Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Malte Kelm

Veränderungen des erythrozytären Redox-Status und der intrazellulären NO-Produktion bei arterieller Hypertonie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Franziska Katharina Strigl

2016

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

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer.nat. Klaus Kröncke

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG 1

KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN 1

1.1. ARTERIOSKLEROSE UND ENDOTHELIALE DYSFUNKTION 1

1.2. STICKSTOFFMONOXID (NO) 3

1.3. eNOS 5

1.4. REDOX-STATUS 7

1.5. ERYTHROZYTEN 9

1.6. EINFLUSS VON NO AUF DIE ERYTHROZYTÄRE VERFORMBARKEIT 10

1.7. MESSUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES MITHILFE VON FLUORESZENZMOLEKÜLEN 12

1.7.1. DAF-FM 13

1.7.2. DCF 14

1.7.3. MITOSOX 14

1.7.4. THIOLTRACKER 15

2. ZIEL DER ARBEIT 16

3. MATERIAL UND METHODEN 17

3.1 MATERIALIEN 17

3.1.1. VERWENDETE MATERIALIEN 17

3.2. METHODEN 19

3.2.1. STUDIENPROTOKOLL 19

3.2.2. STUDIENKOLLEKTIV 21

3.2.3. DETEKTION VON FREIEN RADIKALEN MITTELS FLUORESZENZ-MOLEKÜLEN UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE 22

3.2.4. MESSUNG VON NITRIT MITTELS CHEMILUMINESZENZ DETEKTION (CLD) 29

3.2.5. MESSUNG DER ERYTHROZYTEN-VERFORMBARKEIT MITTELS LASER-ASSISTED OPTICAL ROTATIONAL CELL ANALYZER (LORCA) 30

3.2.6. STATISTIK 31

4. ERGEBNISSE 32

4.1. ETABLIERUNG DER MESSMETHODEN UND ANALYSE DER BASISPARAMETER BEI JUNGEN GESUNDEN PROBANDEN 32

4.1.1. EFFEKT VOM PUFFER AUF DIE MESSUNG VON FREIEN RADIKALEN 32

4.1.2. MITOSOX, EUK-134 UND TEMPOL 34

4.2. ANALYSE DES REDOX STATUS IN JUNGEN GESUNDEN PROBANDEN 38

4.3. EINFLUSS DER ENOS EXPRESSION IN DEN ERYTHROZYTEN AUF DEN REDOX STATUS (MÄUSE) 42

4.4. FALL-KONTROLL-STUDIE 44

4.4.1. CHARAKTERISIERUNG DER STUDIENPOPULATION 44

4.4.2. DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNGEN 47

4.4.3. BESTIMMUNGEN DES NITRITS 49

4.4.4. ERYTHROZYTÄRE VERFORMBARKEIT 50

4.5. ERYTHROZYTÄRE VERÄNDERUNGEN IM ALTER 51

5. DISKUSSION 53

5.1. ETABLIERUNG EINER METHODE ZUR MESSUNG DES OXIDATIVEN STATUS UND DES NO-SPIEGELS 53

5.1.1. DAF-FM DIACETAT 53

5.1.2. DCF DIACETAT 54

5.1.3. MITOSOX 54

5.1.4. TT 55

5.2. EINFLUSS DER ERYTHROZYTÄREN ENOS-EXPRESSION AUF DEN OXIDATIVEN STATUS 56

5.3. OXIDATIVER STATUS UND NO-SPIEGEL IN ERYTHROZYTEN BEI KARDIOVASKULÄREN ERKANKUNGEN 58

5.4. OXIDATIVER STATUS UND NO-SPIEGEL IN ERYTHROZYTEN IM ALTER 62

5.5. EINFLUSS VON KARDIOVASKULÄREN KRANKHEITEN AUF DIE ERYTHROZYTÄRE VERFORMBARKEIT 62

5.6. AUSBLICK 64

6. ZUSAMMENFASSUNG 65

7. LITERATURVERZEICHNIS 67

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AE1	Anionenaustauscher 1
BH_4	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body-Mass-Index
Ca^{2+}	Calcium
CLD	Chemilumineszenzdetektion
DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorescein diacetat
D-Arg	D-Arginin
DCF-FM	2,7-Dichlorhydrofluorescein
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EI	Elongationsindex
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	**F**luorescence activated cell sorting
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FMD	fluss-abhängige Vasodilatation
FMN	Flavin Adenin Mononukleotid
GSH	Glutathion
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HbO_2	Oxygeniertes Hämoglobin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
$HO^{\cdot}$	Hydroxyl-Radikal
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knock-out
L-Arg	L-Arginin
L-NAME	N5-[imino(nitroamino)methyl]-L-ornithin
L-NIO	N5-(1-iminoethyl)-L-ornithin
LORCA	Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer
MetHb	Methämoglobin
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
nNOS	neuronale NO-Synthase
$NO^{\cdot}$	Stickstoffmonoxid
NO^{+}	Nitrosonium-Ion
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOS	NO-Synthase
O_2	molekularer Sauerstoff
O_2^-	Superoxid-Anion
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMS	Phenazin methosulfat
RBC	Red blood cell
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	S-Nitrosothiole
SOD	Superoxid-Dismutase
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TT	Thiol-Tracker
WT	Wildtyp
XOR	Xanthinoxidoreduktase

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen mittlerweile weltweit gesehen die häufigste Todesursache dar. Ursächlich für die meisten kardiovaskulären Erkrankungen ist eine arteriosklerotische Veränderung mittelgroßer und großer Arterien. Ein wesentlicher Faktor sowohl in der Entstehung als auch im Fortschreiten kardiovaskulärer Krankheiten ist die endotheliale Dysfunktion, welche durch eine verminderte Bioverfügbarkeit des Vasodilators Stickstoffmonoxid charakterisiert ist.[1]

Arteriosklerotische Veränderungen von Blutgefäßen sind multifaktoriell bedingt. Bisher sind viele verschiedene Risikofaktoren bekannt, die sich in primäre und sekundäre Faktoren unterteilen lassen. Nicht modifizierbare primäre Risikofaktoren beinhalten das männliche Geschlecht, Alter sowie eine positive Familienanamnese bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen. Zu den modifizierbaren primären Risikofaktoren zählen die arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und das Rauchen. Sekundäre Risikofaktoren sind modifizierbar und als einzeln auftretende Risikofaktoren eher von untergeordneter Bedeutung. Tritt allerdings eine Kombination dieser Faktoren auf, erhöht sich die Krankheitswahrscheinlichkeit deutlich. Zu den sekundären Faktoren zählen beispielsweise psychosoziale Faktoren, erhöhte Werte an Homocystein, Lipoprotein (a), prothrombotischen Faktoren (z.B. Fibrinogen) oder inflammatorische Marker (z.B. C-reaktives Protein).[2]

1.1. Arteriosklerose und endotheliale Dysfunktion

Arteriosklerotische Läsionen der Arterien lösen je nachdem welche Arterie betroffen ist Krankheiten wie die koronare Herzkrankheit, die periphere arterielle Verschlusskrank-

heit oder auch eine zerebrovaskuläre Krankheit aus. Pathophysiologisch gibt es bereits bei Kindern und Jugendlichen Läsionen der Arterienwände, die sogenannten fatty streaks.[3] Eines der ersten Ereignisse in der Pathophysiologie der Arteriosklerose ist die Minderung der endothelialen Funktion, bevor strukturelle Veränderungen wie die Intima-Hyperplasie entstehen.[4] Sind bereits die ersten Läsionen der Gefäßwand entstanden, wird die Bindekraft des Endothels in Bezug auf die Leukozyten und Thrombozyten erhöht und auch die Gefäßpermeabilität nimmt zu. Zudem wird durch die Läsion induziert, dass das Endothel prokoagulative anstatt antikoagulative Eigenschaften aufweist und die Bildung vasoaktiver Moleküle, Zytokine und Wachstumsfaktoren gefördert wird. Dadurch kommt es zu einer Migration und Proliferation der glatten Muskelzellen.[5] Schreiten die Umbaumaßnahmen, das sogenannte „Remodeling" weiter fort, wird die Arterienwand zunehmend dicker, zunächst allerdings ohne Einfluss auf den Durchmesser des Lumens.[6] Eine anhaltende Entzündungsreaktion resultiert aus der Emigration von Makrophagen und Lymphozyten aus dem Blut in die Arterienwand. Die Aktivierung dieser Zellen führt zu einer Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die weiteren Schaden induzieren können.[7] Wiederholen sich diese Zyklen der Zellmigration, Proliferation der glatten Muskelzellen und Bildung von Bindegewebe kann sich eine fortgeschrittene, komplizierte Läsion bilden. Diese besteht aus einer bindegewebigen Deckschicht über einem Kern von Lipiden und nekrotischem Gewebe (Abbildung 1). Zu diesem Zeitpunkt kann die Arterie die Lumeneinengung zumeist nicht mehr durch eine Gefäßdilatation kompensieren und dadurch wird der Blutfluss verändert.[5]

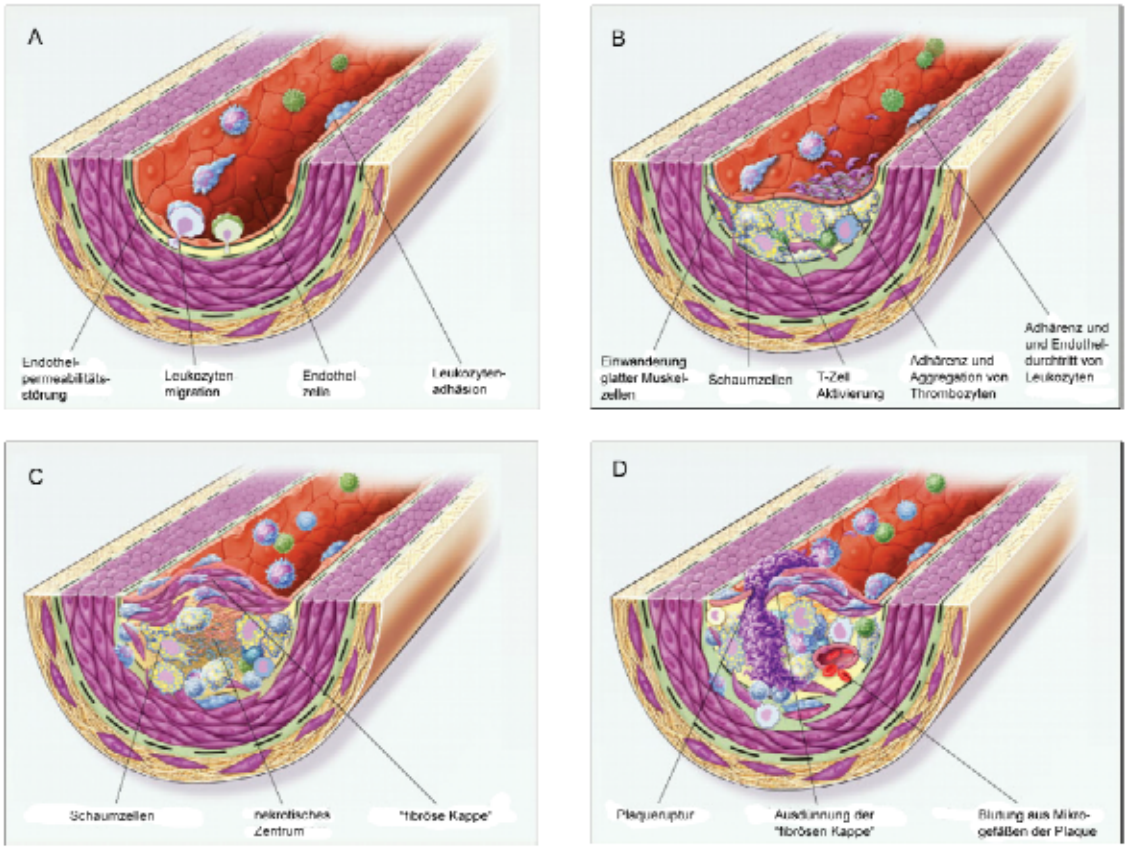


Abbildung 1 Pathogenese der Arteriosklerose (n. R. Ross[5])
A Endotheliale Dysfunktion mit erhöhter Endothelpermeabilität und Leukozyten-migration
B Fatty streaks und Schaumzellbildung
C Plaque mit fibröser Membran
D Plaqueruptur bei fortgeschrittenem arteriosklerotischen Plaque

1.2. Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein freies Radikal mit einem freien Elektron. Es ist sowohl ein intra- als auch interzelluläres Signalmolekül, da es durch seine Ladungsneutralität frei über die Zellmembranen in die Gefäße diffundieren kann. Es reguliert den vaskulären Tonus, die Homöostase der Fibrinolyse und die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen.[8] Das physiologische Target von NO ist die lösliche Guanylat-Zyklase, welche durch die Bindung von NO an die Häm-Gruppe aktiviert wird. Dadurch wird die Konzentration des

zyklischen GMP erhöht, die in den Gefäßen die Relaxierung der glatten Muskulatur und somit eine Vasodilatation vermittelt.[9]

Ein weiteres Target von NO können die Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen sein, um S-Nitrosothiol Verbindungen zu bilden. Eines dieser Proteine ist das Hämoglobin (Abbildung 2) .[10]

NO besitzt eine kurze Halbwertszeit in Plasma und Gewebe und seine primären Oxidationsprodukte sind Nitrit und Nitrat. Nitrat gilt als das stabile Endprodukt des L-Arginin Stoffwechsels und wird mit dem Urin ausgeschieden.[11] Nitrit hat das Potential, ein wichtiges intravaskuläres NO-Speichermolekül zusammen mit Nitrosothiolen zu sein, indem es die NO-Bioaktivität durch das Gefäßsystem zu distalen Orten der NO-Bildung überführt. Die Konzentration des Nitrits im Plasma wurde als ein Index für die eNOS Aktivität in der regionalen wie auch in der systemischen Blutzirkulation beschrieben.[12]

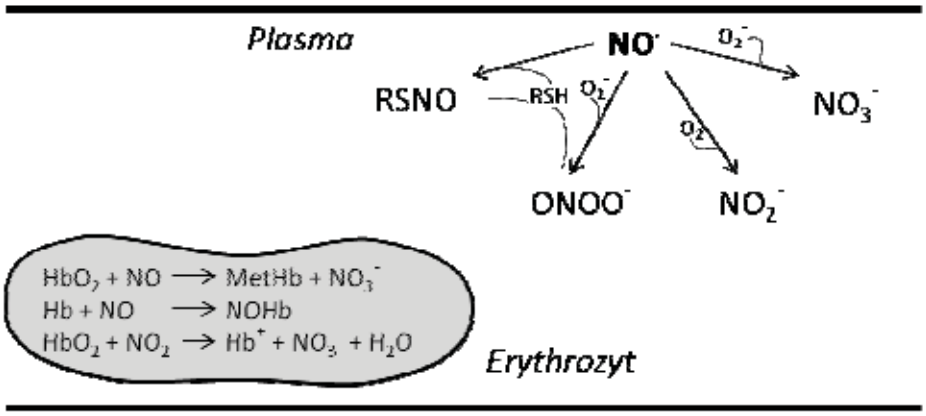


Abbildung 2 Reaktionen von NO im Erythrozyten und Plasma (nach Lauer et al.[13]) NO reagiert unter der Bildung von S-Nitrosothiolen (RSNO) mit Proteinen, intrazellulär auch mit Hämoglobin (oxygeniert = HbO_2, deoxygeniert =Hb). Die Reaktion mit verschiedenen Sauerstoffspezies führt unter anderem zur Bildung von Nitrit (NO_2^-), Nitrat (NO_3^-) oder Peroxynitrit ($ONOO^-$).

Störungen des NO-Signalwegs können eine endotheliale Dysfunktion verursachen, welche zu einer erhöhten Suszeptibilität für Arteriosklerose, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Thrombosen und einer zerebrovaskulären Krankheit führen. Die verminderte NO-Bioverfürbarkeit kann durch verschiedene Mechanismen entstehen wie einer reduzierten eNOS-Expression, einer reduzierten enzymatischen eNOS-Aktivität (u.a. durch Substratmangel oder Anwesenheit von Inhibitoren) oder einem beschleunigten Abbau durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS).[14] Die Regulation der eNOS ist klinisch relevant. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risiko-

faktoren, wie z.B. einer Hypercholesterinämie, wurde eine erhöhte Konzentration von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) gefunden, ein endogenes Arginin-Analogon, welches als kompetitiver Inhibitor der NOS wirkt.[15]

1.3. eNOS

NO-Synthasen (NOS) katalysieren die Oxidation des L-Arginins zu Citrullin und NO. Es sind drei Haupt-Isoformen der NO-Synthasen bekannt, die auf drei verschiedenen Chromosomen durch verschiedene Gene kodiert werden. Die neuronale NOS (nNOS) wird in bestimmten Neuronen und Skelettmuskelzellen exprimiert. Die endotheliale NOS (eNOS) wird vor allem in Endothelzellen exprimiert und die induzierbare NOS (iNOS) zum Beispiel in Makrophagen. Alle Enzym-Isoformen benötigen für eine einwandfreie Funktion die Kofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH_4), Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat (NADPH), Flavin Adenin Dinukleotid und Flavin Adenin Mononukleotid (Abbildung 3).[16]

Die Aktivität der eNOS wird vor allem durch die intrazellulären Konzentrationen von Ca^{2+}/Calmodulin reguliert, die eine Bildung von NOS-Dimeren initiieren, welche die aktive Form der NOS darstellt.[17]

Die Expression der eNOS wird erhöht durch physiologischen Shear Stress und vermindert durch LDL, Angiotensin-II und TNF-α.

Die Aufnahme von L-Arginin kann durch oxidiertes LDL vermindert werden und dadurch eine Entkopplung der eNOS bedingen. Auch eine lokal stark verminderte L-Arginin-Konzentration kann die eNOS entkoppeln und so zu einer Überproduktion von O_2^- und H_2O_2 aus Sauerstoff führen, welches ein Ko-Substrat der eNOS ist. Auch bei einer verminderten Verfügbarkeit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin wird der Elektronentransfer durch eine Entkopplung gestört und Superoxidanion wird gebildet.[18]

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise, dass das eNOS-Level unter pathologischen Bedingungen wie der KHK vermindert sein kann. Heiss et al. konnten 2010 zeigen, dass die Funktion der eNOS in endothelialen Vorläuferzellen bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit vermindert ist.[19] Von der Arbeitsgruppe Moss et al. wur-

de zudem nachgewiesen, dass die Aktivität der eNOS in Thrombozyten bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie vermindert ist.[20] Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass auch der eNOS-Gehalt der Erythrozyten[21] sowie in Mikropartikeln bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion vermindert ist.[22]

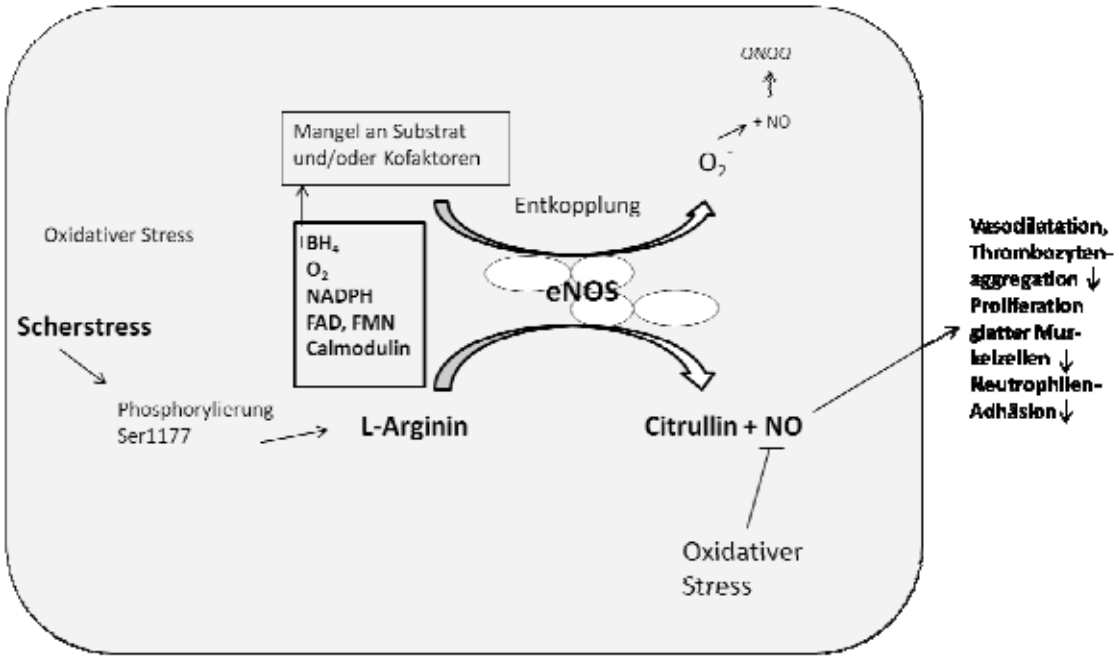


Abbildung 3 Funktion der eNOS - Ein erhöhter Scherstress induziert eine Phosphorylierung der eNOS am Serin 1177 und bewirkt so eine Aktivierung der eNOS. Die eNOS katalysiert die Bildung von Citrullin und NO aus L-Arginin. Voraussetzung ist zum einen die Verfügbarkeit des Substrates, zum anderen die der Kofaktoren, ansonsten kommt es zur Entkopplung und O_2^- wird produziert. Dargestellt sind zudem die unterschiedlichen Stellen, an denen oxidativer Stress eingreifen kann.

Mäuse, denen die endotheliale Isoform der NO-Synthase fehlt, sind hypertensiv, haben eine endotheliale Dysfunktion und zeigen im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen eine schwerwiegendere Reaktion auf Gefäßverletzungen, zerebrale Ischämien und Arteriosklerose, die auf eine ernährungsbedingte Hypercholesterinämie zurückzuführen ist. Die Reaktion zeigt sich in einer erhöhten Neigung zur Bildung von Neointima, die zudem beschleunigt stattfindet.[17]

1.4. Redox-Status

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species - ROS) werden in jeder Zelle produziert; u.a. molekularer Sauerstoff, Superoxid Anion (O_2^-), Hydroxyl-Radikal (HO^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit ($ONOO^-$). Eine übermäßige Produktion von ROS, die die endogenen antioxidativen Schutzmechanismen übersteigen, haben Prozesse zur Folge, in denen biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide oxidiert werden. Dieser Zustand wird üblicherweise als oxidativer Stress bezeichnet.[23]

Gebildet werden die ROS vor allem in den Mitochondrien sowie durch die Enzyme Xanthin Oxidase, NADH/NADPH Oxidase und unter bestimmten Bedingungen durch die NO Synthase.[24]

Mittlerweile weiß man, dass ROS nicht nur schaden, sondern wichtige physiologische Funktionen haben können. Hierzu gehören die Induktion von Genen für die Immunabwehr, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren sowie die Stimulation des Ionentransportsystems. Im Gefäßsystem haben ROS eine physiologische Funktion in der Kontrolle der Endothelfunktion, des Gefäßtonus und der vaskulären Intaktheit. Eine pathophysiologische Funktion haben sie bei Entzündungen, Hypertrophie, Proliferation, Migration, Apoptose, Fibrose und Vasokonstriktion. Somit werden wichtige Faktoren der endothelialen Dysfunktion, nämlich die Vasokonstriktion und das Remodeling der Arterien, durch ROS beeinflusst.[25]

Jede Zelle verfügt über verschiedene Schutzmechanismen, um Radikale unschädlich zu machen und einen Schaden biologischer Moleküle zu verhindern. Zum einen dienen hierzu Antioxidantien wie Vitamin C und Glutathion, zum anderen aber auch spezielle Enzyme.

Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid, welches direkt durch ROS oxidiert werden kann (i.e eine antioxidative Wirkung aufweist) und dabei in eine dimere GSSG-Form übergeht, in der keine freie Thiolgruppe mehr vorliegt.

Auch Tetrahydrobiopterin (BH_4) kann Radikale unschädlich machen, wird dabei allerdings oxidiert und steht in dieser Form der NO-Synthase nicht mehr als Kofaktor zur Verfügung.[26] Antioxidantien wie α-Tocopherol können die Hochregulation verschiede-

ner Gene verhindern, unter anderem wird die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen von Endothelzellen beeinflusst.[3]

Der enzymatische Abbau der ROS wird vor allem durch die Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase, und Katalase katalysiert.[27]

Die SOD baut das Superoxidanion, das in den Mitochondrien produziert wird, ab. Die SOD wird durch verschiedene Isoformen repräsentiert, alle Isoformen katalysieren folgende Reaktion:

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie das entstandene H_2O_2 abgebaut wird.

Die Glutathionperoxidase katalysiert den Abbau von H_2O_2, wobei GSH als Kofaktor wirkt:

$$2\ GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2\ H_2O$$ [28]

Die Isoform Glutathionperoxidase 1 spielt dabei die Hauptrolle und wird in den meisten Zellen, einschließlich der Endothelzellen, exprimiert. Das Fehlen dieser Glutathionperoxidase führt bei Mäusen zu einer abnormen Funktion und Struktur von Gefäßen und Herz. Diese Mäuse zeigen eine vermehrte Neointimabildung, Entzündungsreaktionen im Bereich der Adventitia und vermehrte Kollagenablagerungen im Bereich der Koronararterien.[29]

Die Katalase katalysiert den Abbau von H_2O_2 zu Wasser:

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\ H_2O.$$ [30]

Die endotheliale Dysfunktion ist assoziiert mit einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in den Blutgefäßen. Die Aktivierung der endothelialen NADPH Oxidase und die Bildung von Peroxynitrit während der durch Angiotensin II induzierten mitrochondrialen Dysfunktion moduliert die endotheliale NO- und Superoxid- Bildung, welche wiederum eine Auswirkung auf die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion hat.

Aus Stickstoffmonoxid kann durch eine chemische Reaktion mit O_2^- Peroxynitrit ($ONOO^-$) werden. Die Superoxid Dismutase baut O_2^- ab und bewirkt dadurch eine Aufrechterhaltung der NO-Bioverfügbarkeit. Die Reaktionsrate von O_2^- mit $NO^\cdot$ ist allerdings dreifach höher als die Reaktion von O_2^- mit der SOD.[24]

Eine mögliche Ursache, die zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie führt, könnte ein Ungleichgewicht der Vasodilatatoren sein. Eine kritische Rolle kann dabei der Abbau von NO durch freie Radikale spielen, wodurch die endotheliale Dysfunktion ausgelöst werden könnte, die bei Patienten mit arterieller Hypertonie beobachtet wird.[31] Die Bildung von Hydrogenperoxid und freien Radikalen wie Superoxid Anion und Hydroxyl Radikale ist im Plasma von hypertonen Patienten erhöht.[32] Auch durch regelmäßiges Rauchen erhöht sich die Konzentration freier Radikaler im Plasma.[33]

1.5. Erythrozyten

Lange Zeit galten Erythrozyten als eine Falle für endotheliales NO, weil es mit oxygeniertem Hämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin reagiert. Allerdings wurde gezeigt, dass Nitrit unter hypoxischen Bedingungen mit desoxygeniertem Hämoglobin zu NO und Methämoglobin reagieren kann und dies könnte der Mechanismus der hypoxischen Vasodilatation sein. Mit desoxygeniertem Hämoglobin kann NO reagieren, indem es unter Bildung von Eisen (II)-Nitrosylhämoglobin an das Eisen der Häm-Gruppe bindet.[34]

In 2006 konnte die Expression einer funktionellen NO-Synthase in Erythrozyten nachgewiesen werden.[35] Mittlerweile konnte die erythrozytäre NO-Synthase untersucht werden und man weiß nun mit Sicherheit, dass die Erythrozyten eine endotheliale NO-Synthase exprimieren.[36] Wie auch im Endothel ist die Aktivität der erythrozytären eNOS abhängig von der intrazellulären Calziumkonzentration. Neben der Calziumkonzentration ist auch die intrazelluläre Konzentration des Substrates L-Arginin entscheidend. Durch steigenden Scherstress steigt die Konzentration an NO in einer Erythrozyten-Suspension an.[37] Dies lässt den Rückschluss zu, dass durch Scherstress eine erythrozytäre NO-Bildung induziert werden kann, was wiederum eine Vasodilatation auslösen kann.[38] Zudem kann intraerythrozytäres NO die Verformbarkeit der Erythrozyten verbessern, welche eine entscheidende Determinante für die Mikrozirkulation ist.[39]

Durch einen Vergleich verschiedener Blutzellen bezüglich ihrer NO-Produktion ergibt sich, dass Monozyten die höchste Menge an NO produzieren, gefolgt von den neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Erythrozyten und Thrombozyten. Aufgrund

der hohen Zahl an Erythrozyten im Blut sind allerdings die Erythrozyten die bedeutendsten NO-Produzenten im Blut.[36]

Eine weitere Erythrozyten-assoziierte NO-Quelle unter hypoxischen Bedingungen stellt die Reduktion von Nitrit zu NO dar, die sowohl durch die Xanthinoxidoreduktase (XOR) als auch durch die eNOS katalysiert werden kann. Die Xanthinoxidoreduktase ist an der Außenseite von Endothelzellen und Erythrozyten lokalisiert und die Expression variiert in Abhängigkeit von dem vorliegenden Sauerstoffpartialdruck und pH-Wert.[40]

1.6. Einfluss von NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit

Die Mikrozirkulation versorgt jede einzelne Körperzelle mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die kleinsten Kapillaren haben dabei einen Durchmesser von 2-3 µm. Der durchschnittliche Durchmesser humaner Erythrozyten beträgt allerdings 7,5 µm bei einem durchschnittlichen Zellvolumen von 90 fl, so dass die Erythrozyten enorm verformbar sein müssen, um die kleinsten Kapillaren passieren zu können und so eine Sauerstoffversorgung der Zellen zu gewährleisten.[41] Des Weiteren kann die Viskosität des Blutes bei hohen Scherkräften in großen Blutgefäßen durch die Verformbarkeit der Erythrozyten vermindert werden.[42]

Die wesentlichen Determinanten der erythrozytären Verformbarkeit stellen die Zell-Geometrie (z.B. das Verhältnis der Membranoberfläche zum Zellvolumen), die Zellform, die Viskosität des Zytoplasmas und mechanische Eigenschaften der Membran dar.[39] Maßgeblich für die Verformbarkeit sind Eigenschaften der Membran und das Netzwerk der in der Phospholipid-Doppelschicht verankerten zellulären Strukturproteine, vor allem der Spektrin-Aktin-Filamente.[43] Dieses Netzwerk besteht vor allem aus Spektrin, wobei mehrere Spektrinenden mit einem Aktinmolekül verknüpft sind. Spektrin kann auf 200% seiner Ausgangslänge gedehnt werden und lässt sich auf 40% kontrahieren und stellt damit einen wichtigen Faktor für die Verformbarkeit dar.[44] Die Strukturproteine sind mit Proteinen in der Membran verknüpft, allen voran das Glycophorin C und die Bande 3. Das Protein 4.1 stellt eine Verbindung von Aktin-Spektrin zu Glycophorin C her (Abbildung 4). Ein weiteres wichtiges Brückenprotein ist das Ankyrin, das Spektrin an die zytoplasmatische Domäne von Bande 3 bindet.[43]

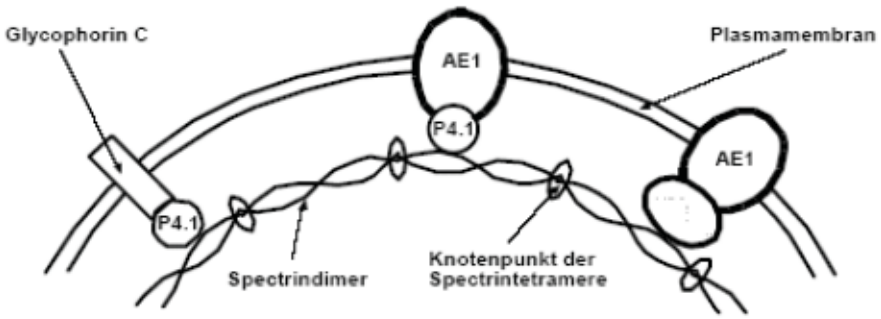


Abbildung 4: Zytoskelett eines Erythrozyten, schematisch dargestellt (Nach Jöns, T.[45]). Dargestellt sind die Spectrin-Filamente und ihre Verankerung in der Plasmamembran über Glycophorin C, AE 2 und das Protein 4.1.

Bereits seit längerem wurde die Relevanz der erythrozytären Verformbarkeit für die Mikrozirkulation erkannt[46]. Man fand heraus, dass die Verformbarkeit abhängig vom Alter der Erythrozyten ist[47]. Genau dieser Mechanismus wird in der Milz für den Abbau älterer Erythrozyten genutzt, indem diese wegen der mangelnden Verformbarkeit in den kleinen Milzsinusoiden stecken bleiben und von Zellen des retikulo-endothelialen Systems phagozytiert werden. Bei einem erhöhten Scherstress kann die NO-Bildung der Erythrozyten induziert werden und eine erhöhte NO-Konzentration verbessert die Verformbarkeit[48] [37]. In den ersten Messungen zur Verformbarkeit wurden die Erythrozyten durch eine Pipette oder einen Filter aspiriert und durch direkte Mikroskopie wurde die Verformbarkeit gemessen oder die Verformbarkeit wurde auf der Basis des nötigen Drucks für die Passage der Erythrozyten durch die Pipette bzw. den Filter abgeschätzt. Erste Experimente mit Erythrozyten in einer viskösen Flüssigkeit wurden gemacht, die Elongationsindices der Erythrozyten wurden manuell mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt. Man erkannte die Relevanz der zytoplasmatischen Viskosität, da die Verformbarkeit bei einer erhöhten Hämoglobin-Konzentration und dementsprechend erhöhter Viskosität deutlich eingeschränkt war. Eine erhöhte intrazelluläre Calziumkonzentration reduzierte die Verformbarkeit, besonders ältere Erythrozyten waren hierfür vulnerabel.[46]

Die Messungen auf dem Prinzip der Ektacytometrie wurden weiter entwickelt, so dass die Erythrozyten automatisch und in größerer Zellzahl vermessen werden konnten und eine zuverlässigere Methode etabliert war. Die Verformbarkeit zeigt sich nach einer Inkubation der Erythrozyten mit einem NOS-Inhibitor deutlich vermindert, wohingegen

die Inkubation mit einem NO-Donor die Verformbarkeit verbessert.[39] Somit ist auch der intraerythrozytäre NO-Spiegel eine wesentliche Determinante für die Verfombarkeit der Erythrozyten.[39]

Die Membranfluidität ist eine weitere Eigenschaft von Biomembranen und ist ein wichtiger Faktor in der Modulation von Zellfunktionen wie der Fließeigenschaften und der Mikroviskosität der Membranen. Bei Patienten mit essentieller arterieller Hypertonie ist die Membranfluidität vermindert. Durch einen NO-Donor konnte die Membranfluidität bei Patienten mit einer Hypertonie in einem höheren Maße verbessert werden als bei gesunden Probanden.[49]

Ebenso wurde bei Patienten mit einer Dyslipidämie[50] und einem Diabetes mellitus[51] eine Verschlechterung der erythrozytären Verformbarkeit nachgewiesen.

Die Zielstruktur der Effekte von NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit ist bisher nicht sicher identifiziert worden, am wahrscheinlichsten ist eine veränderte Phosphorylierung des Zytoskeletts.[52]

1.7. Messung von reaktiven Sauerstoffspezies mithilfe von Fluoreszenzmolekülen

Mit dem Ziel, einen umfassenden Überblick über die biochemische Zusammensetzung der Erythrozyten zu erhalten, wurden zeitgleich die Konzentrationen der reaktiven Sauerstoff Spezies, NO und von Glutathion unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Ein Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass man mit dieser Methode eine Vielzahl von Zellen einzeln betrachten kann und so verlässliche Durchschnittswerte erhält.

Ein Nachteil in der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen besteht darin, dass das Fluoresenzsignal aus unspezifischen Reaktionen generiert werden könnte[53] und schon geringe Änderungen des Versuchsprotokolls oder der äußeren Einflussfaktoren wie z.B. Licht, Umgebungstemperatur oder pH die Ergebnisse der Messung verändern können.

1.7.1. DAF-FM

Da NO ein chemisch sehr instabiler Stoff ist, bereitet es immer noch sehr große Schwierigkeiten eine variable Messung von intrazellulärem NO zu finden. Mit den meisten Methoden werden Abbauprodukte des NO wie Nitrit bestimmt, um so eine Aussage über die NO-Konzentration treffen zu können. Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes 4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorescein diacetat (DAF-FM diacetat) ist es gelungen eine Möglichkeit zur NO-Messung im vitalen Erythrozyten durchzuführen.[54]

Der direkte Nachweis von NO in vitalen Zellen ist seit längerer Zeit der Mittelpunkt verschiedener Studien. Bereits 1998 stellten Kojima et al. den Fluoreszenzfarbstoff DAF-2 vor, dessen Fluoreszenzsignal in glatten Muskelzellen der Rattenaorta vom NO-Spiegel der Zellen abhängig war. Der Fluoreszenzfarbstoff wurde weiterentwickelt zu DAF-FM diacetat, das eine zellpermeable Variante von DAF-2 darstellt. Intrazellulär wird es durch Esterasen deacetyliert und zu DAF-2 hydrolysiert. Durch eine Reaktion mit NO entsteht das grün fluoreszierende Triazolofluorescein (DAF-FM-T).

Die Sensitivität und Spezifität des Fluoreszenzfarbstoffs DAF-FM diacetat wurde in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen getestet. Die Arbeitsgruppe Balcerczyk et al. hat sich vor allem auf die Spezifität von DAF-FM auf NO konzentriert und diese vor allem im Vergleich mit dem zuvor verwendeten DAF-2 bestätigt. Zudem haben sie die Abhängigkeit von H_2O_2 und O_2^- auf das Fluoreszenzsignal getestet und die Untersuchungen erbrachten keine signifikanten Veränderungen des Signals. Der Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM reagiert nicht mit NO direkt, sondern mit abstammenden Molekülen wie N_2O_3.[55] Wobei nach vorheriger Aktivierung des DAF-FMs zu DAF-FM-Radikal eine Reaktion mit NO möglich wird. Unsere Arbeitsgruppe beschrieb die Handhabung von DAF-FM diacetat vor Kurzem als nicht einfach, bewertete die Methode unter Berücksichtigung eines Standardprotokolls jedoch als eine verlässliche und Untersucherunabhängige Methode.[56]

1.7.2. DCF

2,7-Dichlorohydrofluorescein (DCF) ist ein sehr weit verbreiteter Fluoreszenzfarbstoff für reaktive Sauerstoffspezies.[53]

Durch Oxidation entsteht aus DCF das fluoreszierende 2,7-Dichlorofluorescein. Während der Entwicklung DCFs dachte man, einen spezifischen Nachweis für H_2O_2 gefunden zu haben. Mittlerweile hat sich aber gezeigt, dass DCF auch von anderen ROS oxidiert werden kann, wie z.B. $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, $NO^{\cdot}$ oder $ONOO^{\cdot}$. DCF diacetat ist zellpermeabel und somit zur Bestimmung einer intrazellulären Fluoreszenz gut geeignet.[57] Fehlerquellen bei der Messung von ROS mittels DCF bestehen, da es auch durch zelluläre Peroxidasen und Cytochrom C oxidiert werden kann.[58] In der Literatur wird zudem die Möglichkeit diskutiert, dass sowohl die Katalase als auch die Superoxiddismutase die Oxidation von DCFH katalysieren können.[59] Des Weiteren gibt es mehrere Hinweise, dass $O_2^{\cdot-}$ nicht in der Lage ist, eine Oxidation von DCF auszulösen.[60] Trotz einiger Möglichkeiten ist der Fluoreszenzfarbstoff DCF eine sensitive, aber nur qualitative Nachweismethode für reaktive Sauerstoffspezies.[61]

1.7.3. MitoSOX

MitoSOX stellt einen Fluoreszenzfarbstoff für den spezifischen Nachweis von Superoxidanion dar.

Eine Schwierigkeit in der Messung von $O_2^{\cdot-}$ stellt der schnelle Abbau durch die SOD dar. Die Nachweismethode müsste für einen zuverlässigen Nachweis von $O_2^{\cdot-}$ eine schnellere Reaktionsrate aufweisen als die SOD. Mit Mitosox ist eine Methode gefunden worden, die realistisch mit der SOD um die Reaktion mit $O_2^{\cdot-}$ kompetieren kann, allen voran das intrazellulär gebildete Mito-HE Radikal. Mitosox (Mito-HE) ist zellpermeabel, das HE stellt eine reduzierte Form von Ethidium (Etd^+) dar. Intrazellulär kann Mito-HE zum fluoreszierenden Mito-Etd^+ oxidiert werden. Durch andere oxidierende Enzyme (z.B. Peroxidasen, Oxidasen, Cytochrom C, etc.) steigt der intrazelluläre Gehalt des Mito-HE Radikal. Dieses Radikal reagiert sehr schnell und spezifisch mit $O_2^{\cdot-}$,

so dass durch erhöhte Oxidation von Mito-HE die Wahrscheinlichkeit O_2^- darzustellen ansteigt. Mitosox ist ein spezifischer Marker für O_2^-, allerdings stellt es eine semiquantitative Nachweismethode dar, da der Anteil an O_2^- der mit der SOD reagiert unbekannt bleibt.[62] Auch Yan et al. beschrieben Mitosox als einen sensitiven und spezifischen Marker für O_2^-, vor allem zur Quantifizierung mitochondrialer Superoxidanionen.[63] Der Fluoreszenzfarbstoff Mitosox ist in vielen verschiedenen Studien als ein Marker für O_2^- angewendet worden und für verschiedene Methoden wie auch der Durchflusszytometrie etabliert worden.[64]

1.7.4. ThiolTracker

Wie oben bereits dargestellt, gelten Glutathion und die Glutathionperoxidase als eine der wichtigsten Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress in der Säugetierzelle.[65]

Mandavilli et al. beschreiben den Fluoreszenzfarbstoff TT als hochreaktiv in Bezug auf Thiole. Da die große Mehrheit der intrazellulären Thiole Glutathion entspricht, eignet sich ein Farbstoff für Thiole gut für die Darstellung der Glutathionkonzentration in der Zelle. Wird Glutathion (GSH) durch die Glutathionperoxidase für den Abbau von ROS verbraucht, geht es in eine dimere GS-SG Form über, welche keine freie Thiolgruppe mehr enthält. Der Farbstoff TT weist eine gute Fluoreszenz auf, wie es für eine valide Messung erforderlich ist.[66] . Der Fluoreszenzfarbstoff ist für verschiedene Methoden etabliert worden, einschließlich für die hier verwendete Durchflusszytometrie.[67, 68, 69]

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle der erythrozytären eNOS sowie die Konzentrationen und die Einflüsse von ROS auf die Funktion der Erythrozyten, insbesondere der erythrozytären Verformbarkeit zu untersuchen. Hierzu soll zuerst eine Methode etabliert werden, bei der mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig die NO- und ROS-Konzentrationen im Erythrozyten durch die Durchflusszytometrie gemessen werden können. Zweitens, die etablierte Methode soll in einem translationalen Ansatz angewendet werden, um den erythrozytären Redox-Status (ROS, GSH), den NO-Spiegel (DAF-FM, Nitrit, Nitrat) und die Verformbarkeit der Erythrozyten bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit mit oder ohne arterieller Hypertonie sowie an $eNOS^{-/-}$ Mäusen (i.e. ein Mausmodell, das durch eine endothaliale Dysfunktion charakterisiert ist) zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1. Verwendete Materialien

Es folgt eine kurze Auflistung aller verwendeten Chemikalien, geordnet nach der Firma von der die jeweilige Chemikalie bezogen wurde.

Isopropanol wurde bei der **AppliChem GmBH** (Darmstadt, Deutschland) gekauft, L-NIO bei der **Axxora** Deutschland GmbH (Lörrach, Deutschland). Die Sphero™ Rainbow Calibration Particles (8peaks, 3-3,4 µm) stammen von **BD Biosciences** (Heidelberg, Deutschland), Phenazine methosulfate (PMS) N-Methylphenazinium methylsulfate von der **Biomol GmbH** (Hamburg, Deutschland). Von der **Carl Roth GmbH + Co. KG** (Karlsruhe, Deutschland) wurden Essigsäure, L-Arginin, L-Arginin-monohydrochlorid und Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2) bezogen. EUK-134 wurde bei **Cayman Europe** (Tallinn, Estland) gekauft; L-NAME, S-Ethyl-ITU, S-Isopropyl-ITU und Tempol bei der **Enzo Life Sciences GmbH** (Lörrach, Deutschland). Die Fluoreszenzfarbstoffe DAF-FM diacetate, 2,7-Dichlorhydrofluorescein diacetate (DCF), MitoSOX und Thiol-Tracker stammen von der **Invitrogen GmbH** (Darmstadt, Deutschland). Die Firma **Merck KGaA** (Darmstadt, Deutschland) lieferte Kaliumjodid (KJ), Natriumnitrit ($NaNO_2$), Salzsäure (HCl) 25% und Sodium hydroxide (NaOH). Alle weiteren Chemikalien wurden von der **Sigma-Aldrich Biochemie GmbH** (Hamburg, Deutschland) bezogen: Calciumchlorid ($CaCl_2$), D-Arginin , D-Arginin-Hydrochlorid, Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Glucose, Igepal CA-210, Iodid (J_2), Kaliumchlorid (KCl), Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), Magnesiumsulfat ($MgSO_4$), Methanol, β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate, Natriumchlorid (NaCl), Natriumdihydrogenphosphat ($Na_2H_2PO_4$), Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), N-Ethylmaleimide (NEM) und Kalium hexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$).

3.1.2 Puffer-Zubereitung

Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)

Der Puffer setzt sich zusammen aus 137 mM Natriumchlorid, 5,4 mM Kaliumchlorid, 0,3 mM Natriumhydrogenphosphat, 0,4 mM Kaliumhydrogenphosphat, 1,3 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumsulfat, 4,2 mM Natriumhydrogencarbonat und 5,4 mM Glucose.

Stabilization Solution

Zur Verhinderung der Oxidation von Nitrit zu Nitrat durch die Reaktion von Nitrit mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin werden die Erythrozyten durch die Stabilization Solution lysiert und Oxyhämoglobin zu Methämoglobin oxidiert. Dadurch kann Nitrit nicht mehr mit Oxyhämoglobin reagieren.

$$\text{Oxy–Hb(FeII)} + \text{NO} \rightleftharpoons \text{Met–Hb(FeIII)} + \text{NO}_3^-$$

Die Lösung setzt sich zusammen aus 250 µl einer 800 mM Ferricyanidlösung, 2000 µl einer 200 mM N-Ethylmaleimidelösung und 200 µl einer 10 mM Diethylentriaminpentaessigsäure gelöst in 17350 µl Wasser. Zum Schluss werden 200 µl Igepal CA-210 hinzugefügt. Die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt und ist maximal eine Woche haltbar.

