

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rump

Bedeutung von Hypercholesterinämie und kurzkettigen Fettsäuren
auf die Gefäßfunktion im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von
Sascha Martin Höges
(2020)

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Johannes Stegbauer

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Für meine Eltern Andrea und Hans-Werner, die mir alles im Leben ermöglicht haben.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bartolomaeus, H., Balogh, A., Yakoub, M., Homann, S., Markó, L., **Höges, S.**, Tsvetkov, D., Krannich, A., Wundersitz, S., Avery, E., Haase, N., Kräker, K., Hering, L., Maase, M., Kusche-Vihrog, K., Grandoch, M., Fielitz, J., Kempa, S., Gollasch, M., Zhumadilov, Z., Kozhakhmetov, S., Kushugulova, A., Eckardt, K., Dechend, R., Rump, L., Forslund, S., Müller, D., Stegbauer, J., Wilck, N., (2019) Short-Chain Fatty Acid Propionate Protects From Hypertensive Cardiovascular Damage. *Circulation*. **139**(11): p. 1407-1421.

Yang, G., Istaş, G., **Höges, S.**, Yakoub, M., Hendgen-Cotta, U., Rassaf, T., Rodriguez-Mateos, A., Hering, L., Grandoch, M., Mergia, E., Rump, L. C., Stegbauer, J. (2018), Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice. *Pflugers Arch*. **470**(4): p. 661-667.

Zusammenfassung

Die Entwicklung Endothelialer Dysfunktion ist ein Zwischenschritt in der Entstehung von Atherosklerose, welche die Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse wie Schlaganfall oder Herzinfarkt begünstigt. In der Entstehung Endothelialer Dysfunktion spielt die tägliche Ernährung als möglicher Risiko- oder Protektivfaktor eine wichtige Rolle.

Um Ernährung als Risikofaktor bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen zu untersuchen wird auf spezielle Ernährungsformen wie die fett- und cholesterinreiche *Western Diet*, und auf genotypisch veränderte Tiere wie die ApolipoproteinE-defiziente Maus (ApoE-KO) zurückgegriffen. Die so behandelten Tiere entwickeln eine Endotheliale Dysfunktion, Hyperlipidämie, Adipositas und Atherosklerose. Der genaue Verlauf der Entstehung dieser Erkrankungen, sowie das Vorhandensein eines Hypertonus bei diesen Tieren sind nicht eindeutig bekannt, und sollen in diesem Projekt untersucht werden.

In anderen Fällen kann die Ernährung auch einen kardiovaskulär protektiven Effekt haben. So begünstigt eine ballaststoffreiche Ernährung die Bildung kurzkettiger Fettsäuren durch die Darmbakterien. Diese kurzkettigen Fettsäuren wiederum bedingen durch endokrine Funktionen ein Absinken des Blutdrucks. Während hier in letzter Zeit durch Entdeckung und teilweise Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren GpR41, GpR43 und OlfR78 Fortschritte erlangt werden konnten, sind die genauen Mechanismen dieses Effekts bislang unbekannt, und werden ebenfalls in dieser Dissertation behandelt.

Zur Erforschung der Entstehung ernährungsbedingter kardiovaskulärer Risikofaktoren wurde die flussvermittelte Vasodilatation, eine beim Menschen etablierte Methode zur Bestimmung Endothelialer Dysfunktion und prognostischer Marker für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse verwendet., Diese konnte im Mausmodell als neue *in vivo* Methode zur Messung Endothelialer Dysfunktion weiter validiert werden. Hier konnte schon nach einer Fütterungszeit von 16 Wochen durch die alleinige Belastung mit *Western Diet* eine relevante Endotheliale Dysfunktion bei Wild-Typ-Mäusen nachgewiesen werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass bei ApoE-KO Mäusen bereits vor Belastung mit *Western Diet*, und damit früher als bisher in *ex vivo* Studien angenommen, eine Endotheliale Dysfunktion besteht. Bei Evaluation der Endothelfunktion *ex vivo* mittels isoliert perfundierter Niere konnte ebenfalls eine Schädigung festgestellt werden, allerdings erst nach Gabe von *Western Diet*. Es konnte gezeigt werden, dass die Entstehung dieser Endothelialen Schädigung nicht mit der Entstehung eines systemischen Hypertonus einhergeht.

Bei der Erforschung des Mechanismus der durch kurzkettige Fettsäuren induzierten Vasodilatation wurden zwei zu Grunde liegende Mechanismen nachgewiesen, die organabhängig verschieden stark ausgeprägt waren. Während im Darm hauptsächlich ein *Endothelium derived hyperpolarizing factor*-abhängiger Mechanismus vorherrschte, spielte an der Niere zusätzlich ein NO-abhängiger Mechanismus eine wichtige Rolle. Hierbei scheint der NO-abhängige Mechanismus durch den GpR43-Rezeptor induziert zu werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieses Dissertationsprojekts gezeigt werden, dass hypercholesterinämie Ernährung die Endotheliale Dysfunktion verstärkt. Außerdem konnten neue Erkenntnisse zum Endothelialen Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren erlangt werden.

Summary

The occurrence of endothelial dysfunction is an important step in the development of atherosclerosis. Atherosclerosis is an important risk factor for cardiovascular events like stroke or heart attack. One important factor in the development of endothelial dysfunction is the food composition of our daily diet.

The typical high-fat, high-cholesterol diet eaten throughout the Western world is a recognized risk factor in the development of cardiovascular events like stroke or myocardial infarction. Other diets, like a fiber-rich diet, have proven positive cardiovascular effects.

In order to examine the impact of a high-fat, high-cholesterol Western Diet on vascular injury and the development of hypertension, wild type (WT) and ApolipoproteinE-deficient (ApoE-KO) mice were used in this study. ApoE-KO mice develop endothelial dysfunction, hyperlipidemia, obesity and atherosclerosis. However, the exact process of the development of these pathologies is currently unknown, as well as the development of elevated blood pressure in these mice. Both of these questions are being discussed in this publication.

In other instances, our daily diet can have a protective effect on the cardiovascular system. For example, a fiber-rich diet induces the production of short-chain fatty acids by the microbiome. Recent studies show that short-chain fatty acids reduce blood pressure and may protect the cardiovascular system. The exact underlying mechanisms are still unknown. However, an involvement of G-protein coupled receptors GpR41, GpR43 and OlfR78 was shown in recent publications.

To assess the development of endothelial dysfunction we used flow-mediated vasodilation, a method for detection of endothelial dysfunction and assessment of risk for cardiovascular events. Early development of endothelial dysfunction in mice treated with Western Diet for a period of 16 weeks was detected. Furthermore, the same method showed endothelial dysfunction in young ApoE-KO before treatment with Western Diet. This is an earlier occurrence of endothelial dysfunction in these mice than recognized with other *ex vivo* methods, like aortic ring relaxation. Evaluation of endothelial dysfunction *ex vivo* through isolated perfused kidney yielded development of endothelial dysfunction as well, but later. Surprisingly, the development of endothelial dysfunction was not associated with the development of arterial hypertension.

Furthermore, we researched the mechanism of short-chain fatty acid-induced vasodilation. Here we were able to identify different mechanisms in different organs. In the gut, an endothelium derived hyperpolarizing factor-dependent mechanism was most prevalent. However, in the kidney, NO-dependent vasodilation was a factor alongside the already known influence of endothelium derived hyperpolarizing factor.

NO-dependent vasodilation appears to be mediated by the GpR43-receptor.

In conclusion, the presented study shows endothelial dysfunction can be aggravated through the application of Western Diet. Furthermore, our understanding of the mechanism of short-chain fatty acids on the endothelium was extended.

Abkürzungen

4-CMTB	<i>4-Chloro-α-(1-methylethyl)-N-2-thiazolyl-benzeneacetamide</i>
A.	Arteria
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ApoE	ApolipoproteinE
ApoE-KO	ApolipoproteinE-defiziente Maus/Mäuse
AS	Arachidonsäure
ATII	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
c	Konzentration
c-	Zenti-
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenstoffmonoxid
COX	Cyclooxygenase
COX-Hemmer	Cyclooxygenase-Hemmer
d-	Dezi-
EC ₅₀	Mittlere effektive Wirkkonzentration
EDHF	<i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
eNOS-KO	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase Knockout-Maus/ -Mäuse
FELASA	<i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
FFA2/FFAR2	<i>Free Fatty Acid Receptor 2</i>
FFA3/FFAR3	<i>Free Fatty Acid Receptor 3</i>

FMD	flussvermittelte Vasodilatation
g	Gramm
GC	Guanylatcyclase
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GSNO	S-Nitrosoglutathione
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoprotein</i>
IP	Prostacyclin-Rezeptor
k-	Kilo-
K ⁺	Kalium
l	Liter
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
L-Name	L-N ^G -Nitro-Arginin Methyl Ester
m	Meter
μ-	Mikro-
m-	Mili-
M	Mol pro Liter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
Min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MW	Arithmetischer Mittelwert
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n-	Nano-
NA	Noradrenalin
Na ⁺	Natrium

NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaOH	Natriumhydroxid
Na-Propionat	Natriumpropionat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS-Inhibitor	Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitor
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PKA	Proteinkinase A
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR	Blutdruck
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
SEM	Standardfehler
V.	Vena
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>
WD	<i>Western Diet</i>
WT	Wildtyp-Maus/-Mäuse

Inhalt

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungen.....	III
Inhalt.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Endothelabhängige Vasodilatation.....	2
1.1.1. NO-abhängige Vasodilatation.....	2
1.1.2. Prostaglandin-abhängige Vasodilatation.....	3
1.1.3. <i>Endothelium derived hyperpolarizing factor</i> -abhängige Vasodilatation.....	3
1.2 Endotheliale Dysfunktion.....	4
1.3 Die ApolipoproteinE-defiziente Maus.....	5
1.4 Kurzkettige Fettsäuren.....	6
1.5 Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren und ihre Signalwege.....	7
1.6 Mechanismen der kurzkettigen Fettsäuren im Endothel.....	9
1.7 Ziele der Arbeit.....	9
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Materialien.....	11
2.1.1 Reagenzien und Stoffe.....	11
2.1.2 Puffer.....	11
2.1.3 Operations- und Verbrauchsmaterial.....	12
2.1.4 Geräte und Software.....	13
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Tierzucht und -haltung.....	14
2.2.2 Versuchskonzepte.....	15
2.2.2.1 Einfluss der Ernährungsform auf die renale Gefäßfunktion....	15
2.2.2.2 Vaskulärer Mechanismus der kurzkettigen Fettsäure Propionat	15
2.2.3 Isoliert perfundierte Niere.....	16
2.2.4 Isoliert perfundierter Darm.....	19
2.2.5 Flussvermittelte Vasodilatation.....	21

2.2.6	Telemetrische Blutdruckmessung	22
2.2.7	Tail-Cuff-Plethysmographie.....	23
2.2.8	Urinsammlung	24
2.2.9	Nitratbestimmung	24
2.2.10	Kreatininbestimmung.....	25
2.2.11	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	26
2.2.12	Statistische Auswertung	27
3.	Ergebnisse.....	28
3.1	Einflüsse westlicher Ernährung auf das Gefäßsystem in Mäusen	28
3.1.1	Entwicklung der endothelabhängigen Vasodilatation unter <i>Western Diet ex vivo</i>	28
3.1.2	Entwicklung der endothelunabhängigen Vasodilatation unter <i>Western diet ex vivo</i>	30
3.1.3	Entwicklung der endothelabhängigen Vasodilatation unter <i>Western Diet in vivo</i>	31
3.1.4	Blutdruck- und Pulsmessung.....	32
3.1.5	Nitratbestimmung im Urin.....	34
3.2	Vaskulärer Wirkmechanismus kurzkettiger Fettsäuren.....	35
3.2.1	Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren in renalen Gefäßen	35
3.2.2	Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren in intestinalen Gefäßen .	38
3.2.3	Expression der Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren in verschiedenen Gefäßen	40
4.	Diskussion	42
4.1	Kardiovaskuläre Entwicklung unter <i>Western Diet</i>	42
4.1.1	Entwicklung der Endothelfunktion <i>ex vivo</i>	42
4.1.2	Entwicklung der Endothelfunktion <i>in vivo</i>	43
4.1.3	Entwicklung des Blutdrucks unter <i>Western diet</i>	45
4.2	Endotheliale Mechanismen kurzkettiger Fettsäuren	47
4.2.1	Organabhängiger Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren.....	47
4.2.2	Mechanismus der verschiedenen Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren	48
5.	Schlussfolgerung	51
6.	Literaturverzeichnis.....	52

7.	Anhang	56
7.1	Danksagung	56

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Ereignisse wie koronare Ischämien und ischämische Schlaganfälle sind die Haupttodesursache in Deutschland und weltweit[1, 2]. In Anbetracht dieser Tatsache ist ein tiefgreifendes Verständnis der Ursachen für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen von größter Bedeutung zur besseren Prävention und Therapie dieser Erkrankungen.

Zu den wichtigsten bekannten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen gehören körperliche Inaktivität, Rauchen, falsche Ernährung und Fettleibigkeit, Hypertonie, Hyperlipidämie, familiäre Vorbelastung, Diabetes, Alter, Geschlecht und niedriger sozioökonomischer Status[3].

In dieser Arbeit soll vor allem die Ernährung als Risikofaktor, aber auch als möglicher Schutzfaktor in Bezug auf Gefäßschädigung im Mausmodell erforscht werden.

Eine funktionelle Schädigung des Endothels, und damit die verringerte Ausschüttung Endothelialer Botenstoffe wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO), wird auch als Endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Sie stellt ein frühes Anzeichen für Atherosklerose dar[4] und ist mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korreliert[5, 6]. Somit ist das Verständnis der Entstehung Endothelialer Dysfunktion von großer Bedeutung für das Verständnis der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Zur Erforschung der Ernährung als kardiovaskulärer Risikofaktor wird der Einfluss von fett- und cholesterinreicher *Western diet* (WD) auf die Entwicklung von Endothelialer Dysfunktion und arterieller Hypertonie von Wildtyp- und ApoE-KO-Mäusen quantifiziert.

Zur Untersuchung von Ernährung als vaskulärer Schutzfaktor wird die durch kurzkettige Fettsäuren (SCFA) induzierte Vasodilatation untersucht. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf den durch SCFA ausgelösten Mechanismen.

1.1 Endothelabhängige Vasodilatation

Bis zum heutigen Stand der Forschung sind drei Achsen der endothelabhängigen Vasodilatation beschrieben: Die von Stickstoffmonoxid (NO)-abhängige Vasodilatation, die Prostaglandin-abhängige Vasodilatation und die vom *Endothelium derived hyperpolarising factor* (EDHF)-abhängige Vasodilatation (Abb. 1).

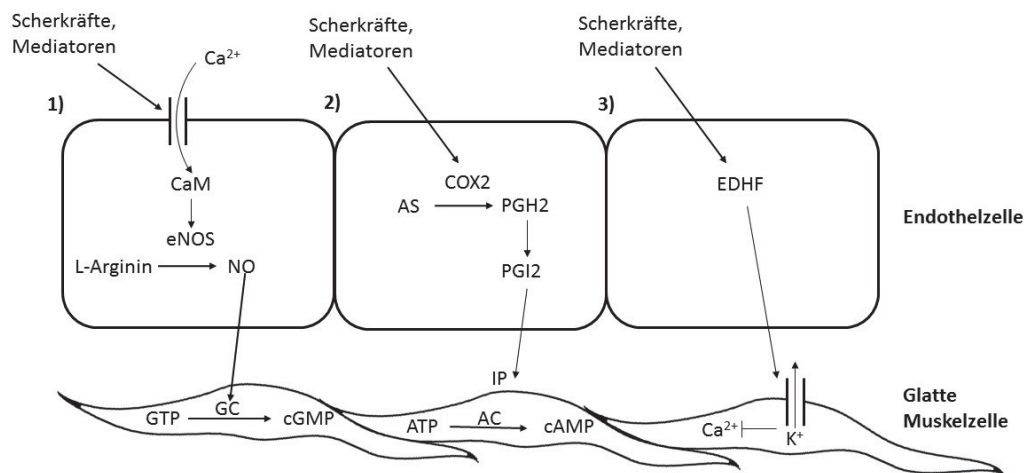


Abb. 1: Mechanismen der endothelabhängigen Vasodilatation

1) **NO-abhängige Vasodilatation:** Durch das Auftreten von Scherkräften oder durch intravasale Mediatoren bedingt strömt Calcium (Ca^{2+}) in die Endothelzelle ein. Dieses bindet an Calmodulin (CaM), welches die Aktivität der Endothelialen NO-Synthase (eNOS) induziert, um NO von L-Arginin abzuspalten. Das NO diffundiert in die glatte Muskelzelle, und induziert hier die Aktivität der Guanylatcyclase (GC), welche Guanosyltriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosylmonophosphat (cGMP) umwandelt. Das cGMP induziert die Vasorelaxation.

2) **Prostaglandin-abhängige Vasodilatation:** Durch die oben genannten Faktoren wird die Cyclooxygenase 2 (COX2) aktiviert, welche Arachidonsäuren (AS) in Prostaglandin H_2 (PGH_2) umwandelt. Dieses wird zu Prostaglandin I_2 (PGI_2) umgewandelt, und bindet an den Prostaglandin-Rezeptor (IP) an der glatten Muskelzelle. Hierdurch wird die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatcyclase (AC) induziert. Das cAMP löst in der glatten Muskelzelle die Vasodilatation aus.

3) **Endothelium derived hyperpolarizing factor-abhängige Vasodilatation:** Durch Scherkräfte und Einfluss von Mediatoren werden Endotheliale hyperpolarisierende Faktoren (EDHF) aktiviert. Diese induzieren in der glatten Muskelzelle einen Kalium (K^+)-Ausstrom, welcher die Ausschüttung von Calcium (Ca^{2+}) hemmt. Durch vermindertes Ca^{2+} im Zytosol ergibt sich eine Verringerung des Tonus der glatten Muskelzelle.

1.1.1. NO-abhängige Vasodilatation

Die NO-abhängige Vasodilatation wird durch Scherkräfte oder Acetylcholin, Bradykinin, Thrombin oder Serotonin aktiviert. Diese bewirken an Calcium- (Ca^{2+})

Kanälen im endoplasmatischen Retikulum und in der Zellmembran einen Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol. Diese binden an Calmodulin (CaM), welches die Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aktiviert. In Anwesenheit von Cofaktoren wie Tetrahydrobiopterin und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) bewirkt die eNOS die Spaltung von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO).

