
273. de Winther, M.P. and P. Heeringa, *Bone marrow transplantations to study gene function in hematopoietic cells*. *Methods Mol Biol*, 2003. **209**: p. 281-92.
274. Hendgen-Cotta, U.B., et al., *Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10256-61.
275. Park, J.L. and B.R. Lucchesi, *Mechanisms of myocardial reperfusion injury*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **68**(5): p. 1905-12.
276. Sheridan, F.M., P.G. Cole, and D. Ramage, *Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model*. *Circulation*, 1996. **93**(10): p. 1784-7.
277. Duilio, C., et al., *Neutrophils are primary source of O2 radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(6): p. H2649-57.
278. Ma, X.L., et al., *Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium*. *Circulation*, 1993. **88**(2): p. 649-58.

7 Literaturverzeichnis

279. Fujii, H., et al., *Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32773-8.
280. Clancy, R.M., J. Leszczynska-Piziak, and S.B. Abramson, *Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 1116-21.
281. Eghbali, M., et al., *Enzyme-Antibody Histochemistry - a Method for Detection of Collagens Collectively*. Histochemistry, 1987. **87**(3): p. 257-262.
282. Eghbali, M. and K.T. Weber, *Collagen Type-I Gene-Expression in the Heart - Influence of Growth, Aging, and Renovascular Hypertension*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **580**: p. 468-472.
283. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. Am J Pathol, 1995. **147**(2): p. 325-38.
284. Cleutjens, J.P., et al., *The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions*. Cardiovasc Res, 1999. **44**(2): p. 232-41.
285. Solomon, S.D., et al., *Influence of ejection fraction on cardiovascular outcomes in a broad spectrum of heart failure patients*. Circulation, 2005. **112**(24): p. 3738-3744.
286. White, H.D., et al., *Left-Ventricular End-Systolic Volume as the Major Determinant of Survival after Recovery from Myocardial-Infarction*. Circulation, 1987. **76**(1): p. 44-51.
287. Ky, B., et al., *Ventricular-Arterial Coupling, Remodeling, and Prognosis in Chronic Heart Failure*. Journal of the American College of Cardiology, 2013.
288. Moens, A.L., et al., *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process*. International Journal of Cardiology, 2005. **100**(2): p. 179-90.
289. Mitchell, G.F., et al., *Left ventricular remodeling in the year after first anterior myocardial infarction: a quantitative analysis of contractile segment lengths and ventricular shape*. Journal of the American College of Cardiology, 1992. **19**(6): p. 1136-44.
290. McKay, R.G., et al., *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion*. Circulation, 1986. **74**(4): p. 693-702.
291. Hickey, M.J., et al., *Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia*. Faseb Journal, 1997. **11**(12): p. 955-964.
292. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric-Oxide - an Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-4655.
293. Dondorp, A.M., et al., *Oxidative stress and rheology in severe malaria*. Redox Report, 2003. **8**(5): p. 292-294.
294. Minetti, M., L. Agati, and W. Malorni, *The microenvironment can shift erythrocytes from a friendly to a harmful behavior: Pathogenetic implications for vascular diseases*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(1): p. 21-28.
295. Bor-Kucukatay, M., H.J. Meiselman, and O.K. Baskurt, *Modulation of density-fractionated RBC deformability by nitric oxide*. Clin Hemorheol Microcirc, 2005. **33**(4): p. 363-7.
296. Anand, I., et al., *Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure*. Circulation, 2004. **110**(2): p. 149-54.
297. Agarwal, A.K. and A.K. Singh, *Therapy with erythropoiesis-stimulating agents and renal and nonrenal outcomes*. Heart Fail Clin, 2010. **6**(3): p. 323-32.
298. Pasricha, S.R., et al., *Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update*. Med J Aust, 2010. **193**(9): p. 525-32.
299. Macdougall, I.C., *Strategies for iron supplementation: oral versus intravenous*. Kidney Int Suppl, 1999. **69**: p. S61-6.
300. Glaspy, J. and I. Cavill, *Role of iron in optimizing responses of anemic cancer patients to erythropoietin*. Oncology (Williston Park), 1999. **13**(4): p. 461-73; discussion 477-8, 483-8.
301. Auerbach, M. and H. Ballard, *Clinical use of intravenous iron: administration, efficacy, and safety*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2010. **2010**: p. 338-47.
302. Eschbach, J.W., *Current concepts of anemia management in chronic renal failure: impact of NKF-DOQI*. Semin Nephrol, 2000. **20**(4): p. 320-9.
303. Seok, J., et al., *Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(9): p. 3507-3512.

Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm, Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikum Düsseldorf, für die Möglichkeit in seiner Klinik arbeiten zu dürfen, die großzügige Überlassung des Themas sowie die Unterstützung meiner Promotion.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Marc W. Merx für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Er war mir ein freundschaftlicher und kompetenter Ansprechpartner und stand mir jederzeit bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek für seine gutachterliche Tätigkeit und die Teilhabe an der Promotionskommission.

Ganz besonderer Dank gilt dem ganzen Team der Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Marc Merx. Im speziellen möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Simone Gorressen, Frau Stefanie Becher, Frau Rabia Taskesen, Frau Dr. med. Annette van de Sandt und Herrn Dr. med. Jan Ohlig für ihre wertvolle fachliche Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Nicht genug danken kann ich meiner Großmutter Frau Dr. rer. nat. Pauline Nahmanovici, meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen verstorbenen Großeltern und Großvater, denn ihre liebevolle Unterstützung hat mir mein Studium, diese Promotion und vieles mehr erst ermöglicht. Ihnen möchte diese Arbeit widmen.

Vielen Dank an meine Freundin Elizabete Rosa Maia für ihre unermüdliche Geduld, ihr Verständnis, ihr Rückhalt in schwierigen Phasen und ihre Unterstützung auf jede erdenkliche Weise während meiner gesamten Promotion und darüber hinaus.

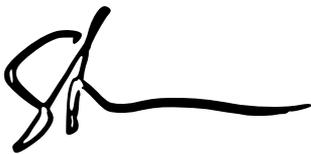
Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Manuel Stern

Düsseldorf, den 30.06.2014

Unterschrift

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' followed by a long horizontal stroke.