3.2. Methoden

3.2.1. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll der vorliegenden Untersuchung umfasst die folgenden Teile:

(I) Patientenrekrutierung

(II) Blutentnahme

(III) Ultraschalluntersuchung

(IV) Blutuntersuchungen

Um die kardiovaskulären Risikofaktoren zu klassifizieren erfolgten eine Anamnese sowie eine körperliche Untersuchung. Zusätzlich wurden klinische Routineparameter im Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf bestimmt. Diese umfassten ein kleines Blutbild, Kreatinin, Harnstoff, Glucose, HbA_{1c}, Cholesterin, Triglyceride und das C-reaktive Protein. Mit dem Ziel eines intraindividuellen Vergleichs, inwieweit Änderungen der endothelialen NOS-Aktivität als wesentliche Grundlage einer endothelialen Dysfunktion mit Änderungen der erythrozytären NOS-Aktivität einhergehen, wurden weitere laborchemische und angiologische Parameter erhoben. Im kardiologischen Labor wurden eine Bestimmung der erythrozytären Verformbarkeit, des Nitritgehalts des Plasmas und der Erythrozyten sowie die Messung von NO und reaktiven Sauerstoffspezies mittels Fluoreszenzfärbung in der Durchflusszytometrie durchgeführt (Übersicht s. Abbildung 4). In der angiologischen Untersuchung wurde der Blutdruck am Arm mit einem herkömmlichen Blutdruckmessgerät gemessen. Die Endothelfunktion wurde mittels duplexsonographischer Bestimmung der fluss-abhängigen Vasodilatation (FMD) an der Arteria brachialis dargestellt.

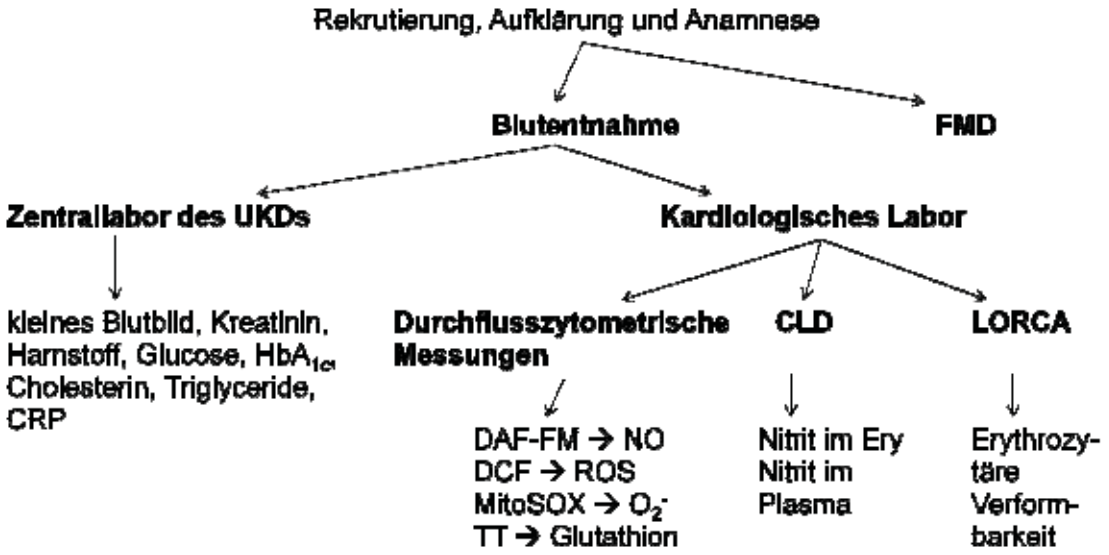


Abbildung 4 Überblick über das Studienprotokoll

3.2.1.1 Rekrutierung der Patienten und Probanden

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf positiv votiert (Studie 3857 und 3450). Für die Untersuchungen wurden gesunde Probanden sowie Patienten der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie des Universitätsklinikums Düsseldorf rekrutiert. Die Rekrutierung der Studienteilnehmer wurde von einem Arzt der kardiologischen Klinik durchgeführt (Dr. med. R. Sansone). In einem ersten Gespräch erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Studienteilnehmer. Nach erfolgter Einwilligung der Probanden erschienen die Probanden zum Untersuchungstag nüchtern.

3.2.1.2 Blutentnahme

Unter Zuhilfenahme einer venösen Punktionskanüle (Butterfly®, ø 0,6mm, Abbott Ireland, Sligo, Irland) wurden etwa 20 ml Blut der Probanden aus der gestauten Vena mediana cubiti unter Vermeidung einer Hämolyse entnommen.

3.2.2. Studienkollektiv

3.2.2.1 Phase I: Optimierung der Messmethoden

In der ersten Phase der klinischen Untersuchung wurden junge gesunde Personen untersucht. Diese Phase diente vor allem der Optimierung der Messmethoden sowie der Analyse von Basisparametern.

Ausschlusskriterien stellten eine Hypertension (Blutdruck >140/90 mmHg), Diabetes mellitus (Nüchternplasmaglucose >128mg/dl), Hypercholesterinämie (LDL >180 mg/dl, HDL <45 mg/dl) sowie akute Infektionen (CRP >0,5 mg/dl) oder maligne Erkrankungen dar. Weiterhin führten eine Herzinsuffizienz, eine akute oder terminale Niereninsuffizienz sowie höhergradige Herzrhythmusstörungen zum Ausschluss. Für die Untersuchung der Endothel-unabhängigen Vasodilatation stellten zudem eine arterielle Hypotension (Blutdruck <100/60 mmHg) sowie eine Intoleranz von Glyzeroltrinitrat Ausschlusskriterien dar.

3.2.2.2 Phase II: Einfluss der eNOS-Expression - Untersuchung am Mausmodell

Um den Einfluss der eNOS-Expression auf Redox-Status und erythrozytäre Verformbarkeit zu untersuchen, wurde das Mausmodell zur Hilfe genommen. In den Untersuchungen wurden Wildtyp C57Bl/6-Mäuse und eNOS-KO-Mäuse miteinander verglichen. Alle Mäuse wurden bis zum Untersuchungstag unter gleichen Bedingungen in der Tierversuchsanstalt Düsseldorf gehalten. Betäubung und Blutabnahme wurden durch Dr.rer.nat M. Cortese-Krott durchgeführt (Aktenzeichen 84-02.04.2011.A227). Den Mäusen wurde intraperitoneal Ketamin/Rumpun titriert nach Wirkung gespritzt. Nach Eintritt der Wirkung wurde das Blut mit Hilfe einer heparinisierten Glaspipette retroorbital bzw. per Herzpunktion entnommen.

Die anschließenden Untersuchungen des Blutes entsprechen dem Protokoll des menschlichen Blutes mit dem einzigen Unterschied, dass das Blut der Mäuse in einem Verhältnis von 1:100 mit Heparin versetzt wurde. Das weitere Protokoll zur durchflusszytometrischen Messung und der Bestimmung des Nitrits im Erythrozyten und im Plasma war identisch.

3.2.2.3 Phase III: Fall-Kontroll-Studie

In dieser Phase wurden Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit mit und ohne arterieller Hypertonie, Patienten mit arterieller Hypertonie sowie gesunde Probanden im gleichen Alter miteinander verglichen.

Ausschlusskriterien waren eine akute Infektion (C-reaktives Protein >0,5mg/dl), eine maligne Erkrankung, eine Herzinsuffizienz (NYHA III-IV), höhergradige Herzrhythmusstörungen oder eine akute oder terminale Niereninsuffizienz. Zudem stellten arterielle Hypotension und Intoleranz von Glyzeroltrinitrat weitere Ausschlusskriterien für die Untersuchung der Endothel-unabhängigen Vasodilatation dar.

3.2.3. Detektion von freien Radikalen mittels Fluoreszenz-Molekülen und Durchflusszytometrie

3.2.3.1 Erythrozytenpräparation

Das frisch abgenommene Blut wurde unmittelbar nach der Blutentnahme zur Antikoagulation in einem Verhältnis von 1:1000 mit Heparin versetzt. Anschließend wurde das

Blut in einem Verhältnis von 1:500 mit gekühltem PBS (Phosphate buffered saline) verdünnt.

Da die eNOS als Substrat für die NO Bildung L-Arginin nutzt, wurden Erythrozyten mit 1,5 mM L-Arginin-hydrochlorid inkubiert, um zu messen, ob sich der NO-Spiegel in der Zelle steigern lässt. Die physiologische L-Arginin Konzentration im Plasma liegt bei 0,1 mM[70], so dass in vitro eine deutlich supraphysiologische Konzentration vorlag, um eine ausreichende Versorgung der NO-Synthase zu bewirken. Als Negativkontrolle wurde eine weitere Probe der Erythrozyten mit 1,5 mM D-Arginin-hydrochlorid behandelt. D-Arginin ist ein Enantiomer von L-Arginin und kann von menschlichen Enzymen nicht verwertet werden.

Außerdem wurde eine weitere Probe mit dem NOS Inhibitor L-NAME behandelt, um weitergehend zu untersuchen, inwieweit das Fluoreszenz-Signal von der Aktivität der eNOS abhängig ist. Kurz vor der Verwendung wurde eine auf PBS basierende Stammlösung von L-NAME hergestellt. Von dieser 300 mM Stammlösung wurden 5 µl zu den 495 µl des verdünnten Vollbluts gegeben, so dass L-NAME in einer Endkonzentration von 3 mM vorlag.

Um die Spezifität des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs zu kontrollieren, wurden weitere Proben der Erythrozyten mit einem Superoxid Anionen Radikal (O_2^-) -generierenden System oder mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt. Das O_2^- -generierende System setzt sich aus dem Elektronendonor β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2′-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH) und Phenazine methosulfat (PMS) zusammen. Durch die Reduktion von PMS durch NADPH unter aeroben Bedingungen wird O_2^- freigesetzt.[71] NADPH wurde den Erythrozyten in einer Endkonzentration von 100 µM zugegeben, PMS in einer Endkonzentration von 1 mM. In einer weiteren Probe wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in einer Endkonzentration von 10 mM zu den verdünnten Erythrozyten pipettiert.

Des Weiteren erfolgte die Einführung der membranpermeablen Superoxid-Dismutase (SOD) –Mimetika Tempol und EUK-134. EUK-134 wurde in einer Stammlösung von 10 mM in DMSO gelöst und die Erythrozyten wurden mit Endkonzentrationen von 10 µM bis 1 mM inkubiert. Für das SOD-Mimetikum Tempol wurde ebenfalls eine 10 mM Stammlösung in DMSO vorbereitet und mit Endkonzentrationen von 10 µM bis 1 mM zu den Erythrozyten gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden die Zellen mit MitoSOX angefärbt und in der Durchflusszytometrie gemessen. Für die Kontrolle der Wirkung des SOD-Mimetikums wurde immer auch eine

Probe der Erythrozyten mit dem O_2^- -generierenden System PMS und NADPH zusätzlich zum SOD-Mimetikum behandelt.

Nach der Festlegung der optimalen Konzentration des SOD-Mimetikums EUK-134, wurde es in einer 80µM-Endkonzentration eingesetzt, um auszuschließen, dass die intrazelluläre Bildung von O_2^- einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal hat.

Diese Proben wurden 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit den verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, inkubiert und gemessen.

3.2.3.2 Behandlung der Erythrozyten mit DAF-FM diacetat

Zum intrazellulären Nachweis von NO wurden die Zellen mit dem membranpermeablen 4-Amino-5-Methylamino-2,7-Difluorescein diacetat (DAF-FM) angefärbt, indem ein Vial DAF-FM in 20 µl DMSO gelöst wurde, so dass eine Stammlösung von 5 mM vorlag. Von dieser Stammlösung wurde 1 µl DAF-FM diacetat in jede Probe pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 10 µM bestand. Die Herstellung der DAF-FM-Stammlösung erfolgte stets unmittelbar vor der Verwendung. Die Proben wurden für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 1:3 Verdünnung mit PBS erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

3.2.3.3 Optimierung der in vitro Bedingungen

Für eine möglichst physiologische und optimale Inkubation der Erythrozyten wurden die beiden Pufferlösungen HBSS und PBS miteinander verglichen. Hierzu wurde Vollblut direkt nach der Blutentnahme 1:500 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt und entweder mit 3 mM L-NAME oder mit 3,15 mM L-NIO für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zusätzlich blieb eine Probe unbehandelt. Da bekannt ist, dass das

DAF-Signal pH-abhängig ist, wurde der pH-Wert der einzelnen Lösungen bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 10 µM DAF-FM gefärbt. Für weitere 30 Minuten wurden die Proben im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer 1:3 Verdünnung mit der jeweiligen Pufferlösung erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Um mögliche Interaktionen zwischen dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM diacetat, NOS-Inhibitoren und dem Puffer besser darstellen zu können, wurden die gleichen Proben auch mit einem Fluorometer (FluoStar Optima Fluorometer, Ex488 Em 590; BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. Die Fluorometrie ist ein Verfahren zur Messung von Fluoreszenz-Intensitäten in Lösungen. Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie werden keine einzelnen Zellen betrachtet. Für jede Probe wurde die Fluoreszenz doppelt bestimmt. Zur Kontrolle diente eine unbehandelte und ungefärbte Probe.

Ähnlich der Proben für die Durchflusszytometrie-Bestimmung wurden Erythrozyten direkt nach der Blutentnahme 1:500 in gekühlter HBSS- oder PBS-Lösung verdünnt. Für 30 Minuten wurden die Zellen mit L-NIO, L-NAME oder unbehandelt im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. In Abweichung zum Durchflusszytometrie-Experiment wurden zusätzlich die gleichen Proben ohne Erythrozyten pipettiert, um mögliche Interaktionen zwischen den Pufferlösungen, den NOS-Inhibitoren und DAF-FM näher zu beleuchten. Bis auf eine ungefärbte Kontrollprobe wurden alle Proben mit 10 µM DAF-FM diacetat versetzt und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Da die Fluorometrie keinen Unterschied zwischen der intrazellulären Fluoreszenz und der Fluoreszenz aus dem umgebenden Medium zulässt, wurden die Erythrozyten-enthaltenden Proben für 5 Minuten bei 300g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 500µl der Pufferlösung resuspendiert. So konnte überschüssiges DAF-FM, das nicht in die Erythrozyten diffundiert ist, aus dem umgebenden Medium entfernt werden. Innerhalb der nächsten 15 Minuten wurden die Proben am Fluorometer gemessen.

3.2.3.4 Behandlung der Erythrozyten mit DCF

Um neben dem NO-Spiegel der Erythrozyten auch die freien Radikale H_2O_2 und O_2^- zu quantifizieren wurde der Fluoreszenzfarbstoff 2,7-Dichlorhydrofluorescein diacetat (DCF) verwendet.

Nach dem ersten Inkubationsschritt wie unter 2.2.3.1 beschrieben wurden die Erythrozyten für 10 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 250 µl gekühltem PBS resuspendiert.

Von DCF wurde eine 40 mM Stammlösung in DMSO vorbereitet. Diese Stammlösung wurde weiter mit gekühltem PBS verdünnt um eine Konzentration von 20 µM zu erhalten. Hiervon wurden 250 µl zu den Erythrozyten pipettiert, wobei eine Probe ungefärbt blieb.

Die Proben wurden für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und danach bei 300 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Erythrozyten in 500 µl PBS resuspendiert. Es folgte die zügige Messung am Durchflusszytometer wie unten beschrieben.

3.2.3.5 Behandlung der Erythrozyten mit TT

Zur Vervollständigung des Überblickes über den Redox-Status der Erythrozyten wurde der Glutathion-Spiegel indirekt über den Fluoreszenz-Farbstoff ThiolTracker (TT) dargestellt, indem TT intrazelluläre Thiole anfärbt. In Erythrozyten sind ein Großteil aller intrazellulären Thiole Glutathion, weshalb man von dem TT-Spiegel Rückschlüsse auf den Glutathion Spiegel der Zelle ziehen kann.

Nach der ersten Inkubation wurden alle Proben für 10 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 250 µl gekühltem PBS resuspendiert. Für diese Probenreihe wurde ein Vial TT in 30 µl DMSO gelöst und 1:500 durch gekühltes PBS verdünnt. Von dieser 20 µM Stammlösung wurden je 250 µl zu den Erythrozyten pipettiert. Beide Probenreihen wurden für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert und danach bei 300 g und 4°C für 10 Minuten

abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, erfolgte die Resuspension der Erythrozyten in 500 µl PBS und die Messung am Durchflusszytometer wie unten beschrieben.

3.2.3.6 Behandlung der Erythrozyten mit MitoSOX

Der Fluoreszenzfarbstoff MitoSOX wurde eingesetzt, um O_2^- spezifisch messen zu können. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen und Protokolle getestet, um ein optimales Protokoll für die O_2^- -Messung zu finden. Es wurde eine 5 mM Stammlösung von MitoSOX hergestellt, indem ein Vial MitoSOX in 13 µl DMSO gelöst wurde. Mit gekühltem PBS wurde die 5 mM Lösung 1:1000 verdünnt. Für eine Endkonzentration von 3,3 µM wurden 1000 µl zu 500 µl 1:500 verdünnter Erythrozyten gegeben. Zudem wurden Endkonzentrationen von 0,67 µM und 6,67 µM getestet. Zur Kontrolle der spezifischen Messung von O_2^- wurde je eine Probe der Erythrozyten mit 1 mM PMS und 100 µM NADPH sowie eine Probe mit 10 mM H_2O_2 behandelt und für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden mit den Endkonzentrationen 0,67 µM, 3,3 µM und 6,67 µM von MitoSOX gefärbt und nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln am Durchflusszytometer gemessen. Zudem wurde ein weiteres Versuchsprotokoll getestet, bei dem die Proben nach der ersten und nach der zweiten Inkubation jeweils bei 300 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert.

Nach der Auswertung der Vorversuche wurde das endgültige Versuchsprotokoll festgelegt und in allen weiteren Versuchen wurde eine MitoSOX-Endkonzentration von 3,3 µM verwendet. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad wurden die Proben am Durchflusszytometer gemessen.

3.2.3.7 Durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung der Fluoreszenz-Aktivität einzelner Zellen. Alle Messungen erfolgten im selben Durchflusszytometer (FACS Canto II) unter Verwendung der Software BD Diva 5.0. Die Daten wurden anschließend mit der Software FlowJo V9 (TreeStar, Ashland, OR, USA) analysiert. Die Erythrozyten wurden durch ihre Größe (Forward Light Scatter, FSC) und ihre Granularität (Side Light Scatter, SSC) charakterisiert. In jedem Experiment diente eine ungefärbte Probe mit Erythrozyten als Kontrolle der Autofluoreszenz.

Für die Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse ist es von großer Relevanz, dass die Einstellungen des Durchflusszytometers bei jedem Experiment identisch sind. Um diese Einstellungen zu verifizieren, wurden deshalb vor jeder Messung zuerst Sphero™ Rainbow Calibration Particles in PBS-Puffer gemessen. Die Höhe der Fluoreszenzlevel wurde in allen entscheidenden Fluoreszenzkanälen bestimmt und bei Abweichungen gegebenenfalls angepasst, indem das Voltage des entsprechenden Fluoreszenzkanals verändert wurde. Erst nachdem die Fluoreszenzlevels angepasst worden waren, wurde mit der Messung der eigentlichen Proben begonnen.

Die Proben wurden alle innerhalb von 15 Minuten nach Ende der Inkubationszeit im Durchflusszytometer gemessen und bis dahin auf Eis und im Dunkeln gelagert.

Die Fluoreszenzfarbstoffe DAF-FM und DCF wurden durch einen Argon Laser mit 488 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenz-Signal wurde im FITC-Kanal (Em_{max} 520 nm, Filter 530/30) gemessen.

Bei der Messung im Durchflusszytometer wurde MitoSOX durch einen Argon Laser mit 488 nm angeregt und das emittierte Fluoreszenz-Signal wurde im PE-Kanal (Em_{max} 578 nm, Filter 575/26) gemessen.

3.2.4. Messung von Nitrit mittels Chemilumineszenz Detektion (CLD)

Eine der sensibelsten und spezifischsten Methode zur Messung von Stickstoffmonoxid (NO) stellt die Chemilumineszenz-Detektion dar.[72] Mittels der CLD werden Lichtquanten gemessen, die bei der Reaktion von NO mit Ozon freigesetzt werden. Die NO-Konzentration ist dabei direkt proportional zur Intensität des Lichtes. Neben der Messung von freiem NO ist auch die Messung der NO-Speicherformen und –Abbauprodukte möglich.

Für die Probenherstellung wurde das Vollblut direkt nach der Blutentnahme zur Antikoagulation in einem Verhältnis von 1:1000 mit Heparin versetzt und anschließend für 15 Minuten bei 800g und 4°C zentrifugiert. Das Plasma wurde in neue Röhrchen überführt und aus dem Pellet wurden 100µl Erythrozyten entnommen und in einem Verhältnis von 1:6,66 mit Stabilization Solution versetzt. Die hierin enthaltene Diethylentriaminpentaessigsäure und Igepal zerstören die Zellmembran der Erythrozyten und ermöglichen dem Ferricyanid den Zugang zum Hämoglobin. Dieses reagiert mit dem Hämoglobin zu Methämoglobin und verhindert so die Umwandlung von Nitrit zu Nitrat. N-Ethylmaleimidelösung alkyliert die Thiole, so dass die Proteine NO nicht mehr binden können. Die Messungen des Plasmas und der Erythrozyten wurden entweder sofort nach der Blutentnahme durchgeführt oder die Proben wurden bis zur Messung bei -80°C gelagert. Kurz vor der Messung wurden die Erythrozyten-Proben 1:1 mit Methanol gefällt und bei 14000 RPM für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und gemessen.

Vor jeder Messung wurde das Gerät geeicht, indem jeweils eine Nitrit-Eichreihe in PBS und eine in Stabilization Solution gemessen wurden. Zudem wurde bei jeder Messung die Nitritkontamination der verwendeten Stabilization Solution und des Methanols bestimmt.

Zur Bestimmung der NO-Konzentration wurden je 100 µl der Probe mit einer Glasspritze in die Reaktionskammer der Anlage gegeben. Jede Probe wurde dreifach bestimmt. In der Reaktionskammer befanden sich 20 ml einer Reduktionslösung, in der 1,62 g Kaliumjodid und 0,57 g Jod in 15 ml Wasser und 200 ml Essigsäure gelöst waren. Durch diese reduktive Lösung wurde das Nitrosoniumion (NO^+) aus Nitrit freigesetzt und regierte mit dem Jodid weiter zu NO. Die Reaktionskammer wurde für gleichbleibende Temperaturbedingungen von außen mit 60°C warmem Wasser umspült und mit

einer konstanten Flussrate von 1 ml/min von dem Trägergas Helium durchströmt. Das freigesetzte gasförmige NO wurde durch das Helium zu einer zweiten Kammer transportiert, die auf 4°C gekühlt wurde. Bevor das NO in die Reaktionskammer des CLDs gelangte, durchströmte es eine 4°C 1M Natronlauge-Lösung. Die beiden gekühlten Kammern dienen dem Abfangen von Säuren, höheren Stickoxiden und Proteinen aus dem Gasstrom.

In der Reaktionskammer des CLD reagierte das NO aus der Probe mit Ozon wobei Licht emittiert wurde, das durch einen gekühlten Photomultipler erfasst wurde. Die Daten wurden von einem Recorder aufgezeichnet und an einen PC weitergeleitet.