Das NO diffundiert aus der Endothelzelle in die glatten Muskelzellen und aktiviert dort die Guanylatcyclase (GC), welche Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umwandelt. Das cGMP bewirkt als *second messenger* eine Relaxation der glatten Muskelzelle und damit eine Vasorelaxation[7].

1.1.2. Prostaglandin-abhängige Vasodilatation

Auch die Bildung von Prostaglandinen im Endothel bewirkt eine Vasodilatation. Unter Einfluss von Scherkräften oder der oben genannten Mediatoren wird die Aktivität der Cyclooxygenase 1 (COX1) und der Cyclooxygenase 2 (COX2) induziert, welche Arachidonsäure zu Prostaglandin H_2 (PGH_2) konvertiert. Dieses wird von der Prostacyclin-Synthase zu Prostaglandin I_2 (PGI_2) weiter konvertiert. Das PGI_2 bindet an den Prostacyclin-Rezeptor (IP) der glatten Muskelzelle und induziert so die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch die Adenylatyclase. Das cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), und induziert so eine Vasorelaxation[8].

1.1.3. *Endothelium derived hyperpolarizing factor*-abhängige Vasodilatation

Selbst nach Inhibition der NO- und der Prostaglandin-Synthese zeigen sowohl menschliche als auch tierische Gefäße noch eine endothelabhängige Vasorelaxation. Diese wird durch Öffnung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen in der glatten Muskelzelle initiiert. Der Ausstrom von K^+ -Ionen bewirkt eine Hyperpolarisierung der glatten Muskelzelle, welche den Ca^{2+} -Einstrom in die glatte Muskelzelle aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und dem Extrazellularraum inhibiert.

Nach Entdeckung dieses Mechanismus wurde zunächst vermutet, dass diese Hyperpolarisierung durch eine einzelne Substanz, einen „*Endothelium-derived hyperpolarizing factor*“ (EDHF) vermittelt wird. Inzwischen ist bekannt, dass diverse Substanzen eine Hyperpolarisierung der glatten Muskelzelle hervorrufen, unter anderem NO, Kohlenstoffmonoxid (CO), Schwefelwasserstoff (H₂S), reaktive Sauerstoffspezies und Arachidonsäuren[9]. Wegen der Vielzahl der identifizierten Substanzen mit dem gleichen Mechanismus ist der Begriff „EDHF“ aber auch heute noch gebräuchlich.

Funktionell kann die EDHF-abhängige Vasorelaxation als Vasorelaxation definiert werden, die nicht auf eNOS- oder Cyclooxygenase-Inhibitoren anspricht, und die stattdessen unter anderem durch eine Erhöhung des extrazellulären K⁺-Spiegels[10], eine Inhibition von kleinen und mittleren spannungsabhängigen K⁺-Kanälen[11], und eine Inhibition der Natrium-Kalium-ATPase (Na⁺-K⁺-ATPase)[12] unterbunden wird.

1.2 Endotheliale Dysfunktion

Wie bereits erwähnt ist die Endotheliale Dysfunktion eine funktionelle Schädigung des Endothels, welche durch eine verminderte Vasorelaxation mit Störung der oben genannten Mechanismen charakterisiert ist. Endotheliale Dysfunktion stellt ein frühes Anzeichen für die Entstehung von Atherosklerose dar, und ist mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korreliert.

Die Entstehung Endothelialer Dysfunktion korreliert beim Menschen mit anerkannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, männlichem Geschlecht, Alter und positiver Familienanamnese [13-15].

Als Kennzeichen der Endothelialen Dysfunktion gilt die Einschränkung der endothel-abhängigen Vasorelaxation[7]. Ein etablierter klinischer Test zur Untersuchung Endothelialer Dysfunktion beim Menschen ist die Bestimmung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD). Hierbei wird eine Blutdruckmanschette an den Oberarm des Patienten angelegt. Diese wird für 5 Minuten auf über 200 mmHg aufgepumpt, um eine kurzzeitige Ischämie des Armes auszulösen. Mittels sonographischer Messung wird der Gefäßdurchmesser der A. brachialis bestimmt. Anschließend wird der Druck von der Manschette abgelassen, und die reaktive Vasodilatation der A. brachialis durch erneute sonographische Messung

des Durchmessers bestimmt. Eine verminderte reaktive Vasodilatation nach passagerer Ischämie wird als Zeichen für Endotheliale Dysfunktion gewertet. Die Bestimmung der FMD wird sowohl in der klinischen Diagnostik von Endothelialer Dysfunktion, als auch in der Verlaufskontrolle genutzt[16].

1.3 Die ApolipoproteinE-defiziente Maus

Zur tierexperimentellen Erforschung der Entstehung von Endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose werden verschiedene genetische und diätische Tiermodelle verwendet, von denen eines der heute populärsten die ApolipoproteinE-defiziente Maus (ApoE-KO) ist[17].

ApolipoproteinE (ApoE) ist ein Bestandteil von *Very low density-lipoprotein* (VLDL), *Low density-lipoprotein* (LDL), und *High density-lipoprotein* (HDL). Es vermittelt die Bindung von ApoE-haltigen Lipoproteinen an LDL- und Chylomikronen-Rezeptor. Somit dient es als wichtiger Mediator des Transports und der hepatischen Elimination von Cholesterin[18].

Phänotypisch erzeugt der Verlust von ApoE bei ApoE-KO Mäusen in jedem Alter stark erhöhte Plasma-Cholesterin-, Triglycerid-, VLDL-, LDL-, und *Intermediate density-lipoprotein*-(IDL)-Spiegel[19]. Außerdem ist die Konzentration von protektiv wirksamem HDL verringert[20].

Hierdurch zeigen diese Tiere eine vermehrte Bildung atherosklerotischer Plaques[21] und eine vermehrte Bildung intravasaler reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)[22].

Diese Effekte werden durch die Fütterung mit einer hochkalorischen, cholesterinreichen *Western diet* (=WD, 42% Fett, 0,15% Cholesterin) weiter verstärkt. So treten bei Fütterung mit *Western diet* erhöhte Lipid-Spiegel[18], vermehrte Endotheliale Dysfunktion[23, 24] und Atherosklerose auf[18].

Bezüglich des Blutdruckprofils von ApoE-KO-Tieren liegt eine variable Studienlage vor. In einigen Veröffentlichungen lagen bei jüngeren Tieren trotz Fütterung mit *Western diet* oder vergleichbarem fett- und cholesterinreichem Futter keine signifikant erhöhten Blutdrücke vor[21, 22, 25-28]. Allerdings konnten Yang et al. zeigen, dass 7,5 Monate alte ApoE-KO Tiere auch ohne vorherige Fütterung mit *Western diet* erhöhte arterielle Blutdrücke zeigen, während 6 Wochen alte Tiere noch normale Blutdruckwerte zeigen[29].

Andere Autoren wiederum beschreiben schon bei weitaus jüngeren ApoE-KO Tieren (6-12 Wochen alt) sowohl unter *Western diet*, als auch unter regelrechter Nahrung erhöhte Blutdrücke und eine Aufhebung des physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus des Blutdrucks [30].

1.4 Kurzkettige Fettsäuren

Kurzkettigen Fettsäuren (eng. *Short-chain fatty acids*, SCFA) sind ein Nebenprodukt des Stoffwechsels der Darmbakterien. Sie entstehen vor allem bei der Verstoffwechslung von Ballaststoffen. Zu Ihnen zählen Propionat, Butyrat und Acetat (Abb. 2).

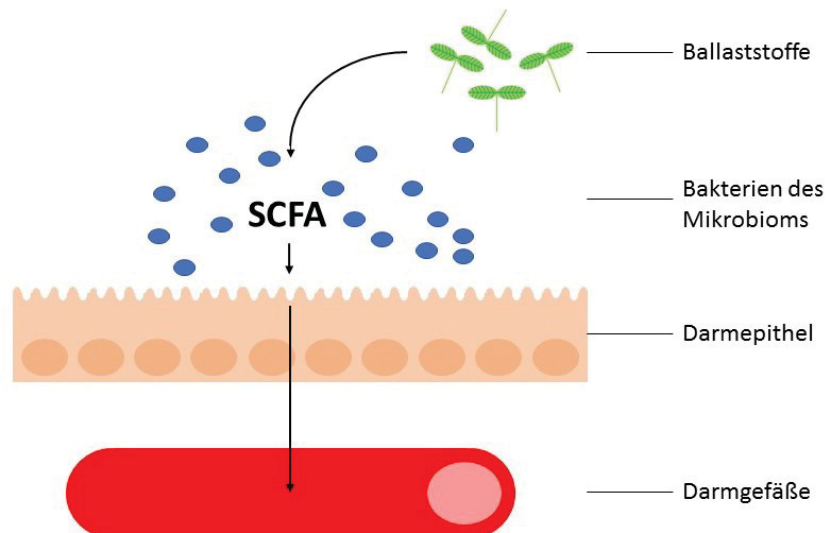


Abb. 2: Bildung und Resorption kurzkettiger Fettsäuren

Enteral aufgenommene Ballaststoffe werden durch Bakterien des Mikrobioms verstoffwechselt. Hierbei entstehen kurzkettige Fettsäuren (SCFA). Diese werden durch das Darmepithel resorbiert, und gelangen so in den Blutkreislauf. Hier werden sie zu ihren Zielorganen transportiert, wo sie endokrine Funktionen ausüben.

In den letzten Jahren konnten den kurzkettigen Fettsäuren vielfältige endokrine Eigenschaften in verschiedenen Organen zugeordnet werden[31].

Unter anderem konnte ein endokriner Effekt auf das Gefäßsystem bewiesen werden: Bereits in den frühen Neunziger Jahren stellte die Arbeitsgruppe um Mortensen einen vasodilatativen Effekt von kurzkettigen Fettsäuren an isolierten

menschlichen Darmarterien fest[32]. Diese Erkenntnis konnte von Nutting et al. im Rattenmodell bestätigt werden[33].

Auch in klinischen Studien konnte ein Absinken des arteriellen Blutdruck bei Probanden festgestellt werden, die entweder probiotisch behandelt wurden, oder vermehrt Ballaststoffe zu sich nahmen (also Maßnahmen zur vermehrten Bildung kurzkettiger Fettsäuren ausgesetzt wurden)[34-36].

1.5 Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren und ihre Signalwege

Kurzkettige Fettsäuren wirken im Blutgefäß der Maus über die G-Proteingekoppelten Rezeptoren GpR41, GpR43, Gpr109a und OlfR78[37-39]. GpR41 wird in der Literatur auch als *Free Fatty Acid Receptor 3* (FFA3/FFAR3) und GpR43 auch als *Free Fatty Acid Receptor 2* (FFA2/FFAR2) bezeichnet.

Von den kurzkettigen Fettsäuren wirkt lediglich Butyrat an Gpr109a, und der Effekt dieser Bindung ist weitgehend unbekannt[40].

Über den Effekt von GpR43 im Gefäßsystem ist ebenfalls wenig bekannt, obwohl bereits weitreichende Effekte der SCFA-GpR43-Bindung in anderen Geweben beschrieben sind[41, 42].

OlfR78 ist vor allem in den Vasa afferentia der Niere und in den glatten Muskelzellen der Tunica muscularis von Gefäßen lokalisiert. Die verstärkte Lokalisierung in den Vasa afferentia lässt eine Beteiligung an der Blutdruckregulation der Niere vermuten. Tatsächlich konnte bereits am KO-Modell gezeigt werden, dass ein Verlust von OlfR78 zu verminderten Renin-Spiegeln, und somit über verminderte Synthese von Angiotensin II zu erniedrigten Blutdrücken führt[37]. OlfR78-Aktivierung scheint also die Bildung und/oder Ausschüttung von Renin auszulösen.

GpR41 wiederum ist vor allem im Endothel lokalisiert. Hier hat er eine vasodilatierende Wirkung, weshalb GpR41-defiziente Mäuse einen erhöhten Blutdruck im Vergleich zu Wildtypen zeigen (Abb. 3)[43].

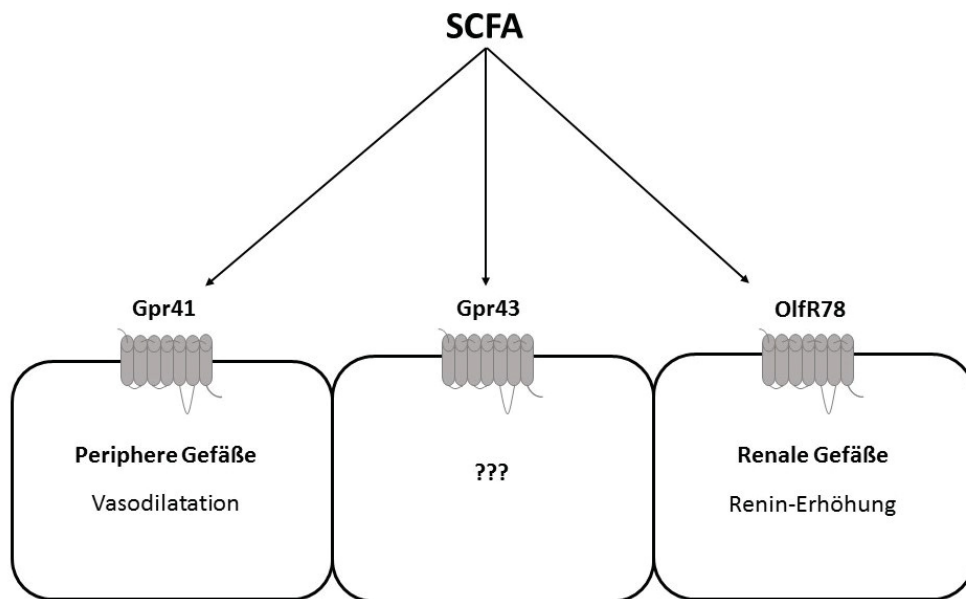


Abb. 3: Endotheliale Rezeptoren der kurzkettigen Fettsäuren

GpR41 ist vor allem in den peripheren Gefäßen lokalisiert. Die Bindung kurzkettiger Fettsäuren bewirkt hier eine Vasodilatation. Über die Lokalisation und die Effekte der Bindung an GpR43 ist wenig bekannt. OlfR78 ist vor allem in den Vasa afferentia der Niere lokalisiert. Die Bindung kurzkettiger Fettsäuren bewirkt hier die Ausschüttung von Renin, was zu einem in Konsequenz zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks führt.

Diese offensichtlich gegensätzliche Wirkung von zwei Rezeptoren mit den gleichen Liganden kann durch die mittlere effektive Wirkkonzentration (EC_{50}) erklärt werden. Während GpR41 bereits bei relativ niedrigen SCFA-Konzentrationen aktiviert wird, wird OlfR78 erst bei höheren SCFA-Spiegeln aktiviert. Es ist somit davon auszugehen, dass vor allem bei basalem SCFA-Spiegel bereits eine partielle Aktivierung des vasodilatativen GpR41-Rezeptors vorhanden ist und erst mit höheren SCFA-Konzentrationen auch der vasokonstriktive OlfR78-Rezeptor aktiviert wird.

Diese Erkenntnisse wurden zunächst von der Arbeitsgruppe rund um Jennifer Pluznick erlangt. Diese postuliert hierzu eine „Notbremsen“-Funktion von OlfR78. So würde OlfR78 nur bei sehr hohen SCFA-Konzentrationen aktiviert, um durch die daraus folgende Reninausschüttung einer möglichen Hypotension bei übermäßiger GpR41-Aktivierung entgegen zu wirken[44].

1.6 Mechanismen der kurzkettigen Fettsäuren im Endothel

Es ist bereits lange bekannt, dass die Applikation kurzkettiger Fettsäuren in isolierten Gefäßen eine Vasorelaxation bewirkt[32, 33]. Über den Mechanismus oder die Mechanismen dieser Vasorelaxation ist wenig bekannt.

Lange Zeit wurde die durch kurzkettige Fettsäuren induzierte Vasodilatation als endothelunabhängig angesehen[45-47]. Knock et al. konnten jedoch auch eine endothelabhängige, SCFA-induzierte Vasorelaxation nachweisen[48]. Die Autoren präsentieren im Rahmen der zitierten Publikation Daten, die auf eine EDHF-abhängige Vasorelaxation durch kurzkettige Fettsäuren hinweisen. Eine Beteiligung der NO- und der Prostaglandin-abhängigen Vasorelaxation schließen die Autoren aus. Die Rolle der oben genannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren finden in der zitierten Arbeit keine Beachtung.

1.7 Ziele der Arbeit

Um die ernährungsabhängigen Einflüsse auf die Endothelfunktion im Mausmodell darzustellen wird in dieser Arbeit Ernährung sowohl als kardiovaskulärer Risikofaktor, als auch als kardiovaskulärer Schutzfaktor betrachtet.

Zur Untersuchung einer kardiovaskulären Risikoernährung wird eine Längsschnittuntersuchung an einer gleichbleibenden Wildtyp-Mauspopulation durchgeführt. Altersabhängig wird der Effekt von fett- und cholesterinreicher Nahrung (*Western diet*) auf die Gefäßfunktion und verschiedene kardiovaskuläre Parameter untersucht. Hierzu gehören die Endothelfunktion *in* und *ex vivo*, der systemische Blutdruck, die Herzfrequenz, und die Ausschüttung von Nitrat im Urin. Hierfür werden für einen Zeitraum von bis zu 16 Wochen regelmäßig die oben genannten Parameter erhoben, um so Rückschlüsse auf Veränderungen unter *Western diet* zu ziehen.

Diese Ergebnisse werden mit jenen von durch genetische Veränderung vaskulär vorgeschädigten ApoE-KO Mäusen verglichen, um bestimmen zu können, inwiefern sich die Effekte einer gesundheitsgefährdenden Ernährung zwischen Gefäßgesunden und -kranken unterscheiden.

Zur Untersuchung einer protektiven Ernährung auf das Gefäßsystem wird der Mechanismus der durch die kurzkettige Fettsäure Propionat ausgelösten Vasodilatation erforscht.

Ein Großteil der veröffentlichten Versuche zum Effekt von kurzkettigen Fettsäuren in isolierten Gefäßen wurden an isolierten Darmarterien durchgeführt. Deshalb ist bisher unbekannt, ob sich der Effekt und Mechanismus der kurzkettigen Fettsäuren in anderen Organen zu jenen in den Darmarterien unterscheidet. Hier sind speziell die renalen Gefäße mit ihren vielfältigen Funktionen in der Regulation des systemischen Blutdrucks von Interesse.

Um mögliche Unterschiede im Verhalten kurzkettiger Fettsäuren an Widerstandsgefäßen von Darm und Niere zu untersuchen, wird das Verhalten von Propionat in renalen Gefäßen mit jenem in mesenterialen Gefäßen verglichen.

Es ist nicht bekannt, mit welchen Mechanismen die verschiedenen Rezeptoren ihre individuellen, zum Teil gegensätzlichen Effekte auf das Gefäßsystem bewirken. Über die Rolle des GpR43-Rezeptors im Gefäßsystem gibt es ebenfalls noch keine Erkenntnisse. Auch diesen Fragen werden in diesem Doktorarbeitsprojekt untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Stoffe

Wirkstoff	Hersteller	Sitz des Herstellers
Angiotensin II	Sigma-Aldrich	Darmstadt
Noradrenalin	Sigma-Aldrich	Darmstadt
L-N ^G -Nitro-Arginin Methyl Ester (L-Name)	Sigma-Aldrich	Darmstadt
Carbachol	Sigma-Aldrich	Darmstadt
S-Nitrosoglutathione (GSNO)	Santa Cruz	Heidelberg
Na-Propionat	Sigma-Aldrich	Darmstadt
Ouabain octahydrat	Sigma-Aldrich	Darmstadt
Butylhydroxytoluol	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe
4-CMTB	Sigma-Aldrich	Darmstadt
AR420626	Sigma-Aldrich	Darmstadt

Tabelle 1: Reagenzien und Stoffe

2.1.2 Puffer

Krebs-Henseleit-Lösung

Produkt	Konzentration	Hersteller	Sitz des Herstellers
NaCl	6,895 g/l	VWR Chemicals	Langenfeld
KCl	0,35 g/l	Merck Millipore	Darmstadt
MgSO ₄	0,11 g/l	Merck Millipore	Darmstadt
NaHCO ₃	2,10 g/l	AppliChem	Darmstadt
KH ₂ PO ₄	1,9997 g/l	Merck Millipore	Darmstadt
Glucose	0,3727 g/l	AppliChem	Darmstadt
CaCl ₂	0,3727 g/l	Merck Millipore	Darmstadt
EDTA	0,0249 g/l	Merck Millipore	Darmstadt
Ascorbinsäure	0,012 g/l	Riedel de Haen	Seelze

Tabelle 2: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

2.1.3 Operations- und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller	Sitz des Herstellers
Gebogene Mosquitoklemme, 12,5 cm	KLS Martin	Tuttlingen
Mini-Gefäßclip nach Biemer, 9,5 mm	KLS Martin	Tuttlingen
Strabismus-Federschere, gebogen, 11,5 cm	KLS Martin	Tuttlingen
Feine Operationsschere, 11,5 cm	Aesculap	Tuttlingen
Chirurgische Schere, 14,5 cm	Aesculap	Tuttlingen
Gebogene Pinzette, 12 cm	Aesculap	Tuttlingen
Anatomische Pinzette, 15 cm	Aesculap	Tuttlingen
Seraflex USP 5/0, EP1 nicht resorbierbarer Seidenfaden	Serag-Wiessner	Naila
Vicryl™, Chirurgisches Nahtmaterial, resorbierbar, 3-0	Ethicon	Norderstedt
Polyethylenschlauch, Außen-Ø 0.61 mm, Innen-Ø 0.28 mm	neoLab	Heidelberg
Polyethylenschlauch, Außen-Ø 0.96 mm, Innen-Ø 0.58 mm	neoLab	Heidelberg
Filtropur S 0,45 µm Filter	Sarstedt	Nürnbrecht
Verbindungsstück mit Injektionsport	B. Braun	Melsungen
Kanüle Gr. 16	B. Braun	Melsungen
Spritze injekt® 10 ml	B. Braun	Melsungen
Rompun® Injektionslösung 2% (Xylazin)	Bayer	Leverkusen
Ketaset® 100 mg/ml (Ketamin)	zoetis	Berlin
Bepanthen® Augensalbe	Bayer	Leverkusen
Carbogen 95% O ₂ 5% CO ₂	Linde	Köln
Gefäßverschluss 5 mm	Harvard Apparatus	Holliston, Massachusetts, USA
Creatinine (urinary) Colometric Essay Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Nitrate/Nitrite Colometric Assay Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
8-Isoprostane EIA Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA
Cyclic GMP EIA Kit	Cayman Chemical	Ann Arbor, Michigan, USA

Western Diet (42% Fett, 0,15% Cholesterin)	Sniff	Soest
RNAlater®	Sigma-Aldrich	Darmstadt
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN	Hilden

Tabelle 3: Operations- und Verbrauchsmaterial

2.1.4 Geräte und Software

Produkt	Hersteller	Sitz des Herstellers
Powerlab 4/30 Datensammlungssystem	ADInstruments	Spechbach
LabChart 5 Datenausgabesoftware	ADInstruments	Spechbach
Dataquest A.R.T. System	Data Sciences International (DSI)	St. Paul, Minnesota, USA
Tail-Cuff-Plethysmograph P-98A	Softron	Tokyo, Japan
Perfusor	Harvard Apparatus	Holliston, Massachusetts, USA
Mauswaage	A&D Company, Limited	Tokyo, Japan
Feinwaage	Sartorius AG	Göttingen
Plattenreader	Beckman Coulter GmbH	Krefeld
Umwälzthermostat DC10-P5/U	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Pumpe Minipuls 2	Gilson	Langenfeld
Vevo 2100 Hochfrequenz Ultraschall	VisualSonics	Toronto, Kanada
30-70 MHz linearer Ultraschallkopf	VisualSonics	Toronto, Kanada
Tischzentrifuge	Eppendorf	Hamburg
Excel	Microsoft	Redmond, Washington, USA
Prism	GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
ABI PRISM 7300	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Metabolische Käfige, Edelstahl		

Tabelle 4: Geräte und Software

2.2 Methoden

2.2.1 Tierzucht und -haltung

Alle Versuche wurden durch Tierversuchs-Genehmigungen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen bewilligt (AZ 84-02.04.2012.A250, AZ 81-02.04.2018.A301). Die *in vivo* Interventionen wurden durch Herrn PD Dr. Johannes Stegbauer oder Herrn Geoffrey Istas durchgeführt. Alle Tötungsversuche und *ex vivo* Versuche wurden unter Ordnungsnummer O68/08 der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die Durchführung dieser Dissertation erwarb ich im Jahr 2015 vor Beginn des Dissertationsprojektes eine Tierversuchsbescheinigung nach FELASA B-Kriterien der Firma „berliner kompakturse“, ansässig in Berlin.

Die verwendeten Tiere stammten aus der hauseigenen Zucht der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle verwendeten Wildtyp-Tiere (WT) stammten aus der C57Bl/6J-Linie. Die ApolipoproteinE-defizienten (ApoE-KO) Tiere basierten auf einem C57Bl/6J-Hintergrund.

In die Tötungsversuche eingebundene Tiere wurden bis zum Alter von 8 Wochen unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen bei einem 12 Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten, und erst zum Versuchstag aus dem spezifisch pathogen-freien Bereich entfernt.

In die Fütterungsversuche eingebundene Tiere wurden bis zum Alter von 8 Wochen unter spezifisch pathogen-freien Bedingungen bei einem 12 Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten, und im Alter von 8 Wochen in einen öffentlich zugänglichen, sterilen Experimentalraum unter 12 Stunden-Tag/Nacht-Rhythmus gebracht. Während des Versuchs wurden die Tiere mit einer *Western diet* (=WD, 42% Fett, 0,15% Cholesterin) gefüttert. Die Tiere hatten sowohl zu Futter als auch zu Wasser freien Zugang.

2.2.2 Versuchskonzepte

2.2.2.1 Einfluss der Ernährungsform auf die renale Gefäßfunktion

Zur Prüfung des Einflusses der Ernährungsform auf die renale Gefäßfunktion wurden 8 Wochen alte WT- und 8 Wochen alte ApoE-KO-Männchen für maximal 16 Wochen mit *Western diet* gefüttert.

Bei beiden Versuchsgruppen wurden nach 0, 4, 8 und 12 Wochen Fütterung mit *Western Diet* eine einwöchige Blutdruckmessung via Telemetrie vorgenommen. An einigen Zeitpunkten wurde außerdem eine Prüfung der renalen Gefäßfunktion via isoliert perfundierter Niere und eine Urinsammlung durchgeführt. Nach 16-wöchiger Fütterung wurde an einigen Tieren die Endothelfunktion *in vivo* mittels flussvermittelter Vasodilatation bestimmt.

In den gesammelten Urinen wurden die Konzentrationen von Nitrat und Kreatinin bestimmt.

2.2.2.2 Vaskulärer Mechanismus der kurzkettigen Fettsäure Propionat

Zur Prüfung des Einflusses des Stoffwechsels der Darmbakterien auf die Gefäßfunktion wurde bei 8 Wochen alten C57Bl/6J-Weibchen isoliert perfundierte Nieren und isoliert perfundierte Därme durchgeführt.

Ferner wurden an Proben aus der *Arteria (A.) renalis*, *A. mesenterica superior* und *Aorta abdominalis* die Dichte verschiedener Rezeptoren mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bestimmt.

2.2.3 Isoliert perfundierte Niere

Die isoliert perfundierte Niere ist eine Methode zur Messung der Druckantwort der renalen GefäÙe *ex vivo* (Abb. 4). Die hier beschriebene Methode ist eine Abwandlung der zuerst von Schweda und Kollegen beschriebenen Methode[49].

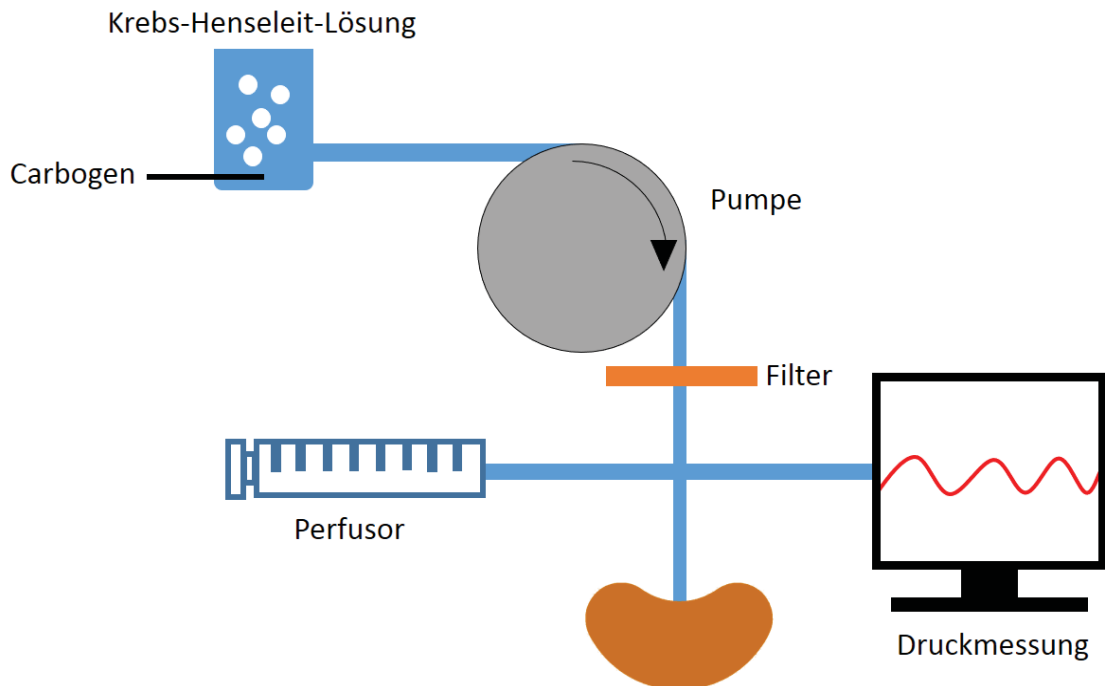


Abb. 4: Aufbau der isoliert perfundierten Niere

Mit Carbogen angereicherte, auf Körpertemperatur erhitzte Krebs-Henseleit-Lösung wurde von einer planetengetriebenen Pumpe mit konstanter Flussrate gepumpt. Nach Passage eines Filters wurden über einen Perfusor Pharmaka appliziert. Über eine eingesteckte Kanüle wurde der Gesamtdruck im System gemessen. Über einen Schlauch in der A. renalis wurde die isolierte Niere perfundiert.

Präparation der Nieren

Nach Tötung der Maus durch Exartikulation im Okzipitalgelenk wurde mit einem Medianschnitt entlang der *Linea alba* der Bauchsitus offengelegt. Nach Legen einer Ligatur um den kranial der Nierenarterien gelegenen Teil der *Aorta abdominalis* wurde die *Aorta kaudal* der Nierenarterien mit einer Mosquitoklemme und einem Mini-Gefäßclip nach Biemer abgeklemmt. Zwischen den Klemmen wurde die *Aorta* inzidiert und mit einem Schlauch kanüliert. Nach Schluss der eben gelegten Ligatur sowie Inzision in die linke Nierenvene zur Schaffung eines Abflusses, wurden die Nieren über die *Aorta* mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Nun wurden die Nierenkapseln beider Nieren entfernt.

Nach vollständiger Darstellung der Nierenarterien und der verbindenden *Aorta* wurde eine noch geöffnete Ligatur um den zwischen den Abgängen der Nierenarterien gelegenen Aortenabschnitt gelegt. Eine weitere, ebenfalls noch geöffnete Ligatur wurde um die rechte Nierenarterie gelegt. Nach einer Aorteninzision im Bereich des Abgangs der rechten Nierenarterie wurde diese mit einem Polyethylenschlauch kanüliert, und die Ligatur um den Schlauch und die Arterie geschlossen. Nach Kanülierung der rechten Nierenarterie, aber vor Entnahme der rechten Niere wurde die Aorten-Ligatur zwischen den Nierenarterien geschlossen, um eine ausreichende Perfusion der linken Niere zu gewährleisten. Nach Entnahme der rechten Niere wurde die linke Nierenarterie nach gleichem Schema kanüliert und die Niere entfernt.

Perfusion der Nieren

Nach Entnahme der Nieren wurden die in den Nierenarterien platzierten Schläuche mit der Perfusionsanlage verbunden, und die Nieren wurden mit 37°C warmer und mit Carbogen gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Eine konstante Flussrate von 3 ml/min wurde durch eine planetengetriebene Pumpe aufrechterhalten.

Über ein Verbindungsstück mit Injektionsport wurden sowohl die Messkanülen des Druckabnehmers eingesteckt als auch über Perfusoren Pharmaka appliziert. Die am Druckmesser erfassten Druckunterschiede wurden mit dem Datensammlungssystem erfasst und die entsprechenden Daten wurden mit einer Datenausgabesoftware dargestellt.

Prüfung der renalen Druckantwort

Nach einer Stabilisierungsphase von ca. 40 Minuten wurde mit einer Bolusinjektion von 60 mM KCl die maximale Druckantwort bestimmt. Eine inadäquate Druckantwort führte hier zum Ausschluss der entsprechenden Niere aus dem Versuch. Nach einer weiteren Stabilisierungsphase von ca. 20 Minuten wurde mit der Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve begonnen.

Bei Versuchen zur Prüfung der renalen Vasokonstriktion wurde zunächst pure Krebs-Henseleit-Lösung via Perfusor mit einer Laufrate von 0,158 ml/min appliziert. Aus der Laufrate des Perfusors und der Laufrate der planetengetriebenen Pumpe ergab sich eine konstante Laufrate, und somit auch ein konstanter Druck in den perfundierten Nieren. Anschließend wurde, bei

konstanter Laufrate von Pumpe und Perfusoren, eine zunehmende Konzentration des zu testenden Pharmakons über wechselnde Perfusoren appliziert.

Nach Applikation der geplanten Maximaldosis wurde wieder ein Perfusor mit purer Krebs-Henseleit-Lösung angeschlossen, und so die maximale Relaxation der renalen Gefäße zum Versuchsende bestimmt.

Bei Versuchen zur Prüfung der renalen Vasodilatation wurde, nach Prüfung der maximalen Druckantwort mit KCl, zunächst pure Krebs-Henseleit-Lösung via Perfusor appliziert, während die Niere gleichzeitig durch Zugabe von Noradrenalin (1 μ M) in die Krebs-Henseleit-Lösung vorkontrahiert wurde. Nach Erreichen eines konstanten Kontraktionsniveaus nach ca. 20 Minuten wurde eine zunehmende Konzentration des zu testenden Pharmakons appliziert. Nach Applikation der geplanten Maximaldosis wurde abermals pure Krebs-Henseleit-Lösung appliziert und die Niere erneut mit Krebs-Henseleit-Lösung ohne Noradrenalin perfundiert, was die Bestimmung der maximalen Relaxation der renalen Gefäße nach Versuchsende erlaubte.

Alle zu testenden Pharmaka wurden in destilliertem Wasser gelöst, und in Krebs-Henseleit-Lösung verdünnt.

Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven

Zur Auswertung der renalen Vasokonstriktion wurde der maximale bei den jeweiligen Konzentrationen auftretende Perfusionsdruck bestimmt. Die Differenz zwischen diesem maximalen Perfusionsdruck(P_{max}) und dem basalen Perfusionsdruck(P_{basal}) wurde als die renale Druckantwort gewertet ($\Delta P_{max} = P_{max} - P_{basal}$).

Zur Bestimmung der renalen Vasorelaxation wurde das Verhältnis zwischen der Druckantwort auf Noradrenalin (P_{NA}) und dem Perfusionsdruck bei Relaxation durch die jeweilige Pharmakon-Konzentration bei Noradrenalin-Vorkontraktion (P_{Rel}) bestimmt ($P_{Prozentual} = (P_{NA} - P_{basal}) / (P_{Rel} - P_{basal})$).

2.2.4 Isoliert perfundierter Darm

Der isoliert perfundierte Darm ist eine Methode zur Messung der Druckantwort der intestinalen Gefäße *ex vivo*.

Die hier beschriebene Methode ist eine eigens entwickelte Abwandlung der zuerst von Schweda und Kollegen beschriebenen Methode zur isolierten Perfusion der Niere[49].

Kanülierung des Darms

Nach Tötung der Maus durch Exartikulation im Okzipitalgelenk wurde durch einen Medianschnitt entlang der Linea alba der Bauchsitus offengelegt. Nach Legen einer Ligatur um den kranial der Nierenarterien gelegenen Teil der *Aorta abdominalis* wurde die *Aorta* kaudal der Nierenarterien mit einer Mosquitoklemme und einem Mini-Gefäßclip nach Biemer abgeklemmt. Zwischen den Klemmen wurde die *Aorta* inzisiert, und mit einem Schlauch kanüliert. Nach Schluss der eben gelegten Ligatur sowie Inzision in die linke Nierenvene zur Schaffung eines Abflusses, wurden der Darm und die Nieren perfundiert.