Alle Messungen wurden am gleichen Gerät (CLD 88e der Firma Eco Physics) durchgeführt. Die Messungen wurden am PC mit dem Programm eDAQ PowerChrom dargestellt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Programme Origin und Microsoft Excel. Die Messung der eigentlichen Proben erfolgte immer nach Auswertung und Bewertung der zugehörigen Eichreihe.

3.2.5. Messung der Erythrozyten-Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA)

Die Messung der erythrozytären Verformbarkeit mittels des Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) basiert auf dem Prinzip der Ektacytometrie. Die Erythrozyten werden zwischen dem inneren Zylinder (bob) und dem drehenden Außenzylinder (cup) durch verschiedene Levels an Scherspannungen verformt. Ein Laserstrahl ist auf die Erythrozyten gerichtet und zeichnet die Veränderungen des Diffraktionsmusters auf. Das Elongationsprogramm berechnet aus der Länge und Breite der Erythrozyten den Elongationsindex (EI= (A-B)/(A+B)). Die Elongationsindices werden gegenüber der entsprechenden Scherspannung aufgetragen und ergeben die Verformbarkeitskurve.

Für jede Probe wurden 5 ml einer fertigen Polyvinylpyrridon-Lösung im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zu der Lösung wurden 25 µl heparinisiertes Vollblut pipettiert und durch Schwenken miteinander vermischt. Wenn auch der Cell Analyzer eine konstante Tem-

peratur von 37°C erreicht hatte, wurden hiervon 1000 µl zwischen dem inneren und äußeren Zylinder aufgegeben und unter Angabe der Viskosität der Polyvinylpyrridon-Lösung konnte die Messung mit Hilfe des Elongationsprogrammes gestartet werden.

3.2.6. Statistik

Die statistische Datenverarbeitung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2007 und GraphPad Prism 5. Deskriptive statistische Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Mittelwerte von Gruppen wurden durch die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA auf Signifikanz untersucht. Konsekutiv wurde der Post-Hoc Test Bonferroni durchgeführt, mit dem die einzelnen Gruppen verglichen wurden. Werte wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn der p-Wert gleich oder unterhalb von 0,05 lag. Bei allen Proben am Fluorometer wurde die Fluoreszenz doppelt bestimmt, bei den Proben zur Nitritmessung mittels CLD wurden alle Werte dreifach bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Messmethoden und Analyse der Basisparameter bei jungen gesunden Probanden

4.1.1. Effekt vom Puffer auf die Messung von freien Radikalen

Durch den Vergleich von zwei verschiedenen Puffern sollten die *in vitro* Bedingungen für die Erythrozyten optimiert werden. Zudem sollten Wechselwirkungen zwischen dem Puffer und DAF-FM ausgeschlossen werden. Die Erythrozyten wurden bei gleicher Behandlung zum einen in HBSS suspendiert und zum anderen in PBS. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass der pH-Wert bei der Verwendung von HBSS instabiler war. Der pH-Wert von PBS lag bei 7,3; HBSS zeigte einen Basiswert von 7,5. Nach der Behandlung mit dem sauren NOS-Inhibitor L-NIO lag in den Proben mit HBSS nur noch ein pH-Wert von 6,2 vor, wohingegen die PBS-Proben einen pH-Wert von 6,8 aufwiesen. In anderen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass ein stabiler pH-Wert bei der Verwendung von DAF-FM sehr wichtig ist, da der pH-Wert die Fluoreszenz von DAF beeinflusst. In den Messungen am Durchflusszytometer zeigten die mit DAF-FM angefärbten Erythrozyten im HBSS-Puffer ein signifikant höheres Signal als die Proben in PBS-Puffer. Im Fluorometer lag das Fluoreszenzsignal ebenfalls höher, allerdings nicht im signifikanten Bereich (Abbildung 5). Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Untersuchungen PBS aufgrund des stärkeren Puffersystems verwendet.

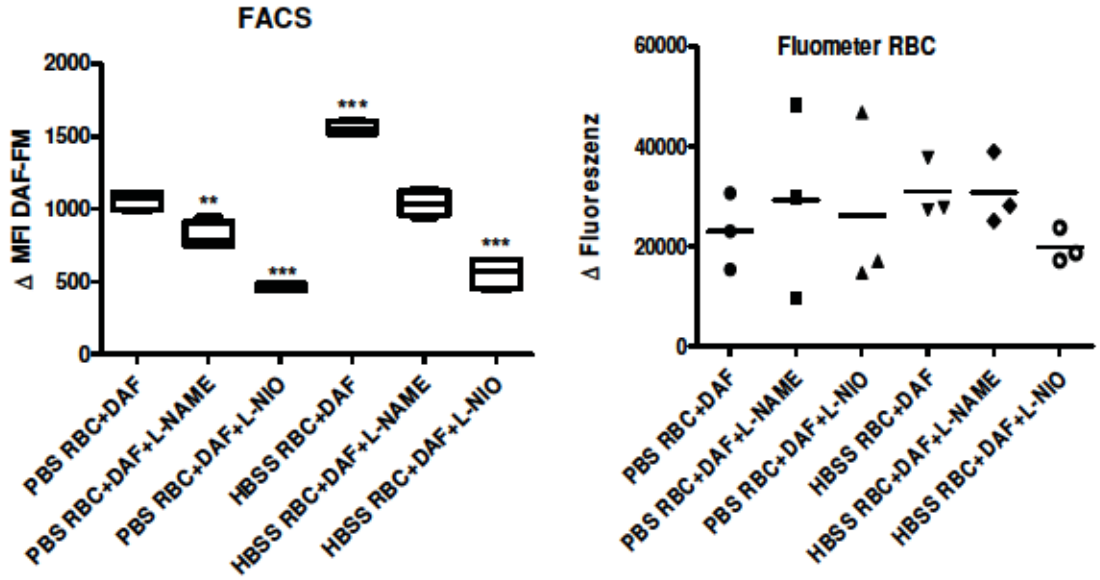


Abbildung 5 HBSS erhöht die Fluoreszenz von DAF-FM. Sowohl in der durchflusszytometrischen als auch in der fluometrischen Messung lagen die Signale von DAF-FM in HBSS-Puffer über denen in PBS. Die Abhängigkeit des DAF-FM-SIngals von der Funktion der eNOS kann in den durchflusszytometrischen Messungen durch die NOS-Inhibitorzugabe unabhängig vom Puffer gesehen werden. ** = p < 0,01; *** = p < 0,001

4.1.2. MitoSOX, EUK-134 und Tempol

Mit dem Ziel, eine Messung von intrazellulärem O_2^- zu etablieren, wurden Erythrozyten mit 0,67 µM, 3,33 µM und 6,67 µM MitoSOX behandelt. Das Fluoreszenzsignal ergab keine signifikanten Unterschiede, allerdings kam es bei der Konzentration von 6,67 µM teilweise zu einer Zytolyse. Bei Zugabe des O_2^- -generierenden System PMS und NADPH[73] kam es bei allen Konzentrationen zu einer signifikanten Steigerung des Fluoreszenzsignals (Abbildung 6). MitoSOX ist somit für den Nachweis von intrazellulärem O_2^- geeignet.

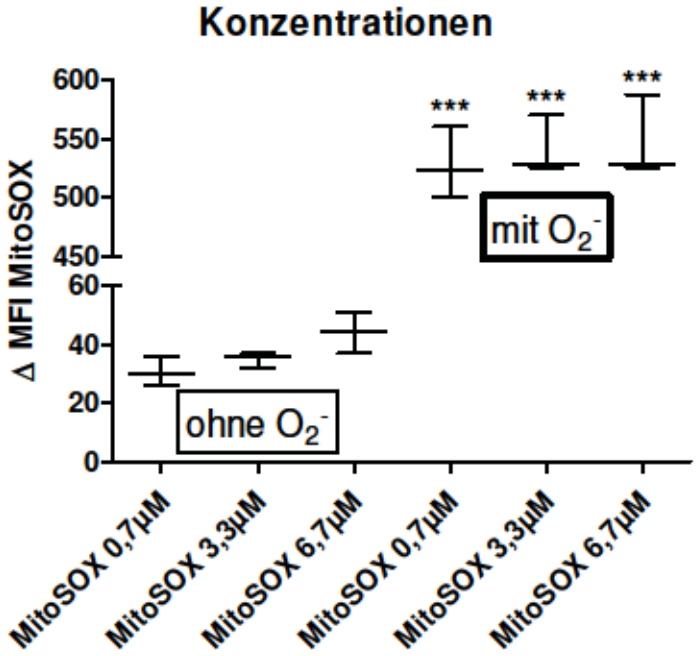


Abbildung 6 Vergleich verschiedener MitoSOX-Konzentrationen. Die Fluoreszenz wird nur wenig beeinflusst, allerdings kam es bei der 6,7 µM Konzentration teilweise zu einer Zytolyse. Das Signal erhöht sich durch die Zugabe von dem O_2^- -generierenden System 1mM PMS und 100µM NADPH signifikant, verglichen mit der Kontrolle der entsprechenden MitoSOX-Konzentration. *** = p < 0,001

Die Fluoreszenz bei der 3,33 µM Konzentration war bei wiederholten Messungen am stabilsten. In allen folgenden Versuchen wurde eine 3,33 µM Lösung verwendet.

Anschließend wurde untersucht, ob das Versuchsprotokoll einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, indem die Erythrozyten zum einen nach den einzelnen Inkubationsschritten mit den Behandlungszusätzen wie O_2^- oder H_2O_2 sowie nach der Färbung mit MitoSOX abzentrifugiert und danach resuspendiert wurden und zum anderen nicht zentrifugiert wurden. Die Untersuchung mit zwei verschiedenen Färbeprotokollen erbrachte keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 7), so dass die Erythrozyten in allen folgenden Untersuchungen mit 3,33 µM MitoSOX gefärbt wurden und das Versuchsprotokoll ohne die Zwischenschritte der Zentrifugation Verwendung fand.

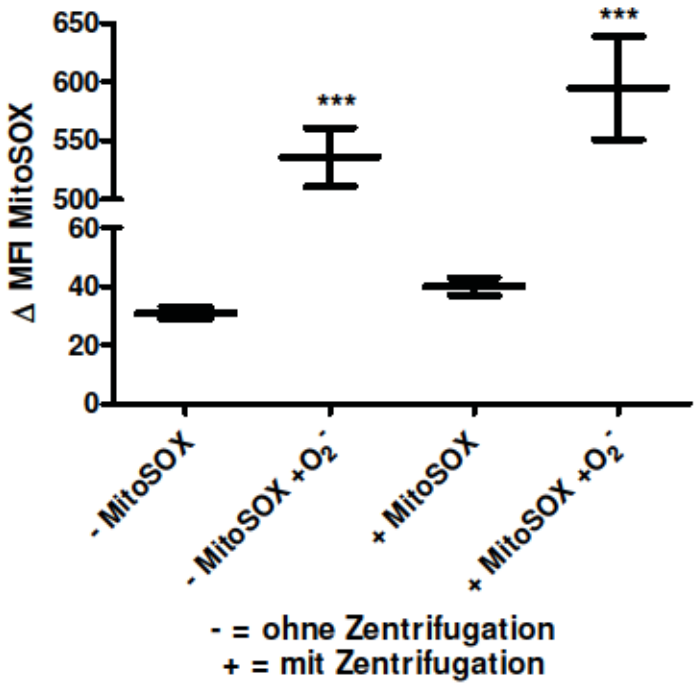


Abbildung 7 Das Versuchsprotokoll hat keinen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal. Verglichen wurden ein Protokoll mit zwei Zentrifugationszwischenschritten, um überschüssiges MitoSOX wegzuwaschen, und ein Protokoll ohne Zentrifugationen. Verglichen wurden die Erythrozyten, die mit dem O_2^- -generierenden System 1mM PMS und 100µM NADPH behandelt wurden mit der entsprechenden Kontrolle. *** = $p < 0{,}001$

Die Spezifität von MitoSOX wurde bestätigt, da es bei einer Behandlung der Erythrozyten mit dem O_2^--generierenden System aus NADPH und PMS zu einer signifikanten Erhöhung des Fluoreszenzsignals kam ($p < 0,0001$). Eine Behandlung der Erythrozyten mit H_2O_2 führte ebenso zu einer signifikanten Signalerhöhung ($p = 0,003$). Eine Behandlung der Erythrozyten mit L-NAME, L-Arginin oder D-Arginin veränderte das Fluoreszenzsignal nicht (Abbildung 8).

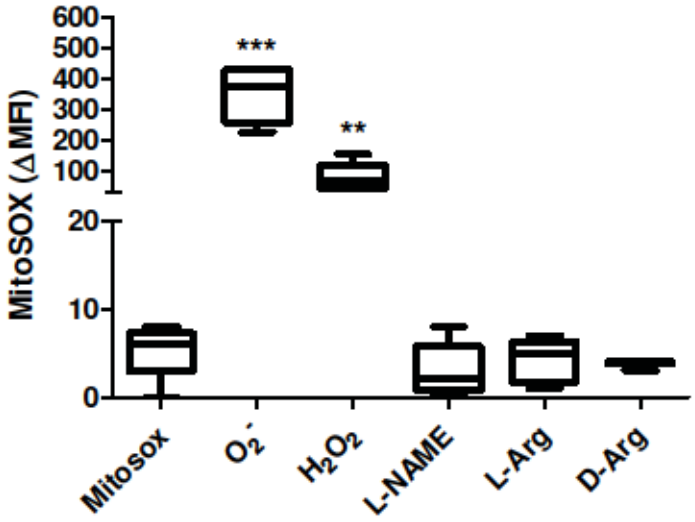
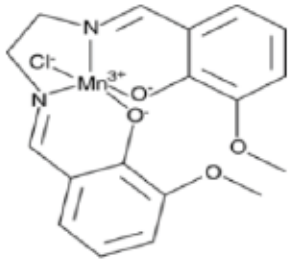


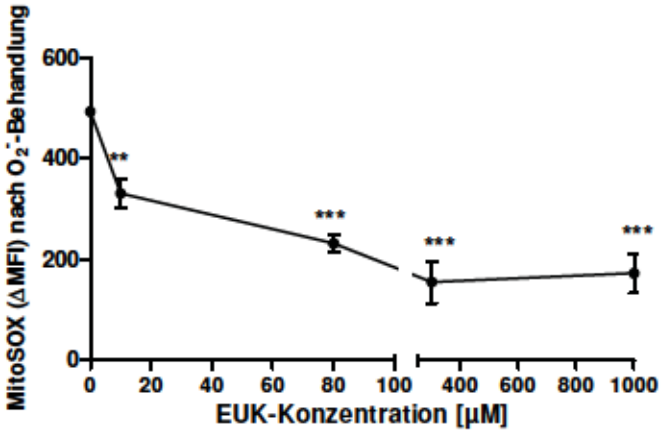
Abbildung 8 MitoSOX ist ein sensitiver Farbstoff für O_2^-. Nach Zugabe von O_2^- (1mM PMS und 100µM NADPH) zeigte sich ein signifikanter Signalanstieg ($p < 0,0001$) , auch 10 mM H_2O_2 bewirkten eine signifikante Erhöhung ($p = 0,003$), wohingegen 3 mM L-NAME, 1,5 mM L-Arginin und 1,5 mM D-Arginin keinen Einfluss auf das Signal hatten. *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$

Für die Sicherstellung, dass sich das von NADPH und PMS gebildete O_2^- intrazellulär befindet, wurden verschiedene Konzentrationen des zellpermeablen SOD-Mimetikums EUK-134 zu den Erythrozyten gegeben.

Die Wirkung von EUK-134 wurde verifiziert, indem eine Probe immer auch mit dem O_2^--generierenden System aus NADPH und PMS behandelt wurde. So wurden Konzentrationen von 10 µM bis 1 mM getestet. Eine Behandlung der Erythrozyten mit EUK-134 ohne die Zugabe von NADPH und PMS hatten keinen Einfluss auf das MitoSOX-Signal. Konzentrationen über 500 µM wirkten teilweise zytolytisch auf die Erythrozyten. Eine Inkubation der Erythrozyten mit 80 µM erbrachte eine signifikante Reduktion des zugesetzten O_2^- ($p < 0,001$) ohne eine Zytolyse auszulösen (Abbildung 9).



A



B

Abbildung 9 (A): EUK-134. (Quelle: Cayman Chemical) (B) EUK-134 wirkt intrazellulär als Superoxiddismutase-Mimetikum. Getestet wurden verschiedene Konzentrationen von EUK-134 nach einer Behandlung mit einer definierten O_2^--Menge (1mM PMS und 100µM NADPH) um eine bestmögliche Wirkung zu erhalten. Bei Konzentrationen ab 300 µM wurden die Zellen teilweise lysiert, so dass in allen weiteren Messungen die 80 µM Konzentration verwendet wurde. ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

Zum Vergleich wurde auch das SOD- und Katalase-Mimetikum Tempol in verschiedenen Konzentrationen von 10 µM bis 1 mM eingesetzt. Die Ergebnisse waren allerdings nicht so deutlich wie bei EUK-134. Es kam zu keiner signifikanten Reduktion des O_2^- (Abbildung 10).

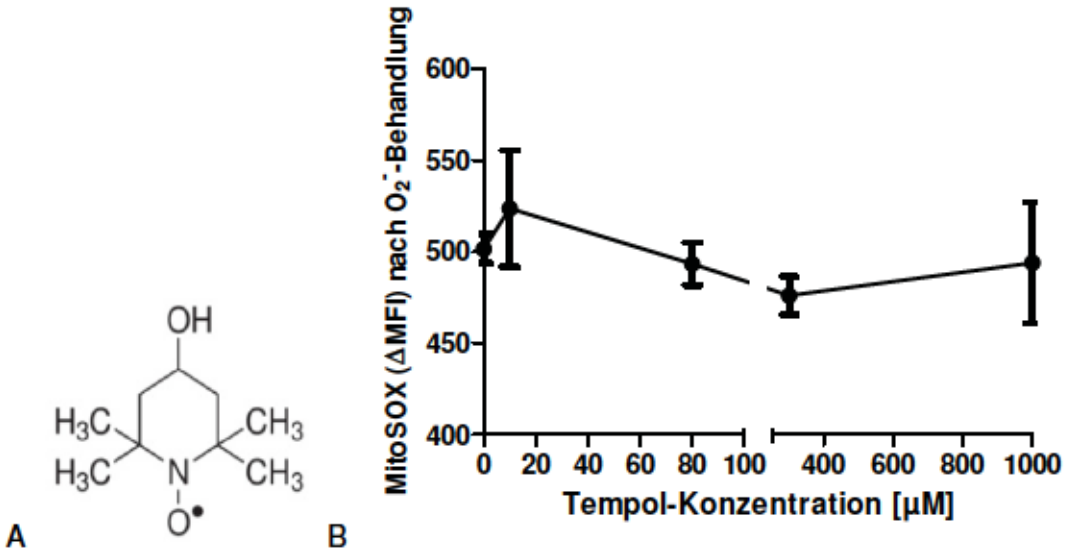


Abbildung 10 (A) Molekulare Struktur von Tempol (Quelle: Sigma Aldrich) (B) Unzureichende Superoxiddismutase-Wirkung von Tempol in dem hier verwendeten Untersuchungsprotokoll. Keine der verwendeten Konzentrationen konnte eine signifikante Reduzierung des MitoSOX- Signals bewirken.

4.2. Analyse des Redox Status in jungen gesunden Probanden

Durch die Untersuchung nach dem zuvor standardisierten Versuchsprotokoll gesunder junger Probanden sollten Basisparameter für die Analyse des Redoxstatus festgelegt werden.

Zunächst wurde untersucht, inwieweit das Signal von DAF-FM von der Aktivität der eNOS abhängig ist. Dazu wurden Erythrozyten mit dem NOS-Inhibitor L-NAME behandelt, was zu einer signifikanten Erniedrigung des DAF-FM-Signals führte ($p = 0,04$). Die Zugabe von L-Arginin oder D-Arginin zeigte keine signifikanten Effekte.

Um die Spezifität von DAF-FM für NO zu testen und zu eruieren, inwieweit ROS das Signal beeinflussen, wurden die Erythrozyten mit einem Superoxid Anionen Radikal (O_2^-) -generierenden System oder mit H_2O_2 behandelt, wodurch das Fluoreszenz-Signal allerdings nicht signifikant verändert wurde. Um die Entstehung von O_2^- und reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) zu verifizieren, wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Mitosox und DCF-DA für den spezifischen Nachweis von O_2^- bzw. ROS immer simultan in einer weiteren Probe verwendet. Um auszuschließen, dass die intrazelluläre Bildung von O_2^- das DAF-FM-Signal beeinflusst, wurden die Erythrozyten zudem mit dem Superoxid-Dismutase (SOD) -Mimetikum EUK-134 inkubiert. Die Zugabe des SOD-Mimetikums hatte keinen signifikanten Effekt auf das DAF-FM-Signal (Abbildung 11).

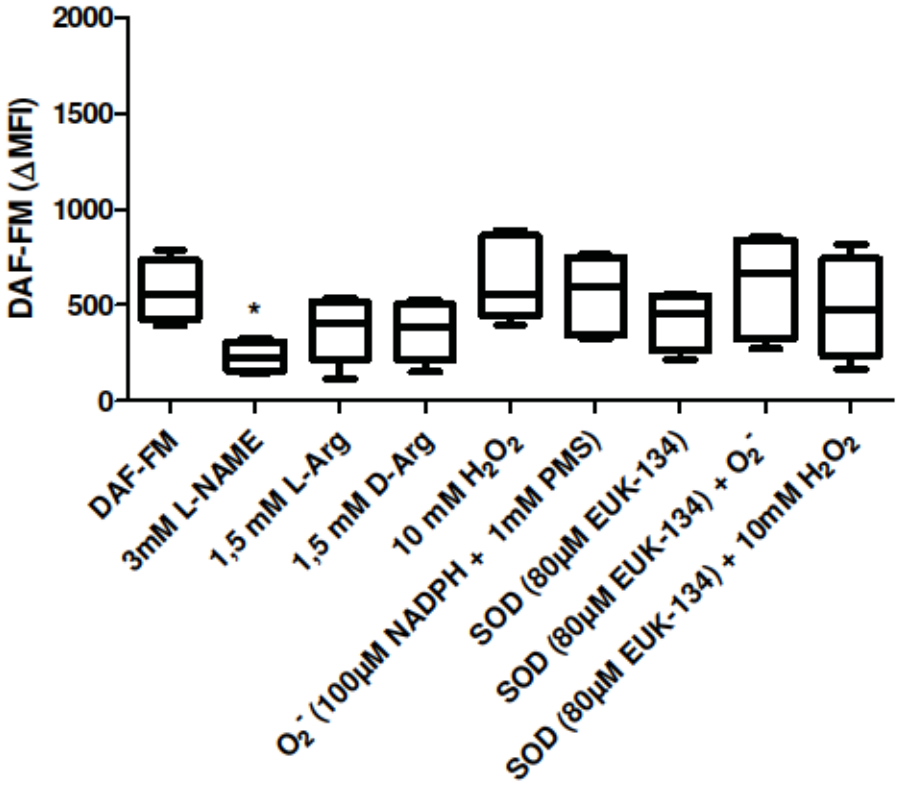


Abbildung 11 Das DAF-FM Signal ist abhängig von der Aktivität der eNOS. Eine Inhibition des Enzyms bewirkt eine signifikante Reduzierung des Signals (p = 0,04). Eine signifikante Anhebung des Signals durch Zugabe des eNOS–Substrats L-Arginin lässt sich nicht erreichen. ROS haben geringen Einfluss auf das DAF-Signal.