Nach Darstellung der *A. mesenterica superior* wurde diese mit einer geöffneten Ligatur umfasst. Nach Inzision in den nahe gelegenen Aortenabschnitt wurde die *A. mesenterica superior* mit einem Polyethylenschlauch kanüliert, und die Ligatur um Schlauch und *Arterie* verschlossen. Im Gegensatz zur isoliert perfundierten Niere wurden der perfundierte Darm nicht aus dem Maussitus entfernt.

Zur Garantie einer physiologischen Darmtemperatur wurde der Mauskörper während des Versuchs mit einer Heizplatte auf 37 ± 1 °C gewärmt.

Prüfung der Druckantwort

Nach Kanülierung wurde der Schlauch an die Perfusionsanlage angeschlossen. Nach einer Stabilisierungsphase von 5 Minuten wurde mit einer Bolusinjektion von 60 mM KCl die maximale Druckantwort der Darmgefäße bestimmt. Nach einer weiteren Stabilisierungsphase von 5 Minuten wurde mit der Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve nach gleichem Prinzip wie bei der isoliert perfundierten Niere begonnen.

Bei Prüfung der mesenterialen Vasokonstriktion wurde zunächst pure Krebs-Henseleit-Lösung via Perfusor mit einer Laufrate von 0,158 ml/min appliziert. Aus der Laufrate des Perfusors und der Laufrate der Planetenpumpe ergab sich eine

konstante Laufrate und somit auch ein konstanter Druck in den perfundierten Darmgefäßen. Anschließend wurde, bei konstanter Laufrate von Pumpe und Perfusoren, eine zunehmende Konzentration des zu testenden Pharmakons über wechselnde Perfusoren appliziert.

Nach Applikation der höchsten geplanten Dosis wurde wieder pure Krebs-Henseleit-Lösung appliziert und so die maximale Relaxation der mesenterialen Gefäße zum Versuchsende bestimmt.

Bei Prüfung der mesenterialen Vasorelaxation wurde der Darm, nach Bestimmung der maximalen Druckantwort mit KCl, durch Zugabe von Noradrenalin (8 μ M) in die mit Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Heizgefäße vorkontrahiert. Gleichzeitig wurde via Perfusor pure Krebs-Henseleit-Lösung mit einer Laufrate von 0,158 ml/min appliziert. Nach Erreichen eines konstanten Kontraktionsniveaus (ca. 20 Minuten) wurde eine zunehmende Konzentration des zu testenden Pharmakons appliziert.

Alle verwendeten Pharmaka wurden in Krebs-Henseleit-Lösung gelöst und in Krebs-Henseleit-Lösung verdünnt.

Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven

Die Auswertung der entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven erfolgte nach dem gleichen Schema wie die Auswertung der Dosis-Wirkungs-Kurven der isoliert perfundierten Nieren (s. 3.2.3).

2.2.5 Flussvermittelte Vasodilatation

Die flussvermittelte Vasodilatation ist eine Methode zur Messung der femoralen Gefäßantwort *in vivo*. Die Verwendung der Methode bei Mäusen wurde erstmalig 2014 von Schuler und Kollegen veröffentlicht[50].

Vorbereitung der Maus und sonographische Darstellung der Arterie

Die untersuchten Mäuse wurden mit Isoflurangas (5% in Raumluft zur Narkoseinduktion, 2% in Raumluft zum -erhalt) anästhesiert. Mit einer Wärmeplatte wurde eine physiologische Körpertemperatur von 37 ± 1 °C sichergestellt.

Das linke Hinterbein wurde rasiert, und die rasierte Hautoberfläche wurde mit vorgewärmten Ultraschall-Gel eingerieben. Anschließend wurde der an einem manuell beweglichen Greifarm montierte Ultraschallkopf auf den Hautbereich über der oberflächlich sichtbaren *V. femoralis* gesetzt.

Die A. femoralis wurde sonographisch aufgesucht. Mit Hilfe eines Doppler-Signal wurde das aufgesuchte Gefäß eindeutig als Arterie identifiziert.

Messung der flussvermittelten Vasodilatation

Nun wurde durch Anbringen und anschließendes Aufblasen eines 5 mm Gefäßverschlusses am äußeren Oberschenkel der arterielle Blutfluss unterbrochen. Nach Ende der Ischämie-Phase wurde der Gefäßverschluss geöffnet und für 3 Minuten in einem 30-Sekunden-Abstand der Durchmesser der A. femoralis sonographisch gemessen.

Datenauswertung

Die flussvermittelte Vasodilatation wurde als prozentuale Veränderung des durchschnittlichen Durchmessers postischämisch im Vergleich zum präischämischen Durchmesser angegeben $[(D_{\text{post}}-D_{\text{prä}})/D_{\text{prä}}]*100$.

Die Messung der flussvermittelten Vasodilatation und die Auswertung der entstandenen Daten geschahen in Kooperation mit Geoffrey Ista und Ana Rodriguez-Mateos aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.2.6 Telemetrische Blutdruckmessung

Die telemetrische Blutdruckmessung ist eine Methode zur invasiven Messung von Blutdruck und Puls.

Implantation der Katheter

Die Mäuse wurden mit einem Präparat aus $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ketamin und Xylazin $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ intraperitoneal anästhesiert. Zum Schutz vor Auskühlung wurde die Operation auf einer auf $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ geheizten Wärmeplatte durchgeführt. Ferner wurden die Augen mit Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt.

Durch das Fehlen des Zwischenzehenreflexes wurde die ausreichende Narkosetiefe sichergestellt. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Hals- und Brustregion der Maus rasiert, und nach einem Hautschnitt in der Halsregion die linke *A. carotis communis* freipräpariert.

Mit einem Mini-Gefäßclip nach Biemer wurde der Blutfluss in der Arterie unterbunden, um anschließend das Gefäß mit einer Strabismus-Federschere zu eröffnen. Nun wurde der zur Druckmessung genutzte Schlauch des Katheters in die Arterie geführt und mit einem nicht-resorbierbarem Faden mit 3 Knoten fixiert. Anschließend wurde der Korpus des Katheters zwischen Haut und *Peritoneum* in den *abdominellen Extraperitonealraum* geführt, und der operative Zugang mit resorbierbarem Faden verschlossen. Zum Abschluss der Operation wurde das Abklingen der Narkose abgewartet, und die Mäuse wieder in den oben beschriebenen Experimentalraum gebracht.

Blutdruckmessung

Nach einer einwöchigen postoperativen Erholungsphase wurde der Katheter durch Heranführen eines Magneten eingeschaltet. Anschließend wurde die Messung für 7 Tage durchgeführt. In 30-minütigen Abständen wurden der systolische und diastolische Blutdruck, der arterielle Mitteldruck, sowie die Herzfrequenz, Pulsamplitude und die Bewegungsaktivität der Tiere aufgezeichnet.

Nach einer jeweils dreiwöchigen Ruhephase wurde die nächste Messphase mit einer Länge von 7 Tagen begonnen. Somit ergaben sich Messzyklen von insgesamt 28 Tagen.

Auswertung der Blutdruckdaten

Zur Verifizierung der korrekten Funktion der Telemetrie-Katheter wurde die zirkadiane Rhythmik des systolischen Blutdrucks bestimmt. Bei korrekter Messung war der durchschnittliche arterielle Mitteldruck in der nächtlichen Periode von 18:00 bis 6:00 Uhr um ca. 10-20 mmHg höher als in der Periode von 6:00 bis 18:00 Uhr.

Ferner wurde eine realistisch zu erwartende Herzfrequenz von 500-700 min⁻¹ als weiterer Indikator einer akkuraten Messung genutzt. Bei auffälligen Messwerten wurden die invasiv gemessenen systolischen Blutdruck- und Pulswerte mit nicht-invasiv via Tail-Cuff-Plethysmographie (s. 3.2.7) erhobenen Werten verglichen. Bei auffälligen Abweichungen wurde eine Messstörung, zum Beispiel durch embolischen Verschluss des Katheterschlauchs, angenommen. Erstmalig auffällige, sowie alle weiteren Messwerte der betroffenen Maus wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

An den für die Blutdruckmessung verwendeten Tieren wurden keine weiteren Versuche durchgeführt, um eine eventuelle Verzerrung der Ergebnisse durch die Mehrbelastung von Operation und Katheter zu verhindern.

2.2.7 Tail-Cuff-Plethysmographie

Die Tail-Cuff-Plethysmographie ist eine Methode zur nicht-invasiven Messung von Blutdruck und Puls.

Vorbereitung der Mäuse

Die Messung wurde an wachen Tieren durchgeführt, die vorher durch Probemessungen an die Prozedur gewöhnt wurden.

Messung des Blutdrucks

Die Mäuse wurden in einem kleinen Gefäß mit erleichtertem Zugang zum Schwanz gelagert. Anschließend wurde der Tail-Cuff über den Mausschwanz gestülpt, und der Schwanz anschließend mit Klebeband fixiert.

Nach einer Eingewöhnungsphase von 5 Minuten wurden insgesamt 10 Einzelmessungen vorgenommen. Der systolische Blutdruck und die Herzfrequenz wurden bestimmt. Das arithmetische Mittel aus allen 10 Einzelmessungen wurde als Messergebnis einer Messung genutzt.

2.2.8 Urinsammlung

Vorbereitung

Um die Stressbelastung der Mäuse zu reduzieren und um eine maximale Urinausbeute zu gewährleisten wurden die Mäuse für einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen in zunehmend längeren Zeitintervallen an die metabolischen Käfige gewöhnt. Bei allen Aufenthalten im metabolischen Käfigen wurde den Mäusen freier Zugang zu Trinkwasser und Futter gewährt.

Probengewinnung

Nach Abschluss der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere über Nacht für ein Zeitintervall von ca. 14 bis 16 Stunden in die metabolischen Käfige gesetzt. Die verwendeten metabolischen Käfige aus Edelstahl erlauben lediglich eine Trennung des Urins von Kot und sonstigem Dreck, wobei nur der Urin gesammelt wurde.

Probenverarbeitung

Nach erfolgter Sammlung wurden die Urine für 5 Minuten bei 400 G zentrifugiert. Anschließend wurden die Urine je nach späterer Nutzung aliquotiert, bei -80°C gelagert und erst zur Analyse wieder aufgetaut.

2.2.9 Nitratbestimmung

Zur Bestimmung des Nitrats im Urin wurde ein *Nitrate/Nitrite Colometric Essay Kit* der Firma Cayman verwendet.

Zunächst wurde mit dem mitgelieferten *Nitrat-Stock* und dem ebenfalls mitgelieferten *Assay Buffer* eine Standardreihe mit 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 µM Nitrat angesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit *Assay Buffer* im Verhältnis 1:40 verdünnt.

Je 80 µl der Standardreihe und der verdünnten Proben wurden im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden nacheinander 10 µl *Enzyme Cofactors* und 10 µl *Nitrate Reductase* zu Proben und Standardreihe hinzugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden nacheinander je 50 µl des mitgelieferten *Griess R1* und *Griess R2* zugegeben.

Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Messung im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Konzentration wurde vom Programm des Plattenreaders bestimmt.

Zur Vermeidung von Fehlern durch verschieden starke Konzentrierung des Urins wurde bei jedem Tier das Verhältnis von Nitrat und Kreatinin bestimmt.

2.2.10 Kreatininbestimmung

Zur Kreatininbestimmung im Urin wurde ein *Colometric Essay Kit* der Firma Cayman verwendet.

Zunächst wurde mit dem mitgelieferten Kreatinin-Standard eine Standardreihe mit den Kreatinin-Konzentrationen 0, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 15 mg/dl angesetzt. Anschließend wurden die zu messenden Proben mit *high performance liquid chromatography*-Wasser im Faktor 1:10 verdünnt.

Danach wurde die Standardreihe im Doppelansatz auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurden je 15 µl der verdünnten Proben im Doppelansatz auf die Platte pipettiert. Zu Standardansatz und zu allen Proben wurde im Anschluss eine Entwicklungslösung aus 13,89 µl *Sodium Borat*, 41,67 µl *Surfactant*, 69,44 µl *Color Reagent* und 25,00 µl NaOH (pro Well, alle Bestandteile der Entwicklungslösung wurden mit dem Kit geliefert) pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln wurde die Platte im Plattenreader bei einer Wellenlänge von 490-500 nm gemessen.

Nach erfolgter erster Messung wurde in jedes Well 5 µl einer mitgelieferten *Acid-Solution* gegeben, und die Platte 20 Minuten unter Bewegung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine weitere Messung bei einer Wellenlänge von 490-500 nm.

Die Messergebnisse wurden in eine vom Hersteller zur Verfügung gestellte Auswertungsmaske eingegeben, und die entsprechenden Ergebnisse übernommen.

2.2.11 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der Expression verschiedener Rezeptoren in der *Aorta abdominalis*, *A. renalis* und der *A. mesenterica superior* wurde die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion angewandt.

Hierfür wurden 16 Wochen alte, weibliche C57Bl/6-Mäuse per Exartikulation im Okzipitalgelenk getötet. Anschließend wurde die *Aorta abdominalis* nach in Kapitel 3.2.3 dargestellter Methode zunächst dargestellt, und anschließend mit einem Schlauch kanüliert. Über den kanülierenden Schlauch wurden anschließend die *Aorta*, sowie die angeschlossene *A. renales* und *A. mesenterica superior* mit Krebs-Henseleit-Lösung gespült.

Anschließend wurden die betreffenden Schlagadern mittels Feinpinzette und Strabismus-Federschere entfernt. Mittels zweier Feinpinzetten wurden Fett- und Geweberückstände an den entnommenen Gefäßen entfernt. Die gewonnen Proben wurden in *RNA-later* bei -80°C zur späteren weiteren Analyse gelagert.

Zur Untersuchung der Expression der verschiedenen Rezeptoren wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen genutzt. Hier wurde zunächst Messenger-Ribonukleinsäure (*mRNA*) mittels des *mRNA mini kits* isoliert. Zur Entfernung der genomischen Desoxyribonukleinsäure (*gDNA*) wurde der *Wipeout-Buffer* hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben mittels *Syber Green* in folgendem Temperaturschema gefärbt: 95°C für 15 Minuten ; 30 Sekunden 95°C insgesamt 39 mal, 58°C für 30 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden; 72°C für 2 Minuten). Anschließend folgte die qPCR im ABI PRISM 7300-System.

2.2.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten und alle Rechnungen, wie die Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen, wurden in Microsoft Excel durchgeführt. Alle statistischen Analysen, sowie die graphische Darstellung der Daten wurde mit Graphpad Prism durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde für die Analyse aller Daten ein Two-Way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur für multiple Tests durchgeführt. Für die Auswertung der Ergebnisse der invasiven Blutdruckmessung oder die Ergebnisse der flussvermittelten Vasodilatation wurde ein One-sided ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Einflüsse westlicher Ernährung auf das Gefäßsystem in Mäusen

3.1.1 Entwicklung der endothelabhängigen Vasodilatation unter *Western Diet ex vivo*

Die Endothelfunktion *ex vivo* wurde in renalen Widerstandsgefäßen mittels isoliert perfundierter Niere bei WT- und ApoE-KO-Tieren nach 0, 8 und 12 Wochen unter *Western Diet* bestimmt. So konnte die Endothelfunktion im zeitlichen Verlauf bestimmt werden. Hierbei wurde nach Vorkontraktion mit Noradrenalin (NA) (1 μM) durch die Applikation des Acetylcholin-Analogons Carbachol (0,01-30 μM) eine endothel-abhängige Vasorelaxation induziert. Diese wurde später als Dosis-Wirkungs-Kurve dargestellt.

Es zeigten sich vor Fütterung mit *Western Diet* keine Unterschiede zwischen allen Testgruppen (Abb. 5 A). Nach achtwöchiger Fütterung zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der Vasorelaxation bei den KO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren. (Abb. 5 B).

Auch nach zwölfwöchiger Fütterung mit *Western Diet* war bei den Wildtyp-Tieren eine stärkere renale Vasodilatation als bei den KO-Tieren festzustellen (Abb. 5 C). Insgesamt trat im gesamten Versuchszeitraum keine Verschlechterung der endothelabhängigen Vasodilatation bei WT-Tieren auf. Bei den ApoE-KO-Tieren konnte wiederum eine tendenzielle Verschlechterung der Endothelfunktion bereits nach vierwöchiger Fütterung, und sogar eine signifikante Verschlechterung nach zwölfwöchiger Belastung durch WD nachgewiesen werden (Abb. 6).

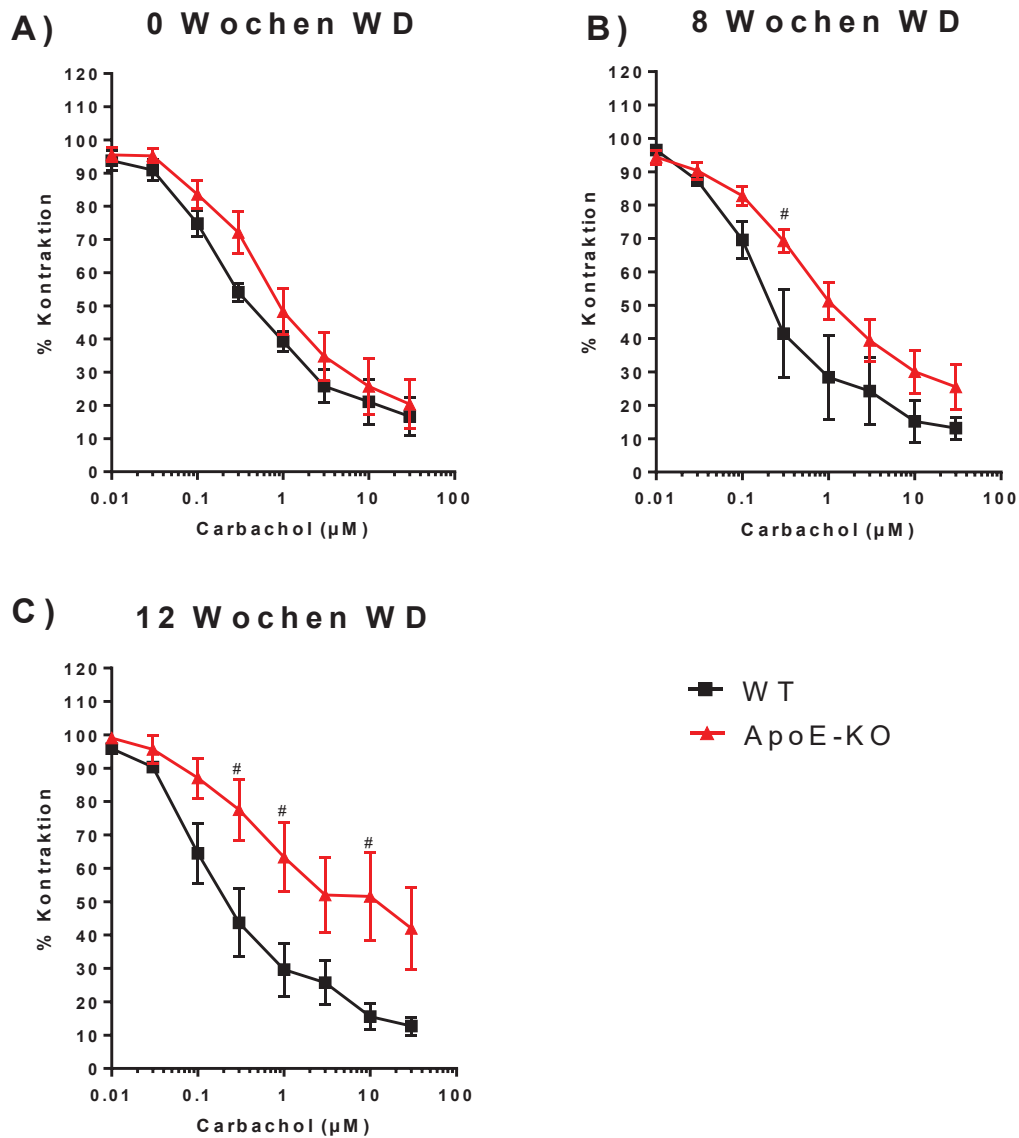


Abb. 5: Vergleich der endothelabhängigen Vasorelaxation zwischen WT und ApoE-KO-Mäusen

Während sich bei Mäusen vor Fütterung mit WD noch keine Unterschiede zwischen KO- und WT-Tieren zeigten(A), bestand nach 8 und 12 Wochen Fütterung eine signifikant schlechtere Vasorelaxation bei ApoE-KO-Tieren gegenüber WT-Tieren (B)/(C). WT $n_{0W}=4$, $n_{8W}=4$, $n_{12W}=6$; ApoE-KO $n_{0W}=8$, $n_{8W}=7$, $n_{12W}=4$, $\# = p < 0,05$. Alle Punkte stellen den MW \pm SEM dar.

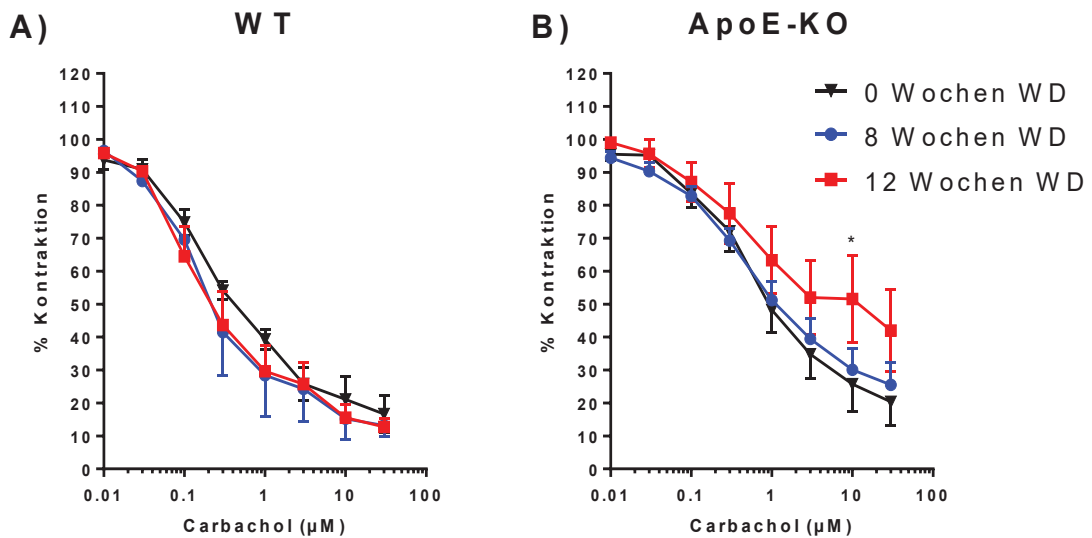


Abb. 6: Verlauf der endothelabhängigen Vasorelaxation unter Western Diet

Bei WT-Mäusen zeigte sich im Versuchszeitraum unter Western Diet keine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion(A). Bei ApoE-KO-Tieren bestand nach 12 Wochen eine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion(B). WT $n_{0W}=4$, $n_{8W}=4$, $n_{12W}=6$; ApoE-KO $n_{0W}=8$, $n_{8W}=7$, $n_{12W}=4$, $*=p<0,05$ Alle Punkte stellen den MW \pm SEM dar.

3.1.2 Entwicklung der endothelunabhängigen Vasodilatation unter *Western diet ex vivo*

Durch Applikation des NO-Analogons S-Nitrosoglutathione (GSNO, 0,1-30 µM) wurde eine endothelunabhängige Vasorelaxation induziert. Zum weiteren Ausschluss endothelabhängiger Effekte wurden alle Versuche in Anwesenheit des NO-Synthase-Inhibitors (NOS-Inhibitor) L-Name (300 µM) und des Cyclooxygenase-Hemmers (COX-Hemmer) Diclofenac (3 µM) durchgeführt.

Im Gegensatz zu der durch Carbachol hervorgerufenen endothelabhängigen Vasorelaxation, welche nach acht- und zwölfwöchiger Fütterung mit *Western Diet* eingeschränkt war, blieb die von GSNO hervorgerufene endothelunabhängige Vasorelaxation sowohl durch den Maus-Genotyp, als auch durch längere Fütterungen mit *Western Diet* unverändert (Abb. 7).

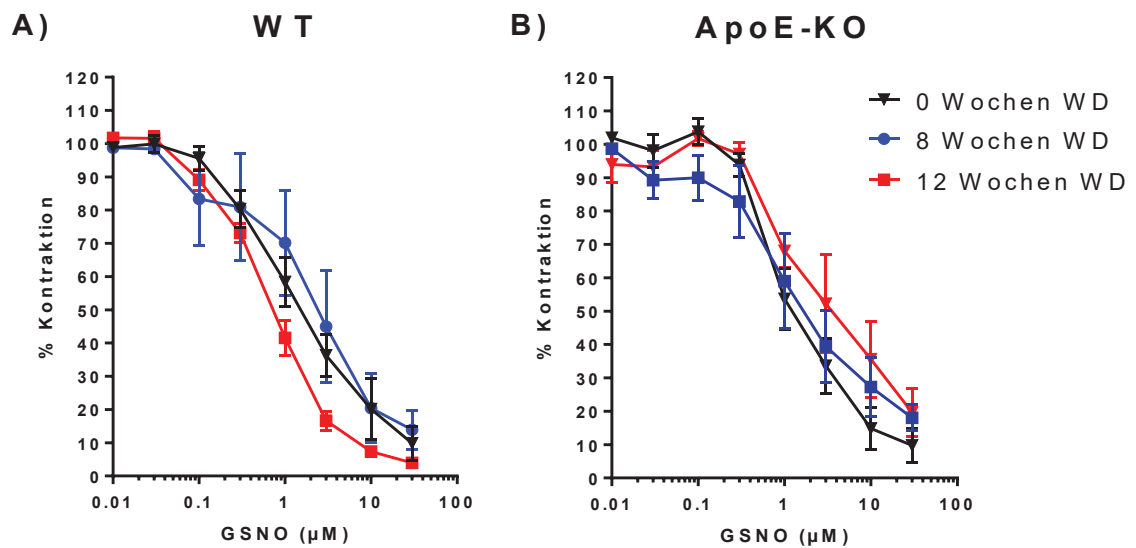


Abb. 7: Veränderung der endothelunabhängigen Vasorelaxation bei Fütterung mit WD

(A-C) Bei Applikation von GSNO zeigte sich keine signifikante Veränderung der Vasorelaxation in Abhängigkeit von Genotyp oder WD-Fütterung. WT $n_{0W}=4$, $n_{8W}=5$, $n_{12W}=4$; ApoE-KO $n_{0W}=4$, $n_{8W}=4$, $n_{12W}=5$. Alle Punkte stellen den MW \pm SEM dar.

3.1.3 Entwicklung der endothelabhängigen Vasodilatation unter *Western Diet in vivo*

Zur Bestimmung der endothelabhängigen Vasodilatation *in vivo* wurde die flussvermittelte Vasodilatation bei Mäusen vor und nach einer Fütterungsperiode von 16 Wochen mit *Western Diet* bestimmt.

Interessanterweise zeigte sich hier bereits vor Fütterung mit *Western Diet* eine eingeschränkte Vasodilatation bei 8 Wochen alten ApoE-KO-Mäusen. Eine weitere signifikante Verschlechterung nach Fütterung mit *Western Diet* lag nicht vor.

Bei WT-Tieren wiederum zeigte sich eine initial signifikant bessere Vasodilatation im Vergleich zum KO-Strang. Nach 16-wöchiger Fütterung mit *Western Diet* war die flussvermittelte Vasodilatation bei den WT-Tieren signifikant eingeschränkt. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und KO-Tieren festgestellt werden (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**8).

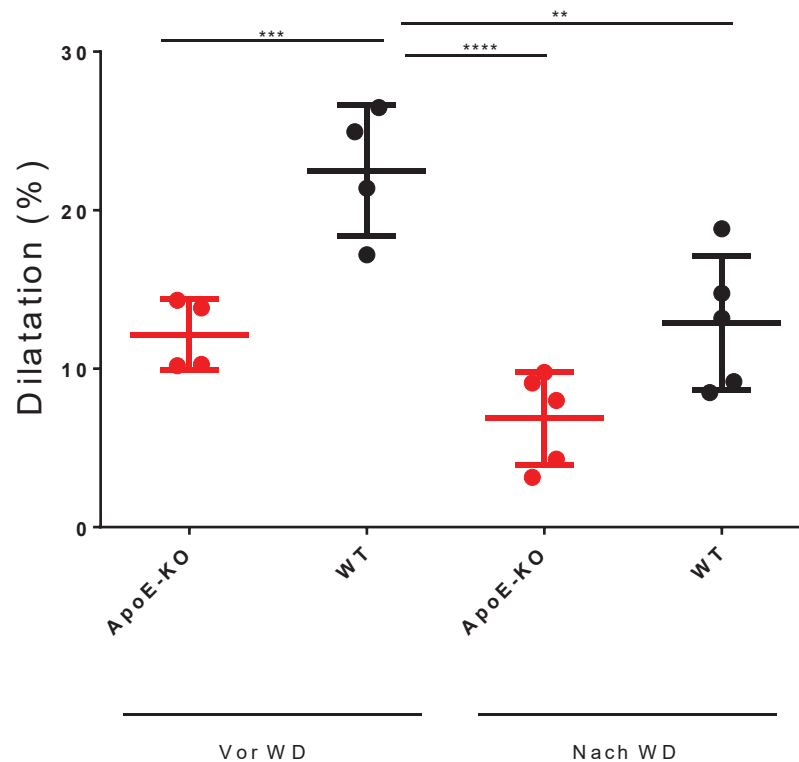


Abb. 8: flussvermittelte Vasodilatation vor und nach 16-wöchiger Fütterung mit WD

Bereits vor Fütterung mit WD bestand bei den KO-Tieren eine eingeschränkte reaktive Vasodilatation, welche durch Fütterung mit WD nicht signifikant verändert wurde. Lediglich bei WT-Tieren ließ sich eine Veränderung der Vasodilatation nach Fütterung mit WD feststellen. Vor WD jeweils n=4, nach WD jeweils n=5, * = p<0,05, ** = p<0,01, **** = p<0,0001. Alle Punkte stellen den MW ± SD dar. Statistische Auswertung via *One-sided ANOVA* mit Bonferroni-Korrektur.

3.1.4 Blutdruck- und Pulsmessung

Bei beiden Maus-Strängen wurden bei kontinuierlicher Fütterung mit *Western Diet* Blutdruck und Puls im 4-wöchigen Rhythmus gemessen.

Es zeigte sich trotz *Western Diet*-Fütterung nicht nur keine Veränderung im systolischen Blutdruck der Tiere, sondern auch keine Veränderung der Herzfrequenz (Abb. 9). Ferner zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und ApoE-KO-Mäusen (nicht dargestellt).

Eine Aufhebung des physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus mit für nachtaktive Tiere typischen erhöhten Blutdrücken nachts konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb. 10, exemplarisch für ApoE-KO dargestellt).

Einige Tiere schieden wegen offensichtlicher und verifizierter Messfehler im Versuchsverlauf aus (s. 2.2.6).

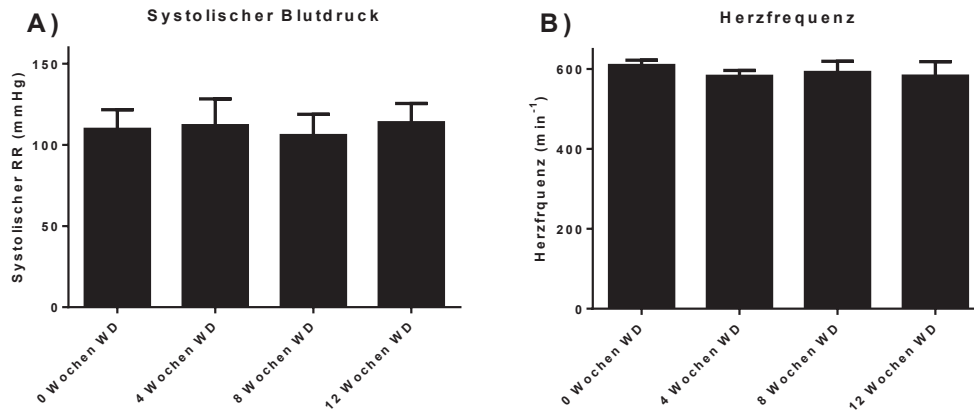


Abb. 9: Entwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz bei WD-Fütterung

A) Es zeigte sich auch mit zunehmender Fütterungsdauer mit WD keine Erhöhung des systolischen Blutdrucks.

B) Es zeigte sich ebenfalls keine Erhöhung der durchschnittlichen Herzfrequenz.

$n_{\text{ApoE-KO (0W)}}=4$, $n_{\text{ApoE-KO (4W)}}=4$, $n_{\text{ApoE-KO (8W)}}=3$, $n_{\text{ApoE-KO (12W)}}=2$ Alle Werte stellen den MW \pm SEM dar.

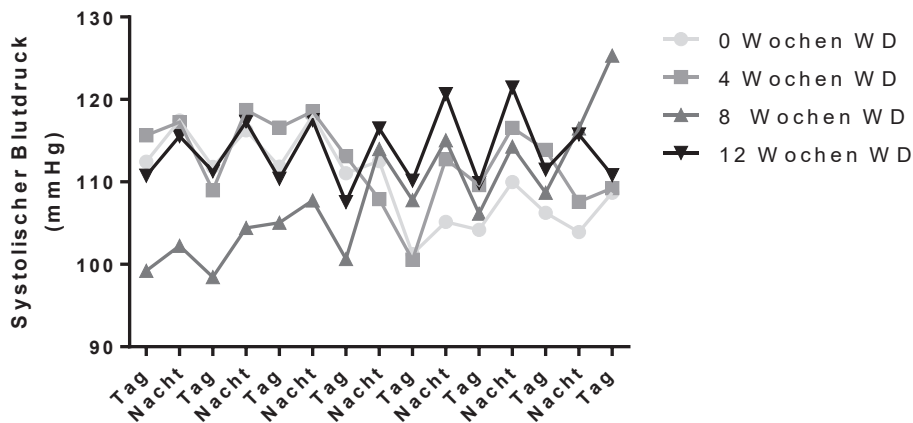


Abb. 10: Tag-Nacht-Rhythmus des systolischen Blutdrucks bei ApoE-KO-Mäusen

Selbst nach 12-wöchiger Fütterung mit *Western Diet* war keine Aufhebung des physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus des systolischen Blutdrucks zu erkennen.

3.1.5 Nitratbestimmung im Urin

Im vierwöchigen Rhythmus wurden Urinproben der mit WD gefütterten Mäuse gesammelt. Diese wurden hinsichtlich ihres Nitratgehalts analysiert. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch verschieden starke Konzentrierung der Urine zu verhindern wurde das Verhältnis zwischen der Nitratkonzentration und der Kreatininkonzentration bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen oder den verschiedenen Fütterungszeiträumen festgestellt werden.

Es zeigten sich aber tendenziell höhere Nitratkonzentrationen bei den WT-Tieren im Vergleich zu den ApoE-KO-Tieren (Abb. 11).

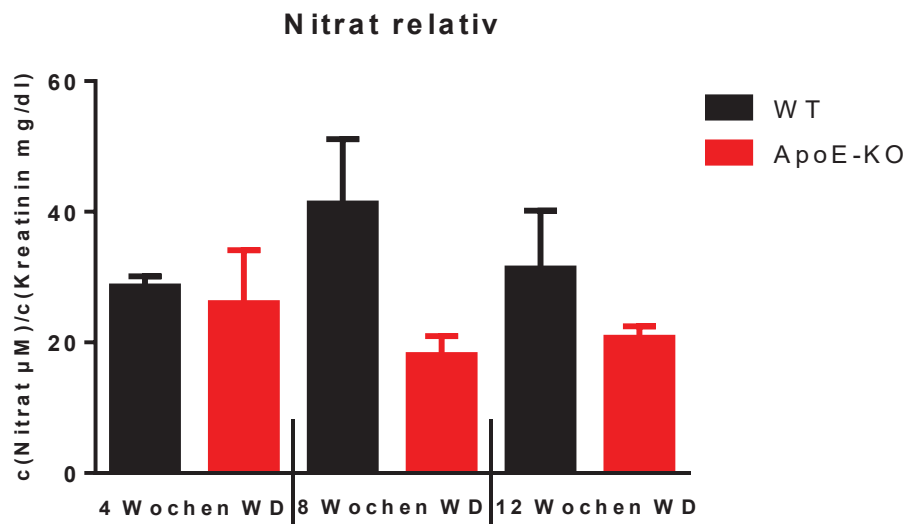


Abb. 11: Nitrat-Bestimmung relativ zum Kreatinin in Urinen nach WD-Fütterung

Nach 4, 8 und 12 Wochen Fütterung mit WD zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen oder den verschiedenen Fütterungszeiträumen. Es zeigten sich tendenziell höhere Nitrat-Konzentrationen bei WT. WT $n_{4W}=4$, $n_{8W}=4$, $n_{12W}=4$; ApoE-KO $n_{4W}=3$, $n_{8W}=5$, $n_{12W}=3$. Alle Werte stellen den MW \pm SEM dar.