Bei den Proben, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA angefärbt wurden, kam es nach der Behandlung mit NADPH und PMS sowie H_2O_2 zu einer signifikanten Signalerhöhung. Bei Zugabe von dem SOD-Mimetikum zusätzlich zur Behandlung mit O_2^- wurde das Signal im Vergleich zur alleinigen O_2^- -Behandlung signifikant gesenkt, zusätzlich zum H_2O_2 erbrachte das SOD-Mimetikum keinen Effekt. Eine Behandlung mit L-NAME, L-Arginin oder D-Arginin hatte keinen Einfluss auf das DCF-Fluoreszenzsignal (Abbildung 12).

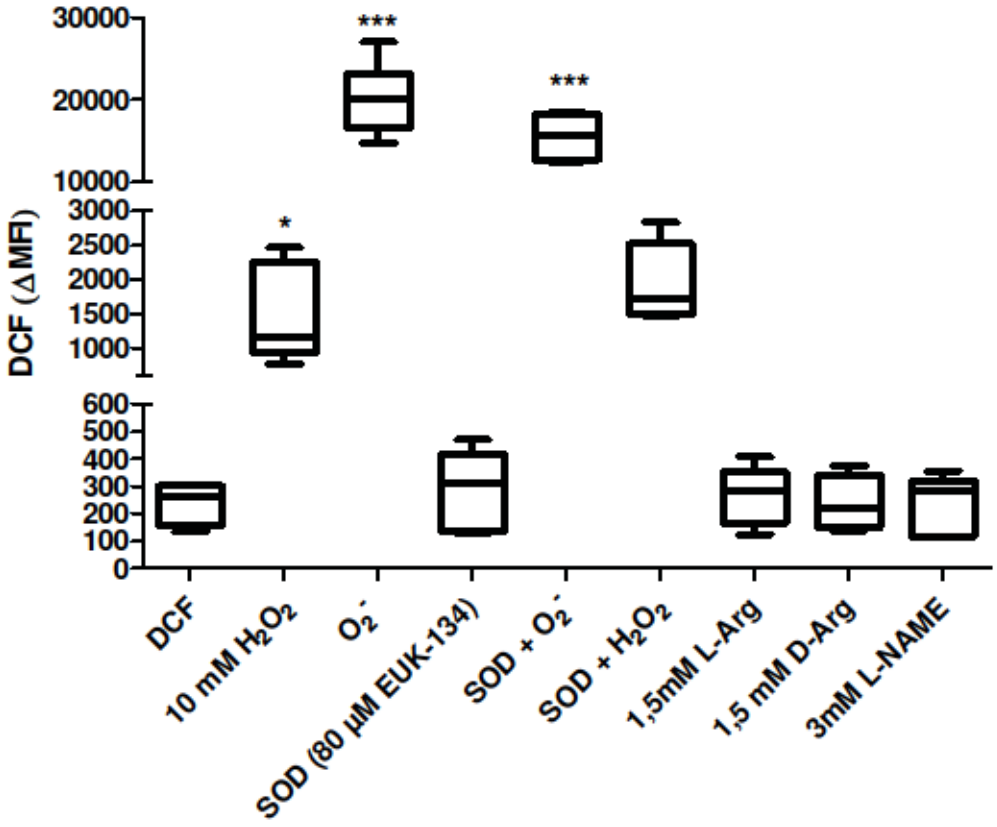


Abbildung 12 DCF eignet sich als Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von ROS. Vor allem durch die Behandlung der Erythrozyten mit O_2^- (1mM PMS und 100µM NADPH) wird eine signifikante Signalverstärkung bewirkt, aber auch durch H_2O_2. *** = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$

Der Fluoreszenzfarbstoff TT färbt die „freien“ Thiole in den Zellen an. In den Erythrozyten sind –SH-Gruppen vor allem in dem Molekül Glutathion zu finden, weshalb TT indirekt ein Marker für die Konzentration an Glutathion in den Erythrozyten ist. Erwartungsgemäß sinkt demnach das TT-Signal ab, wenn die Zelle mit O_2^- ($p < 0{,}001$) bzw. H_2O_2 ($p = 0{,}076$) behandelt wurde. Durch den oxidativen Stress kommt es zu einem Verbrauch an Glutathion und somit zu einer Abnahme des Signals. Die Zugabe von L-NAME, L-Arginin und D-Arginin veränderte das TT-Signal hingegen nicht (Abbildung 13).

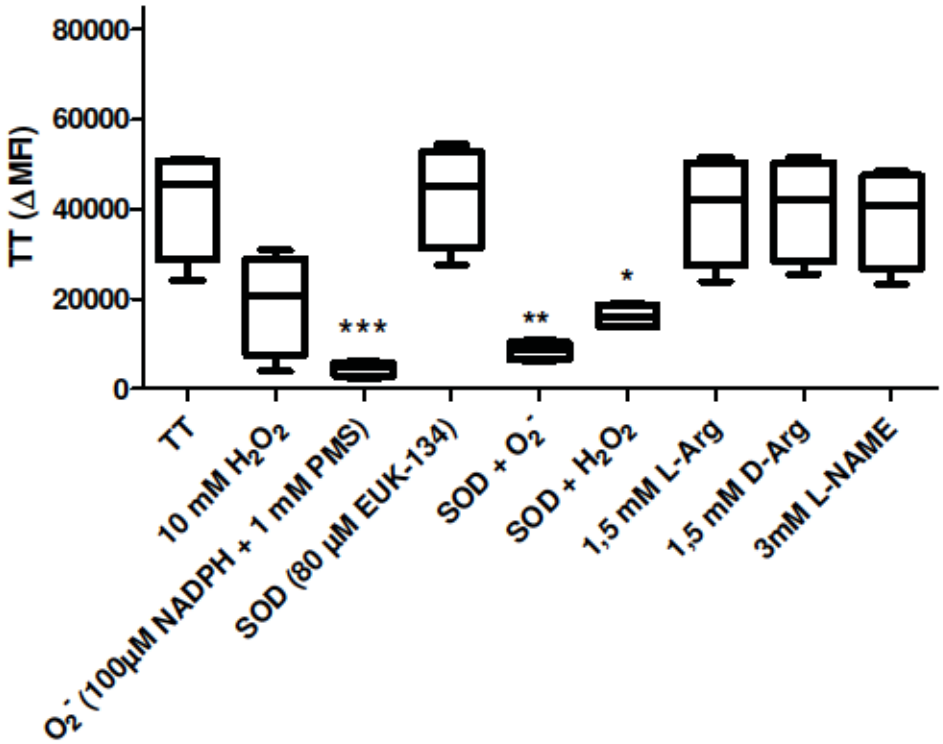


Abbildung 13 Die Glutathion-Konzentration sinkt bei Zugabe von ROS. Gemessen wurde die Glutathion-Konzentration mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Thiol-Tracker. Das Signal bleibt unbeeinflusst durch Zugabe von L-NAME, L-Arginin und D-Arginin. *** = $p < 0{,}001$; ** = $p < 0{,}01$; * = $p < 0{,}05$.

4.3. Einfluss der eNOS Expression in den Erythrozyten auf den Redox Status (Mäuse)

Das Blut der Mäuse wurde nach dem gleichen Versuchsprotokoll untersucht wie auch das humane Blut, mit dem Ziel, den Einfluss der eNOS Expression auf den Redox-Status zu untersuchen.

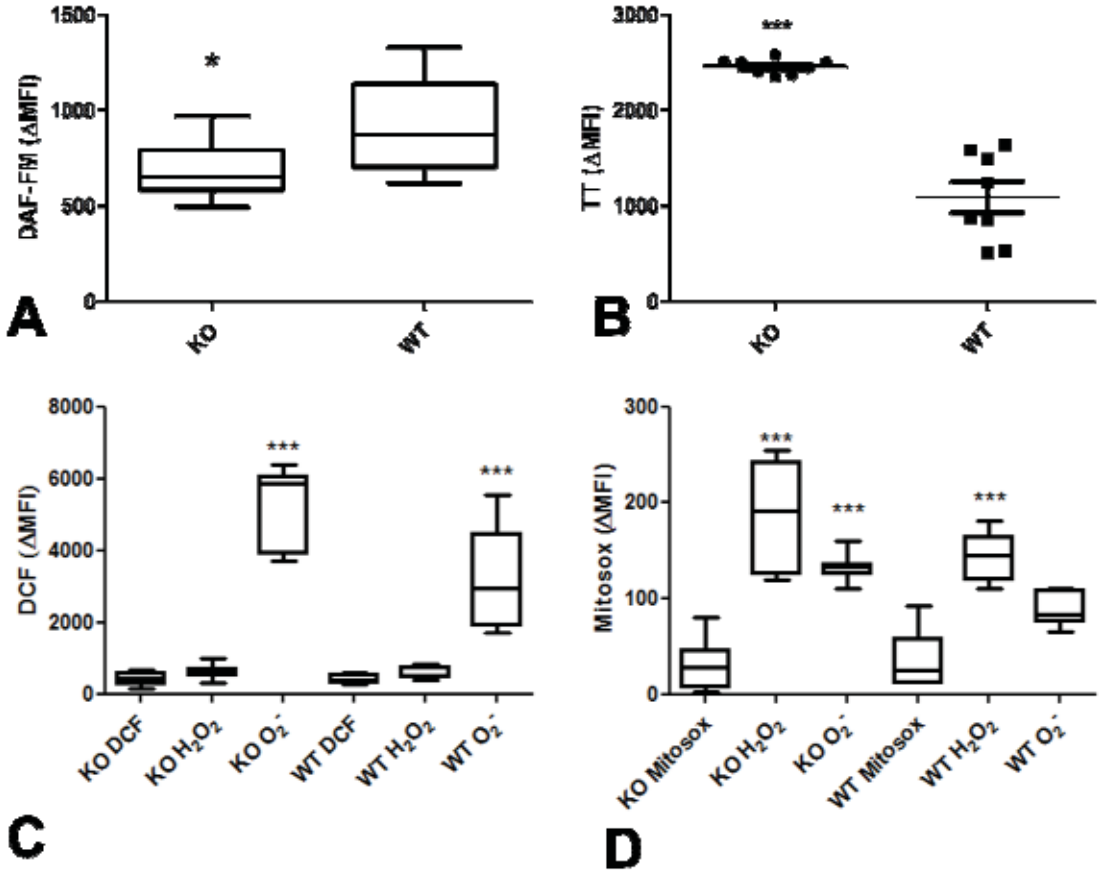


Abbildung 14 (A) Das DAF-FM Signal ist bei den eNOS-KO-Mäusen signifikant verringert ($p = 0,035$). Der intraerythrozytäre NO-Spiegel ist somit bei KO-Mäusen signifikant verringert. Dargestellt ist die ΔMFI der mit DAF angefärbten Erythrozyten. (B) Die freien Thiole (Glutathion-Konzentration) sind bei KO-Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,0001$). Darstellung der ΔMFI des Fluoreszenzfarbstoffs TT. (C) Der Abbau von ROS ist bei eNOS-KO-Mäusen vermindert. Das Fluoreszenzsignal der KO-Erythrozyten nach der Behandlung mit der gleichen Menge an O_2^- (1mM PMS und 100µM NADPH) ist signifikant höher als das Signal der WT-Mäuse ($p = 0,0038$). In dieser Abbildung sind die ΔMFI von DCF vor und nach der Behandlung mit ROS dargestellt. Verglichen wurde jeweils mit der unbehandelten Probe der entsprechenden Erythrozyten. Der natürliche Gehalt von ROS unterscheidet sich nicht in den verschiedenen Erythrozyten-Probe. (D) Der Abbau von ROS ist bei eNOS-KO-Mäusen vermindert. Dargestellt sind die MitosSOX-Fluoreszenzen vor und nach der Behandlung mit 10 mM H_2O_2 bzw. O_2^- (1mM PMS und 100µM NADPH). Verglichen wurde jeweils mit der unbehandelten Probe der entsprechenden Erythrozyten-Probe. Die Konzentrationen an O_2^- vor der Behandlung unterscheiden sich nicht. $^{***} = p < 0,001$; $^{**} = p < 0,01$; $^{*} = p < 0,05$.

Bei den mit DAF-FM gefärbten Proben zeigte sich ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den eNOS-KO-Mäusen (Abbildung 14 A). Trotzdem zeigte sich ein deutliches Signal in den Erythrozyten der eNOS-KO-Mäuse und durch Zugabe des NOS-Inhibitors L-NAME kam es zu einer signifikanten Reduktion des Fluoreszenzsignals (Abbildung 15.2).

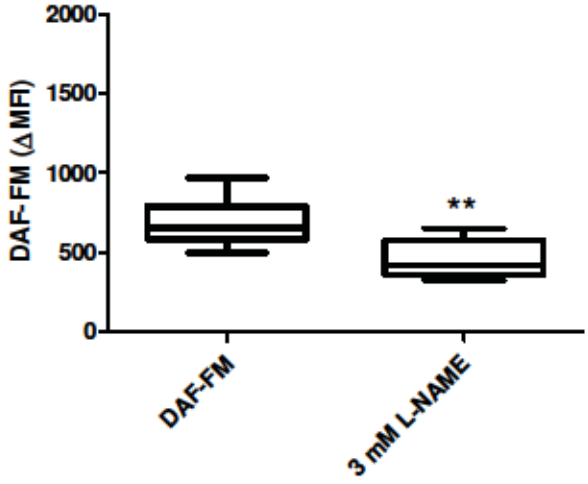


Abbildung 15.2 Das DAF-FM Signal bei den eNOS-KO-Mäusen ist nach der Behandlung mit L-NAME signifkant reduziert (p = 0,004).

Die Konzentration von Glutathion in den Erythrozyten ist signifikant höher in den Erythrozyten der KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abbildung 14 B).

Bei den mit DCF angefärbten Proben liegt das Fluoreszenzsignal der KO-Erythrozyten bei der Behandlung mit der gleichen Menge an O_2^- signifikant über dem Signal der WT-Mäuse (Abbildung 14 C, p = 0,0038).

Nach Auswertung der MitoSOX-Proben scheint die Konzentration an O_2^- in den Erythrozyten der WT-Mäuse tendenziell etwas höher zu sein als bei den KO-Mäusen (p= 0,34). Prozentual gesehen besteht aber die Tendenz, dass die Konzentration von in-

trazellulärem O_2^- bei den KO-Mäusen stärker ansteigt wenn man die Erythrozyten mit O_2^- (p = 0,08) oder H_2O_2 (p = 0,1) behandelt als bei den WT-Mäusen (Abbildung 14 D).

Bei den Nitritmessungen zeigten sich sowohl im Plasma als auch in den Erythrozyten keine signifikanten Unterschiede. Es besteht die Tendenz, dass die Konzentrationen bei den WT-Mäusen etwas oberhalb der KO-Mäuse liegen (Abbildung 15, Plasma p = 0,15, RBC p = 0,06).

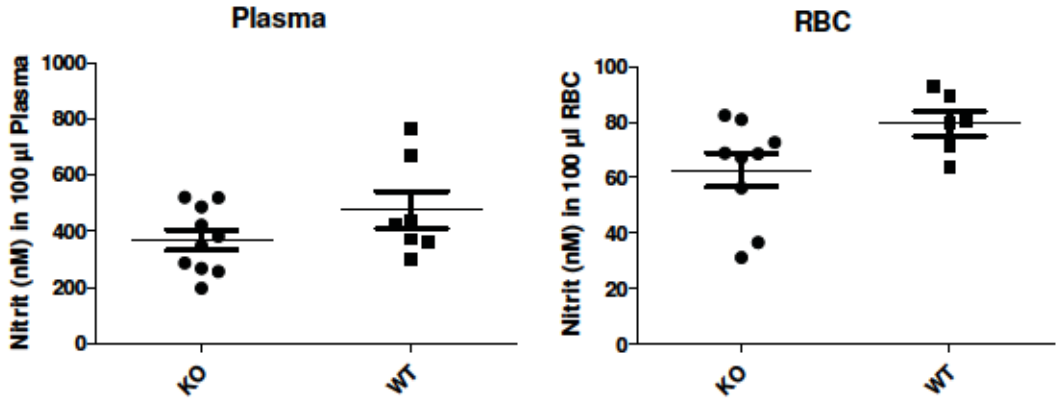


Abbildung 15 Die Nitritkonzentrationen sind sowohl im Plasma (p = 0,15) als auch in den Erythrozyten (p = 0,06) nicht signifikant verändert bei den eNOS-KO-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Nitritkonzentration in nM, welche durch die CLD bestimmt wurden.

4.4. Fall-Kontroll-Studie

4.4.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Die zuvor etablierten Messungen am Durchflusszytometer von ROS, NO und Thiolen wurden bei verschiedenen Probandengruppen durchgeführt und miteinander verglichen. Zudem wurden die erythrozytäre Verformbarkeit und sowohl die plasmatische als auch die intraerythrozytäre Nitritkonzentrationen bestimmt. Insgesamt wurden die Werte bei 44 Personen bestimmt, die vier verschiedenen Personengruppen zugeordnet werden konnten (Tabelle 1). Abschließend wurden die Werte mit den Werten der jungen, gesunden Probanden verglichen. Das eigentliche Kontrollkollektiv für die ver-

schiedenen Patientengruppen setzte sich aus 11 männlichen gesunden Probanden mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 47,8 Jahren zusammen. Als gesund wurde eine Person klassifiziert, die weder eine akute Erkrankung, noch eine bekannte Kreislauferkrankung, Nierenerkrankung oder maligne Erkrankung aufwies. Bei einer durchschnittlichen Körpergröße von 182,9 cm und einem Körpergewicht von 90,5 kg ergab sich für die Kontrollgruppe ein mittlerer Body Mass Index (BMI) von 26,9 kg/m² und liegt damit nur knapp oberhalb der Grenze zum Normalgewicht.

Tabelle 1 Charakterisierung der Studienpopulation

Parameter	Einheit	Kontrollgruppe	Hypertonie	KHK	Hypertonie + KHK	Probanden jung
n		11	9	10	14	6
Geschlecht	[w/m]	0/11	0/9	0/10	0/14	0/6
Alter	[Jahre]	47,8 ± 5,5	50,6 ± 6,9	54,9 ± 3,7	58,4 ± 9,2	25 ± 1,4
Körpergröße	[cm]	182,9 ± 8,9	180,1 ± 4,4	174,1 ± 2,2	174,6 ± 8,3	185 ± 6,6
Gewicht	[kg]	90,5 ± 18,9	96,2 ± 10,4	83,9 ± 12,6	90,2 ± 12,5	81,2 ± 14,1
BMI	[kg/m²]	26,9 ± 4,2	29,6 ± 2,4	27,4 ± 4,2	29,6 ± 3,2	23,6 ± 2,6
Hämoglobin	[g/dl]	15,2 ± 0,8	15 ± 1	14,4 ± 1,3	14,6 ± 1,2	16,1 ± 0,8
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	210,5 ± 40,2	227,7 ± 38,7	195,5 ± 38,1	191 ± 42,6	174,7 ± 15,9
LDL	[mg/dl]	144,1 ± 27,5	153,2 ± 26,5	135,5 ± 42	153,3 ± 36,3	
HDL	[mg/dl]	63,8 ± 22,9	49,2 ± 10	55,2 ± 19,2	44,2 ± 8,9	
Hyperlipidämie	[n]	8	8	9	11	0
GFR	[ml/min]	91,2 ± 11,9	88,8 ± 17,4	76,8 ± 12,1	86,8 ± 11,4	142,7 ± 27,8
Glukose	[mg/dl]	94,2 ± 5,9	92,8 ± 7,6	103,7 ± 12,3	126,1 ± 62,9	88,5 ± 6
HbA1c	[%]	5,5 ± 0,5	5,4 ± 0,3	5,72 ± 0,4	6,3 ± 1,3	
CRP	[mg/dl]	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4	0,3 ± 0,3	0,1
RR sys	[mmHg]	122,7 ± 6,7	144,7 ± 6,4	120 ± 8,8	156,7 ± 15,2	121,7 ± 4,1
RR dia	[mmHg]	76,7 ± 4,9	91,9 ± 6	76 ± 5,3	90,3 ± 8,4	76,7 ± 8,2
Arterieller Mittel-	[mmHg]	92 ± 4,9	109,5 ± 5	90,7 ± 5,9	112,4 ± 7,5	91,7 ± 6,6

druck						
Packungsjahre	[Jahre]	10 ± 18,3	12,2 ± 12,3	27 ± 11,1	28,2 ± 22,2	3,5 ± 2,7
Positive Familien-anamnese	[n]	0	0	1	3	1

Die insgesamt 33 Patienten wurden gemäß ihrer Krankheiten in drei verschiedene Gruppen eingeteilt. Eine der Gruppen erfasste alle Patienten, die an einer arteriellen Hypertonie erkrankt waren. Diese Gruppe umfasste 9 männliche Patienten mit einem durchschnittlichen Lebensalter von 50,6 Jahren. Entscheidend für die Einteilung war eine nichtinvasive Blutdruckmessung in ruhiger Umgebung zu Beginn der Untersuchung. Die mittlere Körpergröße der an einer arteriellen Hypertonie erkrankten Patienten lag bei 180,1 cm bei einem durchschnittlichen Gewicht von 96,2 kg. Somit ergab sich in dieser Gruppe ein durchschnittlicher BMI von 29,6 kg/m². Die zweite Patientengruppe erfasste 10 Patienten mit einer KHK. Alle Personen dieser Gruppe waren männlich und durchschnittlich 54,9 Jahre alt. Die Durchschnittsgröße in dieser Gruppe lag bei 174,1 cm und das Gewicht bei 83,9 kg. Hieraus ergab sich ein durchschnittlicher BMI von 27,4 kg/m². Die dritte Gruppe umfasste 14 männliche Patienten, die sowohl an einer arteriellen Hypertonie als auch an einer KHK erkrankt waren. Bei einer Durchschnittsgröße von 174,6 cm und einem durchschnittlichen Gewicht von 90,2 kg ergab sich für diese Gruppe ein BMI von durchschnittlich 29,6 kg/m². Für alle teilnehmenden Probanden wurden neben den Begleiterkrankungen auch die kardiovaskulären Risikofaktoren bestimmt. Hierbei wurden neben dem bereits erwähnten BMI und dem arteriellen Blutdruck die Blutfette und das Cholesterin laborchemisch bestimmt. Des Weiteren wurde die Krankengeschichte der Probanden bezüglich einer positiven Familienanamnese und des Rauchens erhoben.

4.4.2. Durchflusszytometrische Messungen

Die verschiedenen Messungen am Durchflusszytometer hatten das Ziel, einen umfassenden Überblick über den oxidativen Status sowie der Konzentration von NO in den Erythrozyten der verschiedenen Patientengruppen zu erhalten.

Die O_2^- -Konzentration in den Erythrozyten ist bei Patienten mit einer KHK ($p = 0,009$) und bei Patienten mit einer KHK und einer Hypertonie ($p = 0,008$) signifikant erhöht. In der Gruppe der Hypertoniker zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikante erhöhte Konzentration an O_2^- ($p = 0,51$) (Abbildung 16 A).

Mit einem weiteren Probensatz wurden die reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt, in dem die Proben mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF angefärbt wurden. DCF ist im Gegensatz zu MitoSOX nicht so spezifisch und färbt sowohl O_2^- als auch andere Sauerstoffspezies wie H_2O_2 an. Im Gegensatz zu den gerade beschriebenen Ergebnissen der O_2^--Messungen zeigte sich bei den reaktiven Sauerstoffspezies in der Gruppe der Hypertoniker eine signifikant höhere Konzentration als in den anderen Gruppen ($p = 0,04$) (Abbildung 17 B).