3.2 Vaskulärer Wirkmechanismus kurzkettiger Fettsäuren

3.2.1 Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren in renalen Gefäßen

Der Wirkmechanismus kurzkettiger Fettsäuren in renalen Widerstandgefäßen wurde in der isoliert perfundierten Niere untersucht. Bei alleiniger Applikation der kurzkettigen Fettsäure Na-Propionat (0,1-12 mM) zeigte sich keine Änderung im renalen Gefäßwiderstand (nicht dargestellt). Erst nach Vorkontraktion mit Noradrenalin (NA, 1 μ M) konnte eine dosisabhängige Vasodilatation erzeugt werden.

Die Zugabe des NOS-Inhibitors L-Name (300 μ M), sowie die Zugabe des Na⁺-K⁺-ATPase-Blockers Ouabain (100 μ M) inhibierten diese Vasodilatation deutlich. Der COX-Hemmer Diclofenac (3 μ M) zeigte keinen Effekt. Somit ist hier von einer NO- und EDHF-abhängigen Vasodilatation auszugehen.

Die Kombination von Ouabain und L-Name bewirkte bei einer Konzentration von 12 mM Na-Propionat eine signifikant stärkere Inhibition als die alleinige Applikation von Ouabain (Abb. 12).

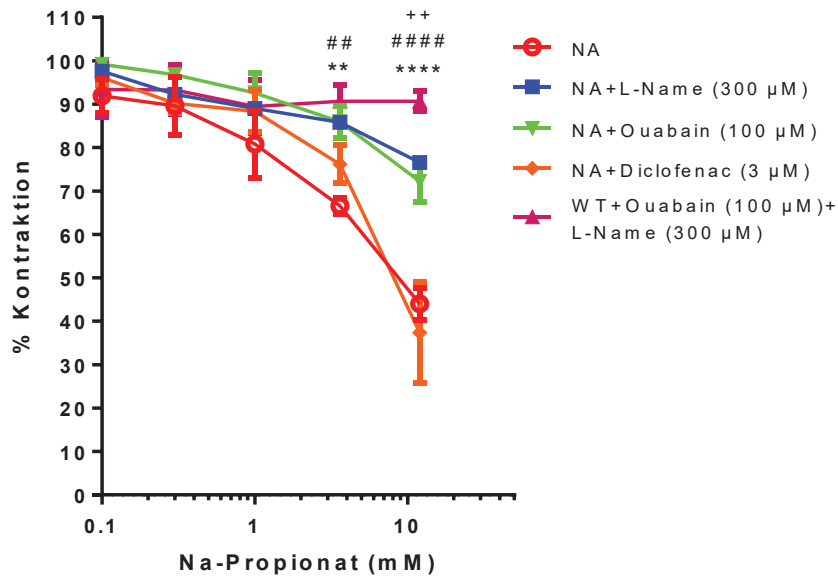


Abb. 12: Untersuchung des Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren in der isoliert perfundierten Niere

Na-Propionat löste eine dosisabhängige Vasodilatation nach Vorkontraktion mit NA aus. Diese wurde in Anwesenheit von L-Name und Ouabain vermindert. Eine Kombination beider Inhibitoren zeigte eine weitere, stärkere Inhibition als die Verwendung eines einzelnen Inhibitors. Diclofenac zeigte keinen Effekt auf die Na-Propionat-abhängige Vasodilatation. Jeweils $n=4$, ** = $p < 0,01$, **** = $p < 0,0001$ NA vs. NA+L-Name; ## = $p < 0,01$, #### = $p < 0,0001$ NA vs. Ouabain, ++= $p < 0,01$ NA+Ouabain+L-Name vs. NA+L-Name. Alle Punkte stellen den $MW \pm SEM$ dar.

Zur weiteren Untersuchung des Verhaltens kurzkettiger Fettsäuren im renalen Gefäßsystem wurden der selektive GPR41-Agonist AR420626 (0,01-10 µM) und der selektive GPR43-Agonist 4-CMTB (0,01-10 µM) in der isoliert perfundierten Niere verwendet.

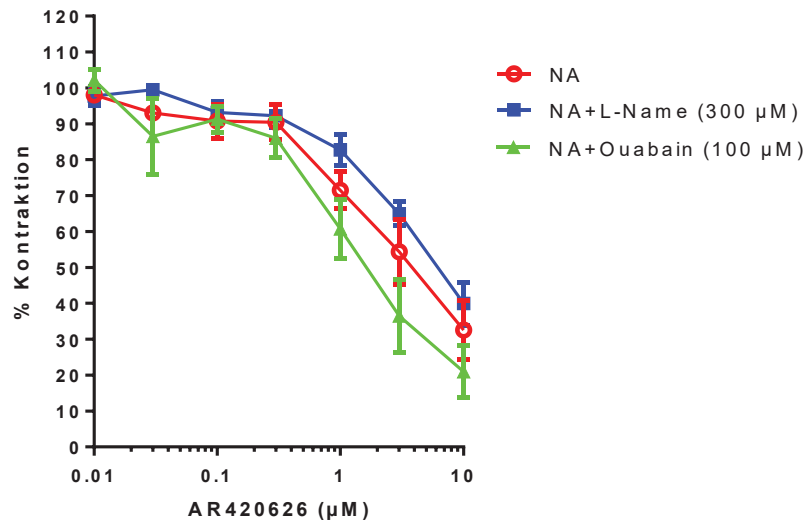
Beide Agonisten zeigten eine dosisabhängige Vasodilatation bei Vorkontraktion mit NA.

Bei Addition von L-Name zeigte AR420626 keine signifikante Einschränkung der Vasodilatation (Abb. 13A). Der vasodilatatorische Effekt von 4-CMTB hingegen ließ sich durch L-Name inhibieren (Abb. 13B).

Die Addition von Ouabain löste für beide Stoffe keine signifikante Inhibition der ausgelösten Vasorelaxation aus (Abb.13).

Somit ist davon auszugehen, dass GpR41 und GpR43 in renalen Gefäßen vorhanden sind, und hier an der Vasodilatation beteiligt sind. Es konnte nachgewiesen werden, dass GpR43 über einen NO-abhängigen Mechanismus wirkt, während der genaue Mechanismus von GpR41 unklar bleibt.

A)



B)

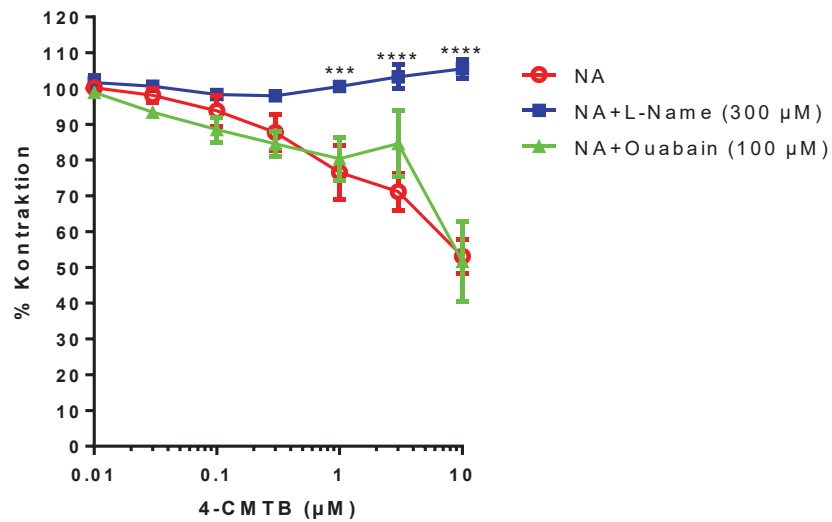


Abb. 13: Verhalten von AR420626 und 4-CMTB in der isoliert perfundierten Niere

Sowohl der GPR41-Agonist AR420626, als auch der GPR43-Agonist 4-CMTB lösten eine dosisabhängige Vasodilatation aus.

A) Bei Zugabe von L-Name zeigte AR420626 keine Inhibition

B) L-Name inhibierte die Wirkung von 4-CMTB deutlich.

Ouabain bewirkte bei beiden Agonisten keine signifikante Inhibition. Jeweils n=4, B) *** = p<0,001, **** = p<0,0001 NA vs. L-Name. Alle Punkte stellen den MW ± SEM dar

3.2.2 Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren in intestinalen Gefäßen

Der Wirkmechanismus kurzkettiger Fettsäuren in intestinalen Gefäßen wurde im isoliert perfundierten Darm untersucht. Wie in der isoliert perfundierten Niere zeigte Na-Propionat auch im Darm keinen vasokonstriktiven Effekt (nicht dargestellt).

Bei der Untersuchung des vasodilatatorischen Verhaltens im Darm zeigte sich überraschend ein Unterschied zum Verhalten in der Niere: Die Addition von L-Name (300 μ M) bewirkte im Darm eine schwächere, nicht signifikante Inhibition der ausgelösten Vasodilatation (Abb. 14). In der Niere zeigte sich eine stärkere, signifikante Einschränkung der Dilatation (Abb. 12).

Analog zur Niere zeigte sich auch im Darm eine signifikante Abschwächung der durch Na-Propionat hervorgerufenen Vasodilatation bei Einsatz von Ouabain (100 μ M). Die Zugabe von Diclofenac (3 μ M) zeigte auch im Darm keinen Effekt (Abb. 14).

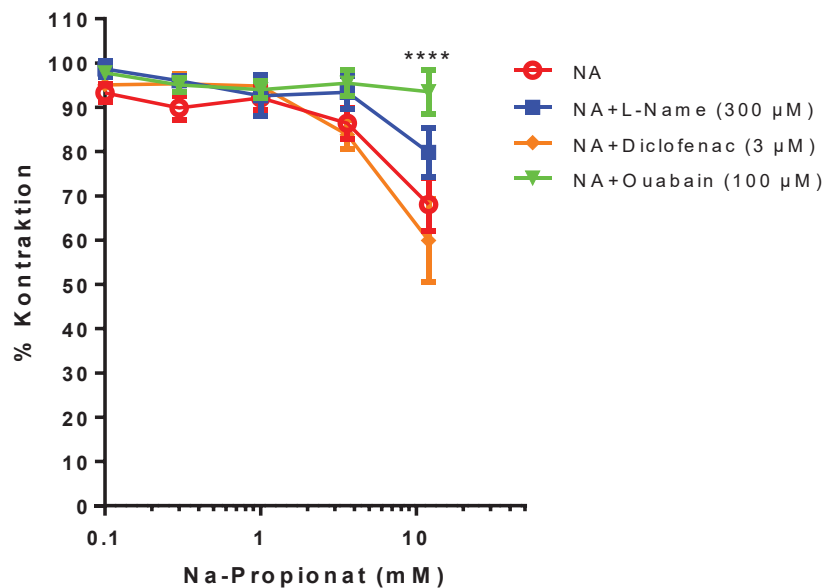


Abb. 14: Untersuchung des Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren im isoliert perfundierten Darm

Na-Propionat löste eine dosisabhängige Vasodilatation nach Vorkontraktion mit NA aus. Diese wurde signifikant durch Zugabe von Ouabain inhibiert. Bei Zugabe von L-Name zeigte sich eine Tendenz zur Inhibition, es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede. Zugabe von Diclofenac ergab keine Unterschiede. Jeweils $n=4$, **** $p<0,0001$ NA vs NA+Ouabain. Alle Punkte stellen den MW \pm SEM dar.

Bei Untersuchung des Verhaltens der Agonisten AR420626 (Gpr41) und 4-CMTB (Gpr43) zeigte sich wie in der Niere keine signifikante Inhibition in Anwesenheit von Ouabain bei beiden Agonisten. Ähnlich zur Niere war auch im Darm kein inhibitorischer Effekt von L-Name auf AR420626 feststellbar. Analog zur Niere bewirkte L-Name auch im Darm eine Inhibition der 4-CMTB-induzierten Vasodilatation (Abb. 15).

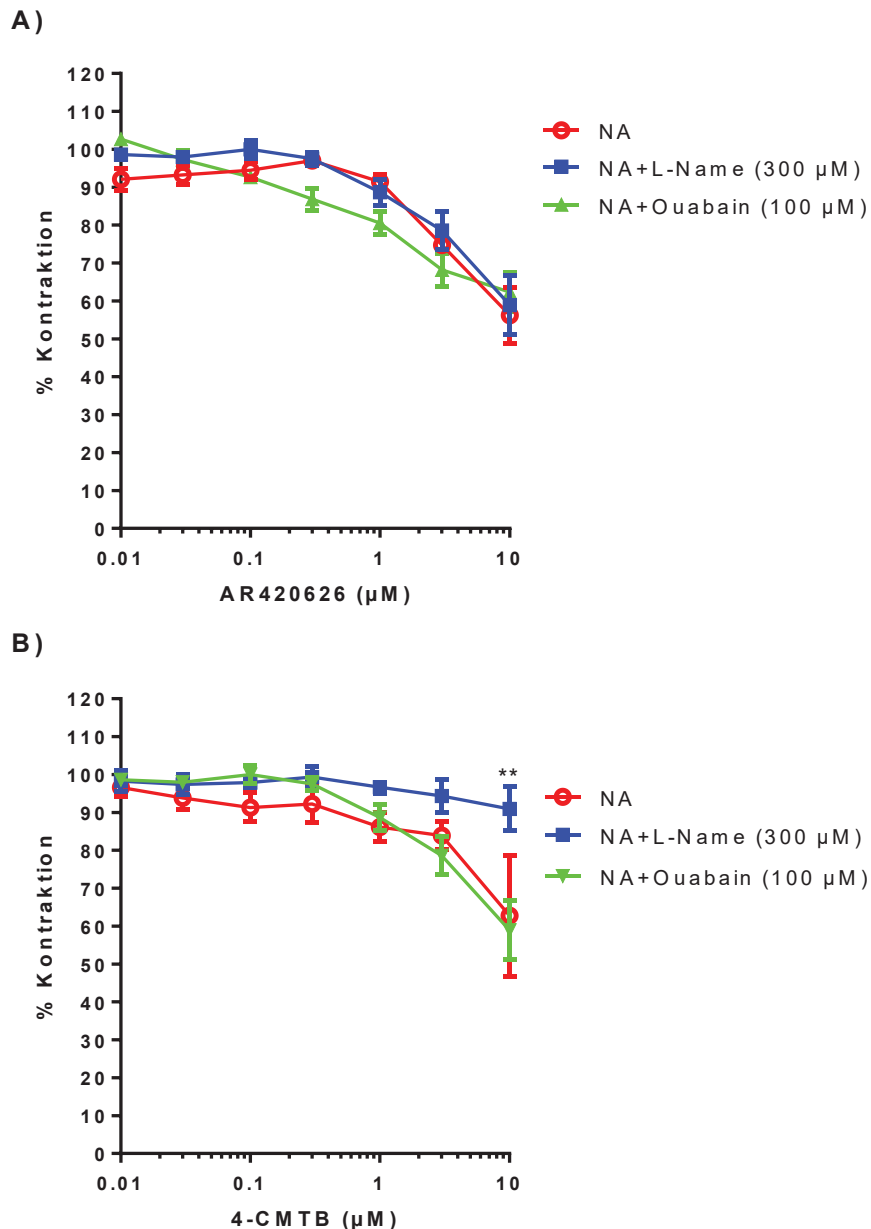


Abb. 15: Verhalten von AR420626 und 4-CMTB im isoliert perfundierten Darm

Sowohl der GPR41-Agonist AR420626, als auch der GPR43-Agonist 4-CMTB lösten eine signifikante, dosisabhängige Vasodilatation aus. Bei Zugabe von L-Name zeigte nur 4-CMTB eine signifikante Inhibition. Ouabain bewirkte bei beiden Agonisten keine signifikante Inhibition. Jeweils n=4, **=p<0,01 NA vs. L-Name. Alle Punkte stellen den MW ± SEM dar.

3.2.3 Expression der Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren in verschiedenen Gefäßen

Zur weiteren Vertiefung der Ergebnisse der isoliert perfundierten Niere und des isoliert perfundierten Darms wurde die Expressionsdichte der bekannten Rezeptoren für kurzkettige Fettsäuren (GpR41, GpR43, OlfR78) in der *Aorta abdominalis*, der *A. renalis sinistra*, und der *A. mesenterica superior* mittels *quantitativer real time PCR* bestimmt und verglichen.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von GPR41 in der *A. mesenterica superior* im Vergleich zur *A. renalis* (Abb. 16 A).

OlfR78 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in der *A. renalis* im Vergleich mit der Aorta und der *A. mesenterica*. Auch zeigte sich eine erhöhte Expression in der *A. mesenterica* im Vergleich zur Aorta (Abb. 16 C).

Interessanterweise überwog die OlfR78-Expression die GpR43-Expression in der *A. renalis* (MW 182,2 vs. 103,8). Die Expression von GpR43 fiel mit Mittelwerten zwischen 4,4 (Aorta) und 18,0 (*A. mesenterica superior*) kaum ins Gewicht.

Für GPR43 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression in den verschiedenen Gefäßen festgestellt werden (Abb. 16 B).