Neben dem oxidativen Status der Erythrozyten sollte auch die Konzentration des intrazellulären NOs bestimmt werden. Zu diesem Zwecke wurden die Erythrozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM angefärbt. Signifikante Unterschiede waren nicht zu sehen. Es zeigt sich die nicht signifikante Tendenz, dass der NO-Spiegel bei den Patienten mit einer KHK ($p = 0,33$) oder einer Hypertonie ($p = 0,41$) verglichen mit der Kontrollgruppe vermindert ist (Abbildung 16 C).

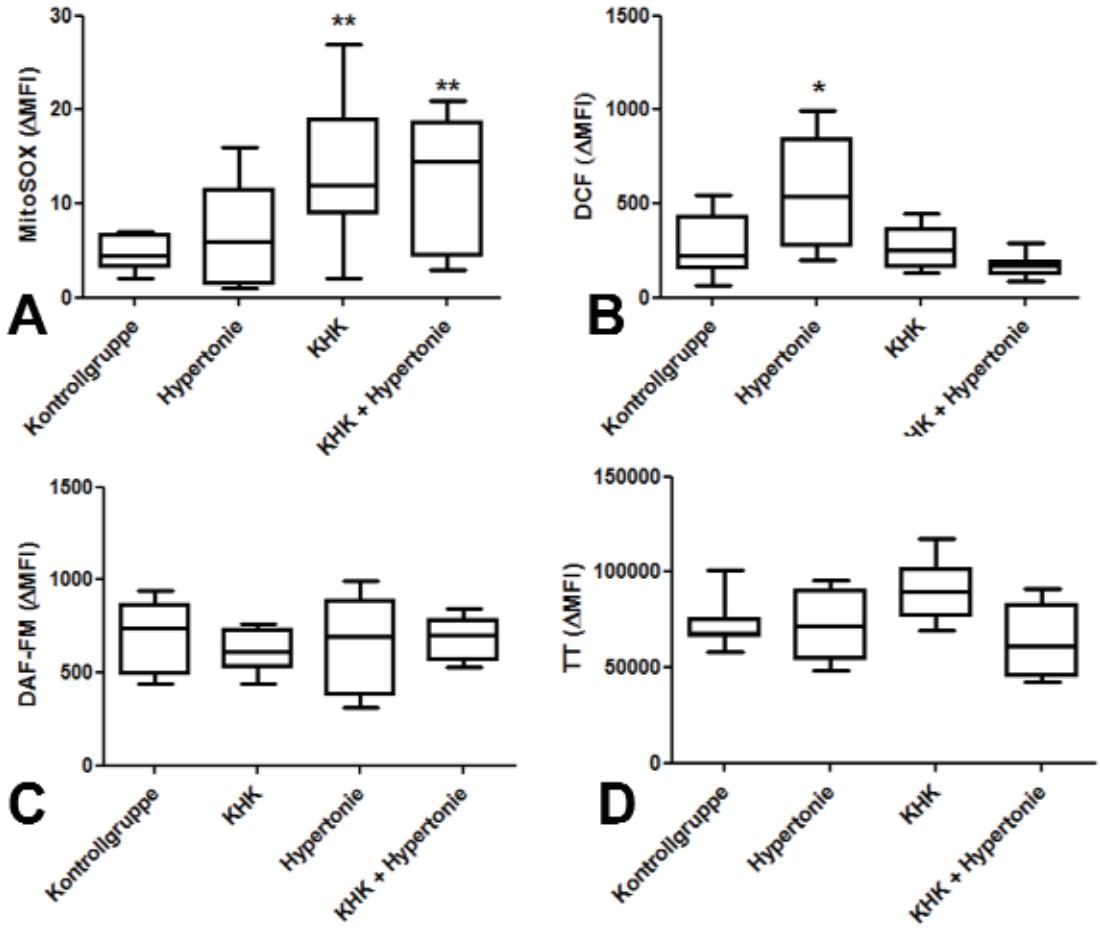


Abbildung 16 (A) Die O_2^--Konzentration ist bei Patienten mit KHK (p=0,009) und KHK + arterieller Hypertonie (p = 0,008) signifikant erhöht. Vergleich der Fluoreszenz von Erythrozyten, die zum Nachweis von O_2^- mit MitoSOX gefärbt wurden. (B) Die ROS-Konzentration ist bei Patienten mit arterieller Hypertonie signifikant erhöht (p = 0,04). Vergleich der Fluoreszenz von Erythrozyten, die zum Nachweis von ROS mit DCF gefärbt wurden. (C) Bei den mittels DAF-FM bestimmten NO-Konzentrationen gibt es keine signifikanten Unterschiede. Darstellung des Fluoreszenzsignals von DAF-FM als ΔMFI. (D) Die Glutathion-Konzentration weist keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Patientengruppen auf. Darstellung der Fluoreszenz von Erythrozyten nach Behandlung mit TT. * = p < 0,05; ** = p < 0,01

Für ein umfassenderes Verständnis des oxidativen Status der Erythrozyten wurde zudem die Konzentration der Thiole in den Zellen bestimmt, indem die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TT angefärbt wurden. Die Konzentration der Thiole lässt direkte Rückschlüsse auf die Konzentration an Glutathion zu. In der oxidierten, dimeren Form enthält Glutathion keine freie Thiolgruppe mehr, so dass es durch den Fluoreszenzfarbstoff TT nicht mehr angefärbt wird. Bei dem von TT angefärbten Glutathion handelt es sich somit ausschließlich um unverbrauchtes, als Antioxidans zur Verfügung stehendes Glutathion.

Die verschiedenen Patientengruppen wiesen große Schwankungsbreiten auf, so dass ein Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Ergebnisse brachte. Tendenziell sind die Werte in der Gruppe der Hypertoniker erhöht verglichen mit der Kontrollgruppe ($p = 0,06$) und die Werte der Patienten mit KHK und Hypertonie verglichen mit der Kontrollgruppe niedriger ($p = 0,31$) (Abbildung 16 D).

4.4.3. Bestimmungen des Nitrits

Nitrit ist ein Abbauprodukt von NO und ein Parameter der endothelialen eNOS-Aktivität. Nitrit wird von den Erythrozyten systemisch transportiert. Neben NO ist auch Nitrit ein chemisch instabiler Stoff und die Blutproben mussten schnell verarbeitet werden. Mithilfe der oben genannten Stabilization Solution, die den Erythrozyten zugegeben wurde, konnte eine Stabilisierung erreicht werden.

Es sind in der intraerythrozytären Nitritkonzentration keine signifikant unterschiedlichen Nitritkonzentrationen zu messen. Auch der Vergleich mit den jungen Probanden bringt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 17).

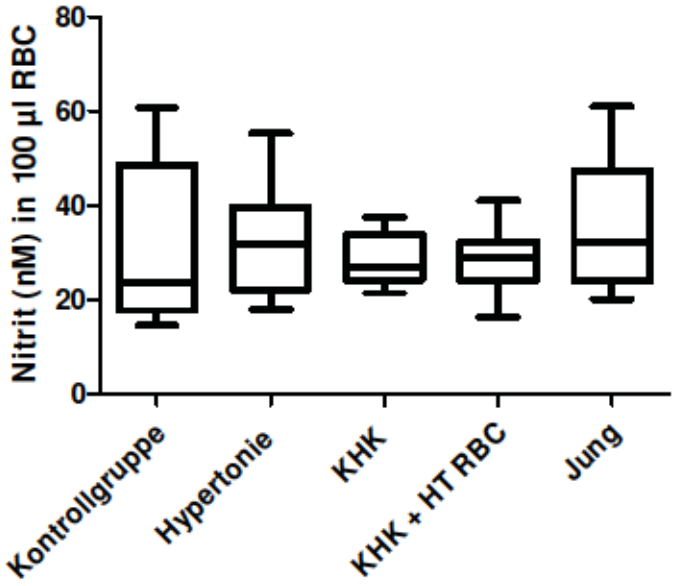


Abbildung 17 Nitrit-Konzentrationen intraerythrozytär sind nicht signifikant verändert in den verschiedenen Gruppen. Vergleich intraerythrozytärer Nitrit-Konzentrationen, mittels CLD gemessen.

4.4.4. Erythrozytäre Verformbarkeit

NO ist an der Regulation der erythrozytären Verformbarkeit beteiligt. Somit haben Krankheiten, die mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit einhergehen wie die KHK zur Folge, dass die erythrozytäre Verformbarkeit eingeschränkt wird. Dadurch können Mikrozirkulationsstörungen im Organismus hervorgerufen werden. Mit dem Laserdiffraktor wurde die erythrozytäre Verformbarkeit bei verschiedenen Scherstress-Leveln gemessen. Die Erythrozyten wurden einem ansteigenden Scherstress von 0,3 Pa bis 10 Pa ausgesetzt. Wie in Abbildung 18 zu sehen, werden durch das Programm die verschiedenen Elongationsindices dargestellt.

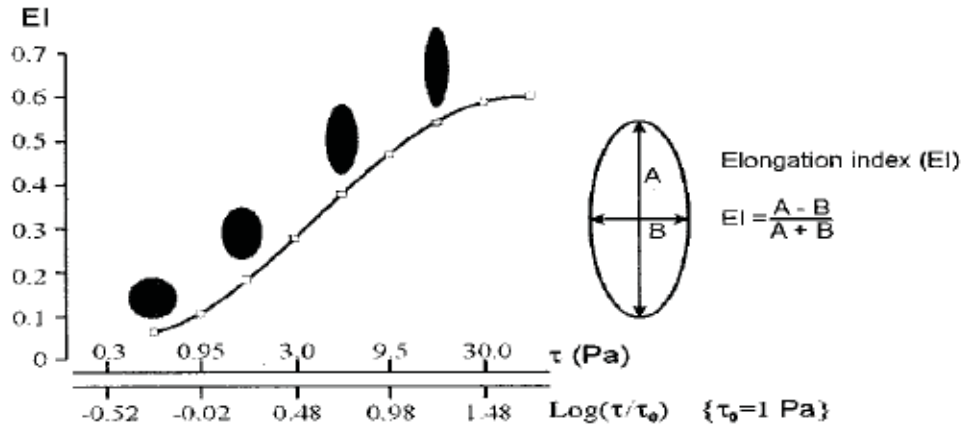


Abbildung 18 Beispiel einer Verformbarkeitskurve wie sie mittels LORCA erstellt wird. Der Elongationsindex wird bei ansteigendem Scherstress gemessen und dementsprechend in eine Kurve eingetragen. (aus: SOP LORCA von Katharina Lysaja)

Bei einem Scherstress von 1,73 Pa zeigte sich ein signifikant verminderter Elongationsindex in der Gruppe der Hypertoniker im Vergleich zu der gesunden, altersangepassten Kontrollgruppe ($p = 0,01$) (Abbildung 19). Auch bei einem Scherstress von 2,68 Pa zeigte sich in der Gruppe der Hypertoniker eine verringerte Verformbarkeit, diese war allerdings statistisch nicht signifikant ($p = 0,11$).

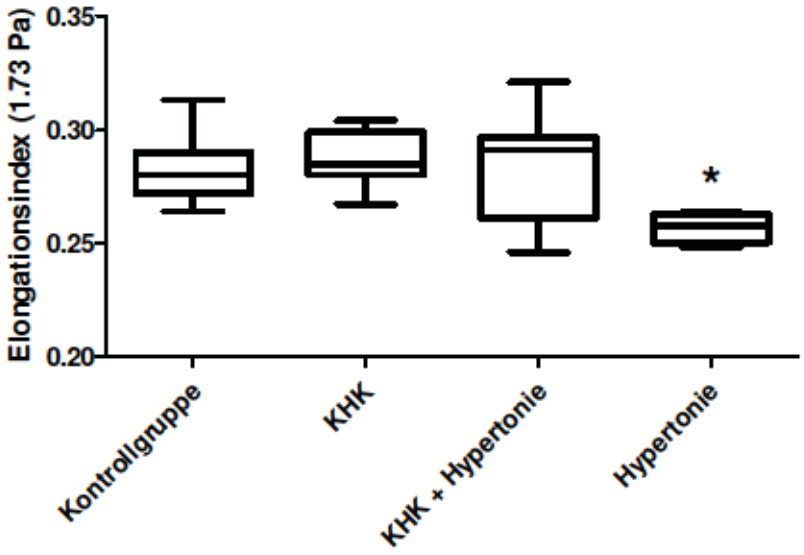


Abbildung 19 Die erythrozytäre Verformbarkeit ist bei Patienten mit arterieller Hypertonie signifikant verringert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Elongationsindices bei 1,73 Pa. * = p = 0,01.

4.5. Erythrozytäre Veränderungen im Alter

Durch eine Gegenüberstellung der durchflusszytometrischen Messungen der jungen und älteren Probanden konnten erythrozytäre Veränderungen im Alter aufgedeckt werden.

Signifikante Unterschiede zeigten sich lediglich bei den Messungen mit DAF-FM. Junge Patienten haben eine signifikant niedrigere NO-Konzentration als ältere Probanden ($p = 0,035$) (Abbildung 20 B).

In den anderen Messungen zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz, dass zum einen die ROS-Konzentration erhöht ist und zum anderen die GSH-Konzentration niedriger ist (Abbildung 20 A,C,D).

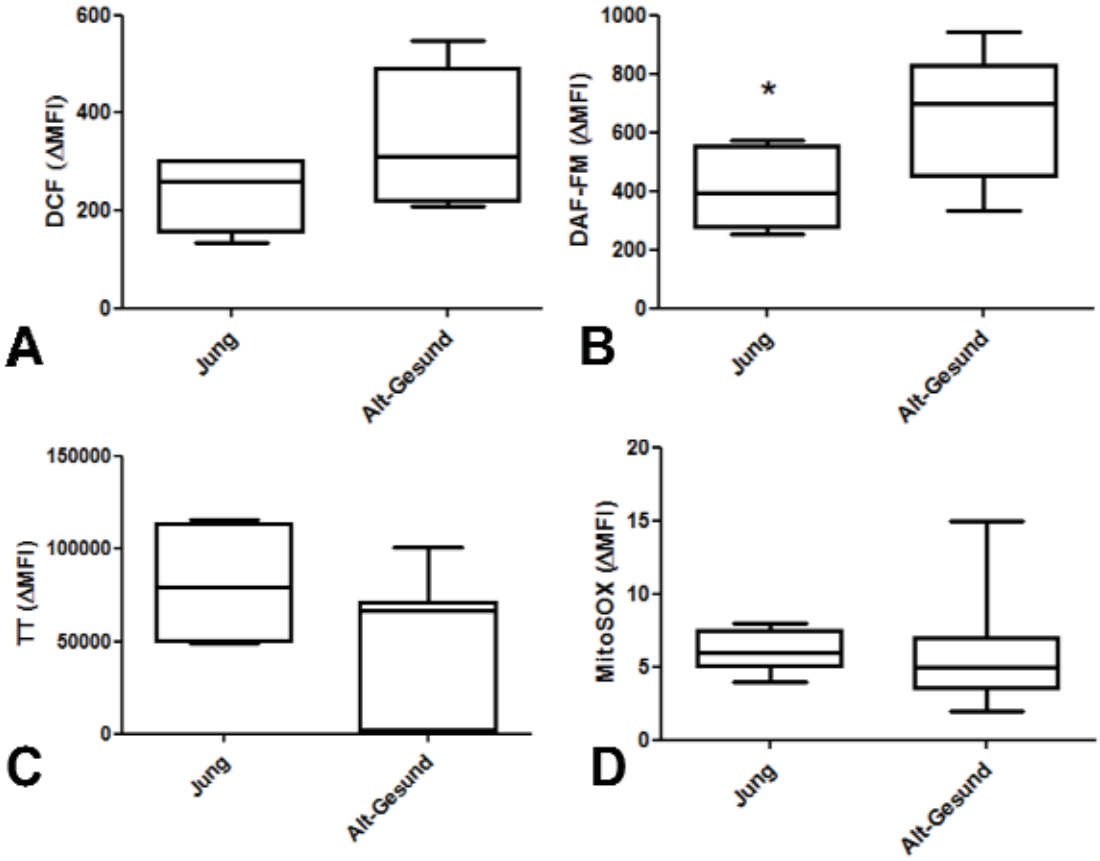


Abbildung 20 (A) Zwischen jungen und älteren Probanden gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,8$). Vergleich der Fluoreszenz von Erythrozyten, die zum Nachweis von ROS mit DCF gefärbt wurden. (B) Das NO-Signal ist bei älteren Probanden verglichen mit jungen, gesunden Menschen signifikant erhöht ($p = 0,035$). Darstellung des Fluoreszenzsignals von DAF-FM als ΔMFI. (C) Bei jungen Probanden ist die GSH-Konzentration nicht signifikant höher als bei der Kontrollgruppe ($p = 0,34$). Darstellung der Fluoreszenz von Erythrozyten nach Behandlung mit TT. (D) Die O_2^--Konzentration weist keinen signifikanten Unterschied auf ($p= 0,54$). Dargestellt ist das MitoSOX-Signal als ΔMFI. * = $p < 0,05$.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass arterielle Hypertonie mit einer verminderten erythrozytären Verformbarkeit sowie einer erhöhten Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht. Bei Patienten mit einer KHK ist die Konzentration von O_2^- erhöht. Bei den Untersuchungen im Mausmodell war die Konzentration von NO in den Erythrozyten der eNOS-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant niedriger. Der Glutathion-Gehalt der Erythrozyten der KO-Mäuse war signifikant erhöht, aber bei Zugabe einer definierten Menge O_2^- stieg der O_2^--Spiegel der KO-Mäuse in höherem Maße an als dies bei den Wildtyp-Mäusen der Fall war.

5.1. Etablierung einer Methode zur Messung des oxidativen Status und des NO-Spiegels

Das Ziel dieser Experimente lag darin, die Rolle der erythrozytären NO-Synthase und des erythrozytären Redox-Status sowohl im physiologischen Zustand als auch bei pathologischen Zuständen wie einer arteriellen Hypertonie oder einer KHK näher zu beleuchten.

Aus diesem Grund wurde eine Methode vorgestellt mit der man unter Zuhilfenahme verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe den Redox-Status und den NO-Spiegel von Erythrozyten im Durchflusszytometer bestimmen kann. Parallel dazu wurden die Nitritkonzentrationen im Plasma und in den Erythrozyten sowie die erythrozytäre Verformbarkeit gemessen.

5.1.1. DAF-FM diacetat

Das DAF-FM-Fluoreszenzsignal zeigte sich in den Untersuchungen abhängig von der Aktivität der NOS (Abb. 6). Die Zugabe der ROS O_2^- und H_2O_2 führte zu keiner signifikanten Änderung des DAF-Signals (Abb. 12).

Die Sensitivität und Störanfälligkeit durch ROS wie O_2^- und H_2O_2 wurde in den Messungen immer mituntersucht. Die Ergebnisse decken sich mit den Angaben aus der Literatur, dass ROS keine signifikanten Veränderungen des DAF-FM-Fluoreszenzsignals bewirken. Um die intrazelluläre Entstehung von O_2^- und reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) zu verifizieren, wurden Mitosox und DCF, zwei andere Fluoreszenzfarbstoffe für den spezifischen Nachweis von O_2^- bzw. ROS, verwendet. Um auszuschließen, dass die intrazelluläre Bildung von O_2^- das DAF-FM-Signal beeinflusst, wurden verschiedene Konzentrationen eines Superoxid-Dismutase (SOD) - Mimetikums getestet. Die Zugabe des SOD-Mimetikums hatte keinerlei Effekt auf das DAF-Signal (Abb. 12). Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich das Signal direkt abhängig von der Aktivität der eNOS, da der NOS-Inhibitor L-NAME das Fluoreszenzsignal reduzierte. Eine Steigerung der Fluoreszenz durch die Zugabe von dem eNOS Substrat L-Arginin auf Zellsuspensionen ließ sich nicht erreichen (Abb. 12). Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür kann sein, dass intrazellulär bereits eine ausreichende L-Arginin Konzentration vorlag und deshalb keine weitere Stimulation der Enzymaktivität möglich ist und/oder diese ist abhängig von der Saturation der Transportmechanismen oder von der Aktivität des Enzyms Arginase im humanen Erythrozyten.[74]

5.1.2. DCF diacetat

DCF ist einer der am weitesten verbreiteten Fluoreszenzfarbstoffe für oxidativen Stress. Durch eine Behandlung mit L-NAME, L-Arginin, D-Arginin oder einem Superoxiddismutase-Mimetikum verändert sich die Fluoreszenz nicht (Abb. 13). Eine Behandlung der Zellen mit H_2O_2 und mit O_2^- erhöht das Signal signifikant. Die zusätzliche Gabe eines Superoxiddismutase-Mimetikums zum O_2^- bewirkt eine deutliche Reduzierung der Fluoreszenz verglichen mit dem Signal nach O_2^-.

DCF ist somit ein unspezifischer Marker für intrazellulären oxidativen Stress.

5.1.3. MitoSOX

MitoSOX stellt einen für Superoxid-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff dar.

Das Fluoreszenzsignal der mit MitoSOX gefärbten Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden war sehr gering und lag nur unwesentlich über der Autofluoreszenz ungefärbter Erythrozyten (Abb. 9). Durch L-NAME, L-Arginin oder D-Arginin ließ sich das Signal nicht beeinflussen. H_2O_2 bewirkte eine mäßige, signifikante Steigerung, wohingegen O_2^- eine gravierende, signifikante Steigerung der Fluoreszenz hervorrief.

Das geringe Fluoreszenzlevel der unbehandelten Erythrozyten impliziert einen sehr geringen Gehalt von O_2^- in den Erythrozyten junger Probanden. Durch eine Behandlung mit O_2^- lässt sich das Signal wie erwartet steigern und zu einem gewissen Ausmaß durch ein Superoxiddismutase-Mimetikum wieder verringern. Überraschend erschien das erhöhte Signal durch eine Behandlung mit H_2O_2, was auf den ersten Blick der vorherrschenden Meinung in der Literatur zu widersprechen scheint. Zum einen ist das Signal nach H_2O_2 nur tendenziell erhöht, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass durch H_2O_2 eine O_2^--Bildung initiiert wird. Insgesamt kann MitoSOX als eine verlässliche und spezifische Messmethode für O_2^- bewertet werden.

5.1.4. TT

Die Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden, die mit TT angefärbt worden sind, wiesen eine recht hohe Fluoreszenz-Aktivität auf (Abb. 14). Die vorherige Inkubation der Zellen mit L-NAME, L-Arginin, D-Arginin oder einem Superoxiddismutase-Mimetikum veränderten das Fluoreszenzsignal nicht, hatten somit keinen Einfluss auf den Glutathionspiegel. Die Zugabe der ROS O_2^- und H_2O_2 reduzierten das Fluoreszenzsignal und somit die Glutathionkonzentration. Die Zugabe von einem Superoxiddismutase-Mimetikum zum H_2O_2 erbrachte kaum eine Veränderung, bei O_2^- lag die Fluoreszenz-Aktivität tendenziell etwas höher bei der Behandlung der Zellen mit so einem Mimetikum als ohne.