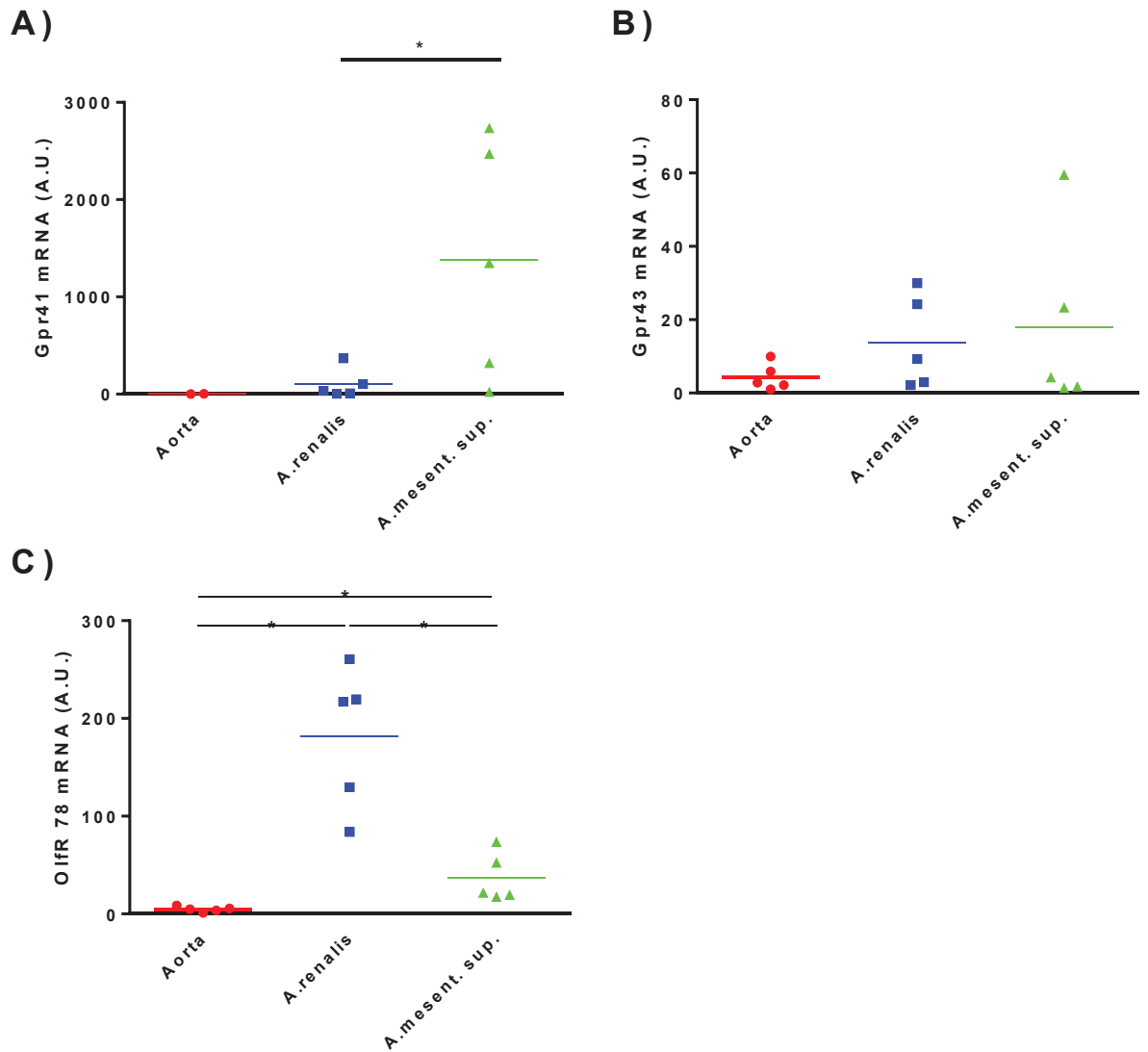


Abb. 16: Bestimmung der SCFA-Rezeptordichte in verschiedenen Gefäßen

(A) Bei der Bestimmung der Expressionsdichte des GpR41-Rezeptors konnte eine signifikant höhere Dichte in der *A. mesenterica* im Vergleich zur *A. renalis* festgestellt werden.
 (B) Für den GpR43-Rezeptor wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.
 (C) Der Olfr78 zeigte in der *A. renalis* eine höhere Expression als in *A. mesenterica superior* und Aorta, wobei die Expression in der *A. mesenterica* größer war als in der Aorta. *= $p < 0,5$. Multiple T-tests.

4. Diskussion

4.1 Kardiovaskuläre Entwicklung unter *Western Diet*

4.1.1 Entwicklung der Endothelfunktion *ex vivo*

Zur Prüfung der Entwicklung der Endothelfunktion bei Fütterung mit *Western Diet* wurden 8 Wochen alte WT- und ApoE-KO-Mäuse für 8 bzw. 12 Wochen mit *Western Diet* gefüttert. Anschließend wurde die renale Endothelfunktion mittels isoliert perfundierter Niere geprüft. Als Kontrolle dienten 8 Wochen alte, nicht mit *Western Diet* gefütterte Tiere.

Bei WT-Tieren konnte weder nach acht-, noch nach zwölfwöchiger Fütterung mit *Western Diet* eine signifikante Verschlechterung der renalen Endothelfunktion in der isoliert perfundierten Niere festgestellt werden. Die Ergebnisse der Bestimmung der flussvermittelten Vasodilatation (s.u.), sowie anderweitig veröffentlichte Untersuchungen an isolierten Aorten-Abschnitten mit längeren *Western Diet*-Fütterungsperioden (23 Wochen)[51] deuten aber darauf hin, dass die Fütterung mit *Western Diet* langfristig auch bei Wildtyp-Mäusen zu Endothelialer Dysfunktion führt.

In Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen [51, 52] zeigten 8 Wochen alte ApoE-KO-Tiere vor Fütterung mit *Western Diet* *ex vivo* Versuchen keine Anzeichen für Endotheliale Dysfunktion. Erst durch die Fütterung mit *Western Diet* zeigte sich eine signifikante Einschränkung der Endothelialen Vasorelaxation. Dieser Effekt wurde bereits an 10 Wochen alten ApoE-KO-Tieren beschrieben, welche für 25 Wochen mit WD gefüttert wurden [24], sowie an 9 Wochen alten Tieren nach einer fünföchigen Fütterung mit WD [21]. Auch sonst wurde in zahlreichen Veröffentlichungen eine abgeschwächte Endothelfunktion bei ApoE-KO-Tieren nach Fütterung mit *Western Diet* festgestellt [23, 25, 27, 53-56], wobei hier weder auf den zeitlichen Verlauf eingegangen wurde, noch ein Vergleich mit normaler Nahrung gezogen wurde. Weiterhin wurde in Untersuchungen zur Endothelfunktion bei ApoE-KO-Mäusen ohne Belastung

durch WD keine Endotheliale Dysfunktion festgestellt[52, 57], wobei auch in den hier zitierten Arbeiten keine Vergleiche zur Belastung mit WD gezogen wurden. Die hier *ex vivo* gewonnenen Daten unterstützen also die vorangegangenen Veröffentlichungen, nach welchen eine messbare Endotheliale Dysfunktion erst durch die doppelte Belastung aus ApoE-KO und WD entsteht.

Auch die tendenziell verringerten Nitrat-Spiegel im Urin der ApoE-KO-Mäuse deuten auf eine verminderte NO-Verfügbarkeit, und damit auf eine verstärkte Endotheliale Dysfunktion im Laufe der Western-Diet-Fütterung hin.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Entwicklung der endothelunabhängigen Vasodilatation belegen, dass die erkennbaren Verschlechterungen der Vasodilatation nicht auf einer Veränderung der Funktion der glatten Muskelzellen der *Tunica muscularis* (zum Beispiel im Rahmen eines verstärkten cGMP-Abbaus oder einer Veränderung der Guanylatcyclase-Aktivität) beruhen.

4.1.2 Entwicklung der Endothelfunktion *in vivo*

Die flussvermittelte Vasodilatation ist eine klinisch gut etablierte Methode zur Diagnostik und Verlaufskontrolle Endothelialer Dysfunktion. Mit Ihrer Hilfe werden kardiovaskuläre Erkrankungen noch vor Auftreten erster klinischer Symptome erfasst, weshalb sie einen immer größeren klinischen Stellenwert genießt. [16]

Überraschend zeigte sich bei der Bestimmung der flussvermittelten Vasodilatation bereits früher, nämlich schon vor Belastung durch *Western Diet*, eine deutlich schlechtere Endotheliale Vasorelaxation bei ApoE-KO-Mäusen. Diese verschlechterte sich auch nach langzeitiger *Western Diet*-Fütterung nicht signifikant weiter.

Bei WT-Tieren zeigte sich nach 16-wöchiger Fütterung mit *Western Diet* eine starke Verschlechterung der Endothelfunktion. Dies steht im Gegensatz zur isoliert perfundierten Niere, wo 12-wöchige Fütterung mit *Western Diet* keine signifikante Verschlechterung der Endothelialen Dysfunktion bewirkte.

Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Bestimmung Endothelialer Dysfunktion *ex vivo* und *in vivo* lässt am ehesten auf eine höhere Sensitivität der flussvermittelten Vasodilatation für Frühstadien der Endothelialen Dysfunktion im Vergleich zu den etablierten *ex vivo* Methoden schließen.

Da die Messung der flussvermittelten Vasodilatation eine relativ neue Methode zur Bestimmung der Endothelialen Dysfunktion im Mausmodell ist[50], gibt es bisher wenige Erkenntnisse zur Sensitivität der Methode bei der Erfassung Endothelialer Dysfunktion. Hier sind in Zukunft weitere Untersuchungen von Nöten, um die Sensitivität der flussvermittelten Vasodilatation mit anderen etablierten Methoden zu vergleichen. So ist zum Beispiel von Interesse, wie sich die Sensitivität der flussvermittelten Vasodilatation (welche an Widerstandsgefäßen bestimmt wird) mit Methoden zur Bestimmung der Endothelialen Dysfunktion an elastischen Gefäßen vergleichen lässt. Als geeignete Vergleichsmethode stände zum Beispiel die Aortenring-Kontraktion im Organbad zur Verfügung. Der hohe Stellenwert der flussvermittelten Vasodilatation als diagnostische Möglichkeit beim Menschen lässt aber auf eine ebenso gute Anwendbarkeit im Mausmodell hoffen.

Von diesen Ergebnissen ausgehend muss die Rolle der *Western Diet* in der Entstehung Endothelialer Dysfunktion bei jungen ApoE-KO-Mäusen hinterfragt werden. Die bisher veröffentlichten Daten weisen darauf hin, dass erst durch Fütterung mit *Western Diet* oder in relativ hohem Alter Endotheliale Dysfunktion entsteht[24, 29]. Auch die in dieser Arbeit vorgestellten *ex vivo* gewonnenen Daten legen diese Schlussfolgerung nahe.

Die Ergebnisse der flussvermittelten Vasodilatation deuten im Gegensatz dazu aber darauf hin, dass bereits das alleinige Fehlen von ApolipoproteinE eine *in vivo* relevante Endotheliale Dysfunktion in jungen Mäusen verursacht, und nicht erst die kombinierte Belastung durch Genotyp plus *Western Diet* oder hohes Alter.

Die vorherrschende Endotheliale Dysfunktion wird in ApoE-KO-Tieren am ehesten durch erhöhte Cholesterin-, VLDL-, und LDL-Spiegel ausgelöst. Diese herrschen bei ApoE-KO-Mäusen bereits unter Standard-Ernährung vor[18, 19]

Die Etablierung der flussvermittelten Vasodilatation als potenziell sensitiverer Früherkennung muriner Endothelialer Dysfunktion eröffnet somit aufregende neue Möglichkeiten für die weitere Erforschung der Entstehung Endothelialer Dysfunktion im Tiermodell.

4.1.3 Entwicklung des Blutdrucks unter *Western diet*

Beim Menschen besteht eine eindeutige Korrelation zwischen dem Auftreten von arterieller Hypertonie und dem Auftreten von Endothelialer Dysfunktion[58]. Im Tiermodell führt eine genetisch[59] oder pharmakologisch[60] herbeigeführte Schwäche der NO-abhängigen Vasodilatation (also eine Form der Endothelialen Dysfunktion) zu arterieller Hypertonie. Hinweise hierfür finden sich auch in Tests am Menschen[61, 62]. Umgekehrt führt im Tiermodell aber auch ein genetisch[63] oder durch Nephrektomie[64] induzierter arterieller Hypertonus im Verlauf zu Endothelialer Dysfunktion. Ob also Endotheliale Dysfunktion ein Auslöser für Hypertonus ist oder ob die durch den hypertensiven Druck veränderte Hämodynamik mit vermehrter Druckbelastung und stärkeren Scherkräften das Endothel überhaupt erst schädigt, ist unklar.

Eine Veränderung der Hämodynamik, wie sie zum Beispiel an einer Gefäßgabelung auftritt, ist ebenfalls ein anerkannter Faktor für die Entstehung von Atherosklerose[65]. Dieser kann in diesem Falle allerdings vernachlässigt werden, da alle Versuche an den gleichen Gefäßen, und unter vergleichbaren hämodynamischen Bedingungen durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen sowohl im KO-Modell, als auch bei Wildtyp-Tieren eine Endotheliale Dysfunktion nach. Im gleichen Beobachtungszeitraum wurde allerdings keine arterielle Hypertonie nachgewiesen. Somit kann eine alleinige hypertensive Schädigung als Ursache für die aufgetretene Endotheliale Dysfunktion ausgeschlossen werden.

Bezüglich des Zusammenspiels der Entstehung von Hypertonie und Endothelialer Dysfunktion legen die hier diskutierten Ergebnisse nahe, dass die Entstehung Endothelialer Dysfunktion zeitlich vor der Entstehung einer arteriellen Hypertonie liegen. Diese Ergebnisse sind durch eine geringe Versuchstierzahl und eine hohe Ausscheidensrate im Versuchsverlauf der invasiven Blutdruckmessung kritisch zu betrachten.

Die Frage, ob Endotheliale Dysfunktion einem arteriellen Hypertonus vorweg geht lässt sich mit den erhobenen Daten leider nicht beantworten, da im Beobachtungszeitraum keine Hypertonie auftrat. Betrachtet man aber die in der Literatur beschriebene Korrelation von Hypertonie und Endothelialer Dysfunktion

beim Menschen[61, 62] und das Auftreten von arterieller Hypertonie und Endothelialer Dysfunktion bei 7,5 Monate alten, nicht mit *Western Diet* behandelten ApoE-KO-Tieren[29], so erscheint ein Auftreten von hypertensiven Blutdrücken bei längerer Belastung durch *Western Diet* und zunehmendem Alter wahrscheinlich. Dies würde für die Hypothese sprechen, dass Endotheliale Dysfunktion nicht nur der Atherosklerose, sondern auch der Hypertonie voraus geht.

Gerade über die Entwicklung von Hypertonie bei ApoE-KO-Mäusen wird kontrovers diskutiert. Viele Untersuchungen zeigten sowohl mit als auch ohne zusätzliche Belastung durch *Western Diet* keine Entwicklung eines systemischen Hypertonus[21, 22, 25-27]. Andere Veröffentlichungen wiederum zeigen die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bei diesen Tieren[30].

Die hier vorgelegten Ergebnisse weisen keinen Zusammenhang zwischen arteriellem Hypertonus und Endothelialer Dysfunktion bei ApoE-KO-Mäusen nach. Schon vor Fütterung mit *Western Diet* findet sich *in vivo* eine deutliche Endotheliale Dysfunktion, welche im weiteren Verlauf auch *ex vivo* nachweisbar ist. Ein arterieller Hypertonus besteht zu keinem Zeitpunkt. Diese Ergebnisse entsprechen der Mehrheit der veröffentlichten Studien mit Tieren in ähnlichem Alter[21, 22, 25-27].

Somit widersprechen die Ergebnisse einer Veröffentlichung, in welcher bei jungen ApoE-KO-Mäusen eine Hypertonie mit einer Erhöhung des (durch alle Versuchstiere gemittelten) systolischen Blutdrucks um 23,7 mmHg [30] nachgewiesen wurde. Auch die dort beschriebene Aufhebung des physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus konnte nicht festgestellt werden. Leider lässt sich der Grund für diese gegensätzlichen Beobachtungen zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklären.

4.2 Endotheliale Mechanismen kurzkettiger Fettsäuren

4.2.1 Organabhängiger Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren

Bei Applikation von Na-Propionat in der isoliert perfundierten Niere zeigte sich eine Vasodilatation. Diese ließ sich nicht durch den COX-Hemmer Diclofenac hemmen, allerdings zeigte sich eine Inhibition durch den eNOS-Inhibitor L-NAME und den Na⁺-K⁺-ATPase Inhibitor Ouabain. Somit ist von einer NO- und eine EDHF-abhängige Komponente der ausgelösten Vasodilatation auszugehen, während es keinen Anhalt für eine Prostaglandin-abhängige Vasodilatation gibt. Die Kombination von NO- und EDHF-Blockern sorgte für eine stärkere Inhibition als die einzelnen Präparate. Es ist somit davon auszugehen, dass sich beide Mechanismen funktionell ergänzen.

Diese Ergebnisse widersprechen jenen der einzigen anderen veröffentlichten Untersuchung zum Mechanismus der Vasorelaxation durch kurzkettige Fettsäuren, welche an *Aa. Mesenterica superiores* von Mäusen lediglich einen EDHF-abhängigen Mechanismus der Vasodilatation feststellt und einen NO-abhängigen Mechanismus ausschließt[48].

Um diesem Widerspruch zwischen Literatur und eigenen Ergebnissen auf den Grund zu gehen testeten wir die Vasodilatation durch Propionat am isoliert perfundierten Darm. Hier zeigte sich interessanterweise ein Unterschied zur isoliert perfundierten Niere: Während weiterhin eine eindeutige EDHF-Abhängigkeit der induzierten Vasodilatation nachzuweisen war, konnte höchstens eine abgeschwächte (aber nicht signifikante) NO-Abhängigkeit nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen somit jenen aus der Literatur.

Leider waren bei allen hier diskutierten Versuchen sehr hohe Na-Propionat-Konzentrationen nötig, um eine relevante Vasorelaxation auszulösen. Während Knock et al. alle Versuche bei einer Na-Propionat-Konzentration von 10 mmol/l durchführten, lösten auch in den hier veröffentlichten Daten Na-Propionat-Konzentrationen ab 1 mmol/l Na-Propionat eine relevante Vasorelaxation aus.

Inwiefern die hohen SCFA-Konzentrationen einen Einfluss auf die vorgelegten Ergebnisse haben wird der Gegenstand weiterer Untersuchungen sein müssen. Zur Erklärung dieser unterschiedlichen Mechanismen an verschiedenen Organen stellten wir die Hypothese auf, dass die verschiedenen SCFA-Rezeptoren unterschiedliche Mechanismen der Vasodilatation aktivieren.

Durch die unterschiedlich starke Expression der verschiedenen Rezeptoren an verschiedenen Organen erklären sich so die unterschiedlichen Inhibitionsmuster an Darm und Niere: Am Darm wird vor allem ein Rezeptor exprimiert, welcher einen EDHF-abhängigen Mechanismus aktiviert. An der Niere wiederum werden zwei Rezeptoren exprimiert, welche jeweils einen EDHF- oder NO-abhängigen Mechanismus aktivieren.

Tatsächlich unterstützt unsere Untersuchung der Rezeptorexpression diese These: Während in der *A. mesenterica superior* die Expression des GpR41-Rezeptors überwiegt, dominiert in der *A. renalis* die Expression des Olfr78-Rezeptors.

Diese Ergebnisse decken sich mit bereits veröffentlichten Ergebnissen, in welchen ebenfalls eine vermehrte Expression von GpR41 in peripheren Widerstandsgefäßen, und eine vermehrte Expression von Olfr78 in renalen Gefäßen festgestellt wurde[37].

Die Expression von GpR43 ist in allen drei Organen ähnlich hoch und fällt generell weitaus geringer aus als die Expression von GpR41 und Olfr78. Somit ist der Stellenwert des GpR43-Rezeptors in der SCFA-induzierten Vasodilatation vermutlich gering.

4.2.2 Mechanismus der verschiedenen Rezeptoren kurzkettiger Fettsäuren

Zur Prüfung der Signalwege der verschiedenen Rezeptoren der kurzkettigen Fettsäuren wurden der GpR41-Agonist AR420626[66] und der GpR43-Agonist 4-CMTB [67] verwendet.

Der einzige bekannte Agonist am Olfr78-Rezeptor neben den kurzkettigen Fettsäuren ist Laktat[68], welches sich wegen seiner zahlreichen vaskulären Wirkungen nicht zur Untersuchung der Rezeptorfunktion eignet.

Die Prüfung des Mechanismus des GpR41-Rezeptors mittels AR420626 ergab in den verwendeten Dosierungen keinen Nachweis eines endothelabhängigen Mechanismus der Vasorelaxation. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass die Aktivierung des GpR41-Rezeptors durch AR420626 einen in den hier durchgeführten Versuchen nicht berücksichtigten (zum Beispiel endothelunabhängigen) Mechanismus triggert. Zur Klärung des genauen Mechanismus des GpR41-Rezeptors sind also weitere Untersuchungen nötig.

Im Gegensatz zu den unklaren Ergebnissen bei der Untersuchung des GpR41-induzierten Mechanismus zeigte sich bei Aktivierung von GpR43 eine eindeutig NO-abhängige Vasodilatation. Hierbei ist jedoch die Frage, inwiefern diese physiologisch ins Gewicht fällt, da die Expression von GpR43 in den Widerstandsgefäßen weit hinter jener von GpR41 und OlfR78 zurückbleibt. Hier wäre die Untersuchung des Phänotyps GpR43-defizienter Mäuse von Interesse. Der durch OlfR78 aktivierte Mechanismus ließ sich wegen fehlender Agonisten leider nicht direkt erforschen. Da allerdings weder GpR41 noch GpR43 einen EDHF-abhängigen Mechanismus auslösen ist zu mutmaßen, dass dieser durch die Bindung kurzkettiger Fettsäuren an den OlfR78-Rezeptor ausgelöst wird. Gegen diese Hypothese spricht allerdings die vermehrte Expression von OlfR78 in renalen Gefäßen, in welchen auch ein NO-abhängiger Mechanismus nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend erweitern die hier vorgelegten Ergebnisse das bisher bekannte Wissen um den Mechanismus der Vasodilatation kurzkettiger Fettsäuren. Der bisher gültigen Annahme einer reinen EDHF-abhängigen Vasodilatation[48] muss teilweise widersprochen werden, da zumindest in den Gefäßbetten einzelner Organe auch eine NO-abhängige Vasodilatation auftritt. Diese scheint durch eine Aktivierung des GpR43-Rezeptors vermittelt zu werden. Der Mechanismus des GpR41-Rezeptors bleibt unklar, wobei eine alleinige Aktivierung dieses Rezeptors ebenfalls eine Vasodilatation auslöst.

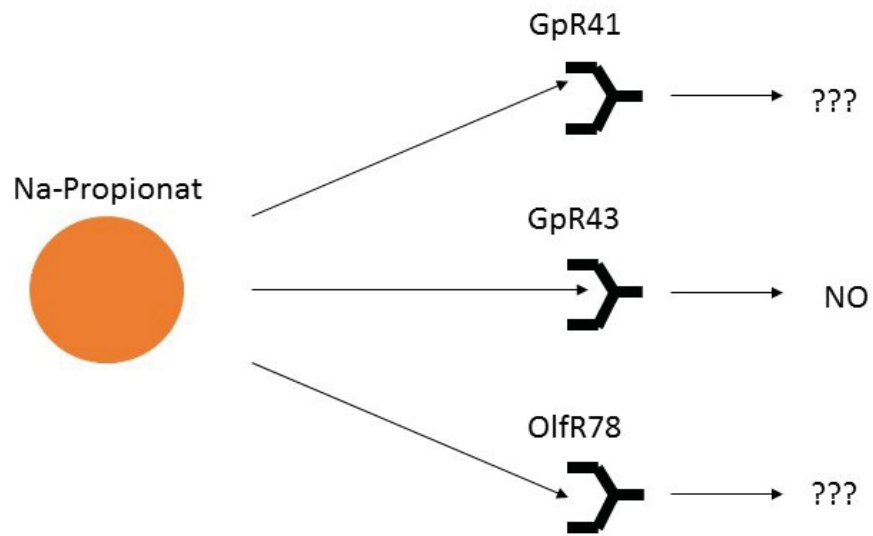


Abb. 17: Mechanismen der SCFA-Rezeptoren

Während der durch GpR41 und OlfR78 ausgelöste Mechanismus unklar bleibt, löst die Aktivierung von GpR43 einen NO-abhängigen Mechanismus aus.

5. Schlussfolgerung

Die Relevanz der Ernährung als wichtiger Faktor in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist bereits seit langem bekannt. In dieser Arbeit sollten speziell ein Beispiel für Ernährung als Schutz- und ein Beispiel für Ernährung als Risikofaktor vaskulärer Erkrankungen untersucht werden. Hierbei ergaben sich einige interessante Ergebnisse.

Bei der Untersuchung Endothelialer Dysfunktion unter *Western Diet* konnten dank der Ergebnisse der flussvermittelten Vasodilatation Hinweise gesammelt werden, dass ApoE-KO-Mäuse bereits früher als bisher bekannt eine funktionell relevante Endotheliale Dysfunktion entwickeln. Auch konnte der Stellenwert der Bestimmung der flussvermittelten Vasodilatation als sensitivere Methode zur Erkennung Endothelialer Dysfunktion aufgezeigt werden.

Es konnten weitere Erkenntnisse zum Zusammenspiel von Endothelialer Dysfunktion und arterieller Hypertonie gesammelt werden, wobei die hier vorgelegten Ergebnisse darauf hinweisen, dass eine Schädigung des Endothels zeitlich der Entstehung eines Hypertonus voraus geht.

Bei der Untersuchung des Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren konnte die bisherige Annahme, dass kurzkettige Fettsäuren lediglich eine EDHF-abhängige Vasodilatation auslösen, widerlegt werden. Stattdessen konnten Beweise für einen komplexeren, je nach Rezeptor und Organ divergierenden Mechanismus angeführt werden. Zum endgültigen, vollständigen Verständnis des Mechanismus kurzkettiger Fettsäuren ist allerdings weitere Forschung, zum Beispiel an KO-Tiermodellen, nötig.

6. Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. *The top 10 causes of death*. 2018 24.5.2018 24.5.2018]; Available from: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
2. Statistisches Bundesamt, *Todesursachen in Deutschland 2015*, in Destatis 2017.
3. World Heart Federation. *Risk Factors Fact Sheet*. 2018 [cited 2018 2.6.2018]; Available from: <https://www.world-heart-federation.org/resources/risk-factors/>.
4. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
5. Halcox, J.P., et al., *Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction*. Circulation, 2002. **106**(6): p. 653-8.
6. Schachinger, V., M.B. Britten, and A.M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
7. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. Ii27-32.
8. Ozkor, M.A. and A.A. Quyyumi, *Endothelium-derived hyperpolarizing factor and vascular function*. Cardiol Res Pract, 2011. **2011**: p. 156146.
9. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *EDHF: an update*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(4): p. 139-55.
10. Campbell, W.B. and D.R. Harder, *Prologue: EDHF--what is it?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2413-6.
11. Zygmunt, P.M. and E.D. Hogestatt, *Role of potassium channels in endothelium-dependent relaxation resistant to nitroarginine in the rat hepatic artery*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(7): p. 1600-6.
12. Edwards, G., et al., *K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 269-72.
13. John, S., et al., *Increased bioavailability of nitric oxide after lipid-lowering therapy in hypercholesterolemic patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind study*. Circulation, 1998. **98**(3): p. 211-6.
14. Vita, J.A., et al., *Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 491-7.
15. Schachinger, V., et al., *A positive family history of premature coronary artery disease is associated with impaired endothelium-dependent coronary blood flow regulation*. Circulation, 1999. **100**(14): p. 1502-8.
16. Frick, M., et al., *Flussvermittelte vasodilatation (FMD) der arteria brachialis: methodik und klinischer stellenwert*. Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology, 2002. **9**(10): p. 439-444.
17. Jawien, J., P. Nastalek, and R. Korbut, *Mouse models of experimental atherosclerosis*. J Physiol Pharmacol, 2004. **55**(3): p. 503-17.
18. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
19. Meyrelles, S.S., et al., *Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 211.
20. Surra, J.C., et al., *Sex as a profound modifier of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice with different genetic backgrounds*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(7): p. 712-21.
21. Johansson, M.E., et al., *Haemodynamically significant plaque formation and regional endothelial dysfunction in cholesterol-fed ApoE^{-/-} mice*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(6): p. 531-8.

22. Wassmann, S., et al., *Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice.* *Circulation*, 2004. **110**(19): p. 3062-7.
23. Jiang, F., A.P. Gibson, and G.J. Dusting, *Endothelial dysfunction induced by oxidized low-density lipoproteins in isolated mouse aorta: a comparison with apolipoprotein-E deficient mice.* *Eur J Pharmacol*, 2001. **424**(2): p. 141-9.
24. Yaghoubi, M., et al., *Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice.* *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. **36**(6): p. 751-7.
25. Barton, M., et al., *Endothelin ETA receptor blockade restores NO-mediated endothelial function and inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(24): p. 14367-72.
26. Gervais, M., et al., *Fluvastatin prevents renal dysfunction and vascular NO deficit in apolipoprotein E-deficient mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(2): p. 183-9.
27. Tesanovic, S., et al., *Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(8): p. 1606-13.
28. Greig, F.H., et al., *The hypotensive effect of acute and chronic AMP-activated protein kinase activation in normal and hyperlipidemic mice.* *Vascul Pharmacol*, 2015. **74**: p. 93-102.
29. Yang, R., et al., *Hypertension and endothelial dysfunction in apolipoprotein E knockout mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(11): p. 2762-8.
30. Pelat, M., et al., *Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E-/- mice in vivo.* *Circulation*, 2003. **107**(19): p. 2480-6.
31. Diamant, M., E.E. Blaak, and W.M. de Vos, *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* *Obes Rev*, 2011. **12**(4): p. 272-81.
32. Mortensen, F.V., et al., *Short chain fatty acids dilate isolated human colonic resistance arteries.* *Gut*, 1990. **31**(12): p. 1391-1394.
33. Nutting, C.W., S. Islam, and J.T. Daugirdas, *Vasorelaxant effects of short chain fatty acid salts in rat caudal artery.* *Am J Physiol*, 1991. **261**(2 Pt 2): p. H561-7.
34. Khalesi, S., et al., *Effect of probiotics on blood pressure: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials.* *Hypertension*, 2014. **64**(4): p. 897-903.
35. Whelton, S.P., et al., *Effect of dietary fiber intake on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled clinical trials.* *J Hypertens*, 2005. **23**(3): p. 475-81.
36. Holmes, E., et al., *Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure.* *Nature*, 2008. **453**(7193): p. 396-400.
37. Pluznick, J.L., et al., *Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(11): p. 4410-5.
38. Le Poul, E., et al., *Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(28): p. 25481-9.
39. Brown, A.J., et al., *The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(13): p. 11312-9.
40. Thangaraju, M., et al., *GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon.* *Cancer Res*, 2009. **69**(7): p. 2826-32.
41. Ohira, H., W. Tsutsui, and Y. Fujioka, *Are Short Chain Fatty Acids in Gut Microbiota Defensive Players for Inflammation and Atherosclerosis?* *J Atheroscler Thromb*, 2017. **24**(7): p. 660-672.

42. Miyamoto, J., et al., *Anti-Inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects of Free Fatty Acid Receptors*. *Handb Exp Pharmacol*, 2017. **236**: p. 221-231.
43. Natarajan, N., et al., *Microbial short chain fatty acid metabolites lower blood pressure via endothelial G-protein coupled receptor 41*. *Physiol Genomics*, 2016: p. physiolgenomics.00089.2016.
44. Pluznick, J., *A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation*. *Gut Microbes*, 2014. **5**(2): p. 202-7.
45. Aaronson, P.I., W. McKinnon, and L. Poston, *Mechanism of butyrate-induced vasorelaxation of rat mesenteric resistance artery*. *Br J Pharmacol*, 1996. **117**(2): p. 365-71.
46. McKinnon, W., et al., *Mechanism of lactate-induced relaxation of isolated rat mesenteric resistance arteries*. *J Physiol*, 1996. **490 (Pt 3)**: p. 783-92.
47. Omar, H.A., et al., *O₂-dependent modulation of calf pulmonary artery tone by lactate: potential role of H₂O₂ and cGMP*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(2 Pt 1): p. L141-5.
48. Knock, G., et al., *Propionate-induced relaxation in rat mesenteric arteries: a role for endothelium-derived hyperpolarising factor*. *J Physiol*, 2002. **538**(Pt 3): p. 879-90.
49. Schweda, F., et al., *Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(4): p. F770-7.
50. Schuler, D., et al., *Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(12): p. 2651-7.
51. Deckert, V., et al., *Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by high-fat feeding in ApoE-deficient mice: toward normalization by human ApoA-I expression*. *Circulation*, 1999. **100**(11): p. 1230-5.
52. Bonthu, S., et al., *Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(11): p. 2333-40.
53. Benko, R., et al., *Restoration of the endothelial function in the aortic rings of apolipoprotein E deficient mice by pharmacological inhibition of the nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase*. *Life Sci*, 2004. **75**(10): p. 1255-61.
54. Pellegrin, M., et al., *New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E-deficient mice*. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(1): p. 35-42.
55. Custodis, F., et al., *Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2008. **117**(18): p. 2377-87.
56. Yang, G., et al., *Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice*. *Pflugers Arch*, 2018. **470**(4): p. 661-667.
57. Fransen, P., et al., *Endothelial function in aorta segments of apolipoprotein E-deficient mice before development of atherosclerotic lesions*. *Pflugers Arch*, 2008. **455**(5): p. 811-8.
58. Panza, J.A., et al., *Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension*. *N Engl J Med*, 1990. **323**(1): p. 22-7.
59. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
60. Guarasci, G.R. and R.L. Kline, *Pressure natriuresis following acute and chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats*. *Am J Physiol*, 1996. **270**(2 Pt 2): p. R469-78.
61. Taddei, S., et al., *Endothelium-dependent forearm vasodilation is reduced in normotensive subjects with familial history of hypertension*. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 1992. **20 Suppl 12**: p. S193-5.

62. Panza, J.A., et al., *Effect of antihypertensive treatment on endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension*. J Am Coll Cardiol, 1993. **21**(5): p. 1145-51.
63. Waeckel, L., et al., *Vascular dysfunctions in the isolated aorta of double-transgenic hypertensive mice developing aortic aneurysm*. Pflugers Arch, 2015. **467**(9): p. 1945-63.
64. Silva, G.C., et al., *Endothelial dysfunction in DOCA-salt-hypertensive mice: role of neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide*. Clin Sci (Lond), 2016. **130**(11): p. 895-906.
65. Peiffer, V., S.J. Sherwin, and P.D. Weinberg, *Computation in the rabbit aorta of a new metric - the transverse wall shear stress - to quantify the multidirectional character of disturbed blood flow*. J Biomech, 2013. **46**(15): p. 2651-8.
66. Nohr, M.K., et al., *GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes*. Endocrinology, 2013. **154**(10): p. 3552-64.
67. Ang, Z., et al., *Human and mouse monocytes display distinct signalling and cytokine profiles upon stimulation with FFAR2/FFAR3 short-chain fatty acid receptor agonists*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34145.
68. Mosienko, V., et al., *Rodents and humans are able to detect the odour of L-Lactate*. PLoS One, 2017. **12**(5): p. e0178478.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Zunächst möchte ich PD Dr. Johannes Stegbauer für die Überlassung dieses spannenden Themas, vor allem aber für die unermüdliche und unerschütterliche Unterstützung in allen Phasen dieses Projekts meinen größtmöglichen Dank aussprechen. Auch Prof. Dr. Philipp Albrecht und Prof. Dr. Lars Christian Rump möchte ich für ihren Einsatz als Zweitkorrektor und als Laborleiter danken..

Ein besonderer Dank geht auch an die deutsche Forschungsgesellschaft und speziell an den deutschen Sprecher des IRTG1902, Prof. Dr. Axel Gödecke, für die Aufnahme in ihr Graduiertenkolleg. Hier möchte ich auch Dr. Sandra Berger, Janett Schindler und allen Stipendiaten für ihre Unterstützung danken.

Christina Schwandt, Blanka Duvnjak und Nicola Kuhr möchte ich für die tägliche fachliche Anleitung und Unterstützung in allen (Labor-)Lebenslagen von ganzem Herzen danken. Ohne Euch wäre diese Dissertation nicht möglich gewesen.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, speziell Dr. Lydia Hering, Dr. Guang Yang, Mina Yakoub, Masodur Rahman, Dr. Manuel Thieme und Dr. Henning Hoch möchte ich ebenso für eine tolle Zeit und tatkräftige Unterstützung danken wie Dr. Raphael Haase, Dr. Esther Reimer, Dr. Eric Seidel, Lukas Heimann, Clara Porwoll, Aida Bajrakterivic, Dr. Eva Königshausen, Dr. Sebastian Potthoff, Andrea Seiwert und allen anderen Mitgliedern der experimentellen Nephrologie.

Auch möchte ich meinen Freundinnen und Freunden, Wegbegleiterinnen und Wegbegleitern danken, die mir auch dann die Treue gehalten haben, wenn ich wieder einmal einen Termin absagen musste, um ins Labor zu gehen, oder mich aufgebaut haben, wenn ich eine schlechte Phase hatte.

Speziell möchte ich meiner Frau Theresa danken. Du bist meine Stütze in der Welt.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Andrea und Hans-Werner Höges danken. Ohne Eure Unterstützung und Förderung seit meiner Geburt hätte ich es niemals geschafft, Arzt zu werden oder eine Dissertation zu verfassen, und dafür werde ich Euch ewig dankbar sein. Euch widme ich diese Dissertation.