Der Fluoreszenzfarbstoff TT ist ein gut etablierter und vielseitig einsetzbarer Indikator für den intrazellulären Thiolgehalt und damit ein indirekter Nachweis der intrazellulären Glutathionkonzentration. Die Ergebnisse der jungen, gesunden Probanden waren gut reproduzierbar und ein Absinken der Glutathionkonzentration nach der Behandlung der Zellen mit O_2^- bzw. H_2O_2 erfolgte wie erwartet. Die zusätzliche Zugabe eines Superoxiddismutase-Mimetikums erbrachte kaum einen Einfluss auf die

Glutathionkonzentration, unabhängig ob die Zelle zuvor mit O_2^- oder mit H_2O_2 behandelt wurde. Da die Wirkung und Funktionalität des Superoxiddismutase-Mimetikums bei den anderen Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden konnte, erscheint eine Dysfunktion als unwahrscheinlich, da der Probenansatz bis auf den Fluoreszenzfarbstoff mit dem der anderen Probenreihen identisch ist. In der Literatur wird die Glutathionperoxidase oft als wichtigster Abwehrmechanismus gegen ROS dargestellt. Sieht man den Abbau von H_2O_2 durch die Glutathionperoxidase als First-Line Mechanismus, sind die Ergebnisse gut nachvollziehbar. Die Superoxiddismutase bildet beim Abbau von O_2^- H_2O_2, welches dann in den Erythrozyten von der Katalase oder eben auch der Glutathionperoxidase weiter abgebaut wird. So könnte sich das Absinken der Glutathionkonzentration nach der Behandlung von O_2^- erklären. Die zusätzliche Gabe von der Superoxiddismutase zum O_2^- scheint keinen großen Effekt zu haben, möglicherweise weil die physiologische Superoxiddismutase den Abbau von O_2^- bei den jungen, gesunden Probanden problemlos übernehmen kann.

5.2. Einfluss der erythrozytären eNOS-Expression auf den oxidativen Status

Das Mausmodell bietet die Möglichkeit die Funktion von bestimmten Proteinen zu bestimmen, mittels der gene-targeting Prozedur[75]. In diesem Fall ist Mäusen gezielt das Gen für die eNOS ausgeschaltet worden.[76] So besteht die Möglichkeit den Einfluss der erythrozytären eNOS-Expression auf den oxidativen Status zu untersuchen. Die Aminosäuresequenz der murinen eNOS stimmt zu 93% mit der humanen überein.

Bei der Beurteilung von Experimenten auf der Basis von Genmanipulationen sollten verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. Durch Veränderungen des Signalwegs zur Regulation des Genprodukts könnten weitere Phänotypen hervorgehen. Möglicherweise werden durch Kompensationsmechanismen wie beispielsweise der Hochregulation anderer Isoformen die Phänotypen maskiert.[17]

Sowohl das DAF-FM Fluoreszenzsignal als auch die Nitritkonzentrationen in den Erythrozyten und im Plasma der KO-Mäuse waren geringer als bei den WT-Mäusen (Abb. 15 A + 16).

Kleinbongard et al. haben bei verschiedenen Spezies die Nitritlevel im Plasma mittels CLD und zwei weiteren Analysetechniken gemessen und für Menschen einen Basiswert von 305 ± 23 nmol/l und für Mäuse von 457 ± 51 nmol/l ermittelt. Der Nitritwert war abhängig von der NOS-Aktivität. Ein Vergleich von eNOS $^{-/-}$ Mäusen und Wildtyp-Mäusen mit inhibierter NOS zeigte, dass 70 ± 5 % des Plasmanitrits von der eNOS stammen. Der Plasmanitritwert der eNOS $^{-/-}$ Mäuse wurde mit 148 ± 45 nmol/l angegeben.[77] Der Wert der Plasmakonzentration der Wildtyp-Mäuse entspricht in etwa dem im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Wert. Die plasmatische Nitrikonzentration der KO-Mäuse lag in den hier vorliegenden Untersuchungen allerdings höher als der in der Literatur angegebene Wert. Hierbei könnte die Ernährung der Mäuse sehr wahrscheinlich eine Rolle spielen, da Nitrit/Nitrat in der Ernährung eine wesentliche Rolle in der Höhe der zirkulierenden Konzentrationen an Plasmanitrit spielt.[78]

Die Basisfluoreszenz der Fluoreszenzfarbstoffe DCF und Mitosox, die für den Nachweis verschiedener ROS eingesetzt wurden, war in den Erythrozyten der KO- und Wildtyp-Mäuse nahezu gleich (Abb. 15 C + D). Der oxidative Stress scheint in den Erythrozyten der KO-Mäuse somit nicht per se erhöht zu sein. Die Zugabe sowohl von H_2O_2 als auch von O_2^- bewirkten in den Erythrozyten der KO-Mäuse einen sehr viel stärkeren Signalanstieg. Die Fähigkeit zum Abbau der ROS ist bei den eNOS$^{-/-}$ Mäusen deutlich verringert.

Die Konzentration des antioxidativen Glutathions in den Erythrozyten der KO-Mäuse ist signifikant erhöht (Abb. 15 B). Die höhere Konzentration Glutathions könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, der aus der verminderten Fähigkeit der KO-Mäuse, oxidativen Stress abzubauen, resultiert. Eine andere Möglichkeit stellt die verminderte Konzentration an den Enzymen Glutathionperoxidase und Katalase dar. Hierbei handelt es sich allerdings um eine Erklärungstheorie, welche noch weiter zu untersuchen ist.

Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Expression der eNOS in den Erythrozyten eine große Rolle spielt. Das Fehlen der eNOS im Erythrozyten bewirkt neben einer erwartet niedrigeren NO- und folglich auch Nitritkonzentration eine verminderte Fähigkeit ROS abzubauen. Eine Abbaumöglichkeit von O_2^-, die Reaktion mit NO, steht in den Erythrozyten der KO-Mäusen aufgrund der verminderten Konzentration in vermindertem Maße zur Verfügung. Ob durch die Genmanipulation möglicherweise auch die Expression anderer Enzyme verändert wird, bleibt näher zu untersuchen. Die Expression der eNOS hat einen tiefgreifenden Einfluss auf die Funktion der

Erythrozyten. Bei den eNOS-KO-Mäusen waren nicht nur die NO- und Nitrit-Konzentrationen vermindert, sondern auch der Redox-Status wurde verändert, da die Fähigkeit zum Abbau oxidativen Stresses vermindert war bei gleichzeitig höherer Konzentration von Glutathion.

5.3. Oxidativer Status und NO-Spiegel in Erythrozyten bei kardiovaskulären Erkankungen

Wie bereits zuvor dargestellt wurde ist NO ein wichtiges protektives Molekül im Gefäßsystem. Durch eine Reaktion mit O_2^- wird NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) inaktiviert.

In der Diskussion steht dagegen immer noch der Mechanismus, wie NO die Erythrozyten wieder verlassen kann, ohne zuvor wieder „inaktiviert" zu werden. Eine mögliche Erklärung ist die Oxidation von Eisen (II)-Nitrosylhämoglobin durch Oxidantien wie Peroxynitrit wodurch NO freigesetzt wird.[79] Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass NO über Zwischenprodukte wie z.B. N_2O_3 aus den Erythrozyten exportiert wird. Dieses könnte die Zelle dann direkt oder über einen weiteren Zwischenschritt, der Bildung von Nitrosothiolen, verlassen.[80] In diesem Zusammenhang könnte der membranständige Anionenaustauscher AE1 eine wichtige Rolle spielen, indem S-Nitrosothiole an den Anionenaustauscher binden und so NO zur Membran transportiert wird.[81]

Bei kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder chronischem Nikotinabusus wird die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies in der Gefäßwand stimuliert.[82]

Das Ziel der hier vorliegenden Untersuchung bestand darin, zu untersuchen inwieweit kardiovaskuläre Erkrankungen bzw. Risikofaktoren wie die arterielle Hypertonie einen veränderten oxidativen Status in den Erythrozyten bedingen.

In den mit DAF-FM gefärbten Proben war die Streubreite der Ergebnisse innerhalb der einzelnen Probandengruppe recht groß, so dass die Interpretation schwierig ist (Abb. 17 C). Es besteht die Tendenz, dass der NO-Gehalt der gesunden, altersangepassten Probanden höher liegt als bei den Patienten. Die Chemilumineszenz-Detektion stellt eine sehr sensitive Messung von NO und NO-gebundenen Spezies dar, mit der bereits kleinste Mengen von 100 fmol detektiert werden können.[83,84] Mit Hilfe der CLD wurden

zudem die intraerythrozytären Nitritkonzentrationen gemessen, die nur sehr geringe Unterschiede in Form einer leichten, aber noch nicht signifikanten Verminderung bei Patienten mit KHK und KHK plus Hypertonie aufweisen (Abb. 18).

Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren ist gezeigt worden, dass das Level der RXNO im Plasma gegenüber Probanden ohne Risikofaktoren deutlich vermindert ist. RXNO sind die Summe aller zirkulierenden NO-Spezies. Das Level an RXNO im Plasma ermöglicht eine Aussage über die NO-Bioverfügbarkeit und damit über die endotheliale Funktion.[85] Dagegen ist über die Nitrit-Konzentration in Erythrozyten und der daraus zu treffenden Aussage bisher kaum etwas bekannt.

Die Ergebnisse deuten eine etwas verminderte NO-Bioverfügbarkeit in Erythrozyten im Falle einer kardiovaskulären Erkrankung an, allerdings ohne Signifikanz (Abb. 17 C + 18). Andere Untersuchungen in diesem Patientenkollektiv zeigten, dass die Expression und die Funktion der erythrozytären eNOS bei Patienten mit einer KHK mit der endothelialen Dysfunktion korrelieren.

Die Konzentrationen von O_2^-, mittels Mitosox gemessen, zeigten eine signifikant erhöhte Konzentration bei den Probanden mit einer KHK, bzw. einer KHK und einer arteriellen Hypertonie (Abb. 17 A). Der weniger spezifische Fluoreszenzfarbstoff DCF zeigte lediglich in der Gruppe der Probanden mit einer arteriellen Hypertonie ein signifikant erhöhtes Signal (Abb. 17 B). Somit scheinen die ROS in allen Patientengruppen erhöht zu sein, allerdings je nach vorliegender Krankheit in einer unterschiedlichen Zusammensetzung.

Der Einfluss der reaktiven Sauerstoffspezies ist bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung, da durch viele Untersuchungen die Bedeutung in der Homöostase der Gefäße und des Blutflusses ersichtlich wurden. Bereits 1995 fanden Suzuki et al. Hinweise, dass der oxidative Stress in der Wand der Mikrogefäße bei Ratten mit arterieller Hypertension erhöht ist.[86] 2000 beschrieben Lenda et al., dass die Arterien von Ratten, die natriumchlorid-reich ernährt wurden, vermindert auf Acetylcholin ansprechen. Es zeigte sich ein vermehrter Gehalt von reaktiven Sauerstoffspezies in der Arterienwand. Gab man in diese Arterie Katalase und Superoxiddismutase, verbesserte sich die Reaktion auf Acetylcholin signifikant. Diese Untersuchungen weisen auf den gleichen Mechanismus hin, nämlich, dass der NO-Gehalt durch einen hohen Spiegel an ROS sinkt und somit nicht für die Vermittlung einer Vasodilatation zur Verfügung steht.[87] Swei et al. zeigten ebenfalls eine erhöhte Konzentration von O_2^- und H_2O_2 im Gefäßsystem bei Ratten mit einer Salz-induzierten arteriellen Hypertonie und sahen

eine Beteiligung der reaktiven oxidativen Spezies bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie.[88] Auch Yang et al. beobachteten bei spontan hypertensiven Ratten, dass ROS eine Schlüsselrolle in der Vasokonstriktion spielen. Eine mögliche Erklärung hierfür sei die Reaktion der ROS mit NO, welches als Vasodilatator nicht weiter zur Verfügung steht.[89] Higashi et al. fanden auch bei Menschen mit einer renovaskulären Hypertonie einen Zusammenhang zwischen erhöhtem oxidativem Stress im Gefäß und dadurch verminderter Endothel-abhängiger Vasodilatation.[90]

Lavi et al. wiesen einen lokal erhöhten oxidativen Stress bei unveränderter NO-Produktion bei Patienten mit koronarer endothelialer Dysfunktion nach, indem unter anderem die Konzentrationen der Superoxiddismutase, Myeloperoxidase und Nitrotyrosin im Blut der Koronararterien bestimmt wurden.[91] Kumar et al. untersuchten den oxidativen Stress und den antioxidativen Status im Blutplasma bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, indem die Höhe der Superoxiddismutase, Katalase und Vitamin C, sowie ein Marker der Lipidperoxidation biochemisch bestimmt wurden. Vitamin C, die Superoxiddismutase und die Katalase zeigten sich bei den Patienten mit KHK gegenüber einer Kontrollgruppe vermindert, der Marker der Lipidperoxidation war erhöht.[92] Sheng et al. verwendeten ebenfalls den Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM zur Bestimmung des NO-Gehalts bei Patienten mit erhöhtem Blutglucosegehalt. Der NO-Spiegel der Endothelzellen war niedriger, stieg aber durch eine Behandlung der Patienten mit Vitamin C und L-Sepiapertin/BH_4 an. Der vermutete Wirkmechanismus beruht auf einer Reduzierung der reaktiven oxidativen Spezies. Diese Studien weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und kardiovaskulären Erkrankungen hin, allerdings ohne den oxidativen Stress direkt nachzuweisen.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die verminderte Bioverfügbarkeit von NO bei einer endothelialen Dysfunktion aus einer eingeschränkten Aktivität der eNOS resultiert. Sasser et al. untersuchten 2004 Endothelzellen von Ratten mit einer Salz-induzierten Hypertonie und verglichen diese mit Wildtyp-Ratten. Die Phosphorylierung der eNOS am Serin 1179 war bei den hypertonen Ratten vermindert und passend dazu war auch das NO/cGMP Signal bei diesen Tieren reduziert. Dies lässt auf eine verminderte Aktivität des Enzyms schließen.[93]

Die Messungen zur Konzentration des Glutathionsspiegel sind aufgrund hoher Streubreiten innerhalb der Gruppen schwierig zu bewerten, es besteht allerdings die Tendenz, dass die Glutathion-Konzentration bei Patienten mit einer KHK erhöht ist (Abb. 17 D). Die erhöhte Glutathion-Konzentration lässt sich auch auf der Basis der erhöhten

ROS-Spiegel in den Erythrozyten der KHK-Patienten möglicherweise als eine Art Anpassungsmechanismus an den dauerhaft erhöhten oxidativen Stress werten. Aber der Mechanismus dafür ist unklar.

Blankenberg et al. berichteten 2003, dass die Aktivität der Glutathionperoxidase 1 in Erythrozyten eine Aussage über das Risiko eines drohenden kardiovaskulären Ereignisses zuzulassen scheint.[94] Bei Mäusen mit einem Glutathionperoxidase-1-Mangel ist die Bioverfügbarkeit von NO scheinbar vermindert.[29] In arteriosklerotischen Plaques der A. carotis beim Menschen ist die Aktivität der Glutathionperoxidase 1 vermindert oder fehlt, was wiederum mit der Entwicklung von schweren Gefäßläsionen assoziiert zu sein scheint.[95] Auf der Basis dieser Untersuchungen könnte die erhöhte Glutathion-Konzentration auch wegen einer verminderten Aktivität der Glutathionperoxidase zu erklären sein. Die prozentuale Abnahme des TT-Signals nach der Behandlung der Erythrozyten war in der Gruppe der Patienten mit einer arteriellen Hypertonie oder einer KHK am niedrigsten, was auf eine verminderte Aktivität der Glutathionperoxidase schließen lässt.

In den meisten Studien gab es die Schlussfolgerung, dass eine vermehrte ROS-Bildung zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit führt. Methodisch wurde zumeist ein indirekter Nachweis des oxidativen Stresses gewählt, indem die Höhe der antioxidativen Substanzen oder Isoprostane - ein Marker für die Lipidperoxidation und somit ein indirekter Marker für oxidativen Stress - gemessen wurde. In dieser Arbeit wird eine Methode vorgestellt, mit der der oxidative Status der Erythrozyten umfassend und direkt gemessen werden kann. Ähnlich wie bei den Endothelzellen scheinen kardiovaskuläre Krankheiten in Erythrozyten eine eNOS-Dysfunktion auszulösen. Zum einen ist die Aktivität und Expression der eNOS vermindert, welches eine verminderte NO-Produktion impliziert. Zum anderen haben die Untersuchungen ergeben, dass die Konzentration der ROS erhöht ist, was wiederum einen vermehrten Abbau von NO bedingt. Ein Kompensationsmechanismus des erhöhten oxidativen Stresses könnte eine vermehrte Produktion von Glutathion sein, es bleibt aber zu untersuchen ob die Konzentration evtl. wegen einer verminderten Aktivität der Glutathionperoxidase erhöht ist. Die erhöhten Konzentrationen von ROS könnten durch einen Abbau von NO zu der verminderten NO-Bioverfügbarkeit beitragen.

5.4. Oxidativer Status und NO-Spiegel in Erythrozyten im Alter

Die Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden, die mit TT angefärbt worden sind, wiesen ein höheres Fluoreszenzsignal auf als die der älteren Kontrollgruppe (Abb. 21 C). Dabei war der oxidative Stress - wie in den anderen Untersuchungen dargestellt (Abb. 21) - bei den jungen Probanden geringer als in der Kontrollgruppe. Die Erythrozyten von jungen, gesunden Personen haben somit eine höhere Konzentration an unverbrauchtem Glutathion zu Verfügung, um möglichen oxidativen Stress schnell abzubauen.

Die Erythrozyten der jungen, gesunden Probanden zeigen eine geringe Basisfluoreszenz nach der Färbung mit DCF (Abb. 21 A).

Verglichen mit den jungen, gesunden Probanden erwies sich das DAF-FM-Signal der gesunden, altersangepassten Probanden als signifikant höher (Abb. 21 B).

Das Alter scheint Veränderungen in den Erythrozyten zu bewirken. Auffallend ist hierbei der erhöhte Level an oxidativem Stress. Auch das Glutathion als mögliches Substrat zum Abbau von ROS ist im Alter niedriger. Bemerkenswert ist allerdings der signifikant erhöhte Spiegel an NO in den Erythrozyten der alten, gesunden Probanden (Abb. 21 B).

Die vermehrte Bildung von NO könnte einen Kompensationsmechanismus darstellen, wie die Erythrozyten der alten, gesunden Probanden versuchen die NO-Bioverfügbarkeit trotz erhöhtem oxidativen Stress aufrecht zu erhalten. Dieser Mechanismus bleibt allerdings noch näher zu untersuchen.

5.5. Einfluss von kardiovaskulären Krankheiten auf die erythrozytäre Verformbarkeit

Basierend auf dem Prinzip der Ektacytometrie kann die Verformbarkeit der Erythrozyten gemessen werden. Die Verformbarkeit ist eine wesentliche Voraussetzung für die Mikrozirkulation, da die kleinsten Kapillaren um ein Vielfaches kleiner sind als die Erythrozyten selbst. Die Messung der erythrozytären Verformbarkeit mit einem laser-

assisted optical rotational cell analyzer (LORCA) ist eine in der Literatur häufig verwendete und evaluierte Methode.

In den Untersuchungen der verschiedenen Probandengruppen ergab sich bei einem Scherstress von 1,73 Pa eine statistisch signifikante Verringerung der erythrozytären Verformbarkeit in der Gruppe der Hypertoniker (Abb. 20). Auch bei einem Scherstress von 2,68 Pa zeigte sich in der Gruppe der Hypertoniker eine verringerte Verformbarkeit, diese war allerdings statistisch nicht signifikant.

Die Arbeitsgruppe von Baskurt[96] konnte durch die Messung der erythrozytären Verformbarkeit unter Verwendung eines LORCAs die Abhängigkeit von der NO-Konzentration nachweisen. Eine Inkubation der Erythrozyten mit einem NO-Inhibitor verminderte die Verformbarkeit, wohingegen die Inkubation mit einem NO-Donator die Verformbarkeit verbesserte. Auch eine Inhibition der Guanylat-Cyclase verminderte die Verformbarkeit.[97] Die gleiche Arbeitsgruppe wies 2000 nach, dass eine chronische Inhibition der NOS bei Ratten nicht nur zu einer verminderten erythrozytären Verformbarkeit und einer verstärkten Aggregation der Erythrozyten führte, sondern auch eine deutliche Steigerung des arteriellen Blutdrucks verursachte.[98] Riquelme et al. untersuchten die Erythrozyten von Patienten mit einer arteriellen Hypertonie und eine Kontrollgruppe[99]. Der Verformbarkeitsindex der Erythrozyten von Patienten mit einer arteriellen Hypertonie zeigte sich vermindert, allerdings waren die Werte statistisch nicht signifikant.

In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant verminderte Verformbarkeit bei Patienten mit einer arteriellen Hypertonie (Abb. 20), so dass der Schluss nahe liegt, dass eine arterielle Hypertonie mit einer veränderten erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit einhergeht. Auch die Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie (Abb. 17), die eine signifikant vermehrte ROS-Konzentration zeigten, welche durch eine Reaktion wiederum die NO-Konzentration senken können, legen diesen Zusammenhang nahe.

Einen weiteren Hinweis auf die enge Verzahnung zwischen oxidativem Stress und der erythrozytären Verformbarkeit lieferten Baskurt et al. Die Arbeitsgruppe behandelte Erythrozyten mit dem Superoxidanion produzierenden System PMS und NADPH. Die intrazellulär erhöhte Konzentration von Superoxidanion bewirkte eine verminderte Verformbarkeit. Dagegen bewirkte eine Erhöhung der extrazellulären Superoxidanion-Konzentration vor allem Veränderungen bei der Aggregation der Erythrozyten.[100]

Eine arterielle Hypertonie scheint somit durch erhöhte Konzentrationen von ROS eine verminderte erythrozytäre Verformbarkeit auszulösen.

5.6. Ausblick

Bisher sah man bei kardiovaskulären Krankheiten vor allem die verminderte Bioverfügbarkeit von endothelial gebildetem NO als Ursache für die Entstehung und das Fortschreiten der Krankheit an. Eine verminderte Konzentration an NO führt unter anderem zu einer geringeren Verformbarkeit der Erythrozyten, wodurch Mikrozirkulationsstörungen hervorgerufen werden können. Durch ein besseres Verständnis biochemischer Vorgänge gerade auch in Krankheitsprozessen können zielgerichtetere Therapien eingesetzt werden. Es bleibt weiter zu untersuchen, inwiefern die veränderte Physiologie der Erythrozyten und die dadurch verminderte erythrozytäre NO-Produktion einen Einfluss oder sogar eine Mitursache in der Entwicklung und dem Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen darstellen.

6. Zusammenfassung

Die Entstehung und das Fortschreiten von KHK und anderen kardiovaskulären Erkrankungen sind unter anderem bedingt durch eine endotheliale Dysfunktion, wodurch die Bioverfügbarkeit von NO vermindert ist. Vor Kurzem wurde eine endotheliale NO-Synthase (eNOS) in Erythrozyten nachgewiesen, allerdings ist die physiologische Rolle der erythrozytären eNOS noch nicht bekannt. Mögliche Ursachen der verminderten NO-Bioverfügbarkeit können eine verminderte eNOS-Aktivität, ein erhöhter Abbau von NO durch ROS oder eine verminderte Expression der NOS sein. Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der erythrozytären NOS sowie die Konzentrationen und den Einfluss von ROS auf die Funktion der Erythrozyten, insbesondere der erythrozytären Verformbarkeit zu untersuchen. Hierzu wurde eine Methode etabliert, bei der mittels verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig die NO- und ROS-Konzentrationen in Erythrozyten durch die Durchflusszytometrie gemessen werden können. Zudem wurde die Verformbarkeit und die Nitrit-Konzentration der Erythrozyten bestimmt. Diese Untersuchungen wurden zum einen bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit und/oder einer arteriellen Hypertonie bezogen auf eine altersangepasste, gesunde Kontrollgruppe und zum anderen im Mausmodell, bei eNOS-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen angewandt. Die Ergebnisse zeigten, dass eine arterielle Hypertonie einhergeht mit einer erhöhten Konzentration an ROS und gleichzeitig verminderter erythrozytären Verformbarkeit. Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit zeigten eine erhöhte Konzentration von O_2^-. Die erhöhten Konzentrationen von ROS könnten durch einen Abbau von NO zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit beitragen. Die genaue Pathologie der essentiellen Hypertonie bleibt allerdings weiterhin unklar, da nicht eruiert werden konnte ob die erhöhten Konzentrationen von ROS eine arterielle Hypertonie bedingen oder ob sie eine Folge der arteriellen Hypertonie darstellen. Bei den Untersuchungen im Mausmodell war die Konzentration von NO in den Erythrozyten der eNOS-KO-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant niedriger. Der Glutathion-Gehalt der Erythrozyten der KO-Mäuse war erhöht, aber bei Zugabe einer definierten Menge O_2^- stieg der O_2^--Spiegel der KO-Mäuse in höherem Maße an als dies bei den Wildtyp-Mäusen der Fall war. Die veränderte Glutathion-Konzentration könnte eine Art Kompensationsmechanismus darstellen, was aber noch weiter zu untersuchen bleibt. Die Expression der eNOS

scheint in jedem Fall eine sehr wichtige und tiefgreifende Rolle für die Funktion der Erythrozyten zu spielen.

7. Literaturverzeichnis

[1] Heiss, Christian; Lauer, Thomas; Dejam, Andre; Kleinbongard, Petra; Hamada, Sandra; Rassaf, Tienush et al. (2006): Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. In: *J Am Coll Cardiol* 47 (3), S. 573–579.

[2] Herold, Gerd: Innere Medizin, Köln 2010, S. 226-227.

[3] Napoli, C.; D'Armiento, F. P.; Mancini, F. P.; Postiglione, A.; Witztum, J. L.; Palumbo, G.; Palinski, W. (1997): Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. In: *J Clin Invest* 100 (11), S. 2680–2690.

[4] Napoli, Claudio; Ignarro, LouisJ (2009): Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. In: *Arch Pharm Res* 32 (8), S. 1103–1108.

[5] Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. In: *N Engl J Med* 340 (2), S. 115–126.

[6] Glagov, S.; Weisenberg, E.; Zarins, C. K.; Stankunavicius, R.; Kolettis, G. J. (1987): Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. In: *N Engl J Med* 316 (22), S. 1371–1375.

[7] Anogeianaki, A.; Angelucci, D.; Cianchetti, E.; D'Alessandro, M.; Maccauro, G.; Saggini, A. et al. (2011): Atherosclerosis: a classic inflammatory disease. In: *Int J Immunopathol Pharmacol* 24 (4), S. 817–825.

[8] Tare, M.; Parkington, H. C.; Coleman, H. A.; Neild, T. O.; Dusting, G. J. (1990): Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. In: *Nature* 346 (6279), S. 69–71.

[9] Hawkins, D. J.; Meyrick, B. O.; Murray, J. J. (1988): Activation of guanylate cyclase and inhibition of platelet aggregation by endothelium-derived relaxing factor released from cultured cells. In: *Biochim Biophys Acta* 969 (3), S. 289–296.

[10] Henry, Y.; Guissani, A. (1999): Interactions of nitric oxide with hemoproteins: roles of nitric oxide in mitochondria. In: *Cell Mol Life Sci* 55 (8-9), S. 1003–1014.

[11] Feelisch, M.; Brands, F.; Kelm, M. (1995): Human endothelial cells bioactivate organic nitrates to nitric oxide: implications for the reinforcement of endothelial defence mechanisms. In: *Eur J Clin Invest* 25 (10), S. 737–745.

[12] Kleinbongard, Petra; Dejam, Andre; Lauer, Thomas; Rassaf, Tienush; Schindler, Achim; Picker, Olaf et al. (2003): Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. In: *Free Radic Biol Med* 35 (7), S. 790–796.

[13] Lauer, Thomas; Kleinbongard, Petra; Kelm, Malte (2002): Indexes of NO bioavailability in human blood. In: *News Physiol Sci* 17, S. 251–255.

[14] Reriani, MartinK; Lerman, LilachO; Lerman, Amir (2010): Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors. In: *Biomark Med* 4 (3), S. 351–360.

[15] Jin, J. S.; D'Alecy, L. G. (1996): Central and peripheral effects of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthetase inhibitor. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 28 (3), S. 439–446.

[16] Sessa, W. C. (1994): The nitric oxide synthase family of proteins. In: *J Vasc Res* 31 (3), S. 131–143.

[17] Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. In: *Biochem J* 357 (Pt 3), S. 593–615.

[18] Özüyaman, Burcin; Grau, Marijke; Kelm, Malte; Merx, Marc W.; Kleinbongard, Petra (2008): RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. In: *Trends in Molecular Medicine* 14 (7), S. 314–322.

[19] Heiss, C.; Schanz, A.; Amabile, N.; Jahn, S.; Chen, Q.; Wong, M. L. et al. (2010): Nitric Oxide Synthase Expression and Functional Response to Nitric Oxide Are Both Important Modulators of Circulating Angiogenic Cell Response to Angiogenic Stimuli. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (11), S. 2212–2218.

[20] Moss, Monique B.; Siqueira, Mariana A.; Mann, Giovanni E.; Brunini, Tatiana Mc; Mendes-Ribeiro, Antonio C. (2010): Platelet aggregation in arterial hypertension: is there a nitric oxide-urea connection? In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37 (2), S. 167–172.

[21] Cortese-Krott, Miriam M.; Rodriguez-Mateos, Ana; Sansone, Roberto; Kuhnle, Gunter G. C.; Thasian-Sivarajah, Sivatharsini; Krenz, Thomas et al. (2012): Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. In: *Blood* 120 (20), S. 4229–4237.

[22] Horn, Patrick; Cortese-Krott, Miriam Margherita; Amabile, Nicolas; Hundsdorfer, Claas; Kroncke, Klaus-Dietrich; Kelm, Malte; Heiss, Christian (2013): Circulating microparticles carry a functional endothelial nitric oxide synthase that is decreased in patients with endothelial dysfunction. In: *J Am Heart Assoc* 2 (1), S. e003764.

[23] Sies, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. In: *Exp Physiol* 82 (2), S. 291–295.

[24] Cai, H.; Harrison, D. G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. In: *Circ Res* 87 (10), S. 840–844.

[25] Montezano, Augusto C.; Touyz, Rhian M. (2012): Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. In: *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 110 (1), S. 87–94.

[26] Li, H.; Forstermann, U. (2000): Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. In: *J Pathol* 190 (3), S. 244–254.

[27] Forsberg, L.; Faire, U. de; Morgenstern, R. (2001): Oxidative stress, human genetic variation, and disease. In: *Arch Biochem Biophys* 389 (1), S. 84–93.

[28] Ursini, F.; Maiorino, M.; Brigelius-Flohe, R.; Aumann, K. D.; Roveri, A.; Schomburg, D.; Flohe, L. (1995): Diversity of glutathione peroxidases. In: *Methods Enzymol* 252, S. 38–53.

[29] Forgione, Marc A.; Cap, Andre; Liao, Ronglih; Moldovan, Nicanor I.; Eberhardt, Robert T.; Lim, Chee Chew et al. (2002): Heterozygous cellular glutathione peroxidase deficiency in the mouse: abnormalities in vascular and cardiac function and structure. In: *Circulation* 106 (9), S. 1154–1158.

[30] Fukai, Tohru; Folz, Rodney J.; Landmesser, Ulf; Harrison, David G. (2002): Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. In: *Cardiovasc Res* 55 (2), S. 239–249.

[31] Rathaus, Mauro; Bernheim, Jacques (2002): Oxygen species in the microvascular environment: regulation of vascular tone and the development of hypertension. In: *Nephrol Dial Transplant* 17 (2), S. 216–221.

[32] Cunha, AnaRosa; Umbelino, Bianca; Correia, MargaridaL; Neves, MarioFritsch (2012): Magnesium and vascular changes in hypertension. In: *Int J Hypertens* 2012, S. 754250.

[33] Yu, Long-Xi; Dzikovski, BorisG; Freed, JackH (2012): A protocol for detecting and scavenging gas-phase free radicals in mainstream cigarette smoke. In: *J Vis Exp* (59), S. e3406.

[34] Gross, S. S.; Lane, P. (1999): Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (18), S. 9967–9969.

[35] Kleinbongard, Petra; Schulz, Rainer; Rassaf, Tienush; Lauer, Thomas; Dejam, Andre; Jax, Thomas et al. (2006): Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. In: *Blood* 107 (7), S. 2943–2951.

[36] Cortese-Krott, Miriam M.; Horn, Patrick; Krenz, Thomas; Krisp, Christoph; Sivarajah, Sivatharsini; Lysaja, Katharina et al. (2010): Isolation, Characterization, and Activity of an Endothelilal Nitric Oxide Sythase in Human Red Blood Cells. SFRBM's 17th Annual Meeting: Program and Abstracts. In: *Free Radical Biology and Medicine* 49 (Supplement 1), S. S112.

[37] Ulker, Pinar; Meiselman, Herbert J.; Baskurt, Oguz K. (2010): Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 45 (2-4), S. 169–175.

[38] Baskurt, OguzK; Ulker, Pinar; Meiselman, HerbertJ (2011): Nitric oxide, erythrocytes and exercise. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 49 (1-4), S. 175–181.

[39] Bor-Kucukatay, Melek; Wenby, RosalindaB; Meiselman, HerbertJ; Baskurt, OguzK (2003): Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (5), S. H1577-84.

[40] Webb, AndrewJ; Milsom, AlexandraB; Rathod, KrishnarajS; Chu, WaiLum; Qureshi, Shehla; Lovell, MatthewJ et al. (2008): Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. In: *Circ Res* 103 (9), S. 957–964.

[41] Gregory, T. R. (2000): Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. In: *Genome* 43 (5), S. 895–901.

[42] Shiga, T.; Maeda, N.; Kon, K. (1990): Erythrocyte rheology. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 10 (1), S. 9–48.

[43] Van, DortHM; Knowles, D. W.; Chasis, J. A.; Lee, G.; Mohandas, N.; Low, P. S. (2001): Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. In: *J Biol Chem* 276 (50), S. 46968–46974.

[44] Lee, J. C.; Wong, D. T.; Discher, D. E. (1999): Direct measures of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton. In: *Biophys J* 77 (2), S. 853–864.

[45] Jöns, Thomas (2001): Zur Bedeutung von Zytoskelett-Membran-Verbindungen für die gerichtete HCl-Sekretion von Parietalzellen. Habilitationsschrift, Humboldt-Universität Berlin

[46] Chien, S. (1987): Red cell deformability and its relevance to blood flow. In: *Annu Rev Physiol* 49, S. 177–192.

[47] Sutera, S. P.; Gardner, R. A.; Boylan, C. W.; Carroll, G. L.; Chang, K. C.; Marvel, J. S. et al. (1985): Age-related changes in deformability of human erythrocytes. In: *Blood* 65 (2), S. 275–282.

[48] Ulker, Pinar; Meiselman, Herbert J.; Baskurt, Oguz K. (2010): Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 45 (2-4), S. 169–175.

[49] Tsuda, K.; Kimura, K.; Nishio, I.; Masuyama, Y. (2000): Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation. In: *Biochem Biophys Res Commun* 275 (3), S. 946–954.

[50] Riquelme, Bibiana; Foresto, Patricia; D'Arrigo, Mabel; Filippini, Fernando; Valverde, Juana (2006): Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 35 (1-2), S. 277–281.

[51] Babu, N.; Singh, M. (2004): Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 31 (4), S. 273–280.

[52] Oonishi, T.; Sakashita, K.; Uyesaka, N. (1997): Regulation of red blood cell filterability by Ca2+ influx and cAMP-mediated signaling pathways. In: *Am J Physiol* 273 (6 Pt 1), S. C1828-34.

[53] Wardman, Peter (2007): Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. In: *Free Radic Biol Med* 43 (7), S. 995–1022.

[54] Cortese-Krott, Miriam M.; Rodriguez-Mateos, Ana; Kuhnle, Gunter G. C.; Brown, Geoff; Feelisch, Martin; Kelm, Malte (2012): A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins. In: *Free Radic Biol Med* 53 (11), S. 2146–2158.

[55] Balcerczyk, Aneta; Soszynski, Miroslaw; Bartosz, Gerzegorz (2005): On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2V,7V-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. In: *Free Radical Biology & Medicine* (39), S. 327–335.

[56] Cortese-Krott, Miriam M.; Rodriguez-Mateos, Ana; Kuhnle, Gunter G. C.; Brown, Geoff; Feelisch, Martin; Kelm, Malte (2012): A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO

production and nitrosation events using diaminofluoresceins. In: *Free Radic Biol Med* 53 (11), S. 2146–2158.

[57] Gomes, Ana; Fernandes, Eduarda; Lima, Jose L. F. C. (2005): Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. In: *J Biochem Biophys Methods* 65 (2-3), S. 45–80.

[58] Royall, J. A.; Ischiropoulos, H. (1993): Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H2O2 in cultured endothelial cells. In: *Arch Biochem Biophys* 302 (2), S. 348–355.

[59] Hempel, S. L.; Buettner, G. R.; O'Malley, Y. Q.; Wessels, D. A.; Flaherty, D. M. (1999): Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. In: *Free Radic Biol Med* 27 (1-2), S. 146–159.

[60] Crow, J. P. (1997): Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. In: *Nitric Oxide* 1 (2), S. 145–157.

[61] Lebel, C. P.; Bondy, S. C. (1990): Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. In: *Neurochem Int* 17 (3), S. 435–440.

[62] Robinson, Kristine M.; Janes, Michael S.; Pehar, Mariana; Monette, Jeffrey S.; Ross, Meredith F.; Hagen, Tory M. et al. (2006): Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (41), S. 15038–15043.

[63] Yan, Hui-Min; Ramachandran, Anup; Bajt, Mary Lynn; Lemasters, John J.; Jaeschke, Hartmut (2010): The oxygen tension modulates acetaminophen-induced mitochondrial oxidant stress and cell injury in cultured hepatocytes. In: *Toxicol Sci* 117 (2), S. 515–523.

[64] Zimmerman, Matthew C.; Oberley, Larry W.; Flanagan, Shawn W. (2007): Mutant SOD1-induced neuronal toxicity is mediated by increased mitochondrial superoxide levels. In: *J Neurochem* 102 (3), S. 609–618.

[65] Raes, M.; Michiels, C.; Remacle, J. (1987): Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. In: *Free Radic Biol Med* 3 (1), S. 3–7.

[66] Mandavilli, Bhaskar S.; Janes, Michael S. (2010): Detection of intracellular glutathione using ThiolTracker violet stain and fluorescence microscopy. In: *Curr Protoc Cytom* 9, S. Unit 9.35.

[67] Tilton, Carisa; Clippinger, Amy J.; Maguire, Tobi; Alwine, James C. (2011): Human Cytomegalovirus Induces Multiple Means To Combat Reactive Oxygen Species. In: *J. Virol.* 85 (23), S. 12585–12593.

[68] Neuwelt, Alexander J.; Wu, Y. Jeffrey; Knap, Narcyz; Losin, Marcin; Neuwelt, Edward A.; Pagel, Michael A. et al. (2009): Using acetaminophen's toxicity mechanism to enhance cisplatin efficacy in hepatocarcinoma and hepatoblastoma cell lines. In: *Neoplasia* 11 (10), S. 1003–1011.

[69] Link, Jason M.; Ota, Sara; Zhou, Zi-Qiang; Daniel, Colin J.; Sears, Rosalie C.; Hurlin, Peter J. (2012): A critical role for Mnt in Myc-driven T-cell proliferation and oncogenesis. In: *PNAS* 109 (48), S. 19685–19690.

[70] Arnal, J. F.; Munzel, T.; Venema, R. C.; James, N. L.; Bai, C. L.; Mitch, W. E.; Harrison, D. G. (1995): Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. In: *J Clin Invest* 95 (6), S. 2565–2572.

[71] Halaka, F. G.; Babcock, G. T.; Dye, J. L. (1982): Properties of 5-methylphenazinium methyl sulfate. Reaction of the oxidized form with NADH and of the reduced form with oxygen. In: *J Biol Chem* 257 (3), S. 1458–1461.

[72] Piknova, Barbora; Schechter, AlanN (2011): Measurement of nitrite in blood samples using the ferricyanide-based hemoglobin oxidation assay. In: *Methods Mol Biol* 704, S. 39–56.

[73] Halaka, F. G.; Babcock, G. T.; Dye, J. L. (1982): Properties of 5-methylphenazinium methyl sulfate. Reaction of the oxidized form with NADH and of the reduced form with oxygen. In: *J Biol Chem* 257 (3), S. 1458–1461.

[74] Yang, J.; Gonon, AT.; Sjöguist, PO.; Lundberg, JO.; Pernow, J.: Arginase regulates red blood cell nitric blood cell synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. In: Proc Natl Acad Sci USA 110 (37), S. 15049-54.

[75] Segal, DJ; Meckler JF: Genome engineering at the dawn of the golden age (2013). In: *Annu Rev Genomics Hum Genet.* (14), S. 135-58.

[76] Gödecke, A.; Decking, UK; Ding, Z.; Hirchenhain, J.; Bidmon, HJ; Gödecke, S.; Schrader, J. (1998): Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. In: Circulation Research 82 (2), S. 186-94.

[77] Kleinbongard, Petra; Dejam, Andre; Lauer, Thomas; Rassaf, Tienush; Schindler, Achim; Picker, Olaf et al. (2003): Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. In: *Free Radic Biol Med* 35 (7), S. 790–796.

[78] Carlström, Mattias; Larsen, Filip; Nyström, Thomas; Hezel, Michael; Borniquel, Sara; Weitzberg, Eddi; Lundberg, Jon: Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A.* (41), S. 17716-20.

[79] Herold, Susanna (2004): The outer-sphere oxidation of nitrosyliron(II)hemoglobin by peroxynitrite leads to the release of nitrogen monoxide. In: *Inorg Chem* 43 (13), S. 3783–3785.

[80] Basu, Swati; Grubina, Rozalina; Huang, Jinming; Conradie, Jeanet; Huang, Zhi; Jeffers, Anne et al. (2007): Catalytic generation of N2O3 by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin. In: *Nat Chem Biol* 3 (12), S. 785–794.

[81] Pawloski, J. R.; Hess, D. T.; Stamler, J. S. (2001): Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. In: *Nature* 409 (6820), S. 622–626.

[82] Hempel, S. L.; Buettner, G. R.; O'Malley, Y. Q.; Wessels, D. A.; Flaherty, D. M. (1999): Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. In: *Free Radic Biol Med* 27 (1-2), S. 146–159.

[83] Feelisch, Martin; Rassaf, Tienush; Mnaimneh, Sanie; Singh, Nisha; Bryan, Nathan S.; Jourd'Heuil, David; Kelm, Malte (2002): Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. In: *FASEB J* 16 (13), S. 1775–1785.

[84] MacArthur, Peter H.; Shiva, Sruti; Gladwin, Mark T. (2007): Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. Analysis of the L-Arginine/NO Pathway. In: *Journal of Chromatography B* 851 (1-2), S. 93–105.

[85] Heiss, Christian; Lauer, Thomas; Dejam, Andre; Kleinbongard, Petra; Hamada, Sandra; Rassaf, Tienush et al. (2006): Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction. In: *J Am Coll Cardiol* 47 (3), S. 573–579.

[86] Suzuki, H.; Swei, A.; Zweifach, B. W.; Schmid-Schonbein, G. W. (1995): In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. In: *Hypertension* 25 (5), S. 1083–1089.

[87] Lenda, D. M.; Sauls, B. A.; Boegehold, M. A. (2000): Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (1), S. H7-H14.

[88] Swei, A.; Lacy, F.; Delano, F. A.; Parks, D. A.; Schmid-Schonbein, G. W. (1999): A mechanism of oxygen free radical production in the Dahl hypertensive rat. In: *Microcirculation* 6 (3), S. 179–187.

[89] Di Yang; Feletou, Michel; Boulanger, Chantal M.; Wu, Heng-Fang; Levens, Nigel; Zhang, Ji-Nan; Vanhoutte, Paul M. (2002): Oxygen-derived free radicals mediate endothelium-dependent contractions to acetylcholine in aortas from spontaneously hypertensive rats. In: *Br J Pharmacol* 136 (1), S. 104–110.

[90] Higashi, Yukihito; Sasaki, Shota; Nakagawa, Keigo; Matsuura, Hideo; Oshima, Tetsuya; Chayama, Kazuaki (2002): Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. In: *N Engl J Med* 346 (25), S. 1954–1962.

[91] Lavi, Shahar; Yang, EricH; Prasad, Abhiram; Mathew, Verghese; Barsness, GregoryW; Rihal, CharanjitS et al. (2008): The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans. In: *Hypertension* 51 (1), S. 127–133.

[92] Kumar, E. P.; Mukherjee, Radhika; Senthil, R.; Parasuraman, S.; Suresh, B. (2012): Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in patients with cardiovascular disease in rural populations of the nilgiris, South India. In: *ISRN Pharmacol* 2012, S. 941068.

[93] Sasser, JenniferM; Sullivan, JenniferC; Elmarakby, AhmedA; Kemp, BruceE; Pollock, DavidM; Pollock, JenniferS (2004): Reduced NOS3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. In: *Hypertension* 43 (5), S. 1080–1085.

[94] Blankenberg, Stefan; Rupprecht, HansJ; Bickel, Christoph; Torzewski, Michael; Hafner, Gerd; Tiret, Laurence et al. (2003): Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. In: *N Engl J Med* 349 (17), S. 1605–1613.

[95] Lapenna, D.; Gioia, S. de; Ciofani, G.; Mezzetti, A.; Ucchino, S.; Calafiore, A. M. et al. (1998): Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. In: *Circulation* 97 (19), S. 1930–1934.

[96] Bor-Kucukatay, Melek; Wenby, RosalindaB; Meiselman, HerbertJ; Baskurt, OguzK (2003): Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (5), S. H1577-84.

[97] Bor-Kucukatay, Melek; Wenby, RosalindaB; Meiselman, HerbertJ; Baskurt, OguzK (2003): Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284 (5), S. H1577-84.

[98] Bor-Kucukatay, M.; Yalcin, O.; Gokalp, O.; Kipmen-Korgun, D.; Yesilkaya, A.; Baykal, A. et al. (2000): Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 22 (4), S. 267–275.

[99] Riquelme, Bibiana; Foresto, Patricia; D'Arrigo, Mabel; Filippini, Fernando; Valverde, Juana (2006): Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. In: *Clin Hemorheol Microcirc* 35 (1-2), S. 277–281.

[100] Baskurt, O. K.; Temiz, A.; Meiselman, H. J. (1998): Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. In: *Free Radic Biol Med* 24 (1), S. 102–110.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und die Mögichkeit, selbstständig zu arbeiten.

Frau Dr. rer. nat. M. Cortese-Krott danke ich für die Einarbeitung in das experimentelle Arbeiten und für ihre unermüdliche und hochmotivierte Betreuung sowohl bei der Planung und Durchführung der Experimente als auch während der Phase des Schreibens.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des kardiologischen Labors, insbesondere Frau Sivatharsini Sivarajah und Frau Katharina Lysaja für die Unterstützung im Labor.

Mein Dank gilt Herrn Dr. med. Roberto Sansone und Dorina Noske für die Unterstützung der klinischen Studien.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und an mich geglaubt hat. In inniger Verbundenheit widme ich ihr diese Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift