

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. Malte Kelm

**Auswirkung kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die erythrokrine Funktion im
Ischämie-/ Reperfusionsschaden am Langendorff-Transfermodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Luise Möllhoff

2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Christian Jung

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Meinen Großeltern zum Dank.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Muessig, J. M., Kaya, S., Moellhoff, L., Noelle, J., Hidalgo Pareja, L., Masyuk, M., Gerdes, N., Pernow, J., Kelm, M. & Jung, C. 2020. A Model of Blood Component-Heart Interaction in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 25, 164-173.

Muessig, J. M., Moellhoff, L., Noelle, J., Kaya, S., Hidalgo Pareja, L., Masyuk, M., Roden, M., Kelm, M. & Jung, C. 2020. Poor glycemic control impairs the cardioprotective effects of red blood cells on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Nitric Oxide*, 97, 1-10.

Zusammenfassung

Der ischämische Myokardinfarkt, verursacht durch den Verschluss eines koronaren Gefäßes, ist weltweit eine der führenden Todesursachen. Doch auch die Reperfusion nach interventioneller Revaskularisierung verursacht Schäden am Myokard. Im Zusammenhang mit diesen sogenannten Ischämie-/ Reperfusionsschäden (I/R-Schäden) kann Stickstoffmonoxid (NO) kardioprotektiv wirken. Eine endogene Hauptquelle des NO ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die zur NO-Produktion ebenso wie die Arginase das Substrat L-Arginin verwendet. Im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion ist die Arginase-Aktivität gesteigert, wodurch der eNOS weniger Substrat für die NO-Produktion zur Verfügung steht. Neben den Endothelzellen werden beide Enzyme auch in Erythrozyten (RBCs) exprimiert.

In dieser Arbeit sollte die Wirkung humaner RBCs auf murine Herzen in einem *ex vivo* Langendorff-Transfermodell untersucht und die Interaktion der eNOS und Arginase in RBCs genauer charakterisiert werden. Zudem sollte der Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf dieses Zusammenspiel untersucht werden. Dafür wurden RBCs junger Probanden sowie älterer, kardiologisch behandelter Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ 2 vor und nach Behandlung mit den Enzyminhibitoren norNOHA und/ oder L-NAME in die Koronarien muriner Herzen geladen. Die Herzen wurden einer 40-minütigen Ischämie unterzogen, der eine 120-minütige Reperusionsphase folgte. Untersucht wurden die funktionellen und strukturellen Veränderungen der Herzen.

Humane RBCs konnten im Vergleich zu Puffer-perfundierten Kontrollen die myokardiale Funktionserhaltung der murinen Herzen nach 60-minütiger Reperfusion verbessern sowie die Infarktgröße nach 120 Minuten Reperfusion verringern. Unter Perfusion mit RBCs diabetischer Patienten war die myokardiale Druckentwicklung nach I/R eingeschränkt verglichen mit der der mit RBCs junger Probanden perfundierten Herzen. Eine Arginase-Inhibition in RBCs diabetischer Probanden mittels norNOHA führte zu einer Verringerung der Infarktgröße und Verbesserung der myokardialen Funktion. Eine zusätzliche Hemmung der eNOS mittels L-NAME hob diesen Effekt wieder auf. Die Hemmung der Enzyme in RBCs junger Probanden verschlechterte das Outcome nach I/R.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Arginase-Aktivität bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren auch in RBCs zu einer Einschränkung der eNOS-Aktivität, einer erythrozytären Dysfunktion, führt. Durch Inhibition der Arginase lässt sich die eNOS-Funktion wieder verbessern. Die Arginase-Inhibition stellt somit ein potentiell pharmakologisches Target für die Therapie des Myokardinfarkts dar.

Abstract

Myocardial infarction (MI) is one of the leading causes of deaths worldwide. During MI, the ischemia and the reperfusion after intervention both cause myocardial damages called ischemia/ reperfusion-injury (I/R-injury). Nitric oxide (NO) can protect the myocardium from I/R-injury. An important source of NO is the endothelial NO-synthase (eNOS), which can be inhibited indirectly by the enzyme arginase as both compete for their common substrate L-arginine. In endothelial dysfunction the activity of arginase is increased. An inhibition of arginase leads to an increase in NO availability and thereby to smaller I/R-injuries. It was shown that not only endothelial cells but also red blood cells (RBCs) express both enzymes.

Using an *ex vivo* Langendorff system, this study examines the impact of human RBCs on murine hearts and characterizes the interaction of RBC eNOS and arginase. It further focuses on the impact of cardiovascular risk factors within this interaction. RBCs were obtained from healthy young volunteers and elderly patients with cardiovascular disease or peripheral artery disease and diabetes mellitus type 2. The RBCs were treated with vehicle or the enzyme inhibitors norNOHA and/ or L-NAME and loaded into the coronary system of the murine hearts, where 40 minutes of global ischemia were followed by 120 minutes of reperfusion. During the experiment, functional and structural changes were analyzed.

Compared to vehicle-perfused controls, human RBCs of young volunteers improved myocardial function after 60 minutes of reperfusion and reduced infarct size after 120 minutes of reperfusion. Perfusion with RBCs of diabetic patients impaired myocardial function after I/R compared to perfusion with RBCs of young volunteers. An arginase-inhibition in diabetic RBCs due to norNOHA reduced infarct size and improved myocardial function. An additional inhibition of eNOS using L-NAME abolished this effect. In contrast, enzyme-inhibition in young RBCs showed a poor outcome after I/R.

The results of this study show that arginase-activity impairs eNOS function also in RBCs of elderly diabetic patients, indicating an erythrocrine dysfunction. Arginase-inhibition in RBCs restores eNOS function representing a potential pharmacological target in the treatment of MI.

Abkürzungsverzeichnis

AAR	<i>Area at Risk</i>
AC	Adenylatcyclase
AD	Antidiabetika
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , univariate Varianzanalyse
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca ²⁺	Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CH ₃ OH	Methanol
cTn, cTnC	kardiales Troponin, kardiales Troponin C
C ₃ H ₃ NaO ₃	Natrium-Pyruvat
C ₆ H ₁₂ O ₆	Glukose
deoxyHb	desoxygeniertes Hämoglobin
DM	Diabetes Mellitus
DP/ LVDP	linksventrikulärer Druck, <i>developed pressure/ left ventricular developed pressure</i>
dP/dt	Druckänderung pro Zeiteinheit
ED	endotheliale Dysfunktion
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS, NOS-3	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fe ²⁺	Eisen
FMN	Flavinmononukleotid
g	Erdbeschleunigung
GC	Guanylylcyclase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HbA1c	glykiertes Hämoglobin, Rückschluss auf Blutzuckerwerte
Hb	Hämoglobin
HbSNO	nitrosyliertes Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
hRBC	<i>human Red Blood Cells</i> , Erythrozyten
HS	Harnsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ⁺	Proton, Wasserstoff Kation
iNOS, NOS-2	induzierbare NO-Synthase

i.E.	internationale Einheiten
i.p.	Intraperitoneal
I/R	Ischämie/ Reperfusion
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer, <i>krebs-henseleit-buffer</i>
KHK	koronare Herzkrankheit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L-NAME	<i>N^ω-nitro-L-arginine methyl ester</i> , N ^ω -Nitro-L-Arginin Methyl Ester
LVEDP/EDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck, <i>left ventricular end-diastolic pressure</i>
M, g/mol	molare Masse, Stoffmengenkonzentration
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MI	Myokardinfarkt
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mM, mMol	milliMolar
n	Anzahl der Probanden
N	Stickstoffatom
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaNO ₂	Natriumnitrit
NO	Stickstoffmonoxid
NOHA	N ^ω -Hydroxy-L-Arginin
norNOHA	N ^ω -Hydroxy-nor-L-Arginin
NOS	NO-Synthase
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
nNOS, NOS-1	neuronale NO-Synthase
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
N ₂	Stickstoff
O	Sauerstoffatom
ONOO ⁻	Peroxinitrit
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Hyperoxid
<i>p</i>	Signifikanzwert
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCI	perkutane koronare Intervention
PDE	Phosphodiesterase
pH	saure/ basische Stärke einer Lösung

PI3-K	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase
PKB/ Akt	Proteinkinase B
PKG	Proteinkinase G
RBCs	<i>red blood cells</i> , Erythrozyten
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i>
STEMI	ST-Hebungs-Myokardinfarkt
THB, BH ₄	Tetrahydrobiopterin
TTC, C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
XOR	Xanthinoxidase
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Nicht aufgeführt sind die Basiseinheiten des SI-Systems. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Myokardinfarkt	1
1.1.1	Ischämie-/ Reperfusionsschäden am Myokard.....	3
1.1.2	Folgeschäden	5
1.2	Stickstoffmonoxid - NO.....	6
1.2.1	NO - Synthese und Wirkung am Herzen	6
1.2.2	Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus.....	10
1.2.3	Die Arginase als indirekter Inhibitor der eNOS und Konsequenzen für das kardiovaskuläre System	11
1.3	Untersuchung myokardialer Pathophysiologien und erythrozytärer Funktionen am Langendorff-Perfusor	14
1.4	Ziele der Arbeit	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Versuchstiere	18
2.1.2	Elektrolyte, Chemikalien, Gase	18
2.1.3	Medikamente.....	19
2.1.4	Geräte	19
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.6	Software.....	22
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Ex vivo I/R-Modell am Langendorff-Perfusor.....	22
2.2.2	Herstellung des Perfusats - Krebs-Henseleit-Puffer	23
2.2.3	Präparation der Mäuseherzen	24
2.2.4	Gewinnung der Blutproben und Probenbereitung	26
2.2.5	Versuchsprotokoll	28
2.2.6	Analyse der Infarktgröße	30
2.2.7	Bestimmung von Nitrit und Nitrat	32
2.2.8	Statistik	34

3	Ergebnisse	36
3.1	Protektive Wirkung von Erythrozyten im Rahmen von I/R-Schäden.....	36
3.2	Verminderung des kardioprotektiven Effekts der Erythrozyten im I/R-Schaden durch Diabetes Mellitus Typ 2 in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen	38
3.3	Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf die murinen Herzen..	41
3.4	Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf den erythrozytenvermittelten kardioprotektiven Effekt im I/R-Schaden	42
3.5	Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf den verminderten kardioprotektiven Effekt von Erythrozyten alter diabetischer Patienten	44
3.6	Nitrit- und Nitratproduktion der Erythrozyten	46
4	Diskussion	48
4.1	Protektiver Effekt humaner Erythrozyten auf den I/R-Schaden.....	48
4.2	Alters- und erkrankungsabhängige Verminderung der Erythrozyten-vermittelten Kardioprotektion	49
4.3	Kardioprotektive Funktion humaner Erythrozyten ist NO-abhängig.....	50
4.3.1	NO-Stoffwechsel in Erythrozyten.....	50
4.3.2	Kardioprotektion im Langendorff-Transfermodell durch erythrozytäre eNOS....	52
4.3.3	Erythrozytäre Dysfunktion	53
4.3.4	NO-Bioverfügbarkeit in diabetischen Erythrozyten	56
4.4	Verwendung eines <i>ex vivo</i> -Mausmodells	58
4.5	Limitationen	60
4.6	Ausblick.....	62
5	Abbildungsverzeichnis.....	65
6	Tabellenverzeichnis.....	67
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	68

1 Einleitung

Bei der Therapie des Myokardinfarkts (MI) zählt jede Minute, um die ischämischen Schäden so gering wie möglich zu halten. In der Vergangenheit geriet auch die Reperfusion immer mehr in den Fokus der Forschung, da sie ebenso wie die Ischämie zu Schäden am Myokard führen kann. Viele Signalwege und Mediatoren werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Einer von ihnen ist das Stickstoffmonoxid (NO), welches kardioprotektiv wirkt. Eine Hauptquelle von NO ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Wie aktuelle Studien belegen, wird eine aktive eNOS neben dem Endothel auch in Erythrozyten (*red blood cells*, RBCs) exprimiert (Cortese-Krott et al., 2012, Kleinbongard et al., 2006). Eine Imbalance in der NO-Homöostase ist die Ursache einer endothelialen Dysfunktion (ED), welche assoziiert ist mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus (DM) und Nikotinabusus (Esper et al., 2008).

Verantwortlich für eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit ist unter anderem eine beeinträchtigte Funktion der eNOS, die aus dem Substrat L-Arginin die Produkte L-Citrullin und NO herstellt. L-Arginin ist gleichzeitig auch das Substrat der Arginase, die bei kardiovaskulären Erkrankungen vermehrt exprimiert wird und über die Konkurrenz um das gemeinsame Substrat L-Arginin zu einer indirekten Hemmung der eNOS führen kann (Pernow und Jung, 2013). In Analogie zur ED ist auch in den RBCs die Expression der eNOS bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen vermindert (Cortese-Krott et al., 2012).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass sich diese erythrozytäre Dysfunktion im Rahmen des MI durch Hemmung der Arginase der RBCs gesunder Probanden und Mäuse verbessern lässt (Yang et al., 2013). Welche Rolle die erythrozytäre Arginase aber bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren spielt ist noch nicht vollständig geklärt.

1.1 Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt ist eine der relevantesten kardiovaskulären Erkrankungen der Welt, welche noch vor den respiratorischen Erkrankungen für den größten Anteil aller Todesfälle verantwortlich sind. Im Jahre 2019 war allein die ischämische Herzerkrankung laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) mit 16 % die Hauptursache aller weltweiten Todesfälle (WHO, 2020). In Deutschland stand der akute MI mit 49.210 Todesfällen im

Jahre 2015 auf Platz zwei der häufigsten Todesursachen (Statistisches Bundesamt Destatis, 2017). Für die Betroffenen und auch für die Gesellschaft hat die Diagnose des MI enorme psychologische, therapeutische sowie ökonomische Konsequenzen.

Myokardinfarkte entstehen durch eine insuffiziente Blutversorgung und die dadurch reduzierte Sauerstoffversorgung des Myokards, resultierend in der Nekrose von Gewebe. Ursachen der Ischämie können primärer Genese sein, wie bei Plaquerupturen und intrakoronarer Thrombenbildung, oder sekundär durch ein Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot im Rahmen von pathologischen Zuständen oder kardiologischen Interventionen entstehen. Seltener können auch nicht-ischämische Schäden, z.B. durch Ablation, Myokarditis oder toxische Substanzen, ursächlich sein (Thygesen et al., 2018).

Begünstigt wird die Entstehung dieser Pathologien durch kardiovaskuläre Risikofaktoren. Dazu gehört die Dyslipoproteinämie (erhöhter Apolipoprotein B/ Apolipoprotein A1-Quotient (Yusuf et al., 2004)), Nikotinabusus, DM, arterielle Hypertonie, abdominelle Adipositas, ein Schlaganfall in der Vergangenheit bei Männern, das männliche Geschlecht per se, ein Eintritt der Menopause vor dem 54. Lebensjahr bei Frauen, psychosozialer Stress oder eine positive Familienanamnese (Yusuf et al., 2004, Gonzales et al., 2017). Für die Entstehung eines MI sind die einzelnen Faktoren geschlechterabhängig von unterschiedlicher Relevanz, welche zum Teil nach dem 65. Lebensjahr abnehmend ist (Gonzales et al., 2017). Eine Kombination von Faktoren erhöht das MI-Risiko erheblich, was sich an Hand von Scores wie dem erstmals 1998 publizierten *Framingham Risk Score* mittlerweile individuell vorhersagen lässt (Mahmood et al., 2014).

Leitsymptome des MI können ein starker retrosternaler Schmerz sowie vorausgehende oder alleinige Beschwerden einer instabilen *Angina Pectoris* sein. Der Schmerz kann diffus sein und in den Arm, den Rücken, das Epigastrium oder den Kiefer ausstrahlen. Begleitsymptome wie Atemnot, Todesangst, Schweißausbrüche oder Übelkeit können auftreten. In 20 % der Fälle kann es vorkommen, dass die Ischämie symptomlos verläuft (Boateng und Sanborn, 2013).

Zur Diagnosestellung eines MI gehört, neben bestehenden Symptomen oder typischen Zeichen im 12-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG), die Bestimmung eines Anstiegs des herzspezifischen Biomarkers kardiales Troponin (cTn) (Thygesen et al., 2018). Im EKG wird zwischen einem ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) und einem Nicht-ST-Hebungs-

Myokardinfarkt (NSTEMI) unterschieden, was das weitere Therapievorgehen bestimmt (Ibanez et al., 2018). Die Therapie erfolgt nach den Empfehlungen der *European Society of Cardiology* und den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie.

Goldstandard der Therapie ist die rasche Reperfusion durch die primäre perkutane koronare Intervention (PCI) bei der Diagnose STEMI. In Abhängigkeit von der Befundkonstellation oder einem erweiterten Zeitfenster kann die Reperfusion auch durch Fibrinolyse erreicht werden (Ibanez et al., 2018).

1.1.1 Ischämie-/ Reperfusionsschäden am Myokard

Eine Ischämie am Myokard entsteht durch die Okklusion eines koronaren „Endgefäßes“, z.B. durch Thromben oder Gefäßspasmen (Herrick, 1983, DeWood et al., 1980). Durch die folgend verminderte Sauerstoff (O₂)- und Nährstoffversorgung kommt es bereits nach wenigen Minuten zur Schädigung des Myokards (Hausenloy und Yellon, 2013). Deren Fortschreiten kann, wie beschrieben, durch eine frühe Intervention in Form von Lyse des Thrombus oder Rekanalisation mittels PCI verhindert werden (Hausenloy und Yellon, 2013, Sanada et al., 2011). Doch auch die Reperfusion nach interventioneller Revaskularisierung verursacht Schäden am Myokard, die bis zu 50 % der Infarktgröße ausmachen können (Hausenloy und Yellon, 2013). Bezeichnet wird dies als Ischämie-/ Reperfusionsschaden (I/R-Schaden), erstmals beschrieben durch Jennings im Jahre 1960 (Jennings et al., 1960, Braunwald und Kloner, 1985). Um die Entstehung des I/R-Schadens nachzuvollziehen, wird im Folgenden die Pathophysiologie der Prozesse erläutert.

Bereits in den ersten Sekunden der Ischämie beginnen sich die Kardiomyozyten auf biochemischer Ebene anzupassen. Sie stellen auf eine anaerobe Glykolyse um, um den Energiebedarf weiter decken zu können (Frank et al., 2012). Hält die Ischämie länger an, kommt es ab ca. 20 Minuten zu irreversiblen Zellschäden (Hausenloy und Yellon, 2013). Je nach Dauer der Ischämie sind diese mehr oder weniger stark ausgeprägt (Braunwald und Kloner, 1985).

Durch das fehlende O₂ kommt es zum Erliegen der oxidativen Phosphorylierung und somit zu einem Abfall von Adenosintriphosphat (ATP). Eine Zellschwellung resultiert aus der verminderten Aktivität von ATP-abhängigen Transportern und der gestörten Funktion von Ionenkanälen. Unter der Ischämie kommt es innerhalb weniger Minuten zum

Aussetzen der kontraktilen Funktion durch eine verminderte Sensitivität von kardialen Troponin C (cTnC) auf Calcium (Ca^{2+}) und das verminderte ATP. Der Anstieg von anorganischem Phosphat und Lactat, welches durch den anaeroben Stoffwechsel anfällt, führt zudem zu einem Abfall des intrazellulären pH. Bei dem Versuch der Zellen überschüssige Protonen (H^+) herauszupumpen, kommt es zu einer intrazellulären Ca^{2+} -Akkumulation. Ca^{2+} -abhängige Proteasen werden aktiviert und erzeugen eine fragile Zellstruktur (Sanada et al., 2011, Hausenloy und Yellon, 2013).

Bei der Reperfusion nehmen die Mitochondrien in den Kardiomyozyten ihre Funktion schnell wieder auf und die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration verursacht eine Hyperkontraktion mit Kontraktionsband-Nekrosen sowie eine weitere Aktivierung von Proteasen. Letzteres führt in der Folge ebenfalls zu nekrotischen Veränderungen (Sanada et al., 2011). Verstärkt wird die Ca^{2+} -Überladung durch die zellulären Austauschprozesse, die in Folge der raschen Normalisierung des extrazellulären pH in Gang gesetzt werden. Als Reaktion auf das erhöhte Ca^{2+} , den rasch normalisierten pH und den oxidativen Stress erhöht sich die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran, wodurch das Membranpotential aufgehoben, die Atmungskette inaktiviert, Ca^{2+} auch in den Mitochondrien akkumuliert und proapoptotisches Cytochrom C freigesetzt wird. Die ATP-Produktion stoppt und weiteres Zellsterben resultiert (Sanada et al., 2011, Frank et al., 2012). Ca^{2+} aktiviert seinerseits weitere apoptotische Kaskaden, die überwiegend in den ischämischen Randregionen stattfinden (Sanada et al., 2011).

Hinzu kommt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch den plötzlichen O_2 -Anstieg, welche unter anderem direkt zytotoxisch wirken (Frank et al., 2012). Auch die Aktivierung von inflammatorischen Prozessen mit einem Anstieg von Zytokinen und Einwanderung von neutrophilen Granulozyten bewirken noch Stunden nach der Reperfusion eine Apoptose der Kardiomyozyten (Hausenloy und Yellon, 2013).

Auf Grund der hohen Relevanz des MI für die Morbidität und Ökonomie der Gesellschaft sind die komplexen Mechanismen der I/R-Schäden Gegenstand vieler Studien, in denen deren Rolle als Angriffspunkte zur Prävention dieser Schäden untersucht wird (Hausenloy und Yellon, 2013).

1.1.2 Folgeschäden

Aus den pathologischen Vorgängen der I/R-Schäden auf biochemischer Ebene ergeben sich erhebliche klinische Konsequenzen und teilweise lebensbedrohliche Komplikationen. Diese manifestieren sich in frühen Stadien bei bis zu 90 % der Infarkte in Rhythmusstörungen aller Art. Deutlich seltener ist der kardiogene Schock nach Reperfusion, welcher jedoch mit einer hohen Mortalität (behandelt 50 %) verbunden ist (Boateng und Sanborn, 2013).

In nekrosetreien Arealen des Myokards kann sich die Kontraktilität fast vollständig wieder erholen. Jedoch kann dies einige Tage andauern, abhängig von Dauer und Ausprägung der Ischämie. Während dem sogenannten *Myocardial Stunning*, bis zur vollständigen Erholung des Myokards, ist der O₂-Verbrauch der Kardiomyozyten verhältnismäßig höher als die ATP-Produktion. Dadurch wird erst nach und nach wieder eine volle Kontraktilität erreicht (Opie, 1989, Moens et al., 2005, Frank et al., 2012).

Bei I/R kann es zudem zu endothelialen Schäden kommen, die dann eine endotheliale oder mikrovaskuläre Dysfunktion verursachen. Dadurch kann es über Mechanismen wie erhöhter kapillärer Permeabilität, Ödemen oder Mikroembolisierungen zu einem *no-reflow*-Phänomen kommen. Es resultiert ein eingeschränkter Blutfluss und somit weiteres Zellsterben und strukturelle Funktionsstörungen (Moens et al., 2005). Einige Tage nach einem MI stellen sich diese in Form von systolischer oder diastolischer Herzinsuffizienz ggf. mit pulmonalvenöser Stauung (Kemp und Conte, 2012), Mitralklappeninsuffizienz, Ventrikulaneurysmen sowie seltener als Ventrikel- oder Septumrupturen und Papillarmuskelabriss dar (Wilansky et al., 2007). Noch Wochen nach der Reperfusion können am geschädigten Myokard Entzündungen sowie autoimmune Reaktionen stattfinden (Reed et al., 2017).

Obwohl die mit dem MI assoziierte Mortalität in den letzten Jahren reduziert werden konnte (Reed et al., 2017), spielen die klinischen Folgen des MI durch I/R-Schäden in der kardiologischen Therapie immer noch eine große Rolle. Daher wurden in der Vergangenheit verschiedene Ansatzpunkte identifiziert, an denen man präventiv intervenieren könnte (Sanada et al., 2011, Hausenloy und Yellon, 2013). Ein besonders relevantes *Target* in diesem Bereich und Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist der NO-*Pathway*. Um die Ansatzpunkte dieser Arbeit besser einordnen zu können, sind folgend die relevanten Funktionen des NO in biochemischen Interaktionen genauer dargestellt.

1.2 Stickstoffmonoxid - NO

Stickstoffmonoxid ist ein Gas, bestehend aus den zwei Atomen Stickstoff (N) und Sauerstoff (O). Es wird getriggert durch eine Reihe von Mediatoren wie Acetylcholin, Bradykinin oder auch durch Scherstress von Endothelzellen ausgeschüttet und führt über eine Relaxation der glatten Muskelzellen zu einer Dilatation der Gefäße (Ignarro et al., 1987, Furchgott und Vanhoutte, 1989, Strijdom et al., 2009).

Neben dem Einfluss auf Blutdruck und -fluss durch seine vasoaktive Funktion, wirkt NO zusätzlich protektiv auf das kardiovaskuläre System durch Inhibition der Thrombozyten- und Leukozyten-Aggregation, eine Proliferationshemmung der glatten Muskelzellen, seine antioxidierende Funktion und seinen Einfluss auf die Kontraktilität des Myokards. Zudem wirkt es als Mediator der unspezifischen Immunantwort, der Neovaskularisation und auch im zentralen und peripheren Nervensystem ist es an der synaptischen Transmission beteiligt (Moncada et al., 1991, Moncada und Higgs, 1993, Forstermann und Sessa, 2012).

1.2.1 NO - Synthese und Wirkung am Herzen

Eine wichtige endogene Quelle des NO sind die NO-Synthasen (NOS). Von dieser Enzymgruppe sind drei Isoformen bekannt: die neuronale NOS (nNOS, NOS-1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS-3). Benannt sind sie nach ihrem ursprünglichen Entdeckungsort, werden jedoch in unterschiedlichen Geweben des Körpers exprimiert. Am Herzen kommen, neben der eNOS in den Endothelzellen, alle drei Formen der NOS in den Kardiomyozyten vor. Die nNOS und eNOS werden konstitutiv exprimiert und sind beteiligt an physiologischen Prozessen wie der Gefäßaktivität oder der neuronalen Transmission. iNOS dagegen wird nur bei inflammatorischen Prozessen und unter pathologischen Bedingungen wie dem I/R-Schaden exprimiert (Ziolo et al., 2008, Strijdom et al., 2009).

NOS sind dimere Enzyme, die die Reaktion katalysieren, bei der das Guanidin des Substrates L-Arginin zu NO und L-Citrullin oxidiert wird (Abb. 1) (Schulz et al., 2004). Am genauesten untersucht sind die Mechanismen an der eNOS. Sie wird hauptsächlich durch Hypoxie aktiviert, wodurch eine Phosphorylierung am Serin1177 der eNOS über den Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (PI3-K) Protein Kinase B (PKB/ Akt)-Signalweg induziert wird (Strijdom et al., 2009). Auch Acetylcholin, Bradykinin, Insulin oder Scherstress bewirken

über verschiedene Kinasen eine Phosphorylierung der eNOS (Abb. 1). Die eNOS und nNOS werden zudem über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg wie z.B. im Rahmen von Ischämien (s.o.) und dessen Bindung an Calmodulin aktiviert. Dagegen ist die iNOS konstitutiv und unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration aktiv sobald sie, durch z.B. Zytokine aktiviert, exprimiert wird (Forstermann und Sessa, 2012).

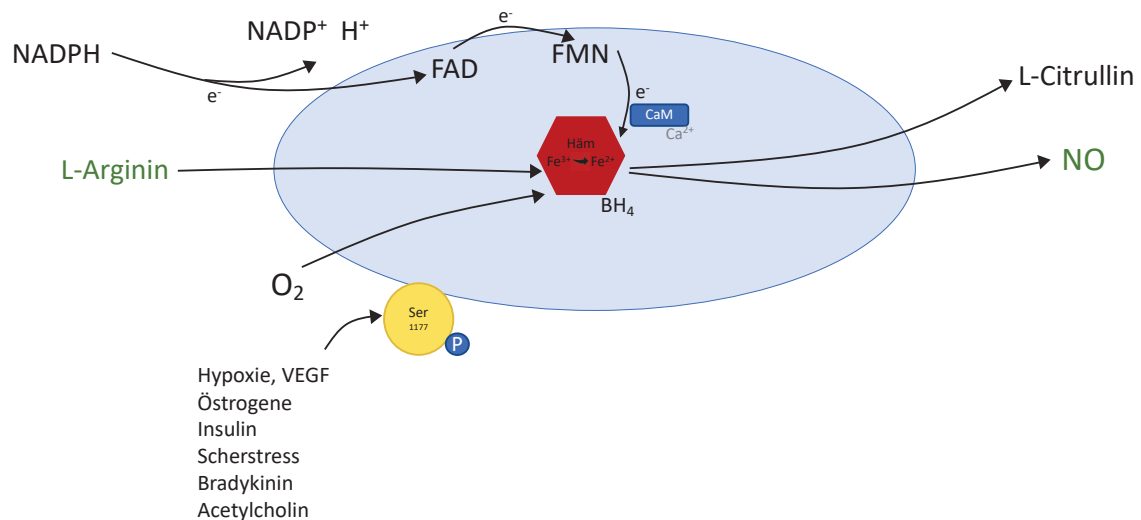


Abb. 1: Reaktion der NO-Synthase. Dargestellt ist die Reaktion der NO-Synthase, bei der L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) oxidiert wird. Elektronen (e^-) werden von NADPH über FAD und FMN zum Häm (rot) transferiert. Calmodulin (CaM, blau) beschleunigt den Elektronentransfer. Am Häm wird L-Arginin zu NO und L-Citrullin oxidiert. In einem Zwischenschritt entsteht N^ω -Hydroxy-L-Arginin (NOHA, nicht dargestellt). BH_4 dient als Cofaktor. Die aufgelisteten Faktoren bewirken über verschiedene Kinasen eine Phosphorylierung (P) am Serin1177 (Ser1177, gelb), wodurch die eNOS aktiviert wird. (BH_4 : Tetrahydrobiopterin; Ca^{2+} : Calcium; Fe^{2+} : Eisen; H^+ : Proton; NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat; FMN: Flavinmononukleotid; O_2 : Sauerstoff; VEGF: vascular endothelial growth factor) Quelle: Eigenes Schema

Intermediat der NOS-Reaktion ist das enzymgebundene N^ω -Hydroxy-L-Arginin (NOHA). Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) und O_2 liefern die Co-Substrate. Als weitere Co-Faktoren agieren Tetrahydrobiopterin (THB, BH_4), Calmodulin, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) (Stuehr, 2004, Schulz et al., 2004, Cortese-Krott und Kelm, 2014). Ist nicht ausreichend Substrat L-Arginin vorhanden, bindet die NOS weiter O_2 und bildet daraus ROS wie Hyperoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dies wird bezeichnet als NOS-Entkopplung und ist z.B. bei einer gesteigerten Aktivität der Arginase (s. 1.2.3) der Fall (Forstermann und Sessa, 2012). ROS wiederum induzieren zusätzlich die Arginase, wodurch ein sogenannter *circulus vitiosus* entsteht (Pernow und Jung, 2013). Auch die Aktivität der iNOS steigert die Arginase-Aktivität und ist an der NOS-Entkopplung beteiligt (Kim et al., 2009). Bei mittleren L-Arginin

Konzentrationen bildet die NOS sowohl NO als auch O_2^- , welche dann zu dem ebenfalls zytotoxischen Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagieren können (Stuehr, 2004).

Während I/R steigt die eNOS Aktivität innerhalb der ersten Minuten der Ischämie an und mit ihr die NO-Konzentration. Bei anhaltender Ischämie wird die eNOS Expression reduziert und durch die entstehende Azidose geht die eNOS Aktivität zurück. Es kommt zu einer gesteigerten Leukozytenadhäsion und Migration von neutrophilen Granulozyten (Merx et al., 2014). Bei Einsetzen der Reperfusion steigt die eNOS-Aktivität erneut an, um nach einiger Zeit wieder abzusinken. Ebenso verhält sich die NO-Konzentration, die dann niedrigere Werte als vor I/R erreicht (Schulz et al., 2004).

NO kann auch Enzym-unabhängig generiert werden, z.B. unter azidotischen Bedingungen. Bei niedrigem O_2 -Partialdruck und ausreichender NADH Konzentration kann die Xanthinoxidase (XOR) dann durch Reduktion von Nitrit (NO_2^-) zur NO-Bioverfügbarkeit beitragen (Schulz et al., 2004).

Da NO ein Gas und zudem auch ein freies Radikal ist, kann es einerseits gut durch die Zellen diffundieren und seine Wirkung in benachbarten Zellen ausüben, hat andererseits aber auch eine kurze Halbwertszeit, da es leicht mit anderen Molekülen (z.B. Hämoglobin (Hb), O_2 oder O_2^-) reagiert (Knowles und Moncada, 1992). Diese Reaktionsprodukte können wiederum auf das umgebende Gewebe wirken (Schulz et al., 2004). Trotzdem kann produziertes NO seine Wirkung ausüben und zudem verschiedene Funktionen erfüllen. Dies wird durch die unterschiedlichen Lokalisationen der einzelnen NOS-Isoformen und deren Assoziation zu spezifischen Proteinen möglich (Knowles und Moncada, 1992, Strijdom et al., 2009).

Der Hauptsignalweg des NOs führt über eine Aktivierung der Guanylylcyclase (GC) durch Nitrosylierung der Hämgruppe der GC. Diese bewirkt eine Steigerung des *second messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches die Proteinkinase G (PKG) aktiviert, die Aktivität von Phosphodiesterasen (PDE) beeinflusst oder direkt über Hemmung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen führt. Die PKG wirkt vasodilatativ und hemmt die Thrombozytenaggregation. NO kann zudem direkt, z.B. über S-Nitrosylierung, Ca^{2+} -Kanäle inhibieren, den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel senken oder spannungsabhängige Kalium-Kanäle aktivieren und so eine Vasodilatation bewirken (Abb. 2) (Schulz et al., 2004, Ziolo et al., 2008).

Weitere kardioprotektive Effekte können cGMP-abhängig oder cGMP-unabhängig erzielt werden. Nachfolgend wird nur eine Auswahl an Mechanismen erwähnt. Eine Hemmung der PDE führt über Steigerung der cAMP-Konzentration und der Proteinkinase A-Aktivität zu einer verbesserten Kontraktion der Kardiomyozyten, ebenso wie NO und cGMP, welche über die direkte Aktivierung von Ryanodin-Rezeptoren und Ca^{2+} -Kanälen wirken (Schulz et al., 2004). Die PKG kann über mehrere Signalmoleküle ein *Remodeling* der Kardiomyozyten verhindern und dadurch eine Hypertrophie verzögern (Hammond und Balligand, 2012). Durch die Assoziation mit dem β -Adrenorezeptor oder die S-Nitrosylierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen kann NO auch direkt negativ inotrop wirken (Ziolo et al., 2008, Hammond und Balligand, 2012). Als Radikalfänger wirkt NO protektiv (Strijdom et al., 2009) und verhindert ROS-Bildung während der Ischämie durch seine Interaktion mit der Cytochrom-C-Oxidase der mitochondrialen Atmungskette (Jones und Bolli, 2006).

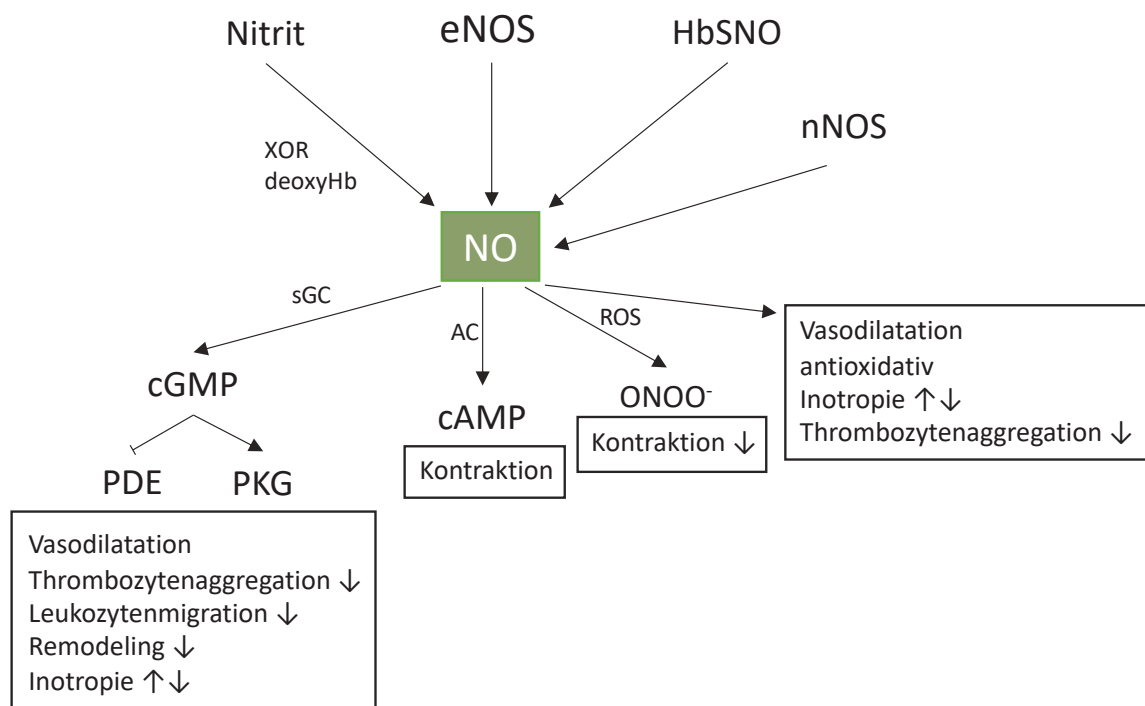


Abb. 2: Funktionen und Signalwege des NO im kardiovaskulären System. Stickstoffmonoxid (NO) kann Enzym-abhängig (NOS) und -unabhängig generiert werden. Seine überwiegend protektiven Funktionen werden hauptsächlich über cGMP ausgeübt. Auch cAMP-abhängige sowie direkte Wirkungen des NO sind bekannt. Die Abbildung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. (AC: Adenylatcyclase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; deoxyHb: deoxygeniertes Hb; HbSNO: nitrosyliertes Hb; NOS: NO-Synthase; ONOO⁻: Peroxinitrit; PDE: Phosphodiesterase; PKG: Proteinkinase G; ROS: *reactive oxygen species*; sGC: *soluble guanylate cyclase*; XOR: Xanthinoxidase) Quelle: Eigenes Schema

Insgesamt wirkt NO auf vielen Ebenen kardioprotektiv. Die beschriebenen Signalwege spielen u.a. eine wichtige protektive Rolle unter pathologischen Bedingungen wie dem I/R-Schaden. Neben den zahlreichen protektiven Funktionen kann NO in hohen Konzentrationen (z.B. unter iNOS Aktivierung) allerdings auch schädlich wirken, indem es, z.B. mit O_2^- , verstärkt zu Peroxinitrit reagiert (Jones und Bolli, 2006, Sanada et al., 2011).

1.2.2 Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus

Erythrozyten sind primär für die O_2 -Versorgung der Organe und den Gas-Transport im Körper verantwortlich und ermöglichen eine geregelte Stoffwechselfunktion des gesamten Organismus. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass auch sie im Sinne einer „*new erythrocrine function*“ (Cortese-Krott und Kelm, 2014: 251) zur NO-Bioverfügbarkeit beitragen, ganz entgegen der Annahme, dass in ihnen enthaltene Hb würde NO lediglich binden und somit inaktivieren (Chen und Mehta, 1998, Kleinbongard et al., 2006, Cortese-Krott et al., 2012).

RBCs können über verschiedene Mechanismen, meist getriggert durch Hypoxie, NO generieren (Cortese-Krott et al., 2012). Dazu gehört u.a. die Reduktion von Nitrit zu NO mittels Deoxyhämoglobin, vermittelt über die Nitrit-Reduktase-Aktivität einer erythrozytären eNOS, oder bei niedrigem pH die Reduktion durch die XOR (Abb. 2) (Webb et al., 2008). Bereits 1996 zeigten Yang et al., dass RBCs protektiv im Rahmen von I/R-Schäden wirken und schrieben dies neben der O_2 -Verfügbarkeit, der ATP-Aktivität und durch RBCs freigesetzten Antioxidantien der NO-Bioverfügbarkeit zu, da der Effekt durch eine NOS-Hemmung aufgehoben werden konnte. Durch NO könnten RBCs das Auftreten freier Radikale reduzieren, genauso wie durch den Erhalt der myokardialen Superoxiddismutase-Aktivität (Yang et al., 1996). In der jüngeren Vergangenheit konnte die Expression einer eNOS in RBCs bestätigt werden, welche in Normoxie und unter physiologischen Bedingungen wie die eNOS der Endothelzellen aus dem Substrat L-Arginin, NO und L-Citrullin synthetisiert (Chen und Mehta, 1998, Cortese-Krott et al., 2012).

Die eNOS der RBCs ist auf der zytosolischen Seite der Zellmembran und in geringerem Ausmaß im Zytoplasma lokalisiert (Kleinbongard et al., 2006). Umgeben ist sie von Methämoglobin, was in Kombination mit ihrer Lokalisation verhindert, dass produziertes NO mit dem freien Hb der Zelle reagiert. Zusätzlich befindet sich die eNOS räumlich

getrennt von der zytosolischen Arginase (vgl. 1.2.3) (Abb. 3). Das NO kann direkt an Kanälen, Transportern und anderen Targets, die in der Nähe der eNOS lokalisiert sind wirken oder aus der Zelle transportiert werden und seine Wirkung an benachbarten Strukturen ausüben (Kleinbongard et al., 2006, Cortese-Krott und Kelm, 2014).

Tatsächlich besitzen alle zirkulierenden Blutzellen eine eNOS. Den größten Einfluss auf die Blutdruck-Regulation und systemische Nitrit-Level haben jedoch, wahrscheinlich auf Grund ihrer großen Anzahl, die RBCs (Wood et al., 2013). Neben den bereits erwähnten protektiven Funktionen des NO trägt die erythrozytäre eNOS Expression zusätzlich zur Elastizität der RBCs und somit zu einem gleichmäßigen Blutfluss bei (Kleinbongard et al., 2006).

Die beobachteten Funktionen und die Expression der erythrozytären eNOS lassen sich sowohl durch unspezifische als auch spezifische NOS-Inhibitoren hemmen (Yang et al., 1996, Chen und Mehta, 1998, Kleinbongard et al., 2006). Das macht die Rolle der Enzym-Aktivität und mögliche Enzym-Interaktionen bei der Entwicklung von Pathologien in deren Therapie bedeutend. Die genaue Funktion und Relevanz dieser eNOS im Zusammenhang mit Pathologien ist jedoch bislang nicht ausreichend untersucht (Cortese-Krott und Kelm, 2014).

1.2.3 Die Arginase als indirekter Inhibitor der eNOS und Konsequenzen für das kardiovaskuläre System

Voraussetzung für eine physiologische Gefäßfunktion ist eine ausreichende NO-Bioverfügbarkeit, weshalb ein eingeschränkter NO-Spiegel als Hauptursache der ED gilt (Esper et al., 2008, Forstermann und Sessa, 2012). Eine Ursache hierfür kann die eNOS-Entkopplung sein, bei der das Enzym vermehrt ROS anstelle von NO produziert. Dazu trägt u.a. eine reduzierte Substratverfügbarkeit an L-Arginin bei (Forstermann und Sessa, 2012).

Die reduzierte Arginin-Verfügbarkeit entsteht z.B. durch eine gesteigerte Expression und Aktivität der Arginase, einem Enzym des Harnstoffzyklus und der Polyamin- sowie Prolin-Synthese (Pernow und Jung, 2013). Ihre Isoform Arginase 1 wird neben vielen anderen Zellformen ebenfalls im Zytosol von RBCs exprimiert (Spector et al., 1985, Yang et al., 2013). Proinflammatorische Zustände, erhöhte Spiegel von Glukose, oxidiertem LDL-Cholesterin oder Thrombin, Hypoxie oder vermehrte Ansammlung von ROS führen über

unterschiedliche Signalwege zur gesteigerten Expression der Arginase. Posttranslationale Modifikationen erhöhen deren Aktivität (Pernow und Jung, 2013). Myokardiale I/R scheint die Aktivität der Arginase zu steigern ohne ihre Expression zu verändern (Gonon et al., 2012). In der Folge steht der eNOS weniger Substrat zur Verfügung, was im Zusammenhang mit vielen kardiovaskulären Erkrankungen und ED zu stehen scheint (Pernow und Jung, 2013).

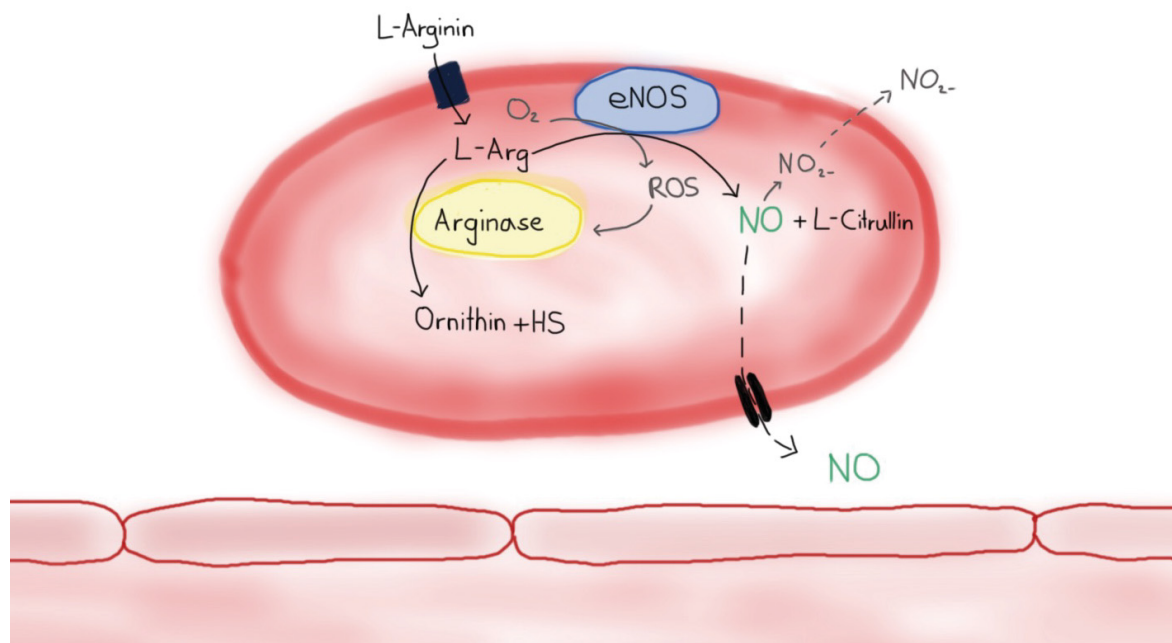


Abb. 3: Interaktion der erythrozytären eNOS und Arginase. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die Arginase konkurrieren um das Substrat L-Arginin, welches über Kationen-Aminosäure-Transporter in die Erythrozyten (RBCs) gelangt. Über die eNOS produziertes Stickstoffmonoxid (NO) kann direkt oder über Transporter (z.B. Anionenaustauscher) aus den RBCs transportiert werden. Zudem kann es z.B. zu Nitrit (NO₂⁻) reduziert werden und so aus den Zellen gelangen. NO kann dann an benachbarten Zellen wie z.B. dem Endothel oder den glatten Muskelzellen wirken. Bedingungen wie z.B. Hypoxie oder erhöhte ROS steigern die Aktivität der zytosolischen Arginase, die Teil des Harnstoffzyklus ist. Der in der inneren Plasmamembran lokalisierten eNOS steht dadurch weniger Substrat zur Verfügung, sie kann jedoch weiter vorhandenes O₂ zu ROS verstoffwechseln. (HS: Harnsäure; L-Arg: L-Arginin; ROS: *reactive oxygen species*) Quelle: Eigene Abbildung

Auch in RBCs ist die eNOS abhängige NO-Bioverfügbarkeit unter pathologischen Bedingungen eingeschränkt. Eine reduzierte Expression und Aktivität der erythrozytären eNOS korreliert mit der verminderten Endothelfunktion, gemessen an der Flussvermittelten Vasodilatation bei Patienten mit Koronarer-Herzkrankheit (KHK) (Cortese-Krott et al., 2012). Die eingeschränkte NO-Verfügbarkeit in RBCs von KHK Patienten geht zudem einher mit erhöhtem oxidativem Stress in den Zellen (Eligini et al., 2013). Dies

deutet darauf hin, dass auch die eingeschränkte Funktion der erythrozytären eNOS an der Entstehung von kardiovaskulären Pathologien beteiligt ist.

Die Aktivität der eNOS kann durch verschiedene direkte und indirekte endogene Inhibitoren moduliert werden, allerdings hat die Konkurrenz der eNOS und der Arginase den größten Einfluss auf das kardiovaskuläre System (Kleinbongard et al., 2006, Pernow und Jung, 2013). Die Assoziation der gesteigerten Arginase-Aktivität mit einer ED und kardiovaskulären Erkrankungen ist ein mögliches *Target* zur Verbesserung dieser Pathologien. Mit der Gabe von L-Arginin (Forstermann und Sessa, 2012) oder einer Inhibition der Arginase (Jung et al., 2010) kann die Substratverfügbarkeit gesteigert werden, wodurch die NO-Produktion erhöht wird. Zur Arginase-Inhibition kann das synthetische Analogon des endogenen Inhibitors NOHA (N^ω-Hydroxy-nor-L-Arginin (norNOHA)) verwendet werden (Durante et al., 2007, Jung et al., 2010). Eine lokale sowie eine systemische Arginase-Inhibition mittels norNOHA kann im Tiermodell die Infarktgröße nach I/R verringern (Jung et al., 2010, Gonon et al., 2012) und das Langzeit-*Outcome* nach I/R-Schäden verbessern (Gronros et al., 2013).

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass auch in den RBCs die Aktivität der Arginase die eNOS in ihrer Funktion beeinflusst (Abb. 3). In murinen sowie humanen RBCs gesunder junger männlicher Probanden lässt sich durch eine Arginase-Inhibition *ex vivo* die NO-Bioverfügbarkeit verbessern. Genauso konnte die ventrikuläre Funktion muriner Herzen nach I/R in *ex vivo* durch deren Perfusion mit murinen RBCs (s.u.) verbessert werden. Dieser Effekt blieb mit RBCs von eNOS-*knockout*-Mäusen aus (Yang et al., 2013). Ebenso konnte *in vivo* an chimären RBC-eNOS-*knockout*-Mäusen gezeigt werden, dass die erythrozytäre eNOS Einfluss auf die Entstehung von I/R-Schäden hat (Merx et al., 2014).

In Folge dieser Erkenntnisse stellt sich die Frage, in wie weit eine eingeschränkte erythrozytäre eNOS-Funktion im Rahmen von kardiovaskulären Pathologien besteht. Eine Hypothese dieser Arbeit war, dass in Analogie zur ED auch eine erythrozytäre Dysfunktion besteht. Inwiefern diese Differenzierung klinisch relevant ist, sollte an humanen RBCs, welche *ex vivo* in murine Herzen im Langendorff-Perfusor eingebracht wurden, untersucht werden.

1.3 Untersuchung myokardialer Pathophysiologien und erythrozytärer Funktionen am Langendorff-Perfusor

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung der erythrozytären Arginase- und eNOS-Aktivität im kardialen I/R-Schaden das von Otto Langendorff 1895 entwickelte Modell des isolierten Herzens verwendet (Langendorff, 1895). Hierbei handelt es sich um ein *ex vivo*-Modell eines Säugetierherzens mit dem einfach und kosteneffektiv, ausreichende Expertise des Anwenders vorausgesetzt, qualitativ und quantitativ gute Daten zur kardiovaskulären Patho-/ Physiologie generiert werden können (Sutherland und Hearse, 2000, Muessig et al., 2020a). Viele Erkenntnisse des heutigen Wissensstandes der kardialen Physiologie sind diesem Modell zu verdanken. Noch immer ist es eine häufig verwendete Methode, um grundlegende Studien zur Rhythmologie, Kontraktilität, Koronargefäßfunktion, Biochemie oder Pharmakologie durchzuführen. Besonders für Forschungen zur direkten Auswirkung myokardialer I/R auf die myokardiale Funktion oder zu biochemischen Veränderungen im I/R-Schaden ist das Modell gut geeignet (Sutherland und Hearse, 2000, Herr et al., 2015).

Im Langendorff-Perfusor wird das explantierte Herz retrograd durch die Aorta mit einem oxygenierten, erwärmten Elektrolytpuffer perfundiert (s. 2.2.1). Durch den Druck des retrograden Flusses bleibt die Aortenklappe geschlossen und das Perfusat versorgt durch die Koronararterien das ventrikuläre Myokard. Die koronaren Venen drainieren dies dann durch den Koronarsinus in den eröffneten rechten Vorhof, durch den das Perfusat anschließend heraus fließt (Skrzypiec-Spring et al., 2007, Bell et al., 2011). Über einen im linken Ventrikel positionierten Ballon können mittels eines Druck-Sensors Informationen über die Kontraktilität und die Herzfrequenz erlangt werden. Die Messung des Flusses mittels Ultraschall liefert Informationen über die Gefäßfunktion. Zusätzliche anschließbare Instrumente ermöglichen zudem Untersuchungen zur Elektrophysiologie (Skrzypiec-Spring et al., 2007).

Verwendet werden kann das isolierte Herz in zwei unterschiedlichen Modi, entweder unter konstantem hydrostatischem Perfusionsdruck oder konstantem koronarem Fluss. Abhängig von den zu untersuchenden Parametern haben beide Methoden unterschiedliche Einsatzbereiche. Für Untersuchungen zur myokardialen Ischämie ist das druckkonstante Modell gut geeignet, da es autoregulatorische Mechanismen der Koronargefäße als Reaktion auf die Ischämie nicht unterdrückt (Skrzypiec-Spring et al.,

2007, Bell et al., 2011). Abb. 4 zeigt schematisch das für diese Arbeit verwendete druckkonstante Modell (Abb. 4).

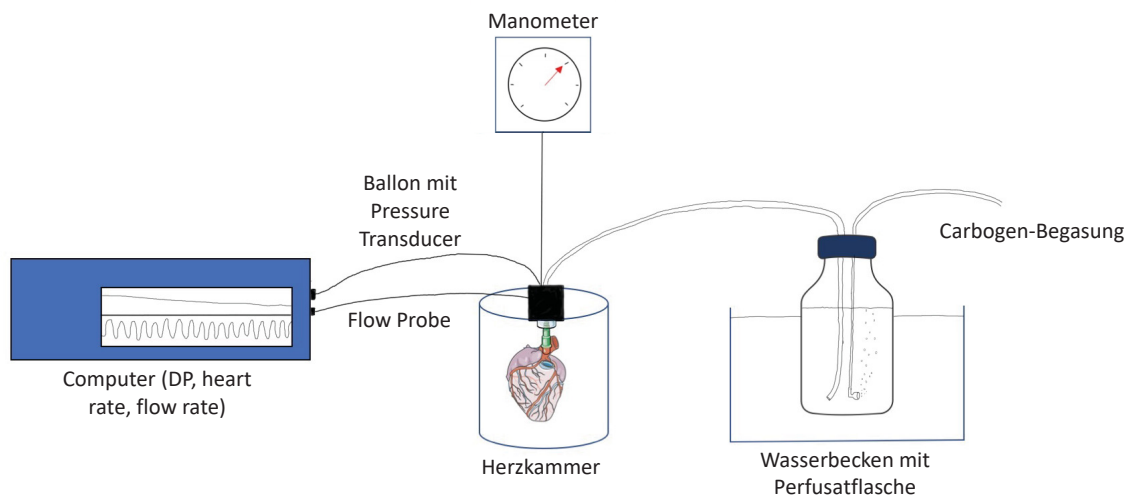


Abb. 4: Aufbau des druckkonstanten Langendorff-Modells. Der Puffer wird im erwärmten Wasserbad begast und unter konstant gehaltenem Druck (mittels Manometer) über die Aorta retrograd Richtung Herz gepumpt. Nahe der Aorta wird der Fluss über Ultraschall mit der *Flow Probe* gemessen. Der ventrikuläre Druck und die Herzfrequenz werden mit Hilfe eines Ballons über den *Pressure Transducer* gemessen. (DP: *developed pressure*) Quelle: Eigene Abbildung

Neben der Möglichkeit die oben genannten Parameter einfach und reproduzierbar messen zu können, hat das heutige Langendorff-Modell den Vorteil, dass die Funktion des Herzens isoliert von neuronalen und humoralen Einflüssen evaluiert und so der direkte Einfluss von Pharmaka auf das Herz beobachtet werden kann (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Anfangs wurden für Untersuchungen zur kardialen Physiologie große Gefäße beatmeter Spendertiere, wie z.B. Ratten oder Hasen, kanüliert und deren Blut retrograd in die Herzen geleitet. Nach Perfusion des Herzens wurde das Blut wieder aufgefangen und zurück in den Kreislauf des Spendertiers geleitet. Hierdurch wurde das Blut ausreichend oxygeniert, es gelangten jedoch vom Spendertier freigesetzte Hormone und zum Teil Verunreinigungen in die Versuchsherzen. Ein weiteres Problem war die entstehende Hämolyse (Sutherland und Hearse, 2000, Bell et al., 2011).

Eine alternative Methode ist die Perfusion mit einem elektrolythaltigen Puffer. Trotz Oxygenierung des Puffers ist die O₂-Versorgung des Herzens jedoch nicht optimal und der koronare Fluss deutlich höher als unter physiologischen Bedingungen. Durch fehlende Kolloide entstehen zudem paravasale Ödeme. Unter den Bedingungen nimmt die Herzfunktion mit der Zeit immer weiter ab, weshalb die Versuchszeit auf einige Stunden limitiert ist (Skrzypiec-Spring et al., 2007, Sutherland und Hearse, 2000).

Eine andere Methode ist, die Herzen mit einer oxygenierten Suspension aus gewaschenen RBCs und Elektrolytlösung zu perfundieren, wodurch die Versuchsbedingungen verbessert werden (Sutherland und Hearse, 2000). Bei der Verwendung von RBCs anderer Spezies kann es dabei zu Immunreaktionen kommen. Aufgrund der benötigten großen Menge an Perfusat wurde in der Vergangenheit jedoch gerne auf solche RBCs zurückgegriffen. Die Hämolyse bleibt sowohl bei der Verwendung *xenogener* als auch *allogener* RBCs als limitierender Faktor bestehen. Zudem ist die Herstellung eines Perfusats aus Blutkomponenten aufwendig und teuer, weshalb trotz der Limitierungen meist eine Pufferlösung verwendet wird (Bell et al., 2011).

Eine neuere Methode, mit der zudem der Einfluss des Perfusats auf die isolierten Herzen während I/R zu untersuchen ist, besteht darin Proben, z.B. in Form von Blutkomponenten, direkt zu Beginn einer Globalischämie am Langendorff-Perfusor in das Koronarsystem von murinen Herzen zu laden. Die Proben verbleiben in den Koronarien während der gesamten Ischämiezeit. Dadurch wird die Interaktion von Zellkomponenten des Perfusats mit den Kardiomyozyten sowie die Wirkung pharmakologischer Substanzen auf die Herzen im Rahmen von myokardialer I/R analysierbar. Die Menge des benötigten Bluts wird mit dieser Methode verringert sowie das Problem der Hämolyse vermieden (Yang et al., 2013, Muessig et al., 2020a).

1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Rolle humaner RBCs und der humanen erythrozytären eNOS im I/R-Schaden genauer evaluiert werden. Zwar existieren Erkenntnisse zur Existenz und Aktivität einer erythrozytären eNOS, die Funktionen dieser wurden bislang jedoch nicht ausreichend charakterisiert. Ziel der Arbeit war, die erythrozytäre eNOS-Funktion im I/R-Schaden genauer zu charakterisieren und den Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren auf diese Funktion aufzudecken. Zudem sollte die Wirkung einer Arginase-Inhibition unter Berücksichtigung der eNOS-Aktivität geprüft werden. Dazu wurde das *ex vivo* Langendorff-Transfermodell verwendet, in dem humane RBCs zu Beginn der Ischämie in die Koronarien von murinen Herzen geladen wurden. An den isolierten Herzen sollte verglichen werden, welchen Einfluss eine Arginase-Inhibition in RBCs junger gesunder Probanden und in RBCs alter Patienten mit DM auf den I/R-Schaden hat.

Eine genaue Charakterisierung der Arginase-Inhibition und ihren Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit von RBCs ist wichtig, da dies ein potentielles *Target* in der Behandlung des akuten MI darstellt. Belegt werden sollte die NO-abhängige Wirkung durch den Nachweis der stabileren NO-Oxidationsprodukte Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) (Himeno et al., 2004). Die Kenntnis dieses Signalweges könnte in Zukunft die Therapie und Prognose des akuten MI verbessern, Reperfusionsschäden reduzieren und so die durch MI bedingte Mortalität weiter senken.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit den Herzen männlicher C57BL/6J Mäuse durchgeführt, die im Mittel zwischen 12 und 13 Wochen alt und 25,4 g schwer waren. Die Tiere wurden von Janvier Labs in Saint-Berthevin, Frankreich bezogen. Unter der Organisationsnummer O51/16 wurden diese für mindestens sieben Tage bis zum Versuchstag in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, gemäß den geltenden Tierschutzaufgaben mit Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.1.2 Elektrolyte, Chemikalien, Gase

Bezeichnung	Hersteller
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid ($C_{19}H_{15}ClN_4$)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Carbogen Lab (95% O_2 , 5% CO_2)	Linde AG, Pullach, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Flüssiger Stickstoff (N_2)	Linde Gas, Unterschleißheim, Deutschland
Glukose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol (CH_3OH)	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
NaCl 0,9% (Lösung)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Natrium-Pyruvat ($C_3H_3NaO_3$)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International BVBA, Leuven, Belgien
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nitrat (NO ₃ ⁻)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
NO Carrier Powder	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan
NO Packing Gel	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan
NO Reactor A Powder	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan
NO Reactor B Powder	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan
Salzsäure (HCl, 37%)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 1: Übersicht der für die Versuche verwendeten Elektrolyte, Chemikalien und Gase.

2.1.3 Medikamente

Arzneimittel	Hersteller
Heparin 25.000 i.E.	Rotexmedica, Trittau, Deutschland
Ketanest® (Ketamin) 25 mg/ml 1:10	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Kodan® Tinktur forte, farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
L-NAME (269,69 g/mol)	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
norNOHA (176,18 g/mol)	Bachem AG, Bubendorf, Schweiz
Rompun® (Xyalin) 2%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht der für die Versuche verwendeten Medikamente und medizinischen Produkte.

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage (ISO 9001)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Coaxial stimulation electrode mini (73-0181)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Einhängethermostat (E100)	Lauda GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
feine Schere, spitz (14088-10)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
HPLC Autosampler „Insight“ (AS-700)	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan

ISOTEC <i>Pressure Transducer</i>	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Kaltlichtquelle Mikroskop (KL1500LCD) (2x)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kamera (HV-C20A)	Hitachi, Tokio, Japan
Langendorff-Perfusor (<i>Apparatus Isolated Heart</i> , Size: 1)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Magnetrührer (IKAMAG RET)	IKA®-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Manometer	Bosch + Sohn, Jungingen, Deutschland
Mikroskop (Nikon SMZ645)	Nikon, Tokio, Japan
NOx Analyzer ENO-20	©EICOM Corporation, Kyoto, Japan
Pinzette, abgewinkelt 5/45 (11251-35 Dumoxel)	Fine Science Tools by Dumont, Heidelberg, Deutschland
Pinzette, gebogen, verzahnt 0.8 mm (11051-10)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettierhilfe Eppendorf <i>Research</i> 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Eppendorf <i>Research</i> 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe Eppendorf <i>Research</i> 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PowerChrom 280 <i>Chromatographic Data Recording System</i> (ER280)	eDAQ Pty Ltd, New South Wales, Australia
Präzisionswaage (L2200P)	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland
Schere, stumpf (12D402 14575-11)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schlauchpumpe REGLO Digital, Ismatec®	Cole-Parmer® GmbH, Wertheim, Deutschland
Schrittmacher (HSE Stimulator P)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Springschere (15003-08)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Stereomikroskop (Leica MZ6)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Thermomixer (5436)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transonic <i>Flow Probe</i> (MC1PRB-HSE for HSE-TTFM)	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March, Deutschland
Umlaufkühler (UK 12/600)	Behr Labor-Technik, Düsseldorf, Deutschland
Vortex-Genie® 2 (SI-0236)	Scientific Industries Inc.™, New York, USA

Wasseraufbereitungssystem <i>Millipore Milli-Q Reference</i>	Merck <i>Millipore</i> , Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge (5417R)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (MIKRO 200R)	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 3: Übersicht der für die Versuche verwendeten Geräte.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
96-Well Platte <i>PlateOne</i> ®	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
BD Eclipse <i>Needle</i> 21G x 1 ½ TW	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD Eclipse <i>Needle</i> 25G x 5/8	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD <i>Microlane</i> 3 20G	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
BD <i>Vacutainer Safety-Lok</i> 21 G x ¾" x 12" (0,8 x 19 mm x 305 mm)	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Deckgläser 24 x 60 mm no.1	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Eppendorfgefäß 1,5 ml (weiß/braun)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorfgefäß 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Faden Seraflex 5/0	SERAG Wiessner GmbH & Co.KG, Naila, Deutschland
Membranfilter 0,45 µm	Merck <i>Millipore</i> , Darmstadt, Deutschland
Objektträger 76 x 26 x 1 mm	Engelbrecht Medizin und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl XL	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl m. Filter <i>TipOne</i> ®	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl XL	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Rotilabo®-Einmal-Wägeschalen	Carl Roth® GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Selbstklebende Verschleißfolie	Starlab GmbH, Hamburg, Deutschland
Spritze 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze 2 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Spritze 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tape	Durapore™ 3M™, Neuss, Deutschland

Tabelle 4: Übersicht der für die Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien.

2.1.6 Software

Programm	Hersteller
DISKUS Mikroskopische Dokumentation, Version 4.30.7-#247, 2001	Hilgers, Königswinter, Deutschland
DISKUS.view Mikroskopische Diskussion, Version 4.80.8342-#0	Hilgers, Königswinter, Deutschland
EndNote X8.1, Version 18.0.0.12000, 2017	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania
GraphPad PRISM®, Version 6.0c	GraphPad Software, Inc., San Diego, Californien
iox 2.4.5.6, 2008	Emka Technologies, Paris, Frankreich
Microsoft® Excel für Mac, Version 16.10 (180210), 2017	Microsoft® Corporation, Redmond, Washington
Microsoft® Word für Mac, Version 16.12 (180410), 2018	Microsoft® Corporation, Redmond, Washington
PowerChrom, Version 2.6.7, 2010	eDAQ Pty Ltd, New South Wales, Australia

Tabelle 5: Übersicht der für die vorliegende Arbeit verwendeten Softwareprogramme.

2.2 Methoden

2.2.1 Ex vivo I/R-Modell am Langendorff-Perfusor

Zur Untersuchung der erythrozytären Funktion im Rahmen kardialer I/R wurden humane RBCs zu Beginn einer globalen kardialen Ischämie in die Koronarien muriner Herzen am *ex vivo* Langendorff-Transfermodell geladen.

Langendorff-Perfusor

Der Langendorff-Perfusor (Hugo Sachs Elektronik) wurde wie in früheren Arbeiten beschrieben verwendet (Sutherland und Hearse, 2000, Skrzypiec-Spring et al., 2007, Bell et al., 2011, Totzeck et al., 2016, Muessig et al., 2020a). Es wurde das druckkonstante Modell des Langendorff-Herzens verwendet (s. Abb. 4), wobei der aortale Druck der murinen Herzen über ein Manometer konstant auf 100 mmHg (Millimeter Quecksilbersäule) gehalten wurde. Hiermit konnte, im Gegensatz zum flusskonstanten Modell, die Autoregulation des koronaren Flusses beobachtet werden, die unter anderem als Einschlusskriterium der Herzen bewertet wurde und für die Myokardfunktion wichtig war.

Das Perfusat, in Form eines modifizierten Krebs-Henseleit-Puffers (KHB, vgl. 2.2.2), wurde durch eine Fritte mit gesintertem Filter für mindestens 15 Minuten vor Versuchsbeginn mit Carbogen begast, um einen pH von 7,4 zu erreichen (Totzeck et al., 2016). Erwärmt wurde es durch den *Thermocirculator* im 38,5 °C warmen Wasserbad und über die Schlauchpumpe in das System transportiert, wo es dann bei ca. 37 °C am Herzen ankam (Abb. 5).

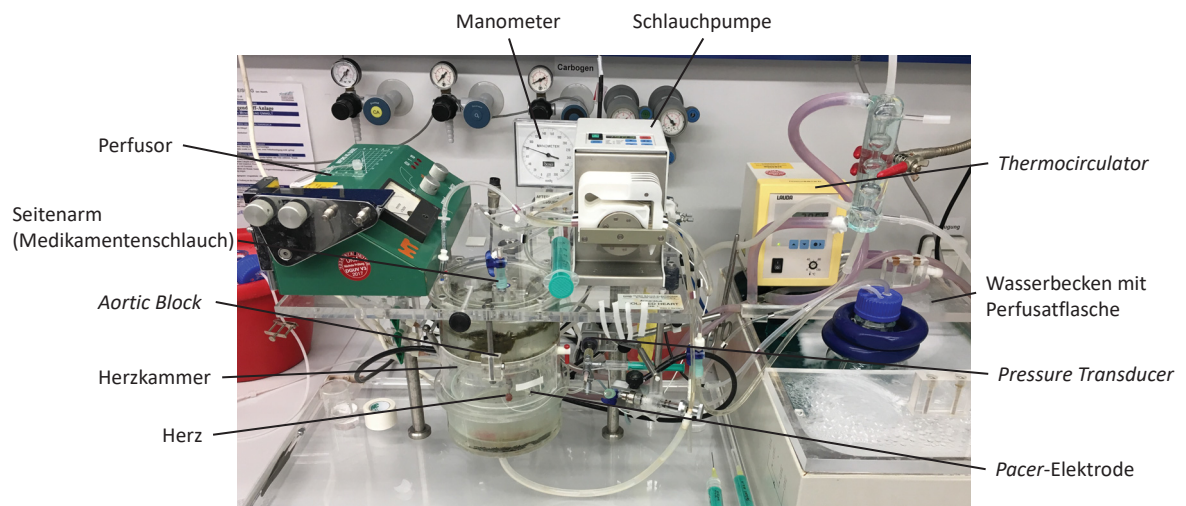


Abb. 5: Aufbau des verwendeten Langendorff-Perfusors. Quelle: Eigene Aufnahme

Globalischämie

Die Ischämie des I/R-Modells wurde in Form einer globalen Ischämie durchgeführt. Dafür wurde der Zufluss des Puffers durch das Umlegen des Absperrhahns (s. Abb. 6), der den Zufluss reguliert, für 40 Minuten unterbrochen und anschließend für zwei Stunden (Reperfusion) weitergeführt (vgl. 2.2.5). In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe erwiesen sich 40 Minuten als optimale Infarktzeit (Muessig et al., 2020a).

2.2.2 Herstellung des Perfusats - Krebs-Henseleit-Puffer

Die Elektrolyte (außer dem Calciumchlorid (CaCl_2)), Glukose sowie das Natrium-Pyruvat ($\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$) wurden entsprechend der folgenden Tabelle (vgl. Tabelle 6) in zwei oder vier Litern *Millipore*-Wasser (H_2O) 15 Minuten unter Rühren gelöst und dabei für mindestens 15 Minuten mit Carbogen begast, um einen pH von 7,4 zu erreichen. Erst darunter war das

CaCl₂ löslich, konnte hinzugefügt werden und der Puffer wurde für weitere zwei Minuten unter Rühren begast.

	2 Liter	4 Liter	Molarität
NaCl	13,8 g	27,6 g	118 mM
KCl	0,7 g	1,4 g	4,7 mM
MgSO₄	0,4 g	0,8 g	0,8 mM
NaHCO₃	4,18 g	8,36 g	25 mM
KH₂PO₄	0,32 g	0,64 g	1,2 mM
Glukose	1,8 g	3,6 g	5 mM
C₃H₃NaO₃	0,44 g	0,88 g	110 mM
Lösung 15 Minuten mit Carbogen begasen			
CaCl₂	0,74 g	1,48 g	2,5 mM

Tabelle 6: Elektrolyte zur Herstellung des verwendeten Krebs-Henseleit-Puffers. Mengenangaben in Gramm (g). (NaCl: Natriumchlorid, KCl: Kaliumchlorid, MgSO₄: Magnesiumsulfat, NaHCO₃: Natriumhydrogen-carbonat, KH₂PO₄: Kaliumdihydrogenphosphat, C₃H₃NaO₃: Natrium-Pyruvat, CaCl₂: Calciumchlorid)

Um eventuelle kristalline und andere Partikel herauszufiltern, wurde die Flüssigkeit durch ein 0,45 µm Filterpapier gefiltert und bei 4 °C für höchstens 48 Stunden aufbewahrt.

Die Konzentration des Energiemetaboliten Pyruvat ist höher als ursprünglich von Krebs und Henseleit verwendet, weshalb es sich um einen modifizierten KHB handelt (vgl. (Skrzypiec-Spring et al., 2007, Bell et al., 2011)). Die Konzentrationen der Elektrolyte entsprechen in etwa denen der physiologischen Konzentrationen im Blutplasma.

2.2.3 Präparation der Mäuseherzen

Vor Durchführung der Versuche fand die Teilnahme am Tiertötungskurs statt. Den Mäusen wurde eine finale Narkose von 49,94 mg/ kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 40,04 mg/ kg KG Xylazin intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Zur Antikoagulation erhielten sie 1.000 i.E. Heparin i.p.. Der Tod erfolgte durch das Verbluten nach der Organentnahme.

Zur Präparation wurde der ventrale Thorax rasiert und die Maus auf einen Präparationstisch gespannt. Die Haut über dem Sternum wurde mit einem medialen Schnitt mit der Schere entfernt. Danach wurde mit einem transversalen Schnitt unter dem Sternum sowie nach Durchstechen des Diaphragmas, mit jeweils einem Entlastungsschnitt rechts und links durch die Rippenbögen in Richtung Axilla, der Brustkorb eröffnet. Das

Sternum wurde dann nach oben geklappt, womit der Zugang zum Herzen frei lag. Der bindegewebige Gefäßstrang kaudal des Herzens wurde mit der stumpfen Pinzette gegriffen. Vena cava inferior und Oesophagus wurden kaudal und Aorta descendens, Vena cava superior und Trachea kranial des Herzens, dicht über der Wirbelsäule durchtrennt. Das komplette Thorax-Organpaket wurde in eine Kaltschale, die mit 4 °C kaltem KHB und 4.000 i.E. Heparin befüllt war, transferiert. Zunächst wurden dann die Lungenflügel und die dorsal gelegene Trachea sowie der Oesophagus mit der spitzen Schere entfernt. Nach Eröffnung des linken Vorhofs und Entfernung des umliegenden Fettgewebes, wurden ventral die einzelnen Thymuslappen entfernt. Wichtig war dabei, die Aorta ascendens stehen zu lassen. In einer mit 1000 i.E. Heparin und eisgekühltem KHB vorbereiteten Kanülenschale wurde die Aorta auf eine Metallkanüle gestülpt und mit einem nicht resorbierbaren Faden befestigt. Dabei war darauf zu achten, dass die Kanüle distal der Aortenklappe in der Aorta ascendens zu liegen kam, um eine Versorgung des Myokards durch die Koronarien zu gewährleisten. Wenn die Spitze der Kanüle gerade nicht mehr durch die dünne Aortenwand zu sehen war und hinter dem Myokard verschwand, war sie richtig positioniert. Die Kanüle wurde dann bei eingeschaltetem Perfusor an die Aufnahme unter der *Compliance*-Kammer (Abb. 6) eingehängt, um Luftembolien in den Koronararterien zu vermeiden. Zur Aufnahme der Drücke des linken Ventrikels wurde ein kleiner selbst gebastelter, mit *Millipore*-Wasser befüllter Ballon aus *High-Density Polyethylen*-Folie über den linken Vorhof in den Ventrikel eingebracht. Der Ballon wurde über einen mit Wasser gefüllten Schlauch an einen Druck-Sensor (*Pressure Transducer*) konnektiert und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) zwischen 5 und 10 mmHg adjustiert.

Zur Stimulation des Herzens wurde von rechts eine *Pacer*-Elektrode in die Nähe der Vorhofebene angelegt (Abb. 6), die mit 600 Hz bei 2-5 Volt stimuliert. Die Zeit vom ersten Hautschnitt bis zum Einhängen des Herzens in den Perfusor betrug in allen Versuchen zwischen fünf und neun Minuten.

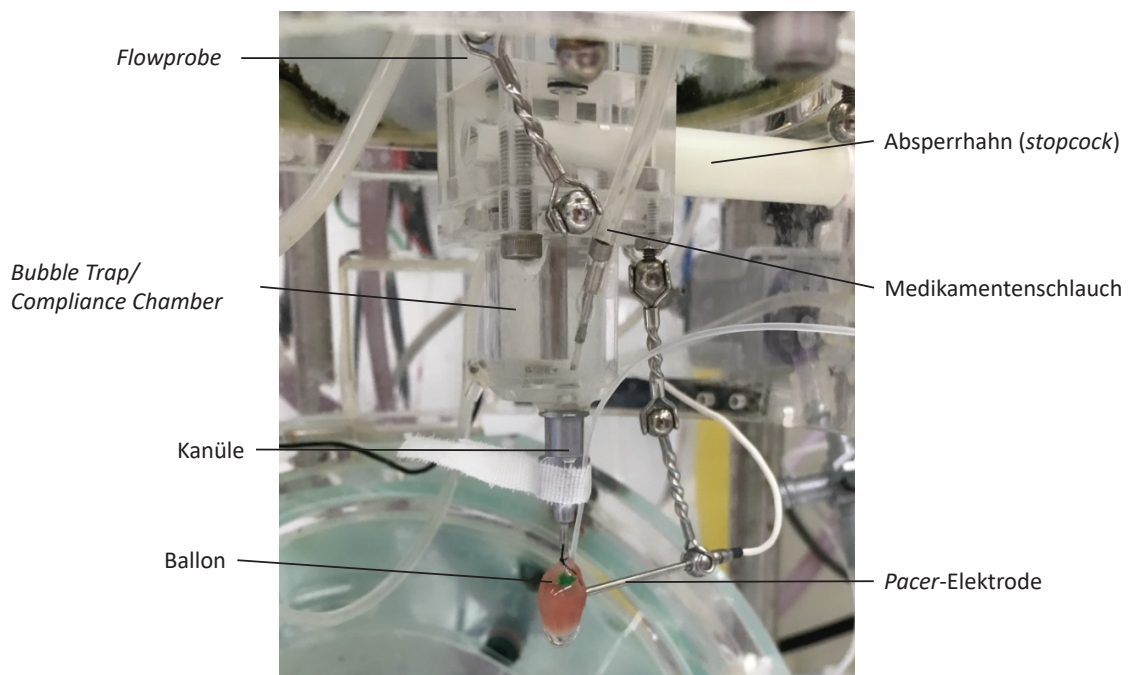


Abb. 6: Aortic Block innerhalb der Herzkammer mit im linken Ventrikel positioniertem Ballon. Das Perfusat wird über den abgebildeten Turm dem Herzen zugeführt. Der Zufluss kann mit dem Absperrhahn reguliert werden, wobei der Fluss über die *Flowprobe* gemessen wird. Eventuell vorhandene Luftblasen werden in der *Compliance Chamber* abgefangen. Der ventrikuläre Druck wird über den Ballon am *Pressure Transducer* aufgenommen. Quelle: Eigene Aufnahme

2.2.4 Gewinnung der Blutproben und Probenbereitung

Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf am 10.08.2017 genehmigt und läuft unter der Studiennummer 5903R sowie der Registrierungs-ID 2017034183. Die schriftliche Einwilligung aller Probanden liegt vor.

Zur Gewinnung der humanen Erythrozyten wurde Probanden venöses Blut abgenommen. Gesunde Probanden ≤ 30 Jahren (Median = 28,5 Jahre) wurden aus Studierenden und wissenschaftlichen Mitarbeitern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert. Außer der Einnahme oraler Kontrazeptiva bei Frauen, hatten alle Probanden eine negative Medikamentenanamnese. Probanden mit einem medikamentös behandelten Diabetes Mellitus Typ 2 ($\text{HbA1c} \geq 7,1 \%$), ≥ 60 Jahren (Median = 77 Jahre) und einer KHK oder peripheren arteriellen Verschlusskrankung (pAVK) als Zeichen einer

Endorganschädigung wurden aus den Patienten der kardiologischen Abteilung der MNR Klinik Düsseldorf rekrutiert (s. Tabelle 7).

Merkmal	gesund (n=10)	DM (n=6)	p
Anzahl	10	6	-
Alter (Jahre)	27,5 ± 2,73	76,33 ± 6,45	0,0001
Geschlecht (männl.)	5 (50)	3 (50)	> 0,99
BMI (kg/ m ²)	22,48 ± 1,49	29,08 ± 5,56	0,005
HbA1c (%)	-	9,18 ± 1,82	-
GFR (ml/ min)	-	52,5 ± 21,78	-
Insulin	0 (0)	4 (66,67)	0,0009
orale AD	0 (0)	3 (50)	0,0104
ASS	0 (0)	5 (83,34)	0,0001
pAVK	0 (0)	3 (50)	0,0104
KHK	0 (0)	5 (83,34)	0,0001

Tabelle 7: Patientencharakteristika. Angaben von Alter, BMI, HbA1c und GFR als Mittelwert ± Standardabweichung, weitere Parameter angegeben als absolute und relative (in Klammern) Häufigkeit. (AD: Antidiabetika; ASS: Acetylsalicylsäure; DM: Diabetes Mellitus; GFR: Glomeruläre Filtrationsrate; HbA1c: glykiertes Hämoglobin; KHK: Koronare Herzkrankheit; n: Probandenanzahl; p: Signifikanzwert; pAVK: periphere arterielle Verschlusskrankheit)

Bei der Abnahme wurde die Gerinnung des Blutes mit ca. 2 ml (10.000 i.E.) Heparin gehemmt und zügig bei 4 °C für 10 Minuten mit 830 g (Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Das Plasma sowie der *Buffy white coat* (Leukozyten, Thrombozyten) wurden abpipettiert und die RBCs anschließend zweimal mit frischem oxygenierten KHB in der Zentrifuge unter den gleichen Bedingungen gewaschen. Der Überstand wurde dabei jeweils mit der Pipette entfernt. Die gewaschenen RBCs wurden zusammen mit KHB in 2 ml Eppendorfgefäßen für bis zu 24 Stunden bei 4 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Für die Proben wurde ein physiologischer Hämatokrit von 40 % verwendet, da dieser in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe (Muessig et al., 2020a) die besten Ergebnisse erzielte. Dafür wurden 400 µl RBCs mit 600 µl KHB in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vermischt.

Der Arginase-Inhibitor norNOHA und der eNOS-Inhibitor N^ω-Nitro-L-Arginin Methyl Ester (L-NAME) wurden in 0,9 %iger NaCl-Lösung gelöst und jeweils in einer Endkonzentration von 1 milliMolar (mM) der Erythrozytensuspension oder dem KHB zugesetzt. Diese Konzentration zeigte in Vorversuchen und den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Yang et al. den größten Effekt (Yang et al., 2013).

Pro Versuch wurden jeweils drei identische Proben vorbereitet. Zwei Proben wurden anschließend für 30 Minuten bei 38 °C inkubiert. Von diesen wurde eine den Koronararterien der Herzen über einen Seitenarm des Perfusors (Medikamentenschlauch, Abb. 6) zu Beginn der Ischämie zugeführt. Die beiden anderen Proben wurden direkt nach ihrer Fertigstellung (vor und nach 30-minütiger Inkubation) für 10 Minuten bei 4 °C mit 10.000 g zentrifugiert. Überstand und RBCs wurden getrennt, direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Analyse der Nitrit- und Nitratkonzentrationen bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.5 Versuchsprotokoll

Nach dem Einbringen des Herzens in den Perfusor musste dieses für mindestens 25 Minuten äquilibrieren. Gegebenenfalls wurde in der Zeit der LVEDP, der im Verlauf tendenziell anstieg, nachadjustiert, so dass er unter 15 mmHg lag. Auch die weiteren Parameter Aortendruck, Herzfrequenz, Temperatur des KHB, Alter der Mäuse und Präparierzeit wurden in allen Versuchen konstant gehalten.

Es wurden erste *Baseline*-Werte für die Kurzischämie aufgezeichnet und der Zufluss danach für 20 Sekunden gestoppt. Bei der folgenden Reperfusion musste durch die Koronarien eine Flusssteigerung von mindestens 50 % (Median = 237%) der *Baseline* erreicht werden. Dies sicherte, dass das Herz über eine ausreichende Koronarreserve verfügte und es im Rahmen der Präparation zu keiner relevanten Verletzung der Aorta oder der Koronararterien gekommen war. Zudem sollte der Koronarflussfluss nicht über 4 ml/min und der linksventrikuläre Druck (*left ventricular developed pressure*, LVDP/ DP) mindestens 50 mmHg betragen, um für alle Versuche konstante Bedingungen zu gewährleisten. Herzen, die diese Bedingungen nicht erfüllten, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Um die Werte vergleichbar zu halten, wurden nur Werte bei einer Herzfrequenz von 600 Hz vermerkt, was etwas über der physiologischen Frequenz der Mäuse liegt. Erreichten die Herzen diese Frequenz nach der Globalischämie nicht mehr wurden sie ebenfalls ausgeschlossen.

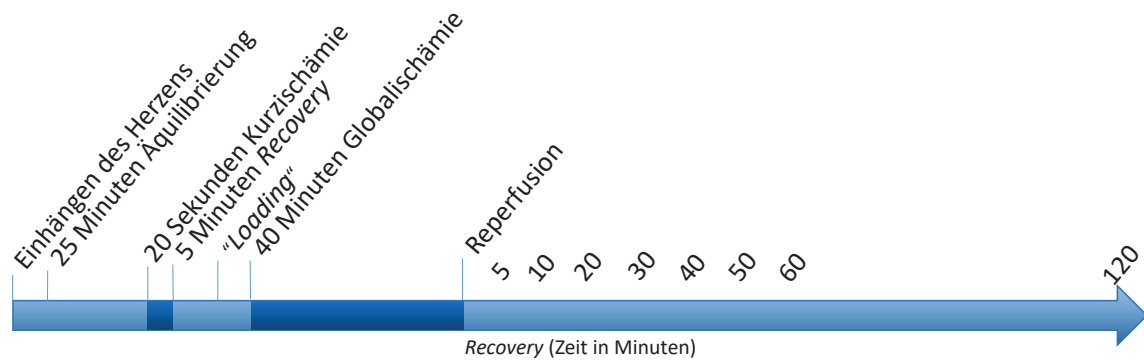


Abb. 7: Zeitleiste des Versuchsprotokolls. Schematisch dargestellte Abfolge der Versuchsschritte, die Ischämie-Phasen sind dunkelblau dargestellt. Die Zeitpunkte, zu denen die ausgewerteten Variablen aufgezeichnet wurden, sind in Minuten angegeben.

Nach einer mindesten fünf-minütigen Erholungsphase wurden, sobald das Herz eine konstante Druckentwicklung zeigte, alle Werte als *Baseline*-Werte aufgezeichnet. Die interessierenden Variablen waren dabei neben dem koronaren Fluss (*flow* (ml/min)) und dem entwickelten LVDP (mmHg), die positive bzw. negative Druckänderung pro Zeiteinheit der Kontraktions- bzw. der Relaxationsphase ($+dP/dt$, $-dP/dt$ (mmHg/s)) und der LVEDP (mmHg). Die Aufzeichnung und Speicherung der Werte geschah mittels der Software iox 2.4.5.6 (Emka Technologies).

Im Anschluss wurde der Fluss des KHBs durch die Koronararterien, durch Umlegen des Absperrhahns sowie durch Abschalten der Pumpe unterbrochen.

Die Proben wurden mit 400 μ l/min über den Seitenarm den Koronararterien zugeführt und diese damit für 60 Sekunden perfundiert, so dass die Koronargefäße mit RBCs gefüllt waren („*Loading*“, s. Abb. 7) (Muessig et al., 2020a). Daraufhin folgte sofort die 40-minütige Globalischämie unter Normothermie, wofür das Herz in ein mit 38 °C warmen KHB befülltes Becherglas gehängt wurde. Während der Phase verblieben die RBCs in den Koronargefäßen.

Nach der Ischämie-Phase wurde das Herz für zwei Stunden mit KHB reperfundiert. In den zwei Stunden wurden alle Werte zu den in Abb. 7 angegebenen Zeitpunkten aufgezeichnet. Nach 120 Minuten Erholungsphase („*Recovery*“) war der Versuch beendet (Abb. 7).

2.2.6 Analyse der Infarktgröße

Die im Langendorff-Perfusor verwendeten Herzen wurden direkt nach Versuchsende gewogen. Dafür wurden sie zuvor auf weichem Zellstoff abgetropft, um überflüssigen Puffer zu entfernen. Anschließend wurden sie fest in Frischhaltefolie gewickelt, um Gefrierbrand zu vermeiden und direkt für mindestens eine Stunde bei -24 °C eingefroren.

In gefrorenem Zustand konnten die Ventrikel der Herzen in 6 - 7, ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten werden. Jede Ebene wurde gewogen, wobei das Gesamtgewicht mindestens 50 % des Gewichtes vor dem Einfrieren betragen sollte und anschließend mit einer Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC-Färbung, s.u.) für mindestens zwei Minuten bei 38 °C gefärbt. Das TTC kann durch die Zellmembran gelangen und bindet in den Zellen an Dehydrogenasen, die dies mittels NADPH reduzieren. Da lebende Zellen viel NADPH und somit auch Dehydrogenasen enthalten, erscheinen diese durch Reduzierung des TTC rot, die abgestorbenen Gewebeanteile blieben hingegen weiß (Bell et al., 2011) (s. Abb. 8).

Unter dem Mikroskop wurden Fotos gemacht, an Hand derer die Infarktgröße planimetrisch mit dem Computerprogramm DISKUS.view (Hilgers) ausgewertet werden konnte (Abb. 8). Aus den planimetrischen Messungen und dem Gewicht der einzelnen Ebenen wurde dann der infarzierte Gewebeanteil mittels Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation) berechnet.

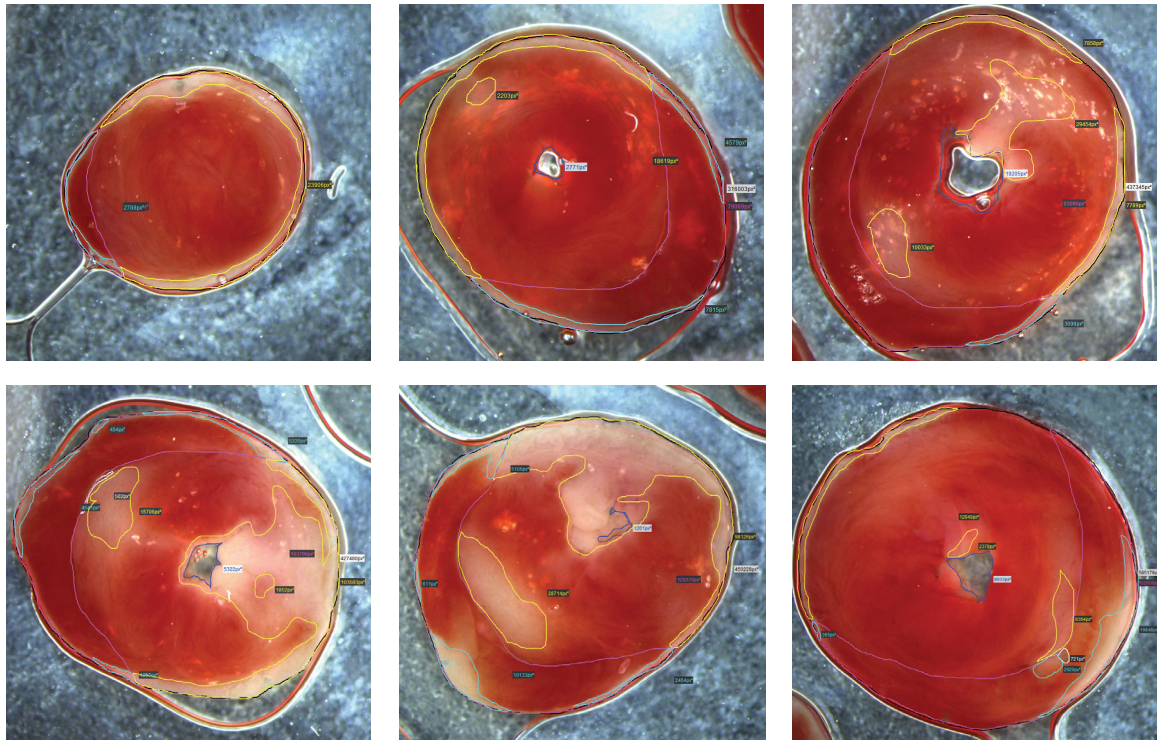


Abb. 8: Ausmessung der Infarktfläche an Myokardschnitten mittels TTC-Färbung. Nach Versuchsende vitale Bereiche des Myokards werden rot angefärbt, nekrotisierte Bereiche bleiben farblos. Die Infarktgröße des dargestellten linken Ventrikels beträgt 17,9 %. Maßstab ca. 10:1. (TTC: Triphenyltetrazoliumchlorid)

Herstellung des TTC-Farbstoffes

Herstellung der beiden Pufferlösungen:

- Puffer 1 (basisch): 0,1 M Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
 → 14,2 g Na_2HPO_4 (141,96 M) auf 1 l *Millipore*- H_2O
- Puffer 2 (sauer): 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)
 → 6 g NaH_2PO_4 (137,99 M) auf 0,5 l *Millipore*- H_2O

Für 1 Liter Pufferlösung wurden 800 ml des 1. Puffers mit 200 ml des 2. Puffers vermengt. Der pH des Puffers sollte bei etwa 7,4 liegen. Dafür wurde so lange Pufferlösung unter ständigem Rühren hinzu titriert, bis der pH erreicht war. Der fertige Puffer kann in einem lichtgeschützten Gefäß bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Zur Herstellung der Farblösung wurden Puffer und TTC-Pulver täglich frisch vermischt. Pro 1 ml Puffer waren dazu 10 mg TTC notwendig. Zur Färbung eines Herzens wurde 3 ml Farblösung benötigt.

2.2.7 Bestimmung von Nitrit und Nitrat

Zur indirekten Bestimmung der NO-Konzentration in den verwendeten Proben wurden dessen stabilere Oxidationsprodukte NO_2^- und NO_3^- spektrophotometrisch mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Dazu wurde das spezielle HPLC-System ENO-20 (©EiCom Corporation) verwendet. Diese Methode der Bestimmung der NO-Konzentration wurde bereits in früheren Arbeiten verwendet (Ishibashi et al., 2001, Yang et al., 2013).

Vor Gebrauch des NOx-Analyzers ENO-20 wurden die gespülten *Carrier*- und *Reactor*-Flaschen (s. Abb. 9) mit den benötigten Reagenzien befüllt:

Ansatz der Reagenzien

- *Carrier*: 900 ml *Millipore*-H₂O + 100 ml Methanol verrühren bis sich keine Schlieren mehr bilden
→ mit 1 Flasche *Carrier-Powder* verrühren
- *Reactor A*: 450 ml *Millipore*-H₂O + 50 ml Methanol + 12,5 ml Salzsäure (37%ig) verrühren
→ mit 1 Flasche *Reactor A-Powder* verrühren
- *Reactor B*: 450 ml *Millipore*-H₂O + 50 ml Methanol
→ mit 1 Flasche *Reactor B-Powder* verrühren (lichtgeschützt mit Alufolie umwickelt aufbewahren)

Alle Reagenzien können luftdicht und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Reactor A und *B* wurden zu gleichen Teilen (ca. 100ml) täglich neu angesetzt (Griess-Reagenz) und in die mit Aluminiumfolie umwickelte *Reactor*-Flasche gefüllt. Bei rosa Verfärbung der Lösung kann diese nicht mehr verwendet werden. Von der *Carrier*-Lösung wurden ca. 200 ml in die Flasche abgefüllt. Die *air-trap* Gefäße wurden mit einer 20 ml Spritze aspiriert, so dass auch diese mit Reagenzien befüllt waren (s. Abb. 9).

Bei der Messung mit dem NOx-Analyzer werden zuerst in der *Pre column* Proteinreste aus den Proben abgefangen. Nitrit und Nitrat werden dann in der *Separation column* nach ihrer Polarität voneinander getrennt. Das Nitrat wird in der *Reduction column*, in einer Reaktion mit Cadmium und reduziertem Kupfer, zu Nitrit reduziert. Nitrit reagiert dann

wiederum mit der *Reactor*-Lösung aus Sulfanilamid und N-Ethylendiamin in einer Griess-Reaktion zu einem Diazo-Produkt. Dieses kohlenstoff- und stickstoffhaltige Produkt absorbiert Licht bei 540 nm und kann mittels HPLC an der Photodiode sichtbar gemacht werden (Bryan und Grisham, 2007). Da Nitrit direkt durch die Säulen läuft und Nitrat erst den Reduktionsschritt durchlaufen muss, ergeben sich auf der Zeitachse des Chromatogramms zwei *Peaks*, deren Fläche jeweils die Menge des absorbierenden Produktes von Nitrit widerspiegelt.

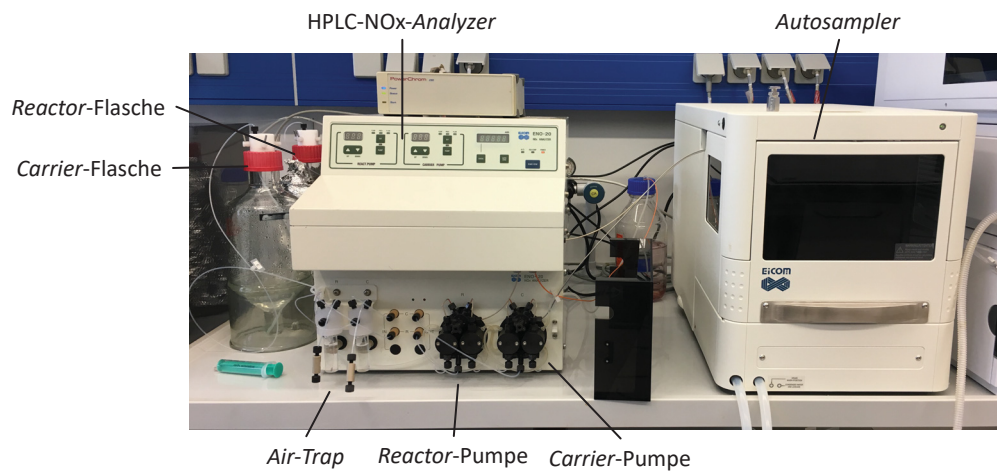


Abb. 9: Aufbau des verwendeten NOx-Analyzers. Mit dem *Autosampler* wurden die Proben nacheinander in das Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-System eingebracht und die Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen spektrophotometrisch gemessen. Quelle: Eigene Aufnahme

Bei Inbetriebnahme wurden der Fluss, die Drücke und Pumpen des ENO-20 überprüft. Die Reaktionskammer wurde auf 35 °C erwärmt und die *Pre column* zunächst mit *Precolumn-Powder* gelöst in Aceton und anschließend mit *Millipore-H₂O* und Methanol gespült (s. Abb. 9). Der *Autosampler* wurde programmiert, die vorbereiteten Kalibrierungslösungen und Proben (s.u.) in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Messungen über das Programm PowerChrom (eDAQ©) gestartet.

Kalibrierungslösung

1 M Nitrit/ Nitrat-Lösung: 0,699 g Nitrit + 0,849 g Nitrat in 10 ml *Millipore*-H₂O
unter Rühren auflösen

Zur Erstellung der Kalibrierungsreihe wurde die Lösung mit Nitrit-freiem *Millipore*-H₂O auf 100 µM, 10 µM, 1 µM und 0,1 µM verdünnt sowie eine Probe mit 0 µM (*Millipore*-H₂O) angesetzt. Je 100 µl der Verdünnungsreihe wurden mit 100 µl eiskaltem Methanol in 1,5 ml Eppendorfgefäße gefüllt, vermengt und bei 10.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in die erste Reihe einer 96-Well-Platte gefüllt.

Probenvorbereitung

Die Vorbereitung der Proben geschah mit besonderer Sorgfalt und Hygiene, da die Metabolite NO₂⁻ und NO₃⁻ extrem kurzlebig und durch viele Faktoren wie unter anderem der Raumluft, Licht oder dem Speichel des Untersuchers beeinflussbar sind (Bryan und Grisham, 2007).

Der Überstand der unbehandelten und behandelten RBCs diabetischer Patienten (s. 2.2.4) wurde aufgetaut und zu je 100 µl mit 100 µl Methanol in 1,5 ml Eppendorfgefäßen gevortext. Die Proben wurden dann ebenfalls bei 10.000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, so dass sich ein Pellet aus in der Lösung verbliebenen Proteinen absetzte. Je 100 µl des Überstandes wurden direkt in die weiteren *Wells* gefüllt und im ENO-20 gemessen. Während der Verarbeitung wurden die Proben auf Eis kalt gehalten.

2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Parameter am Langendorff-Perfusor (s.o.) wurde mittels der Software Graphpad PRISM 6.0c (GraphPad Software) und Microsoft® Excel für Macintosh durchgeführt. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert ± Standardabweichung (*standard deviation*, SD) und wird in % zu den *Baseline*-Werten vor Globalischämie oder im Fall der Infarktgröße, prozentual zum gesamten linksventrikulären Myokard gesetzt. Die Angaben des LVEDP erfolgen als absolute Werte in mmHg.

Beim Vergleich zweier unabhängiger Gruppen wurde der *students* t-Test und bei dem Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen die unifaktorielle Varianzanalyse

(ANOVA) gefolgt von Bonferroni-korrigierten *post hoc* t-Tests verwendet. Bei der ANOVA Testung wurde jeweils die Gruppe ohne Medikamente als Kontrolle angesehen. Bei dem Vergleich der drei Kontrollgruppen untereinander wurden die jeweiligen Mittelwerte miteinander verglichen.

Die Auswertung der am ENO-20 generierten Chromatogramme erfolgte mit PowerChrom (eDAQ©) für Windows sowie Graphpad PRISM 6.0c und Microsoft® Excel für Macintosh. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert $\pm$ SD. Es wurden zwei Gruppen mittels *students* t-Test miteinander verglichen.

Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Protektive Wirkung von Erythrozyten im Rahmen von I/R-Schäden

Um die Funktion humaner Erythrozyten im Rahmen des kardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens zu evaluieren, wurden RBCs zu Beginn einer 40-minütigen Ischämie in das Koronarsystem muriner Herzen am Langendorff-Perfusor eingebracht. Zunächst wurden dafür die Herzen der Kontrollgruppe mit KHB beladen und die Koronarien so für eine Minute perfundiert. Vergleichend wurden dann in der zweiten Gruppe die Herzen mit RBCs junger gesunder Spender, mit einem Hämatokrit von 40 % gelöst in KHB, beladen. Die relevanten Parameter wurden nach dem beschriebenen Versuchsprotokoll erhoben (vgl. 2.2.5).

Die mit KHB behandelten Kontroll-Herzen erreichten im Mittel 60 Minuten nach Reperfusion wieder einen linksventrikulären Druck (*LV Developed Pressure*) von $24 \pm 7 \%$ im Vergleich zu den *Baseline*-Werten. Die Herzen, deren Koronarien mit RBCs perfundiert wurden, konnten dagegen einen signifikant höheren LVDP von $64 \pm 19 \%$ der *Baseline* erreichen ($p = 0,001$, $n = 6$) (Abb. 10). Ebenso zeigten sich signifikante Unterschiede in der maximalen positiven sowie negativen Druckänderung pro Zeiteinheit (dP/dt). Die $+dP/dt$ lag bei den Versuchen mit KHB bei nur noch $27 \pm 7 \%$ der positiven Druckänderung vor I/R, wohingegen die Herzen mit RBCs eine Druckänderung von noch $72 \pm 24 \%$ der *Baseline* erreichten ($p = 0,002$, $n = 6$). Die $-dP/dt$ konnte von $21 \pm 5 \%$ der *Baseline* bei den Versuchen mit KHB auf $60 \pm 19 \%$ ($p = 0,001$, $n = 6$) durch die Applikation von jungen RBCs gesteigert werden (Abb. 10).

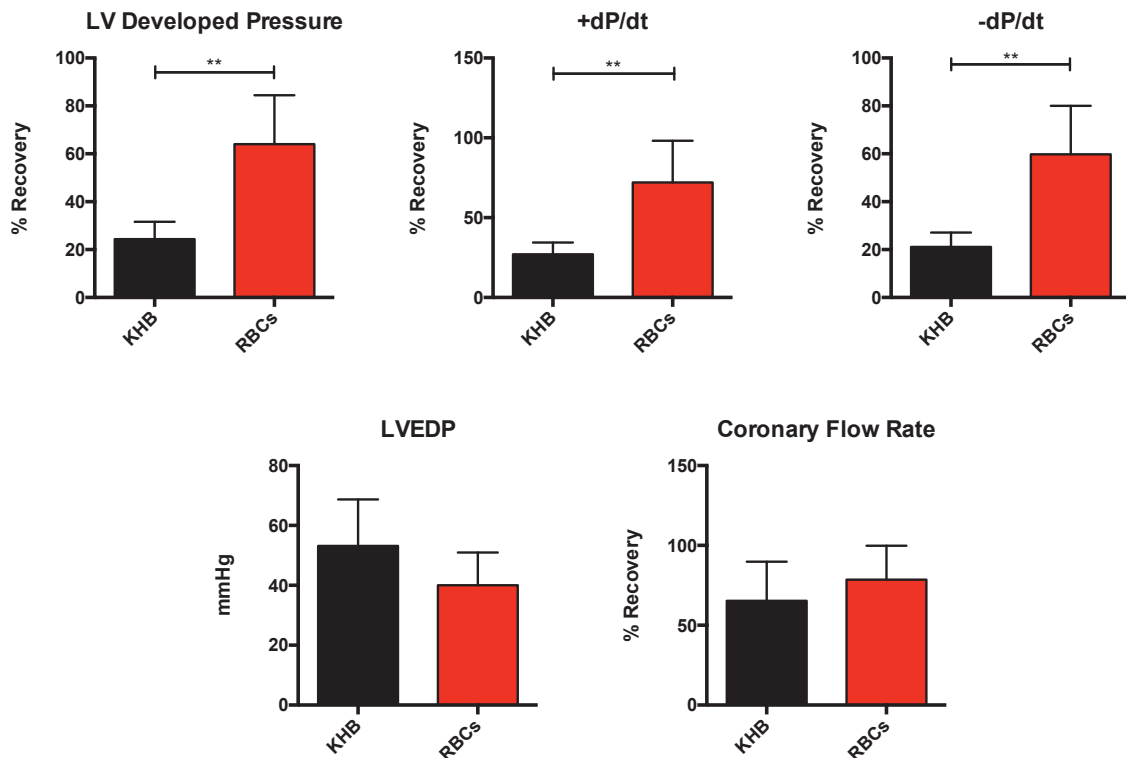


Abb. 10: Wirkung humaner Erythrozyten auf die linksventrikuläre Myokardfunktion nach I/R am Langendorff-Modell. Die Perfusion der Koronararterien mit humanen Erythrozyten (RBCs, rot) in 40 %-iger Konzentration führte zu einer signifikanten Steigerung der linksventrikulären Druckentwicklung (LV Developed Pressure) und der positiven sowie negativen Druckänderung (+dP/dt, -dP/dt) (% Recovery zur Baseline) nach I/R im Vergleich zu den Puffer-perfundierten Kontrollen (KHB, schwarz). (LVEDP: *left ventricular end-diastolic pressure*; ** $p < 0,01$, $n = 6$)

Die linksventrikuläre Infarktgröße (*Infarct Size*, % der *Area at Risk* (AAR)), welche nach 120 Minuten Reperfusion mit Hilfe der TTC Färbung ermittelt wurde und prozentual zum gesamten linksventrikulären Myokardvolumen gesetzt wurde, konnte zudem signifikant von 51 ± 15 % des linksventrikulären Myokards (AAR) in der Kontrollgruppe auf 27 ± 10 % ($p = 0,009$, $n = 6$) in der Gruppe mit RBCs junger Spender reduziert werden (Abb. 11).

Die Untersuchungen der Flussrate der Koronararterien (*Coronary Flow Rate*, 65 ± 22 % vs. 79 ± 20 % *Recovery* zur *Baseline*, $p = 0,34$, $n = 6$) sowie des enddiastolischen Drucks (LVEDP, 53 ± 14 mmHg vs. 40 ± 10 mmHg, $p = 0,12$, $n = 6$) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und RBC-Gruppe (Abb. 10).

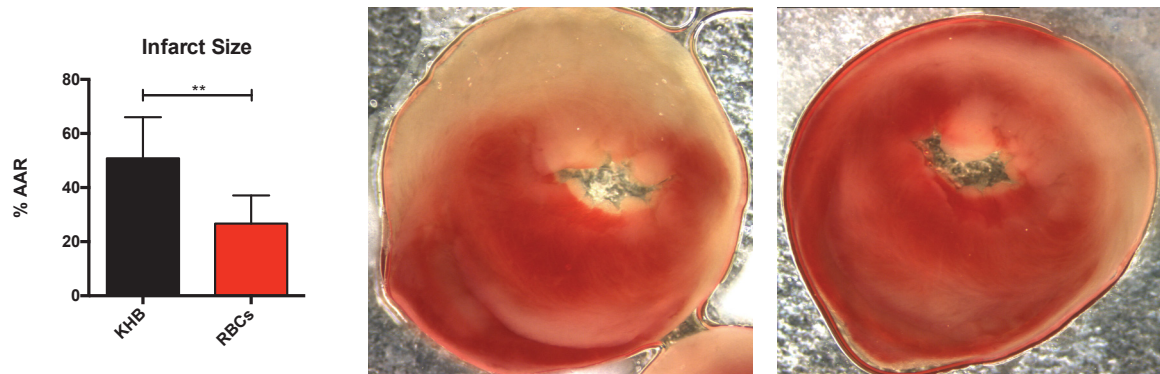


Abb. 11: Verringerung der Infarktgröße durch Perfusion mit humanen Erythrozyten. Die Perfusion der Koronararterien der murinen Herzen mit humanen Erythrozyten (RBCs, rot) führte zu einer signifikanten Reduzierung der Infarktgröße nach I/R (*Infarct Size*; % AAR, *Area at Risk*) verglichen mit der der Puffer-perfundierten Kontrollen (KHB, schwarz). Die Abbildungen zeigen repräsentative mittelventrikuläre Schnitte eines mit KHB (links, IS 52%) und eines mit humanen RBCs (rechts, IS 30%) perfundierten Herzens. (IS = *Infarct Size*; ** $p < 0,01$, $n = 6$)

Insgesamt lässt sich eine Steigerung der linksventrikulären Funktionsparameter sowie eine Reduktion der Infarktgröße durch Applikation von RBCs junger gesunder Spender in die Koronararterien der Herzen am Langendorff-Perfusor erkennen.

3.2 Verminderung des kardioprotektiven Effekts der Erythrozyten im I/R-Schaden durch Diabetes Mellitus Typ 2 in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen

Als nächstes wurde untersucht, ob die Faktoren Diabetes Mellitus Typ 2 (medikamentös behandelt) und Alter (> 60 Jahre) in Verbindung mit einer KHK oder pAVK als Zeichen einer vorhandenen Endorganschädigung die kardioprotektive Wirkung der Erythrozyten nach kardialer I/R beeinflussen.

Hierfür wurden die Koronarien der Herzen der dritten Gruppe zu Beginn der 40-minütigen Ischämie mit den vorbereiteten Proben aus Erythrozyten der Patientengruppe perfundiert. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Versuchen mit RBCs junger Spender eine signifikante Verminderung der Druckentwicklung (LV *Developed Pressure*) nach 60-minütiger Reperfusion von 64 ± 19 % auf 42 ± 9 % der *Baseline* ($p = 0,04$, $n = 6$) (Abb. 12).

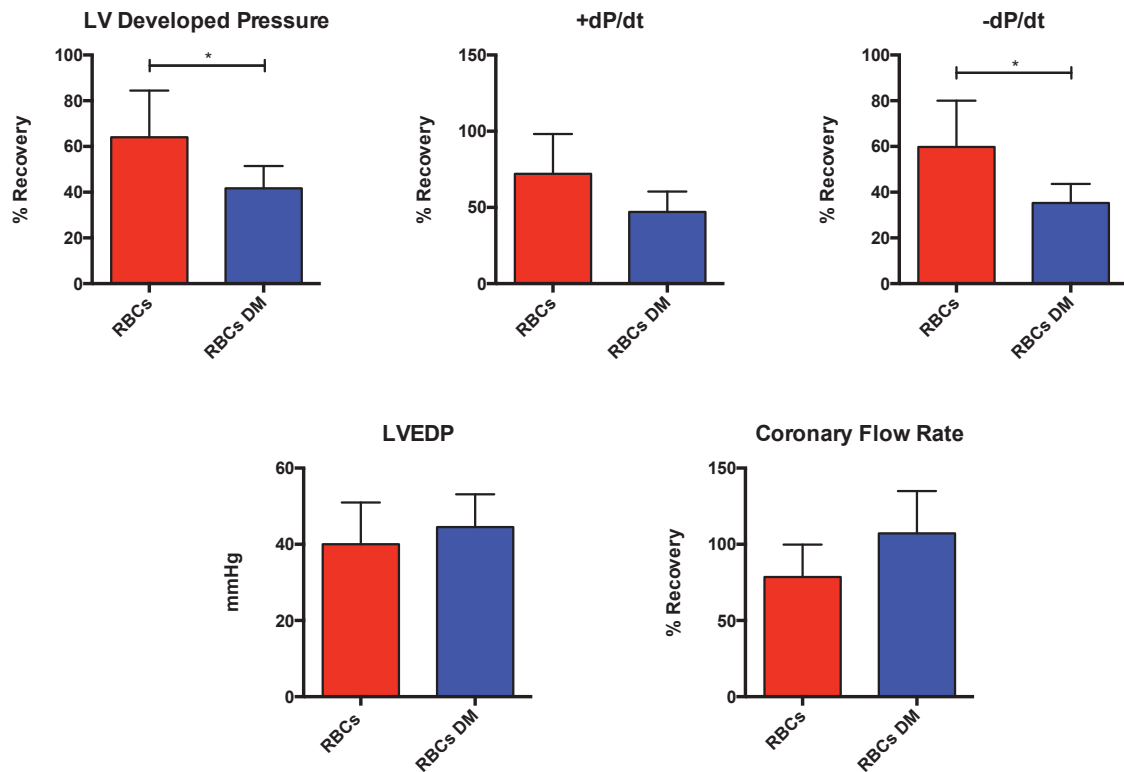


Abb. 12: Vergleich der Wirkung humaner Erythrozyten junger gesunder Spender mit der humanen Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 auf die linksventrikuläre Myokardfunktion nach I/R. Die Perfusion der Koronarien mit Erythrozyten kardiologischer Patienten mit einem Diabetes Mellitus (RBCs DM, blau) führte zu einer signifikanten Verminderung der linksventrikulären Druckentwicklung (LV *Developed Pressure*) und der negativen Druckänderung (-dP/dt) (% *Recovery* zur *Baseline*) nach I/R im Vergleich zu der Gruppe mit Erythrozyten junger Spender (RBCs, rot). (LVEDP: *left ventricular end-diastolic pressure*; * $p < 0,05$, $n = 6$)

Auch bei Betrachtung der Druckänderung pro Zeit konnte eine signifikante Reduzierung der negativen dP/dt beobachtet werden verglichen mit den Proben der jungen Probanden (60 ± 18 % vs. 35 ± 8 % der *Baseline*, $p = 0,02$, $n = 6$). Die positive dP/dt der RBCs der diabetischen Probanden unterschied sich nicht signifikant von der der jungen Spender (72 ± 24 % vs. 47 ± 12 % der *Baseline*, $p = 0,06$, $n = 6$).

In Analogie zur reduzierten Druckentwicklung war die Infarktgröße 120 Minuten nach I/R mit 42 ± 5 % der AAR signifikant größer als bei der Perfusion der Koronarien mit jungen RBCs (27 ± 10 % der AAR, $p = 0,01$, $n = 6$) (Abb. 13).

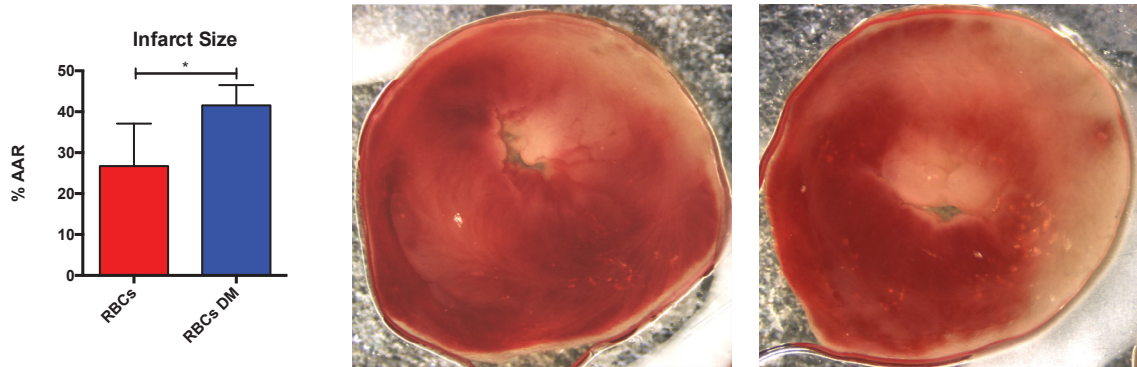


Abb. 13: Vergrößerung der Infarktgröße unter Perfusion mit humanen Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2. Die Perfusion der Koronararterien der murinen Herzen mit Erythrozyten kardiologisch behandelter Spender (RBCs DM, blau) führte zu einer signifikanten Steigerung der Infarktgröße nach I/R (*Infarct Size*; % AAR, *Area at Risk*) verglichen mit der der mit RBCs gesunder Spender perfundierten Herzen (RBCs, rot). Die Abbildungen zeigen repräsentative mittelventrikuläre Schnitte eines mit RBCs gesunder Spender (links, IS 30%) und eines mit RBCs diabetischer Probanden (rechts, IS 44%) perfundierten Herzens. (DM: Diabetes Mellitus; IS: *Infarct Size*; * $p < 0,05$, $n = 6$)

Bei dem Vergleich der drei Kontrollgruppen miteinander zeigte sich in den Versuchen mit diabetischen RBCs eine signifikant gesteigerte koronare Flussrate im Gegensatz zu den Kontrollversuchen mit KHB ($107 \pm 25\%$ vs. $65 \pm 22\%$, $p < 0,05$, $n = 6$). Diese erreichte mit im Mittel 107 % Werte, die über denen der *Baseline* lagen. Von den jungen RBCs unterschieden sich die RBCs der diabetischen Spender hierin nicht signifikant. Bei den weiteren beobachteten Parametern waren keine Unterschiede zwischen den Puffer-perfundierten und den mit diabetischen RBCs perfundierten Herzen zu sehen. Im LVEDP waren insgesamt keine signifikanten Veränderungen zu beobachten (Abb. 14).

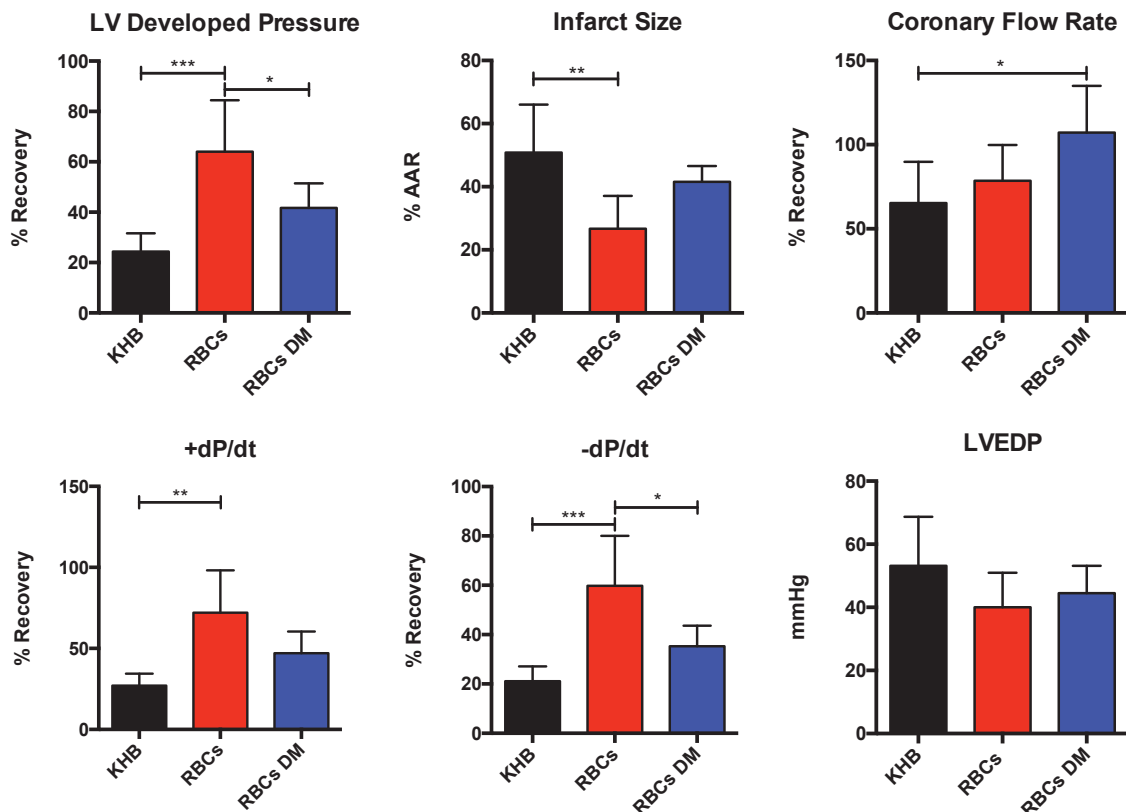


Abb. 14: Vergleich der Wirkungen der Kontrollgruppen aus Puffer (KHB, schwarz), humanen Erythrozyten junger gesunder Spender (RBCs, rot) und humanen Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 (RBCs DM, blau) auf die linksventrikuläre Myokardfunktion und Infarktgröße nach I/R. Die *Coronary Flow Rate* der mit diabetischen Erythrozyten perfundierten Herzen zeigte eine signifikante Steigerung zu den Puffer-perfundierten Kontrollen (% *Recovery* zur *Baseline*). One-way ANOVA, hier Vergleich jeder Gruppe mit jeder weiteren. Zur Erklärung der weiteren dargestellten Signifikanzen, s. Abb. 10-13. (DM: Diabetes Mellitus; LV: linker Ventrikel; % AAR, *Area at Risk*; dP/dt: Druckänderung pro Zeiteinheit; LVEDP: *left ventricular end-diastolic pressure*; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ $n = 6$)

3.3 Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf die murinen Herzen

Als nächstes sollte der Einfluss des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die murinen Herzen untersucht werden. Dafür wurden diese in 1 mMolarer Konzentration gelöst in KHB den Koronarien der Herzen zugeführt. Beobachtet wurde die Anwendung der Medikamente allein und in Kombination, so dass sich drei Gruppen ergaben, welche mit der Kontrollgruppe aus KHB (vgl. 3.1) verglichen wurden. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Druckentwicklung, der koronaren Flussrate und der Infarktgröße zwischen den Gruppen (Abb. 15). Lediglich die Kombination beider Medikamente konnte in den Versuchen die Druckentwicklung nach I/R im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas steigern (LVDP, 24 ± 7 % ($n = 6$) vs. 39 ± 15 % ($n = 5$)).

Die Verwendung der Medikamente an den murinen Herzen lässt somit keinen eindeutigen Effekt auf die myokardiale Funktion erkennen.

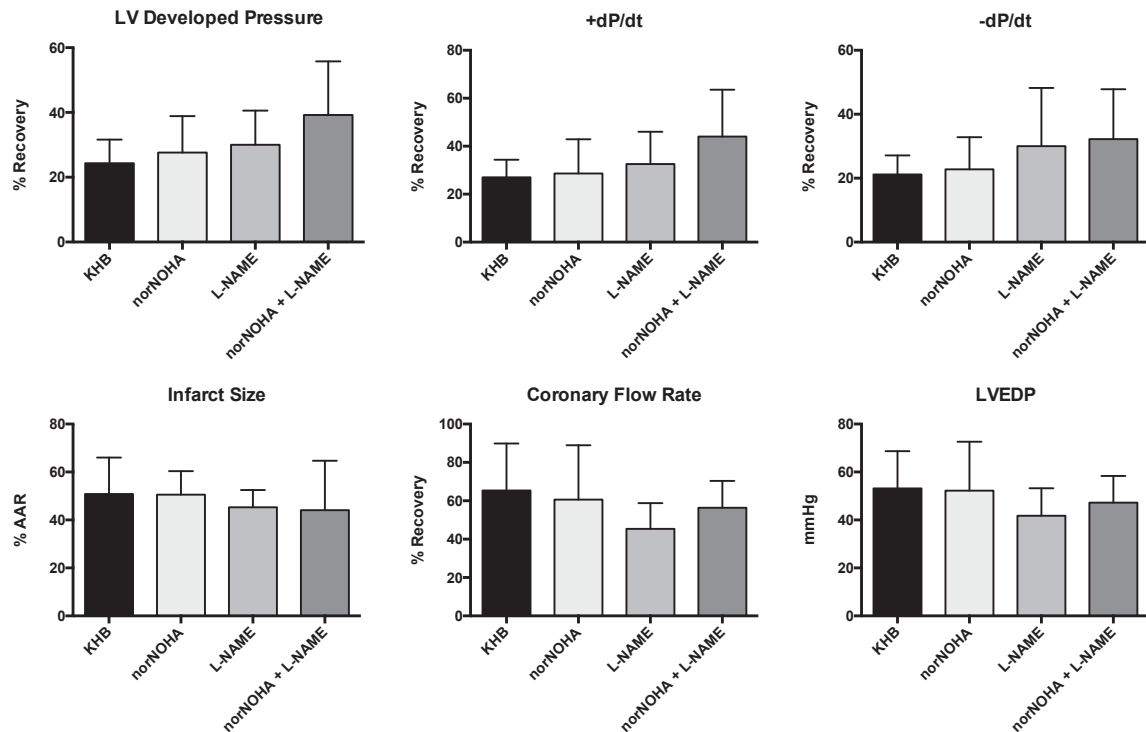


Abb. 15: Wirkung des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die murinen Herzen nach I/R. Die Perfusion der Koronararterien muriner Herzen mit norNOHA (1 mM) oder L-NAME (1 mM) sowie deren Kombination (jeweils 1 mM) zu Beginn der 40-minütigen Globalischämie zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Myokardfunktion und Infarktgröße des linken Ventrikels nach I/R. (% Recovery zur Baseline; LV: linker Ventrikel; KHB: Krebs-Henseleit-Puffer; dP/dt: Druckänderung pro Zeiteinheit; % AAR, Area at Risk; LVEDP: left ventricular end-diastolic pressure)

3.4 Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf den erythrozytenvermittelten kardioprotektiven Effekt im I/R-Schaden

Weiterhin sollte getestet werden, ob die verwendeten Medikamente eine Wirkung auf die zuvor beobachtete Kardioprotektion der Erythrozyten (vgl. 3.1) haben. Zum Testen des Effekts einer verbesserten Substratverfügbarkeit der eNOS wurde der Arginase-Inhibitor norNOHA verwendet und zur Überprüfung der erythrozytären Wirkung auf den myokardialen I/R-Schaden unter Ausschaltung der eNOS-Wirkung wurde L-NAME verwendet. Die Medikamente wurden in 1 mMolarer Konzentration mit RBCs einzeln und in Kombination für 30 Minuten inkubiert und anschließend den Koronarien muriner Herzen zu Beginn der 40-minütigen Globalischämie zugeführt. Auch hier ergaben sich so drei

verschiedene Gruppen, die mit der Kontrollgruppe der jungen RBCs ohne pharmakologische Behandlung verglichen wurden.

In allen Interventionsgruppen konnte eine Verschlechterung der kardialen Funktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit RBCs junger Spender ohne Behandlung mit Medikamenten beobachtet werden. Signifikant unterschied sich dabei die Druckentwicklung unter Anwendung des eNOS-Inhibitors L-NAME von der Kontrollgruppe (LVDP, $32 \pm 3 \%$ ($n = 5$) vs. $64 \pm 19 \%$ ($n = 6$) der *Baseline*, $p < 0,05$) (Abb. 16). Analog zum LVDP kam es zu einer signifikanten Verringerung der positiven und negativen Druckänderung pro Zeiteinheit. Die $+dP/dt$ sank signifikant von $72 \pm 24 \%$ ($n = 6$) auf $38 \pm 7 \%$ ($n = 5$) *Recovery* zur *Baseline* ($p < 0,05$) unter L-NAME und bei Betrachtung der $-dP/dt$ erholten sich die Herzen unter der Anwendung von L-NAME nur noch zu $27 \pm 4 \%$ ($n = 5$) im Vergleich zu erreichten $60 \pm 19 \%$ ($n = 6$) der *Baseline* der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Die anderen Interventionsgruppen verhielten sich tendenziell ähnlich, ohne jedoch signifikante Unterschiede zu erreichen (Abb. 16).

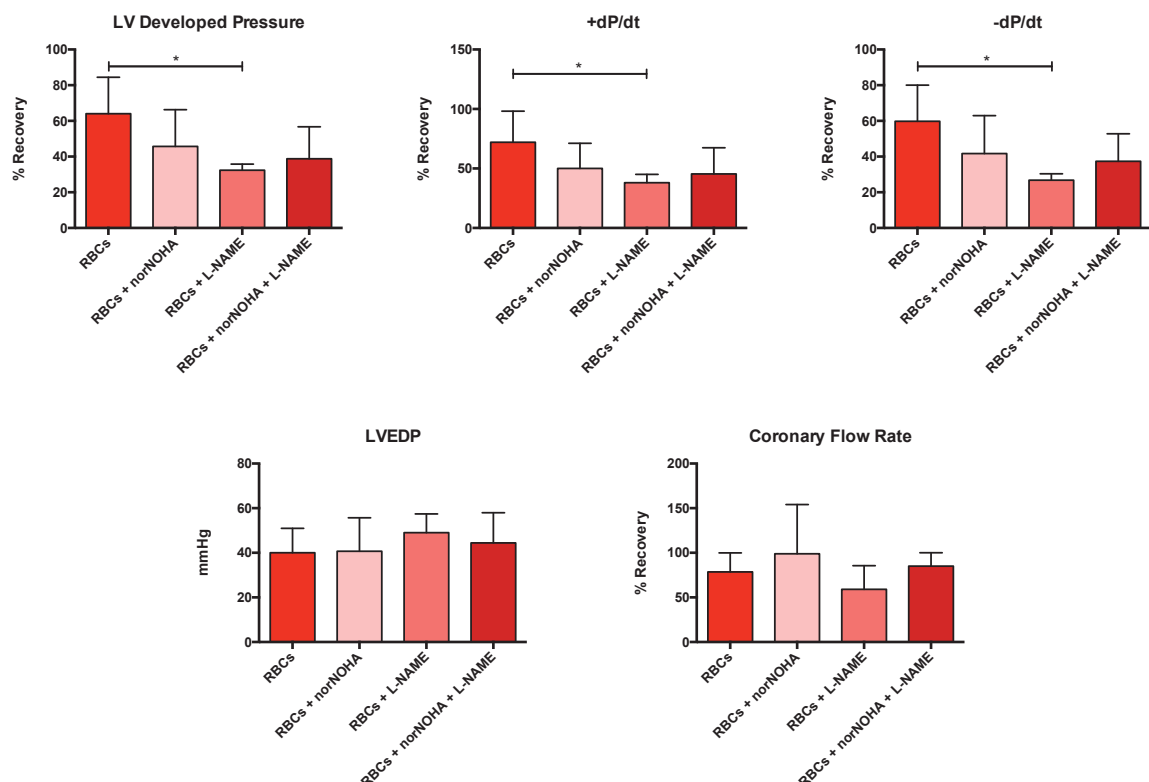


Abb. 16: Wirkungen des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Kardioprotektion von Erythrozyten junger Spender am linken Ventrikel nach I/R. Die Inkubation der 40%-igen Probe Erythrozyten (RBCs) mit 1 mM L-NAME ($n=5$) führte zu einer signifikanten Verminderung der linksventrikulären Druckentwicklung (LV *Developed Pressure*) sowie der positiven und negativen Druckänderung ($+dP/dt$, $-dP/dt$) (% *Recovery* zur *Baseline*) nach I/R verglichen mit der Kontrollgruppe aus unbehandelten RBCs junger Spender ($n=6$). (LVEDP: *left ventricular end-diastolic pressure*; * $p < 0,05$)

Die Parameter „Koronarer Fluss“ und „enddiastolischer Druck“ des linken Ventrikels ließen keine eindeutigen Änderungen unter Anwendung der Medikamente erkennen.

Unter Kombination beider Inhibitoren zeigte sich eine signifikante Steigerung der Infarktgröße ($27 \pm 10\%$ ($n = 6$) vs. $54 \pm 15\%$ ($n = 5$) der AAR, $p < 0,05$) (Abb. 17). Auch hier ließen die übrigen Gruppen eine ähnliche Tendenz zu einer vergrößerten Infarktgröße erkennen.

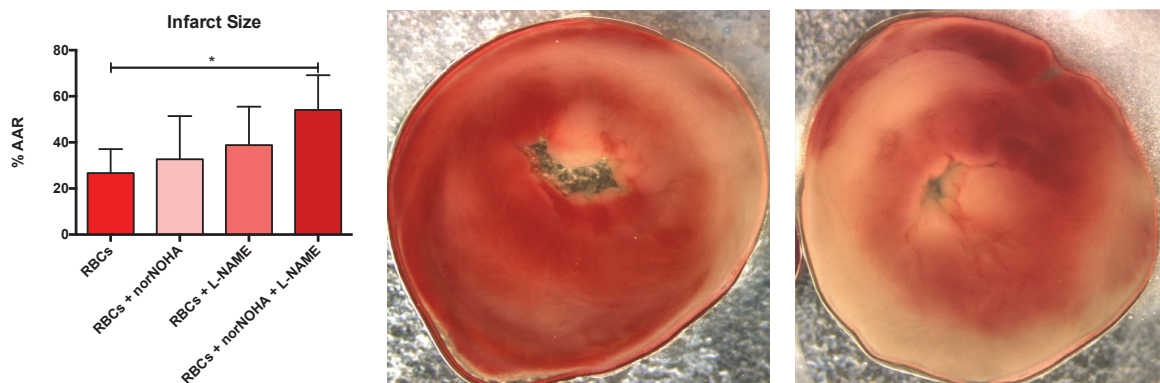


Abb. 17: Vergrößerung der Infarktgröße durch die kombinierte Anwendung des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME an humanen Erythrozyten junger gesunder Spender. Nach Inkubation der 40%-igen Probe humaner Erythrozyten (RBCs) mit je 1 mM L-NAME und norNOHA ($n=5$) zeigte sich nach I/R eine signifikante Steigerung der Infarktgröße (*Infarct Size*; % AAR, *Area at Risk*) der murinen Herzen verglichen mit der der mit unbehandelten RBCs ($n=6$) perfundierten Herzen. Die Abbildungen zeigen repräsentative mittelventrikuläre Schnitte eines mit behandelten (norNOHA + L-NAME) RBCs (rechts, IS 52%) und eines mit unbehandelten RBCs (links, IS 30%) perfundierten Herzens. (IS: *Infarct Size*; $*p<0,05$)

3.5 Pharmakologische Wirkung von norNOHA und L-NAME auf den verminderten kardioprotektiven Effekt von Erythrozyten alter diabetischer Patienten

Abschließend sollte der Einfluss der beiden Enzym-Inhibitoren auf die Wirkung der RBCs alter diabetischer Probanden im Rahmen des *ex vivo* I/R-Modells evaluiert werden.

Analog zu den Versuchen mit RBCs junger Spender wurden wieder drei weitere Gruppen gebildet, in denen norNOHA und L-NAME einzeln und in Kombination (jeweils 1 mM) mit den RBCs diabetischer Spender inkubiert wurden. Diese wurden dann mit der Kontrollgruppe aus RBCs ohne Behandlung mit Medikamenten verglichen.

Anders als zuvor bei Beobachtung der Effekte auf RBCs junger Spender, war hier durch den Einsatz des Arginase-Inhibitors norNOHA eine Steigerung der Myokardfunktion zu

erkennen. Die Infarktgröße sank dabei signifikant von $42 \pm 5 \%$ auf $32 \pm 7 \%$ des linksventrikulären Myokards (AAR, $p < 0,05$, $n = 6$) (Abb. 18).

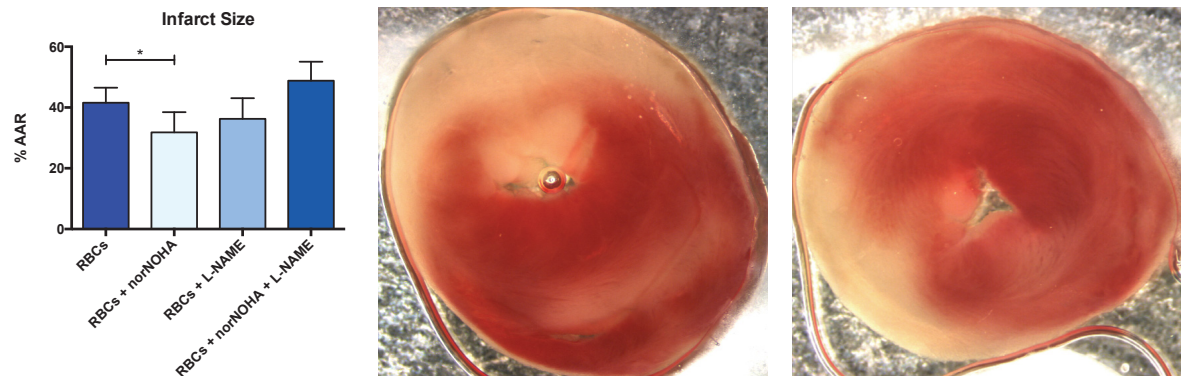


Abb. 18: Verringerung der Infarktgröße unter Anwendung des Arginase-Inhibitors norNOHA an humanen Erythrozyten kardiologischer Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ 2. Nach Inkubation der 40%-igen Probe Erythrozyten diabetischer Spender (RBCs) mit 1 mM norNOHA zeigte sich nach I/R eine signifikante Reduktion der Infarktgröße (*Infarct Size*) um 10% des Myokards der murinen Herzen (% AAR, *Area at Risk*) im Vergleich zu den mit unbehandelten RBCs perfundierten Herzen. Abgebildet sind repräsentative mittelventrikuläre Schnitte eines mit unbehandelten (links, IS 46%) und eines mit norNOHA behandelten RBCs (rechts, IS 32%) perfundierten Herzens. (I/R: Ischämie/Reperfusion; IS: *Infarct Size*; L-NAME: eNOS-Inhibitor; * $p < 0,05$, $n = 6$)

Entsprechend der Verringerung der Infarktgröße zeigte sich tendenziell eine Steigerung der Druckentwicklung des linken Ventrikels unter Anwendung von norNOHA (LVDP, $42 \pm 9 \%$ vs. $52 \pm 15 \%$ der *Baseline*, $n = 6$). Bei den Parametern $+dP/dt$ und $-dP/dt$ zeigten sich ähnliche Tendenzen, ohne signifikante Unterschiede zu erreichen ($+dP/dt$: $47 \pm 12 \%$ vs. $55 \pm 14 \%$ der *Baseline*, $n = 6$; $-dP/dt$: $35 \pm 8 \%$ vs. $47 \pm 18 \%$ der *Baseline*, $n = 6$) (Abb. 19).

Die Inkubation der RBCs mit L-NAME zeigte keinen Einfluss auf die Wirkung der RBCs diabetischer Spender im I/R-Modell (LVDP: $42 \pm 9 \%$ ($n = 6$) vs. $36 \pm 10 \%$ ($n = 5$) der *Baseline*; *Infarct Size*: $42 \pm 5 \%$ ($n = 6$) vs. $36 \pm 7 \%$ ($n = 5$) der AAR) (Abb. 19), ebenso wie die Kombination beider Medikamente, die lediglich eine tendenzielle Steigerung der Infarktgröße erkennen ließ ($42 \pm 5 \%$ ($n = 6$) vs. $49 \pm 6 \%$ ($n = 5$) der AAR) (Abb. 18).

Der koronare Fluss wurde nach der Inkubation der RBCs mit L-NAME (1 mM) signifikant gesenkt ($107 \pm 25 \%$ ($n = 6$) vs. $60 \pm 31 \%$ ($n = 5$) der *Baseline*, $p < 0,05$) (Abb. 19). Bei der Bewertung des LVEDP waren wiederum keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

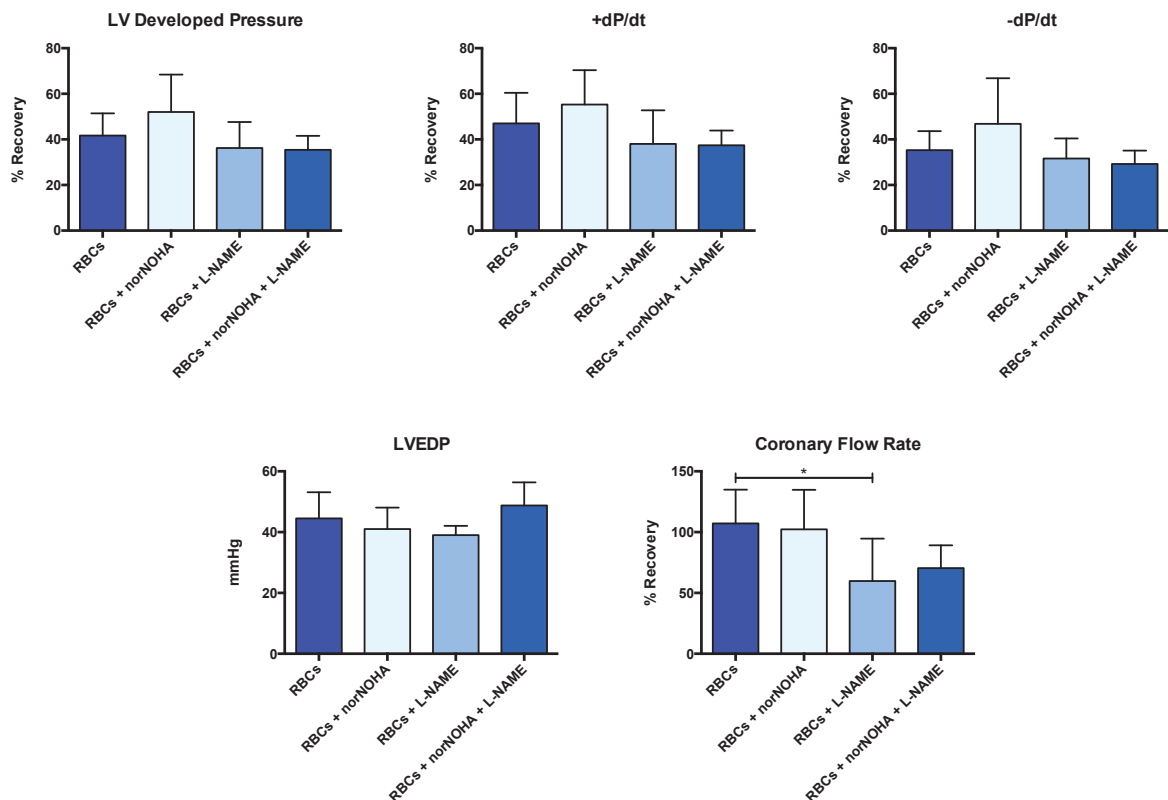


Abb. 19: Einfluss des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf den eingeschränkten kardioprotektiven Effekt von Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 auf die linksventrikuläre Funktion im I/R-Schaden. Durch Inkubation der Erythrozyten diabetischer Spender (RBCs) mit L-NAME (1 mM, n=5) kam es nach I/R zu einer signifikanten Reduktion des koronaren Flusses (*Coronary flow rate*) der murinen Herzen verglichen mit den mit unbehandelten RBCs perfundierten Herzen (% *Recovery* zur *Baseline*). (LV: linker Ventrikel; dP/dt: Druckänderung pro Zeiteinheit; LVEDP: *left ventricular end-diastolic pressure*; * $p < 0,05$)

3.6 Nitrit- und Nitratproduktion der Erythrozyten

Um die eNOS Aktivität und die NO-Abhängigkeit der beobachteten Ergebnisse zu evaluieren, wurde indirekt die NO-Exkretion der RBCs anhand der Oxidationsprodukte NO_2^- und NO_3^- bestimmt. Da bei den Proben diabetischer Spender eine Verbesserung der Infarktgröße unter norNOHA beobachtet werden konnte, wurden die NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen dieser RBCs mit und ohne Behandlung mit norNOHA verglichen.

Durch die Behandlung der RBCs diabetischer Patienten mit dem Arginase-Inhibitor norNOHA wurde die NO_3^- -Konzentration signifikant von $0,063 \pm 0,092 \mu\text{mol/l}$ auf $0,827 \pm 0,661 \mu\text{mol/l}$ gesteigert ($p = 0,03$, $n = 6$) (Abb. 20). Bei Betrachtung der NO_2^- -Konzentrationen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen ($0,86 \pm 1,92 \text{ nmol/l}$ vs. $438,97 \pm 558,15 \text{ nmol/l}$, $p > 0,1$, $n = 6$).

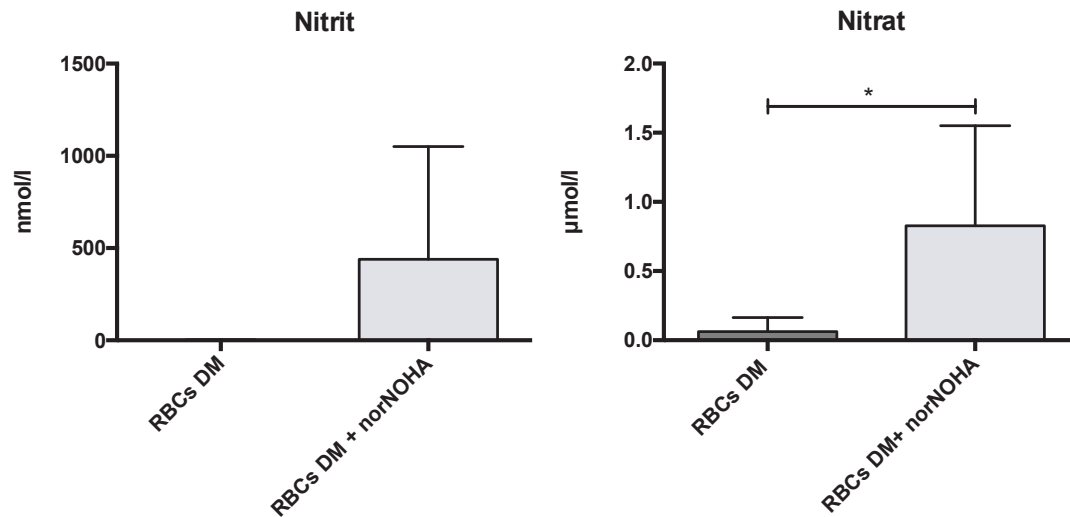


Abb. 20: Nitrit- und Nitrat-Exkretion humaner Erythrozyten. Die Inkubation von Erythrozyten diabetischer Spender (RBCs DM) mit dem Arginase-Inhibitor norNOHA (1 mM) führte zu einer signifikanten Steigerung der Nitrat-Konzentration (in µmol/l). (DM: Diabetes Mellitus; * $p < 0,05$, $n=6$)

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die eNOS-Funktion von humanen RBCs bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren genauer charakterisiert und deren Auswirkung auf den kardialen I/R-Schaden untersucht werden. Dabei konnte primär gezeigt werden, dass der protektive Effekt humaner RBCs im I/R-Schaden muriner Herzen am Langendorff-Perfusor bei RBCs älterer diabetischer Patienten aufgehoben war. Durch eine Arginase-Inhibition in den RBCs ließ sich dieser Effekt teilweise wiederherstellen. Dabei war die NO_3^- -Konzentration der entsprechenden Proben aus RBCs diabetischer Spender erhöht.

4.1 Protektiver Effekt humaner Erythrozyten auf den I/R-Schaden

In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *ex vivo*-Mausmodell konnten wir zeigen, dass humane RBCs gesunder junger Spender, welche zu Beginn der Globalischämie den Koronarien zugeführt wurden, verglichen mit KHB perfundierten Kontrollen, die linksventrikuläre Pumpfunktion des Myokards nach 60-minütiger Reperfusion deutlich verbessern. Analog wurde die Infarktgröße durch die RBCs signifikant reduziert. Zudem konnte tendenziell eine geringere Steigerung des LVEDP nach I/R beobachtet werden, was auf eine verbesserte Relaxation hindeutet und somit für eine geringere diastolische Dysfunktion des linken Ventrikels spricht.

Die Ergebnisse bestätigen die Versuche von Yang et al. aus dem Jahr 1996, die einen kardioprotektiven Effekt muriner RBCs auf die Kontraktionskraft und den koronaren Perfusionsdruck isolierter Rattenherzen nach I/R in einem ähnlichen Experiment zeigen konnten (Yang et al., 1996). In vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnten wir zeigen, dass humane RBCs in unserem Modell vergleichbare Effekte auf die Mäuseherzen haben wie murine RBCs (Muessig et al., 2020a). Andere Studien die eine protektive Wirkung von RBCs postulierten konzentrierten sich bisher überwiegend auf tierische Modelle, sowohl *ex vivo* mit murinem Blut (Ulker et al., 2013) als auch *in vivo* an chimären Mäusen (Merx et al., 2014). Mit dieser Arbeit konnten nun weitere Erkenntnisse bezüglich der Rolle humaner RBCs im Rahmen des MI gewonnen werden.

Die verglichenen Perfusate der Puffer-perfundierten Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe mit humanen RBCs unterschieden sich lediglich durch die RBCs. Weitere

Faktoren, die protektiv auf die Herzen wirken können, wie z.B. die Temperatur der verwendeten Proben, waren identisch. Zudem enthielten die Proben keine weiteren Proteine, die als Mediatoren interagieren konnten. Die Reinheit der RBCs, frei von anderen Zellbestandteilen und Proteinen, wiesen Yang et al. nach Durchführung desselben Waschvorganges wie in dieser Arbeit verwendet, mittels Zählung des Differentialblutbildes, nach (Yang et al., 2013). Lediglich der Gesamtgehalt an Elektrolyten in den Proben der RBC-Gruppe unterschied sich leicht von dem der KHB-Gruppe, bedingt durch das extrazelluläre und intrazelluläre Kompartiment.

Der Unterschied der verwendeten Proben lag demnach allein an dem Vorhandensein der RBCs, weshalb diese in unserem Versuchsaufbau für die Verbesserung der myokardialen Funktion nach I/R verantwortlich gemacht werden können. Für eine genauere Charakterisierung dieses Effekts wurden weitere Versuche mit einer weiteren Probandenkohorte sowie mit zwei unterschiedlichen Enzym-Inhibitoren durchgeführt.

4.2 Alters- und erkrankungsabhängige Verminderung der Erythrozyten-vermittelten Kardioprotektion

Der protektive Effekt der humanen RBCs auf das Myokardium wurde in den Versuchen mit RBCs von Patienten, die alle einen medikamentös behandelten DM vorwiesen, im Alter von über 65 Jahren waren und an einer pAVK oder KHK als Nachweis einer Endorganschädigung litten, signifikant verringert. Bei Perfusion der Koronarien mit RBCs dieser Patienten (im Folgenden wird die Bezeichnung diabetische RBCs verwendet) zeigte sich ein signifikant niedrigerer LVDP verglichen mit der Gruppe der Herzen, deren Koronarien mit RBCs gesunder Probanden (folgend junge RBCs genannt) beladen wurden. Wie der LVDP verschlechterte sich auch die Infarktgröße nach I/R, welche wieder annähernd der Infarktgröße, der mit KHB behandelten Kontrollgruppe entsprach. Die positive sowie negative Druckentwicklung pro Zeiteinheit ($\pm$ -dP/dt) veränderten sich analog zum LVDP beim Vergleich der beiden Gruppen. Da der LVDP der gemittelte Wert der positiven und negativen dP/dt ist, zeigte sich diese Analogie in allen angestellten Vergleichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit KHB wurde die koronare Flussrate durch die RBCs diabetischer Probanden signifikant gesteigert und lag zudem über den *Baseline*-Werten vor I/R. Yang et. al hatten dieses Phänomen in Verbindung mit der reduzierten

myokardialen Kontraktionskraft, bei uns repräsentiert durch den reduzierten LVDP, als Korrelat einer myokardialen Dysfunktion beschrieben (Yang et al., 1996). Widersprüchlich dazu wäre die bei unseren Versuchen zu beobachtende, tendenzielle Steigerung der Flussrate der mit jungen RBCs perfundierten Koronarien im Vergleich zu den mit KHB perfundierten Kontrollen. Das wiederum kann durch die erheblich gesteigerte Pumpfunktion bedingt sein, da eine gesteigerte myokardiale Arbeit eine vermehrte O₂- und Nährstoffversorgung erfordert.

Eine KHK, genauso wie eine pAVK ist assoziiert mit einer ED, die sich hauptsächlich über eine geringere Fähigkeit des Endothels darstellt, zur NO-Bioverfügbarkeit beizutragen. Daraus resultieren u.a. eine verminderte Vasodilatation und eine Hemmung proatherogener Mechanismen (Esper et al., 2008). Dies sind Bedingungen, die das kardiovaskuläre System schädigen können. Wir konnten nun zeigen, dass RBCs von Patienten mit Risikofaktoren wie einem höheren Alter, Symptomen einer ED und erhöhter Blutglukose (HbA1c $\geq 7,1$ %) im Vergleich zu RBCs gesunder Probanden das Outcome auf die myokardiale Funktion nach I/R verschlechtern. Daraus lässt sich ableiten, dass RBCs an der Pathologie der ED beteiligt sind oder über eigene Signalwege ebenfalls als Mediator pathologischer Zustände wirken.

4.3 Kardioprotektive Funktion humaner Erythrozyten ist NO-abhängig

4.3.1 NO-Stoffwechsel in Erythrozyten

Humane RBCs exprimieren eine an der NO-Bioverfügbarkeit des Organismus beteiligte eNOS (Kleinbongard et al., 2006, Cortese-Krott et al., 2012), worüber sie protektiv im Rahmen des myokardialen I/R-Schadens zu wirken scheinen (Yang et al., 2013).

2013 postulierten Pernow und Jung, dass eine Arginase-Inhibition den L-Arginin Verbrauch in Endothelzellen in Richtung der eNOS verschiebt, woraus eine Protektion des Myokards gegen I/R-Schäden resultiert (Pernow und Jung, 2013). Die Grundannahme dieser Arbeit war, dass diese Interaktion zwischen eNOS und Arginase auch in RBCs stattfindet. Wie vermutet konnten wir durch Inhibition der erythrozytären Arginase mittels norNOHA eine signifikante Reduktion der myokardialen Infarktgröße der mit diabetischen RBCs perfundierten Herzen nach I/R zeigen. Dieser Effekt lässt sich vermutlich mit der bereits von den Endothelzellen bekannten Interaktion der Enzyme erklären.

Pharmakokinetisch betrachtet hat die eNOS einen um bis zu das 4-fache niedrigeren K_m -Wert als die Arginase. Trotzdem stehen beide Reaktionen im physiologischen Zustand im Gleichgewicht, da die letztere eine deutlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit hat. Die Aktivität der beiden Enzyme wird daher über die Substratverfügbarkeit oder das Verhältnis der Enzyme bestimmt (Porro et al., 2014). Pathologische Zustände steigern die Aktivität der Arginase. Durch Arginase-Inhibition wird die Substratverfügbarkeit der eNOS verbessert, welche wiederum ihre Aktivität steigern kann (Jung et al., 2010). Folgend resultiert eine vermehrte NO-Bioverfügbarkeit während I/R. NO wirkt über die Hemmung immunologischer Prozesse und Erhalt des oxidativen Metabolismus vermutlich auch während des künstlich induzierten MI kardioprotektiv (Schulz et al., 2004, Jones und Bolli, 2006). Dies bewirkt eine Reduzierung des nekrotischen Areals unter norNOHA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Entsprechend ist eine leichte Verbesserung des LVDP nach 60-minütiger Reperfusion erkennbar. Inhibition der erythrozytären Arginase führt demnach zu einer partiellen Erhaltung der linksventrikulären Funktion nach I/R. Ob der Effekt mit dem von den Endothelzellen bekannten Mechanismus zu erklären ist, wird hiermit jedoch noch nicht bestätigt und bedarf weiterer biochemischer Analysen.

Die Versuche dieser Arbeit bestätigen die Untersuchungen von Yang et al. (Yang et al., 2013). Die von der Arbeitsgruppe beschriebene, durch die Arginase regulierte eNOS-Funktion von murinen RBCs kann somit auch auf humane RBCs übertragen werden. Yang et al. konnten dabei eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion durch Arginase-Inhibition in murinen RBCs nach 45-minütiger Globalischämie und 60-minütiger Reperfusion am Langendorff-Perfusor zeigen. Eine eNOS-Inhibition mittels L-NAME verhinderte die Protektion und lässt auf eine Verbindung zwischen dem Enzym und der kardioprotektiven Wirkung schließen (Yang et al., 2013). Ähnlich blieb in den Versuchen dieser Arbeit an diabetischen RBCs die durch norNOHA gezeigte Verringerung der Infarktgröße, bei simultaner Hemmung der eNOS, aus. Die Kombination der Arginase- und eNOS-Inhibitoren zeigte in der Tendenz sogar eine Vergrößerung der Infarktfläche verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Demnach ist, wie zuvor vermutet, die myokardiale Protektion durch RBCs auch in unserem Versuchsaufbau von der eNOS-Aktivität abhängig.

Die alleinige pharmakologische eNOS-Inhibition zeigte auch auf die myokardiale Druckentwicklung (repräsentiert durch den LVDP) im Vergleich zur Kontrollgruppe keine

Wirkung bei diabetischen RBCs. Ihr Einfluss auf die myokardiale Kontraktion scheint bei vorliegenden Risikofaktoren bereits so weit reduziert zu sein, dass keine relevante Hemmung mehr erreicht wird. Die unter L-NAME signifikante Reduzierung der koronaren Flussrate zeigt dennoch eine vorhandene Aktivität in diabetischen RBCs. Die eNOS-Inhibition führte vermutlich NO-vermittelt zu einer Verringerung des Gefäßdurchmessers und damit zu der beobachteten reduzierten Flussreduktion.

Zahlreiche Studien belegten in der Vergangenheit, dass die Arginase ein Mediator der ED ist und in damit assoziierten pathologischen Zuständen wie Hypertonie, erhöhter Blutglukose oder auch mit zunehmendem Alter vermehrt aktiv ist (Durante et al., 2007). Ein protektiver Effekt durch Arginase-Inhibition, vermittelt über Verbesserung der NO-Bioverfügbarkeit, wurde bereits in verschiedensten Modellen kardiovaskulärer Pathologien gezeigt (Pernow und Jung, 2013). Bisher ging man von einer Mediation des Effektes über die endotheliale Arginase- und eNOS-Aktivität aus, welche, wie sich in dieser und anderen Arbeiten (Yang et al., 2013) zeigte, nicht alleine für die Protektion verantwortlich gemacht werden kann. Auch RBCs besitzen eine kardioprotektive Funktion, die vermutlich ebenfalls über eine durch die erythrozytäre Arginase kontrollierte eNOS-Aktivität vermittelt wird.

4.3.2 Kardioprotektion im Langendorff-Transfermodell durch erythrozytäre eNOS

Um isoliert die erythrozytäre Funktion beurteilen zu können und auszuschließen, dass bei den durchgeführten Versuchen die Enzyme der Endothel- oder Myokardzellen an den beobachteten Effekten beteiligt sind, wurden die verwendeten Enzym-Inhibitoren gelöst in Puffer zuvor den Koronarien der Versuchsherzen vor I/R zugeführt. Dabei zeigten sich kaum funktionelle sowie strukturelle Veränderungen des untersuchten linken Ventrikels. Die Medikamente haben demnach keinen relevanten Einfluss auf die verwendeten Herzen und die durch die Inhibitoren erzeugten Effekte in den Versuchen dieser Arbeit lassen sich mit dem Einfluss auf die erythrozytären Stoffwechselprozesse erklären. Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Yang et al., welche eine mögliche Beteiligung der endothelialen- und myokardialen eNOS an der Kardioprotektion durch Verwendung von RBCs und Herzen von eNOS Wildtyp- und *Knockout*-Mäusen ausschlossen (Yang et al., 2013).

4.3.3 Erythrozytäre Dysfunktion

Bei der äquivalenten Anwendung der Enzyminhibitoren an RBCs junger gesunder Probanden konnte unter Arginase-Inhibition keine Kardioprotektion beobachtet werden. Die Anwendung von norNOHA verminderte im Gegensatz zu diabetischen RBCs tendenziell die linksventrikuläre Druckentwicklung nach I/R und führte zu einer größeren Infarktgröße. Da die Interaktion der Arginase und eNOS in RBCs unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht steht (Porro et al., 2014), lässt die eingeschränkte myokardiale Erholung nach I/R unter Arginase-Inhibition vermuten, dass dieses Gleichgewicht durch Hemmung der Enzyme gestört wird. So zeigte sich nach pharmakologischer Intervention mit norNOHA und L-NAME an jungen RBCs in allen Gruppen eine reduzierte Erholung der myokardialen Funktion nach I/R. Diese präsentierte sich in Form einer reduzierten Druckentwicklung und einer vergrößerten Infarktfläche verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe. Es gilt zudem anzunehmen, dass die Zugabe jeglicher den Arginin- und NO-Spiegel beeinflussenden Substanz störend auf die erythrozytäre Funktion wirkt. Die Kombination der Medikamente vergrößerte die Infarktgröße signifikant.

Dass die physiologische Funktion der Enzyme protektiv im I/R-Schaden wirkt, wird durch die besser erhaltene Myokardfunktion nach I/R bei Perfusion mit RBCs junger gesunder Spender, verglichen mit der KHB-Kontrolle und den diabetischen RBCs, bestätigt. Synthetische Verbindungen im Allgemeinen könnten zudem den physiologischen erythrozytären Stoffwechsel stören. In dem Falle ließe sich der beobachtete Effekt nicht allein mit einer Störung der eNOS-Funktion erklären. Aus den Ergebnissen ist jedoch zu erkennen, dass die humane erythrozytäre eNOS unter physiologischen Bedingungen eine relevante protektive Rolle im Rahmen des MI einnimmt. Alleinige eNOS-Inhibition mittels L-NAME verschlechterte signifikant die Druckentwicklung verglichen mit der Kontrollgruppe. Gleichzeitig kam es zu einer Vergrößerung der Infarktfläche. Auch in anderen Studien konnten die protektiven Effekte durch strukturell variierende eNOS-Inhibitoren aufgehoben werden. Das spricht für die Beteiligung der eNOS an protektiven Prozessen im kardiovaskulären System (Yang et al., 1996, Kleinbongard et al., 2006, Merx et al., 2014). Aus unseren Versuchen an RBCs junger gesunder Spender wird deutlich, dass die erythrozytäre eNOS wie die endotheliale eNOS unter Hypoxie eine protektive Rolle erfüllt. Es ist zu vermuten, dass wie in Endothelzellen auch bei RBCs die Aktivität bei anhaltender Hypoxie wieder sinkt (Schulz et al., 2004). Ein weiterer

Aktivierungsmechanismus der erythrozytären eNOS scheint, ebenso wie bei den Endothelzellen, der Scherstress zu sein (Ulker et al., 2013).

Aus den Versuchen wird insgesamt deutlich, dass die erythrozytäre eNOS nicht nur unter Normoxie (Cortese-Krott et al., 2012), sondern auch im I/R Schaden eine zentrale Rolle einnimmt. Ihre Aktivität ist in den Experimenten an gesunden RBCs protektiv und lässt sich hemmen, wohingegen sich die eingeschränkte Aktivität in diabetischen RBCs älterer Probanden durch eine Verbesserung des Substratangebots wiederherstellen lässt. Da die Entstehung der ED multifaktoriell ist, kann angenommen werden, dass auch in RBCs das Gleichgewicht zwischen eNOS und Arginase-Aktivität durch mehrere Einflüsse gestört wird. Diese werden durch diese Arbeit noch nicht genauer charakterisiert.

Weitere bereits durchgeführte Studien unterstützen die Beobachtungen der unterschiedlichen eNOS-vermittelten Effekte von RBCs gesunder und erkrankter Probanden. An humanen RBCs konnte gezeigt werden, dass die Expression und Aktivität der erythrozytären eNOS, gemessen an der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin, bei Patienten mit einer KHK vermindert ist (Cortese-Krott et al., 2012, Eligini et al., 2013).

Eine erst kürzlich publizierte Studie von Yang et al. konnte an einem ähnlichen *ex vivo* Modell die Beobachtungen dieser Arbeit zur funktionellen Relevanz der eNOS bestätigen. An RBCs diabetischer Probanden sowie diabetischer Versuchsmäuse führte die Arginase-Inhibition zu einer Steigerung der Druckentwicklung muriner Herzen (Yang et al., 2018). Auch hier ließ sich der protektive Effekt von norNOHA an murinen diabetischen und Wildtyp RBCs, abhängig von der norNOHA-Dosis (1 oder 3 mM), durch L-NAME partiell oder vollständig wieder aufheben. An gesunden humanen RBCs wurde die Protektion durch L-NAME vollständig aufgehoben. Im Gegensatz zu dieser Arbeit zeigte die kombinierte Anwendung von norNOHA und L-NAME an diabetischen murinen und humanen RBCs keine Veränderung im Vergleich zur alleinigen Gabe von 1 mM norNOHA und wirkte somit ebenfalls protektiv (Yang et al., 2018). Diese Abweichung kann damit zu erklären sein, dass Yang et al. L-NAME in 0,1 mM Konzentration anwendeten, wohingegen für diese Arbeit die zehnfache Menge zur Hemmung der eNOS in RBCs verwendet wurde. Bei Betrachtung aller Ergebnisse dieser und der vorliegenden Arbeit konnte in RBCs älterer diabetischer Probanden eine durch die Arginase eingeschränkte eNOS-Aktivität gezeigt werden. Die gezeigte Einschränkung ließ sich dosisabhängig aufheben. An murinen RBCs ließ sich die Wirkung der Arginase-Inhibition ebenfalls dosisabhängig steigern (Yang et al., 2018).

Ergänzend wurde ein Effekt der ebenfalls in RBCs exprimierten iNOS ausgeschlossen (Yang et al., 2018), was die eingangs dieser Untersuchungen gestellte Annahme zu einer im I/R-Schaden primär relevanten Rolle der eNOS bestätigt. Yang et al. konnten zudem an RBCs gesunder Probanden eine bessere myokardiale Funktion nach I/R durch Arginase-Inhibition zeigen. Diese Probanden waren altersadjustiert an die diabetischen Probanden und somit signifikant älter als die gesunden Probanden dieser Arbeit ($27,5 \pm 0,86$ vs. $60 \pm 1,4$, $p = 0,0001$) (Yang et al., 2018). Da die Hemmung der Arginase in gesunden RBCs unserer Versuche gegenteilige Wirkung mit einer verschlechterten myokardialen Funktion zeigte, ist neben der Diabetes-abhängigen auch von einer altersabhängigen Einschränkung der eNOS-Aktivität durch die Arginase auszugehen. Alter steigert wie bereits bekannt auch in Endothelzellen die Arginase-Aktivität und trägt so zur ED bei (Pernow und Jung, 2013).

Die Einschränkung der erythrozytären eNOS-Aktivität scheint den Ergebnissen dieser Arbeit zu Folge nicht nur im Tiermodell, sondern auch im Menschen pathophysiologische Konsequenzen zu haben. Analog zur ED kann in dem Zusammenhang auch von einer erythrozytären Dysfunktion gesprochen werden. Neben den von der ED bekannten Effekten schränkt die Dysfunktion der RBCs auch weitere Mechanismen wie z.B. die Elastizität der Erythrozyten ein (Kleinbongard et al., 2006). An einem *in vivo* Modell wurde gezeigt, dass diese unter pathologischen Zuständen wie u.a. nach I/R ebenfalls reduziert wird (Merx et al., 2014). Eine erythrozytäre Dysfunktion beträfe daher nicht nur die von Cortese-Krott und Kelm als „erythrokrine Funktion“ beschriebene exokrine NO-Funktion der RBCs (Cortese-Krott und Kelm, 2014). Zusätzliche Schäden können resultieren, da die Elastizität von RBCs, wie allgemein bekannt, die Fließeigenschaften des Blutes und auch die Lebensdauer der Zellen beeinflusst. Eine Einschränkung dieser Funktionen kann besonders die Mikrozirkulation sowie die Hämolyse der RBCs beeinflussen. Die eingeschränkte Aktivität der RBCs macht sich außerdem durch ihre Verteilung schneller systemisch bemerkbar als die des Endothels, welches meist primär lokal betroffen ist. Eine erythrozytäre Dysfunktion würde sich daher eher präsentieren als eine ED und neben dem kardiovaskulären System auch alle anderen Organe betreffen. Eine genauere Charakterisierung der erythrozytären Dysfunktion und deren Therapieoptionen ist demnach nicht unerheblich.

4.3.4 NO-Bioverfügbarkeit in diabetischen Erythrozyten

Das Ausmaß der erythrozytären Dysfunktion sollte anhand der Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen, repräsentativ für die NO-Bioverfügbarkeit der verwendeten Proben, gemessen werden. Einige Studien deuten darauf hin, dass vor allem die Messung von NO_2^- repräsentativ für die NOS-Aktivität ist (Lauer et al., 2001, Kleinbongard et al., 2003, Wood et al., 2013). NO_2^- und NO_3^- wurden bereits vielfach als indirekte Parameter des NO gemessen (Himeno et al., 2004, Bryan und Grisham, 2007). In der RBC Membran lokalisierte Anionenaustauscher nahe der eNOS und weitere integrale Proteine transportieren in RBCs produziertes NO hinaus (Ulker et al., 2013), weshalb seine Produkte im Überstand gemessen werden können. Verglichen wurden die Proben der diabetischen Spender, bei denen der beobachtete, der eNOS zugeschriebene Effekt herabgesetzt war, mit den Proben nach Intervention durch norNOHA. Der Arginase-Inhibitor konnte die myokardiale Funktion in den vorangegangenen Versuchen am Langendorff-Transfermodell vermutlich NO-abhängig verbessern. Dementsprechend waren NO_2^- und NO_3^- nach der Inkubation der Proben mit norNOHA, verglichen mit den in der Kontrolle kaum messbaren Konzentrationen, gesteigert. Den Messungen zur Folge ist anzunehmen, dass in RBCs von Probanden mit kardiovaskulären Risikofaktoren keine relevante NO-Produktion mehr stattfindet. Diese kann allerdings durch Arginase-Inhibition wiederhergestellt werden.

Bei Messung der Proben junger Probanden wären ähnliche NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen zu erwarten gewesen wie nach der Intervention mit norNOHA an den diabetischen RBCs. Auf eine Messung der Proben wurde jedoch aus nachfolgend erläuterten Gründen für diese Arbeit bewusst verzichtet.

Insgesamt zeigten die Messungen des NO_2^- - und NO_3^- -Gehalts der Proben dieser Arbeit breite Streuungen bei sehr geringen Konzentrationen. Ziel war es, den Zustand der für die Langendorff-Versuche verwendeten Proben darzustellen. Bedingt durch den dafür angewendeten Ablauf kann es bei den im *NOx-Analyzer* durchgeführten Messungen zu den erheblichen Streuungen gekommen sein. Die NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen wurden im Überstand der RBC-Suspensionen, bestehend aus dem für die I/R-Versuche verwendeten Puffer, gemessen. Der Puffer wurde täglich neu angesetzt, wodurch es zu leichten Abweichungen in der Zusammensetzung gekommen sein kann. Diese können die Konzentrationen beeinflusst haben. Zudem ist eine Streuung bei der Messungen vom

NO_2^- - und NO_3^- -Gehalt in Biomaterialien auf Grund natürlicher Schwankungen häufiger zu beobachten (Tsikas, 2007).

Abgesehen von den zuvor festgelegten Einschlusskriterien unterschieden sich die ausgewählten Patienten in ihrem BMI und anderen Endorganschäden. Das könnte die starken Abweichungen zwischen den Proben zusätzlich erklären. Die systemischen NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen sind zudem, neben der endogenen Produktion, u.a. abhängig von der Nahrungsaufnahme, dem Bakterienstatus und auch der Leber- und Nierenfunktion (Lauer et al., 2001, Bryan und Grisham, 2007). Diese Faktoren wurden bei der Wahl der Probanden nicht beachtet. Hinzu kommt eine *in vivo* ungleiche Verteilung der Produkte zwischen den Kompartimenten RBCs und Plasma, was die alleinige Messung der Produkte im Überstand fehleranfällig macht (Himeno et al., 2004). Auch das bei der Blutabnahme verwendete Heparin kann die Messung der Nitrit-Konzentration beeinflussen. Andere Antikoagulantien haben jedoch einen größeren Einfluss auf die Konzentrationen, weshalb sie keine Alternative für die Versuche darstellten (Tsikas, 2007). Durch den Waschvorgang der RBCs vor der Messung müssten die Proben zudem frei von Heparin gewaschen worden sein.

Die geringen Konzentrationen kann die versuchsbedingte Dilution der RBCs in den Proben bedingt haben. Die Nitrit-Konzentration im Blut ist per se gering und wird nach Möglichkeit ohne Verdünnung gemessen (Tsikas, 2007). In den Versuchen von Yang et al., die ebenfalls NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen in den Überständen von RBCs junger Probanden sowie im Blut junger Probanden mittels HPLC darstellten, konnten an RBCs junger Probanden höhere Konzentrationen bei geringeren Streuungen gemessen werden als die Messungen an diabetischen RBCs dieser Arbeit zeigten (Yang et al., 2013). Dies kann durch die eingeschränkte eNOS-Funktion diabetischer RBCs zu erklären sein. Zu beachten ist dabei, dass den Proben von Yang et al. L-Arginin hinzugegeben wurde (Yang et al., 2013). Die dadurch verbesserte Substratverfügbarkeit könnte ebenfalls die höheren NO_2^- - und NO_3^- -Konzentrationen in den jungen RBCs erklären (Stuehr, 2004). Auch die geringere Streuung der Ergebnisse könnte durch die verbesserte Substratverfügbarkeit an L-Arginin sowie durch die höhere Konzentration des norNOHA (3 mM) in den Proben mit Blut erklärt werden (Yang et al., 2013).

Obwohl die Messungen unter großer Sorgfalt geschahen, da es sich bei Nitrit und Nitrat um rasch reaktive Moleküle handelt, scheinen unsere Ergebnisse für eine valide Aussage

nicht konstant genug. Es ließ sich kein reliables Korrelat einer erythrozytären Dysfunktion von RBCs älterer erkrankter Probanden bestimmen. Für eine präzisere Aussage zur eNOS-Aktivität müssten die präanalytischen Bedingungen konstanter gehalten werden, wodurch allerdings das Ziel einer Messung der tatsächlichen Konzentrationen unter Versuchsbedingungen nicht umsetzbar wäre. Alternativ könnte hierfür wie bei Yang et al. die Substratverfügbarkeit für die Messungen standardisiert verbessert werden (Yang et al., 2013). Eine weitere Möglichkeit zur NO-Bestimmung stellt z.B. die Bestimmung der eNOS- und Arginase-Nebenprodukte Citrullin und Ornithin dar (Jung et al., 2010).

Bei zukünftigen *in vivo* Experimenten wäre die NO_2^- - und NO_3^- -Bestimmung im Blut, einem Hämolysat und im Plasma zu bevorzugen, um den schwerer zugänglichen erythrozytären Gehalt sowie die gesamte eNOS-Aktivität zu bestimmen (Himeno et al., 2004). Da alle Methoden gewisse Limitierungen haben, ist es sinnvoll die Bedingungen der Methode so physiologisch wie möglich zu halten (Bryan und Grisham, 2007).

Entgegen unserer Hypothese konnten die Versuche auf Grund der genannten Bedingungen nicht direkt die Funktionszustände der RBCs, auf die aus den Versuchen am Langendorff-Transfermodell geschlossen wurde, widerspiegeln. Die Ergebnisse vorangegangener Studien lassen jedoch auch für die Versuche zur myokardialen Funktion dieser Arbeit einen NO-vermittelten Einfluss der RBCs vermuten (Yang et al., 2013, Merx et al., 2014).

4.4 Verwendung eines *ex vivo*-Mausmodells

Zwar konnten in der jüngeren Vergangenheit bereits Einschränkungen der humanen eNOS-Expression und -Aktivität an RBCs von KHK-Patienten nachgewiesen werden (Cortese-Krott et al., 2012, Eligini et al., 2013), funktionelle Auswirkungen der eingeschränkten eNOS-Aktivität am Menschen zeigten die Studien bisher jedoch noch nicht. Dahingehend konnte, mittels des Transfermodells und dem Vergleich von RBCs junger gesunder Probanden mit denen älterer kardiologischer Patienten, die humane erythrozytäre eNOS-Funktion unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren etwas besser charakterisiert werden.

Viele Säugetiere besitzen eNOS- und Arginase-Isoformen in unterschiedlicher Ausstattung (Schulz et al., 2004). Von ihnen hat sich die Maus in der Vergangenheit zu

einem oft verwendeten Modell in der kardiovaskulären Forschung etabliert. Neben dem geringen Kostenaufwand und der Möglichkeit mit genetischer Manipulation Modelle für viele Pathologien zu erzeugen (Sutherland et al., 2003), ähnelt ihre Verteilung der genannten Enzyme der des Menschen (Cortese-Krott und Kelm, 2014, Yang et al., 2013).

In dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Langendorff-Transfermodell wurden humane RBCs in die murinen Koronarien eingebracht, was mit dem Prinzip einer Xenotransplantation vergleichbar ist. Wie sich in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe zeigte, ist der Effekt dieser „Transplantation“ von humanen RBCs in die Mäuseherzen auf deren Funktion gleich dem der durch die Anwendung muriner RBCs erreicht wurde (Muessig et al., 2020a). Daher eignet sich dieses Modell, um die Wirkung humaner RBCs im I/R-Schaden zu untersuchen.

Das *ex vivo* Langendorff-Modell macht Zellinteraktionen unter Ausschluss von neuronalen und humoralen Einflüssen beurteilbar (Sutherland und Hearse, 2000, Muessig et al., 2020a), was einen Vorteil gegenüber *in vivo* Modellen darstellt. Zentrale Aufmerksamkeit dieser Arbeit galt dem Effekt der humanen erythrozytären eNOS und Arginase auf die Kardiomyozyten und die Entwicklung von I/R-Schäden. Da ein Einfluss der verwendeten Enzym-Inhibitoren auf die Myokard- und Endothelzellen in dem Modell weitestgehend ausgeschlossen wurde (s.o.), können durch die Versuche isoliert Aussagen zur erythrozytären Funktion getätigt werden. Ein weiterer Vorteil zu den in einigen Arbeiten verwendeten eNOS *knockout*-Modellen ist, dass kompensatorische Mechanismen der anderen NOS-Isoformen umgangen werden. Diese können den eNOS-abhängigen Effekt verfälschen (Tsutsui et al., 2010). Anhand der anschließend angefertigten Myokardschnitte konnte die Schädigung zudem durch strukturelle Korrelate belegt werden.

Zusammenfassend ermöglicht das Langendorff-Transfermodell die Auswirkungen der humanen erythrozytären eNOS auf die Herzen zu analysieren und ihre Regulation durch die erythrozytäre Arginase zu visualisieren. Die Methode eignet sich daher, um reproduzierbare Ergebnisse zur Pathophysiologie humaner RBCs zu gewinnen und gezielt die Anwendung pharmakologischer Substanzen zu testen.

4.5 Limitationen

Die Untersuchungen zur Interaktion der erythrozytären Arginase und eNOS dieser Arbeit wurden an einem *ex vivo* Modell durchgeführt. In diesem Modell werden die im menschlichen Körper während I/R stattfindenden Interaktionen mit anderen Blutzellen, Hormonwirkungen sowie immunologische und neurogene Signale ausgeschlossen. So unterscheidet sich z.B. die ROS-Entwicklung *in vivo* von der an isolierten Herzen (Schulz et al., 2004). Eine direkte Übertragung der an dem Transfermodell beobachteten Zusammenhänge auf den Menschen ist daher nicht möglich. Weder kann eine Vorhersage zu dem Ausmaß der myokardialen Schädigung noch zur pharmakologischen Wirkung der Inhibitoren am Menschen getroffen werden. Zur Evaluation einer Kardioprotektion am Menschen durch die Pharmaka sind weiterführende lokale und systemische Untersuchungen am Menschen nötig. Da die Arginase u.a. auch am Harnstoffzyklus beteiligt ist, müssen dabei mögliche Nebenwirkungen berücksichtigt werden. Am Tiermodell waren durch Arginase-Inhibition bislang keine toxischen Effekte zu beobachten (Pernow und Jung, 2013). In ersten Versuchen zur Anwendung von norNOHA am Menschen wurde dieses auch von den Probanden gut toleriert. Kövamees et al. konnten dabei zeigen, dass sich die lokale Endothelfunktion nach I/R und auch die mikrovaskuläre Dysfunktion am Unterarm bei Patienten mit DM Typ 2 durch Arginase-Inhibition verbessern lässt (Kövamees et al., 2014, Kövamees et al., 2016). Inwieweit die erythrozytäre Arginase ebenfalls an diesen Effekten beteiligt ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die jeweilige Relevanz der hier kombinierten Risikofaktoren ist schwer zu differenzieren, da die Probandengruppe der Patienten in dieser Arbeit in Bezug auf die Organfunktion, den HbA1c, das Alter und den BMI sehr heterogen zusammengesetzt war. Zudem wurde die Medikamenteneinnahme der Patienten, abgesehen von der Diabetes-Medikation und Antikoagulation, bei deren Rekrutierung nicht berücksichtigt. Viele Medikamente wie z.B. Statine (Hernandez-Perera et al., 1998) oder ACE-Inhibitoren (Bonner, 1997) beeinflussen ebenfalls den NO-Spiegel im Körper. Diese finden vor allem Anwendung bei Patienten, welche den vorliegenden Ergebnissen zur Folge von einer Arginase-Inhibition profitieren würden. Der gezeigte norNOHA-abhängige Effekt könnte daher *in vivo* durch diese Medikamente beeinflusst werden.

Die am Langendorff-Modell durchgeführten Versuche waren zeitlich begrenzt und bildeten lediglich den Zeitraum während der Ischämie und die ersten zwei Stunden der

Reperfusion ab. Eine Interaktion zwischen RBCs und den Herzen fand nur während der Ischämie sowie kurz danach statt. Die weiteren Effekte der RBCs vor Ischämie und während der späteren Reperfusion sowie immunologische Prozesse im Verlauf der folgenden Stunden bis Tage wurden nicht abgebildet. Länger angelegte Versuchsprotokolle sind an diesem Modell weniger sinnvoll, da die Herzen allein durch die Versuchsbedingungen im Verlauf Schaden nehmen, was den sinnvollen Versuchszeitraum limitiert (Sutherland und Hearse, 2000). Am Tiermodell deutete sich aber bereits an, dass die kurzzeitige Inhibition auch längerfristig die Arginase-Aktivität im Gewebe einschränkt (Gronros et al., 2013). Ob dies auch für die Arginase-Aktivität der RBCs gilt, bedarf weiterer Untersuchungen. Für die akute Schädigung kann das verwendete Modell jedoch repräsentativ gesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht direkt die Aktivität der eNOS und der Arginase nachgewiesen. Auch die Vermittlung des Effekts über NO konnte anhand der HPLC Messung von NO_2^- und NO_3^- nicht valide bestätigt werden. In der Vergangenheit wurden weitere Mechanismen diskutiert, über die RBCs protektiv im kardiovaskulären System wirken können. Dazu gehört z.B. freigesetztes ATP, welches über NO-Aktivierung in Endothelzellen vasodilatativ wirken kann. Der über ATP vermittelte vasodilatative Effekt von RBCs wurde in Untersuchungen von Ulker et al. bereits weitestgehend ausgeschlossen (Ulker et al., 2013). Der NO-Freisetzung aus zirkulierendem Nitrit oder aus S-nitrosyliertem Hb wurde ebenfalls eine protektive Rolle zugesprochen (Porro et al., 2014). Auch die O_2 -Transportkapazität der RBCs kann über den Erhalt oxidativer Stoffwechselprozesse zur Kardioprotektion beitragen. Andere Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten dies anhand der O_2 -Extraktion, der am Langendorff-Perfusor verwendeten Proben, teilweise bestätigen. Zudem konnte eine Korrelation des protektiven Effekts mit der Annäherung der Proben an einen physiologischen Hämatokrit nachgewiesen werden (Muessig et al., 2020a). Das Ausbleiben der unter norNOHA beobachteten Reduzierung der Infarktgröße durch den NOS-Inhibitor L-NAME bestärkt allerdings die Annahme einer eNOS-vermittelten Kardioprotektion unter Arginase-Inhibition in unseren Versuchen und bestätigt die Relevanz der erythrozytären eNOS. Protektive Effekte einer Arginase-Inhibition könnten zudem auch über die gehemmte Polyaminsynthese und dadurch reduzierte Proliferation der glatten Muskelzellen erreicht werden (Pernow und Jung, 2013). Dies würde auch eine längerfristige Protektion bedeuten. Erst kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen, dass in RBCs eine lösliche Guanylatcyclase (sGC) aktiv ist (Cortese-Krott et al., 2018). Dieses

den Hauptrezeptor des NO darstellende Enzym ist, genauso wie PDE und PKG, auch in RBCs von kardiovaskulär erkrankten Patienten noch aktivierbar. Das erhärtet die Annahme über die Wirksamkeit des pharmakologischen Einflusses auf diesen Signalweg, z.B. über Arginase-Inhibition (Cortese-Krott et al., 2018).

An dem Langendorff-Transfermodell konnte die unterschiedliche Aktivität der erythrozytären eNOS in RBCs gesunder und erkrankter Probanden im I/R Schaden dargestellt werden. Obwohl der positive Einfluss einer erythrozytären Arginase-Inhibition auf die eNOS-Funktion gezeigt werden konnte bleibt weiter offen, welche der zahlreichen Faktoren der Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen die eNOS-abhängige Kardioprotektion einschränken. Auch der Nachweis der gesteigerten eNOS-Aktivität gelang nicht ausreichend, weshalb eine valide Aussage über den protektiven Mechanismus von RBCs noch nicht möglich ist.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der kardioprotektive Effekt der eNOS humaner RBCs vor I/R-Schäden an einem *ex vivo* Model bestätigt werden. Zudem wurde eine Minderung dieses Effekts bei vorhandenen kardiovaskulären Risikofaktoren in Abhängigkeit von der erythrozytären Arginase-Aktivität gezeigt. Dies stellt einen potentiellen Ansatz pharmakologischer Interventionen, z.B. lokal im Rahmen einer PCI bei myokardialer Ischämie, dar. Als weiterer wichtiger Schritt ist die Übertragung *in vivo* auf den Menschen anzustreben.

Um die erythrozytäre Dysfunktion und den Einfluss pathologischer Zustände auf die eNOS- und Arginase-Interaktion genauer zu definieren, ist es erforderlich die Patientenkohorten präziser zu unterteilen. So kann unterschieden werden, inwieweit die Faktoren Alter, Blutzucker-Einstellung nach dem HbA1c-Wert, andere Organdysfunktionen oder das Geschlecht die erythrozytäre Dysfunktion bedingen. Danach kann ggf. prognostiziert werden, welche Patientengruppen von einer pharmakologischen Intervention am ehesten profitieren würden.

Erste Hinweise geben neuere Untersuchungen um Yang et al., die darauf hinweisen, dass DM eine entscheidende Rolle spielt. Eine erhöhte Blutglukose steigere demnach die Arginase-Aktivität in RBCs (Yang et al., 2018, Mahdi et al., 2019a). Weitere Versuche der

Arbeitsgruppe unterstreichen anhand der Vasodilatation von murinen und humanen arteriellen Segmenten, dass DM ein entscheidender Faktor bei der Entstehung der ED ist. Dieser wird u.a. vermittelt über die erhöhte Arginase-Aktivität und ROS-Produktion in diabetischen RBCs (Zhou et al., 2018). Zudem gingen sie bereits der Frage nach, wie entscheidend die Blutglukoseeinstellung der Patienten ist. Im Rahmen eines *ex vivo* Langendorff I/R-Modells konnte gezeigt werden, dass eine gute Blutzuckereinstellung protektiv wirkt und auch dieser Zustand durch Arginase-Inhibition weiter verbessert werden kann (Mahdi et al., 2019a). Der durch Arginase-Inhibition induzierte, protektive Effekt der RBCs sei jedoch nicht allein über eine verbesserte NO-Bioverfügbarkeit zu erklären. Auch eine über Arginase-Inhibition verminderte ROS-Produktion der NOS durch geringere eNOS-Entkopplung und geringere Arginase induzierte ROS-Produktion trage dazu bei (Yang et al., 2018, Zhou et al., 2018). Auch neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass vor allem eine mangelhafte Blutzuckereinstellung der Probanden für eine reduzierte kardioprotektive Funktion von RBCs während I/R im *ex vivo* Langendorff-Modell verantwortlich gemacht werden kann (Muessig et al., 2020b).

Neben der Blutglukose ist zudem interessant, in welchem Ausmaß das Alter der Patienten eventuell eine Rolle spielt. Über den Zusammenhang des Alters und der Arginase-Aktivität liefert die Arbeitsgruppe um Mahdi et al. ebenfalls erste Erkenntnisse. Die Endothelium-abhängige Vasodilatation nimmt demnach mit steigendem Alter ab und lässt sich zunehmend wieder durch Arginase-Inhibition steigern (Mahdi et al., 2019b). Auch der bereits erwähnte Vergleich unserer Patientenkohorte mit der der Versuche von Yang et al. (vgl. 4.3.3) im Rahmen des I/R-Schadens liefert Hinweise darauf, dass mit zunehmendem Alter eine Arginase-Inhibition auch in RBCs relevanter wird (Yang et al., 2018). Bei neueren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte dagegen kein Einfluss des Alters in Verbindung mit kardiovaskulären Erkrankungen auf den kardioprotektiven Effekt von RBCs im I/R-Schaden gezeigt werden (Muessig et al., 2020b). Um eine sichere Aussage zum Einfluss des Alters auf die erythrozytäre Funktion tätigen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

In Zusammenschau der genannten Studien und Ergebnisse dieser Arbeit wird deutlich, dass die Differenzierung zwischen der endothelialen und der erythrozytären eNOS im Rahmen kardiovaskulärer Pathologien klinisch und therapeutisch relevant ist (Zhou et al., 2018, Yang et al., 2018, Mahdi et al., 2019a, Muessig et al., 2020b).

Weiterführende Untersuchungen sollten unter physiologischen Bedingungen im Organismus durchgeführt werden, da im I/R-Schaden auch immunologische Prozesse die in *ex vivo* beobachtete Kardioprotektion beeinflussen können. Erste *in vivo* Untersuchungen existieren bereits im Zusammenhang mit dem MI an Tieren (Jung et al., 2010, Gonon et al., 2012) sowie zur ED im menschlichen Organismus (Mahdi et al., 2018).

Neben der Inhibition der Arginase werden weitere Methoden zur Verbesserung NO-Bioverfügbarkeit diskutiert. Dazu gehört u.a. die Substitution von L-Arginin. Der Effekt wird jedoch in Frage gestellt, da im Menschen selten ein echter Mangel an L-Arginin vorliegt (Forstermann und Sessa, 2012) und die NO-unabhängigen Signalwege des Arginins den protektiven Effekten entgegen wirken (Durante et al., 2007). Auch Daten zur exogenen Gabe von NO sind inkonsistent (Schulz et al., 2004), wohingegen NO-Donoren überwiegend kardioprotektiv wirken (Rassaf et al., 2006, Andreadou et al., 2015). Eine weitere vielversprechende Methode ist das *Remote ischaemic conditioning*, welches ebenfalls über den NO-Pathway wirkt (Basalay et al., 2012). Ebenfalls am Transfermodell könnten hierzu weitere Versuche mit humanen RBCs durchgeführt und die Signalwege auf biochemischer Ebene analysiert werden.

Auch die Rolle der erythrozytären eNOS-Funktion in nicht degenerativen erythrozytären Erkrankungen wie Enzymopathien, Anämien oder Malaria, genauso wie in Blutkonserven bleibt ein spannendes Feld (Wood et al., 2013). Versuche mit RBCs entsprechender Patienten und möglichen Therapieoptionen wären an dem Transfermodell durchführbar.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit mit der Darstellung der erythrozytären eNOS-Arginase-Interaktion ein wichtiger Teil der Entstehung von I/R-Schäden genauer definiert werden. Die Ergebnisse liefern wertvolle Erkenntnisse zur eNOS-vermittelten Kardioprotektion humaner RBCs und deren Einschränkung im Rahmen von Pathologien. Dies kann einen wichtigen Beitrag zur zukünftigen Therapie des MI leisten und die Prognose und Mortalität weiter verbessern.

5 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reaktion der NO-Synthase.	7
Abb. 2: Funktionen und Signalwege des NO im kardiovaskulären System.	9
Abb. 3: Interaktion der erythrozytären eNOS und Arginase.	12
Abb. 4: Aufbau des druckkonstanten Langendorff-Modells.	15
Abb. 5: Aufbau des verwendeten Langendorff-Perfusors.	23
Abb. 6: <i>Aortic Block</i> innerhalb der Herzkammer mit im linken Ventrikel positioniertem Ballon.	26
Abb. 7: Zeitleiste des Versuchsprotokolls.	29
Abb. 8: Ausmessung der Infarktfläche an Myokardschnitten mittels TTC-Färbung.	31
Abb. 9: Aufbau des verwendeten NOx-Analyzers.	33
Abb. 10: Wirkung humaner Erythrozyten auf die linksventrikuläre Myokardfunktion nach I/R am Langendorff-Modell.	37
Abb. 11: Verringerung der Infarktgröße durch Perfusion mit humanen Erythrozyten.	38
Abb. 12: Vergleich der Wirkung humaner Erythrozyten junger gesunder Spender mit der humaner Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 auf die linksventrikuläre Myokardfunktion nach I/R.	39
Abb. 13: Vergrößerung der Infarktgröße unter Perfusion mit humanen Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2.	40
Abb. 14: Vergleich der Wirkungen der Kontrollgruppen aus Puffer (KHB, schwarz), humanen Erythrozyten junger gesunder Spender (RBCs, rot) und humanen Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 (RBCs DM, blau) auf die linksventrikuläre Myokardfunktion und Infarktgröße nach I/R.	41
Abb. 15: Wirkung des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die murinen Herzen nach I/R.	42

Abb. 16: Wirkungen des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf die Kardioprotektion von Erythrozyten junger Spender am linken Ventrikel nach I/R.	43
Abb. 17: Vergrößerung der Infarktgröße durch die kombinierte Anwendung des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME an humanen Erythrozyten junger gesunder Spender.	44
Abb. 18: Verringerung der Infarktgröße unter Anwendung des Arginase-Inhibitors norNOHA an humanen Erythrozyten kardiologischer Patienten mit einem Diabetes Mellitus Typ 2.	45
Abb. 19: Einfluss des Arginase-Inhibitors norNOHA und des eNOS-Inhibitors L-NAME auf den eingeschränkten kardioprotektiven Effekt von Erythrozyten kardiologisch behandelter Patienten mit Diabetes Mellitus Typ 2 auf die linksventrikuläre Funktion im I/R-Schaden.	46
Abb. 20: Nitrit- und Nitrat-Exkretion humaner Erythrozyten.	47

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der für die Versuche verwendeten Elektrolyte, Chemikalien und Gase.	19
Tabelle 2: Übersicht der für die Versuche verwendeten Medikamente und medizinischen Produkte.	19
Tabelle 3: Übersicht der für die Versuche verwendeten Geräte.	21
Tabelle 4: Übersicht der für die Versuche verwendeten Verbrauchsmaterialien.	21
Tabelle 5: Übersicht der für die vorliegende Arbeit verwendeten Softwareprogramme.	22
Tabelle 6: Elektrolyte zur Herstellung des verwendeten Krebs-Henseleit-Puffers.	24
Tabelle 7: Patientencharakteristika.	27

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ANDREADOU, I., ILIODROMITIS, E. K., RASSAF, T., SCHULZ, R., PAPAPETROPOULOS, A. & FERDINANDY, P. 2015. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *British Journal of Pharmacology*, 172, 1587-1606.
- BASALAY, M., BARSUKEVICH, V., MASTITSKAYA, S., MROCHEK, A., PERNOW, J., SJOQUIST, P. O., ACKLAND, G. L., GOURINE, A. V. & GOURINE, A. 2012. Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms. *Experimental Physiology*, 97, 908-917.
- BELL, R. M., MOCANU, M. M. & YELLON, D. M. 2011. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 50, 940-50.
- BOATENG, S. & SANBORN, T. 2013. Acute myocardial infarction. *Dis Mon*, 59, 83-96.
- BONNER, G. 1997. The role of kinins in the antihypertensive and cardioprotective effects of ACE inhibitors. *Drugs*, 54, 23-30.
- BRAUNWALD, E. & KLONER, R. A. 1985. Myocardial Reperfusion - a Double-Edged Sword. *Journal of Clinical Investigation*, 76, 1713-1719.
- BRYAN, N. S. & GRISHAM, M. B. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43, 645-57.
- CHEN, L. Y. & MEHTA, J. L. 1998. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol*, 32, 57-61.
- CORTESE-KROTT, M. M. & KELM, M. 2014. Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function? *Redox Biol*, 2, 251-8.
- CORTESE-KROTT, M. M., MERGIA, E., KRAMER, C. M., LUCKSTADT, W., YANG, J., WOLFF, G., PANKNIN, C., BRACHT, T., SITEK, B., PERNOW, J., STASCH, J. P., FEELISCH, M., KOESLING, D. & KELM, M. 2018. Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease. *Redox Biol*, 14, 328-337.
- CORTESE-KROTT, M. M., RODRIGUEZ-MATEOS, A., SANSONE, R., KUHNLE, G. G. C., THASIAN-SIVARAJAH, S., KRENZ, T., HORN, P., KRISP, C., WOLTERS, D., HEISS, C., KRONCKE, K. D., HOGG, N., FEELISCH, M. & KELM, M. 2012. Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood*, 120, 4229-4237.
- DEWOOD, M. A., SPORES, J., NOTSKE, R., MOUSER, L. T., BURROUGHS, R., GOLDEN, M. S. & LANG, H. T. 1980. Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N Engl J Med*, 303, 897-902.
- DURANTE, W., JOHNSON, F. K. & JOHNSON, R. A. 2007. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34, 906-11.
- ELIGINI, S., PORRO, B., LUALDI, A., SQUELLERIO, I., VEGLIA, F., CHIORINO, E., CRISCI, M., GARLASCHE, A., GIOVANNARDI, M., WERBA, J. P., TREMOLI, E. & CAVALCA, V. 2013. Nitric Oxide Synthetic Pathway in Red Blood Cells Is Impaired in Coronary Artery Disease. *Plos One*, 8.
- ESPER, R. J., VILARINO, J. O., MACHADO, R. A. & PARAGANO, A. 2008. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Adv Cardiol*, 45, 17-43.
- FORSTERMANN, U. & SESSA, W. C. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*, 33, 829-37, 837a-837d.
- FRANK, A., BONNEY, M., BONNEY, S., WEITZEL, L., KOEPPEN, M. & ECKLE, T. 2012. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 16, 123-32.
- FURCHGOTT, R. F. & VANHOUTTE, P. M. 1989. Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors. *Faseb Journal*, 3, 2007-2018.

- GONON, A. T., JUNG, C., KATZ, A., WESTERBLAD, H., SHEMAKIN, A., SJOQUIST, P. O., LUNDBERG, J. O. & PERNOW, J. 2012. Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PLoS One*, 7, e42038.
- GONZALES, T. K., YONKER, J. A., CHANG, V., ROAN, C. L., HERD, P. & ATWOOD, C. S. 2017. Myocardial infarction in the Wisconsin Longitudinal Study: the interaction among environmental, health, social, behavioural and genetic factors. *Bmj Open*, 7.
- GRONROS, J., KISS, A., PALMER, M., JUNG, C., BERKOWITZ, D. & PERNOW, J. 2013. Arginase inhibition improves coronary microvascular function and reduces infarct size following ischaemia-reperfusion in a rat model. *Acta Physiol (Oxf)*, 208, 172-9.
- HAMMOND, J. & BALLIGAND, J. L. 2012. Nitric oxide synthase and cyclic GMP signaling in cardiac myocytes: from contractility to remodeling. *J Mol Cell Cardiol*, 52, 330-40.
- HAUSENLOY, D. J. & YELLON, D. M. 2013. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 92-100.
- HERNANDEZ-PERERA, O., PEREZ-SALA, D., NAVARRO-ANTOLIN, J., SANCHEZ-PASCUALA, R., HERNANDEZ, G., DIAZ, C. & LAMAS, S. 1998. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 2711-2719.
- HERR, D. J., AUNE, S. E. & MENICK, D. R. 2015. Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. *J Vis Exp*, e52908.
- HERRICK, J. B. 1983. Landmark article (JAMA 1912). Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. By James B. Herrick. *JAMA*, 250, 1757-65.
- HIMENO, M., ISHIBASHI, T., NAKANO, S., FURUYA, K., YOSHIDA, J., KIGOSHI, T., UCHIDA, K. & NISHIO, M. 2004. Implication of steady state concentrations of nitrite and nitrate metabolites of nitric oxide in plasma and whole blood in healthy human subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 31, 591-6.
- IBANEZ, B., JAMES, S., AGEWALL, S., ANTUNES, M. J., BUCCIARELLI-DUCCI, C., BUENO, H., CAFORIO, A. L. P., CREA, F., GOUDVENOS, J. A., HALVORSEN, S., HINDRICKS, G., KASTRATI, A., LENZEN, M. J., PRESCOTT, E., ROFFI, M., VALGIMIGLI, M., VARENHORST, C., VRANCKX, P., WIDIMSKY, P., COLLET, J. P., KRISTENSEN, S. D., ABOYANS, V., BAUMBACH, A., BUGIARDINI, R., COMAN, I. M., DELGADO, V., FITZSIMONS, D., GAEMPERLI, O., GERSHLICK, A. H., GIELEN, S., HARJOLA, V. P., KATUS, H. A., KNUUTI, J., KOLH, P., LECLERCQ, C., LIP, G. Y. H., MORAIS, J., NESKOVIC, A. N., NEUMANN, F. J., NIESSNER, A., PIEPOLI, M. F., RICHTER, D. J., SHLYAKHTO, E., SIMPSON, I. A., STEG, P. G., TERKELSEN, C. J., THYGESEN, K., WINDECKER, S., ZAMORANO, J. L., ZEYMER, U. & CARDIOLOGY, E. S. 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 39, 119-+.
- IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. & CHAUDHURI, G. 1987. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein Is Nitric-Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 9265-9269.
- ISHIBASHI, T., KUBOTA, K., HIMENO, M., MATSUBARA, T., HORI, T., OZAKI, K., YAMAZOE, M., AIZAWA, Y., YOSHIDA, J. & NISHIO, M. 2001. Respiratory alkalosis does not alter NOx concentrations in human plasma and erythrocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281, H2757-61.
- JENNINGS, R. B., SOMMERS, H. M., SMYTH, G. A., FLACK, H. A. & LINN, H. 1960. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70, 68-78.
- JONES, S. P. & BOLLI, R. 2006. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 40, 16-23.
- JUNG, C., GONON, A. T., SJOQUIST, P. O., LUNDBERG, J. O. & PERNOW, J. 2010. Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, 85, 147-54.

- KEMP, C. D. & CONTE, J. V. 2012. The pathophysiology of heart failure. *Cardiovascular Pathology*, 21, 365-371.
- KIM, J. H., BUGAJ, L. J., OH, Y. J., BIVALACQUA, T. J., RYOO, S., SOUCY, K. G., SANTHANAM, L., WEBB, A., CAMARA, A., SIKKA, G., NYHAN, D., SHOUKAS, A. A., ILIES, M., CHRISTIANSON, D. W., CHAMPION, H. C. & BERKOWITZ, D. E. 2009. Arginase inhibition restores NOS coupling and reverses endothelial dysfunction and vascular stiffness in old rats. *J Appl Physiol* (1985), 107, 1249-57.
- KLEINBONGARD, P., DEJAM, A., LAUER, T., RASSAF, T., SCHINDLER, A., PICKER, O., SCHEEREN, T., GODECKE, A., SCHRADER, J., SCHULZ, R., HEUSCH, G., SCHAUB, G. A., BRYAN, N. S., FEELISCH, M. & KELM, M. 2003. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, 35, 790-796.
- KLEINBONGARD, P., SCHULZ, R., MUENCH, M., RASSAF, T., LAUER, T., GODECKE, A. & KELM, M. 2006. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *European Heart Journal*, 27, 127-127.
- KNOWLES, R. G. & MONCADA, S. 1992. Nitric-Oxide as a Signal in Blood-Vessels. *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 399-402.
- KOVAMEES, O., SHEMYAKIN, A., CHECA, A., WHEELOCK, C. E., LUNDBERG, J. O., OSTENSON, C. G. & PERNOW, J. 2016. Arginase Inhibition Improves Microvascular Endothelial Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 101, 3952-3958.
- KOVAMEES, O., SHEMYAKIN, A. & PERNOW, J. 2014. Effect of Arginase Inhibition on Ischemia-Reperfusion Injury in Patients with Coronary Artery Disease with and without Diabetes Mellitus. *Plos One*, 9.
- LANGENDORFF, O. 1895. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.*, 61, 291 doi:10.1007/BF01812150.
- LAUER, T., PREIK, M., RASSAF, T., STRAUER, B. E., DEUSSEN, A., FEELISCH, M. & KELM, M. 2001. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 12814-12819.
- MAHDI, A., JIAO, T., YANG, J. N., KOVAMEES, O., ALVARSSON, M., VON HEIJNE, M., ZHOU, Z. C. & PERNOW, J. 2019a. The Effect of Glycemic Control on Endothelial and Cardiac Dysfunction Induced by Red Blood Cells in Type 2 Diabetes. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
- MAHDI, A., KOVAMEES, O., CHECA, A., WHEELOCK, C. E., VON HEIJNE, M., ALVARSSON, M. & PERNOW, J. 2018. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus despite intensive glucose-lowering therapy. *Journal of Internal Medicine*, 284, 388-398.
- MAHDI, A., PERNOW, J. & KOVAMEES, O. 2019b. Arginase Inhibition Improves Endothelial Function in an Age-Dependent Manner in Healthy Elderly Humans. *Rejuvenation Research*, 22, 385-389.
- MAHMOOD, S. S., LEVY, D., VASAN, R. S. & WANG, T. J. 2014. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: a historical perspective. *Lancet*, 383, 999-1008.
- MERX, M. W., GORRESSEN, S., VAN DE SANDT, A. M., CORTESE-KROTT, M. M., OHLIG, J., STERN, M., RASSAF, T., GODECKE, A., GLADWIN, M. T. & KELM, M. 2014. Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Basic Res Cardiol*, 109, 398.
- MOENS, A. L., CLAEYS, M. J., TIMMERMANS, J. P. & VRINTS, C. J. 2005. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int J Cardiol*, 100, 179-90.
- MONCADA, S. & HIGGS, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002-12.
- MONCADA, S., PALMER, R. M. & HIGGS, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43, 109-42.
- MUESSIG, J. M., KAYA, S., MOELLHOFF, L., NOELLE, J., HIDALGO PAREJA, L., MASYUK, M., GERDES, N., PERNOW, J., KELM, M. & JUNG, C. 2020a. A Model of Blood Component-Heart

- Interaction in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury using a Langendorff-Based Ex Vivo Assay. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 25, 164-173.
- MUESSIG, J. M., MOELLHOFF, L., NOELLE, J., KAYA, S., HIDALGO PAREJA, L., MASYUK, M., RODEN, M., KELM, M. & JUNG, C. 2020b. Poor glycemic control impairs the cardioprotective effects of red blood cells on myocardial ischemia/reperfusion injury. *Nitric Oxide*, 97, 1-10.
- OPIE, L. H. 1989. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*, 80, 1049-62.
- PERNOW, J. & JUNG, C. 2013. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res*, 98, 334-43.
- PORRO, B., ELIGINI, S., SQUELLERIO, I., TREMOLI, E. & CAVALCA, V. 2014. The red blood cell: a new key player in cardiovascular homeostasis? Focus on the nitric oxide pathway. *Biochem Soc Trans*, 42, 996-1000.
- RASSAF, T., POLL, L. W., BROUZOS, P., LAUER, T., TOTZECK, M., KLEINBONGARD, P., GHARINI, P., ANDERSEN, K., SCHULZ, R., HEUSCH, G., MODDER, U. & KELM, M. 2006. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J*, 27, 1699-705.
- REED, G. W., ROSSI, J. E. & CANNON, C. P. 2017. Acute myocardial infarction. *Lancet*, 389, 197-210.
- SANADA, S., KOMURO, I. & KITAKAZE, M. 2011. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301, H1723-H1741.
- SCHULZ, R., KELM, M. & HEUSCH, G. 2004. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61, 402-13.
- SKRZYPIEC-SPRING, M., GROTHUS, B., SZELAG, A. & SCHULZ, R. 2007. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 55, 113-26.
- SPECTOR, E. B., RICE, S. C., KERN, R. M., HENDRICKSON, R. & CEDERBAUM, S. D. 1985. Comparison of arginase activity in red blood cells of lower mammals, primates, and man: evolution to high activity in primates. *Am J Hum Genet*, 37, 1138-45.
- STATISTISCHES BUNDESAMT DESTATIS 2017. Gesundheit Todesursachen in Deutschland. DESTATIS wissen. nutzen.
- STRIJDOM, H., CHAMANE, N. & LOCHNER, A. 2009. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr*, 20, 303-10.
- STUEHR, D. J. 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr*, 134, 2748S-2751S; discussion 2765S-2767S.
- SUTHERLAND, F. J. & HEARSE, D. J. 2000. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacol Res*, 41, 613-27.
- SUTHERLAND, F. J., SHATTOCK, M. J., BAKER, K. E. & HEARSE, D. J. 2003. Mouse isolated perfused heart: characteristics and cautions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30, 867-78.
- THYGESEN, K., ALPERT, J. S., JAFFE, A. S., CHAITMAN, B. R., BAX, J. J., MORROW, D. A., WHITE, H. D. & GROUP, E. S. C. S. D. 2018. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*.
- TOTZECK, M., HENDGEN-COTTA, U. B., FRENCH, B. A. & RASSAF, T. 2016. A practical approach to remote ischemic preconditioning and ischemic preconditioning against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Biol Methods*, 3.
- TSIKAS, D. 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 851, 51-70.
- TSUTSUI, M., SHIMOKAWA, H., OTSUJI, Y. & YANAGIHARA, N. 2010. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: Novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacology & Therapeutics*, 128, 499-508.
- ULKER, P., GUNDUZ, F., MEISELMAN, H. J. & BASKURT, O. K. 2013. Nitric oxide generated by red blood cells following exposure to shear stress dilates isolated small mesenteric arteries under hypoxic conditions. *Clin Hemorheol Microcirc*, 54, 357-69.
- WEBB, A. J., MILSOM, A. B., RATHOD, K. S., CHU, W. L., QURESHI, S., LOVELL, M. J., LECOMTE, F. M. J., PERRETT, D., RAIMONDO, C., KHOSHBIN, E., AHMED, Z., UPPAL, R., BENJAMIN, N.,

- HOBBS, A. J. & AHLUWALIA, A. 2008. Mechanisms Underlying Erythrocyte and Endothelial Nitrite Reduction to Nitric Oxide in Hypoxia Role for Xanthine Oxidoreductase and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation Research*, 103, 957-U114.
- WHO. 2020. *Leading causes of death and disability/ A visual summary of global and regional trends 2000-2019* [Online]. Available: <https://www.who.int/data/stories/leading-causes-of-death-and-disability-2000-2019-a-visual-summary> [Accessed 2021/01/26].
- WILANSKY, S., MORENO, C. A. & LESTER, S. J. 2007. Complications of myocardial infarction. *Crit Care Med*, 35, S348-54.
- WOOD, K. C., CORTESE-KROTT, M. M., KOVACIC, J. C., NOGUCHI, A., LIU, V. B., WANG, X., RAGHAVACHARI, N., BOEHM, M., KATO, G. J., KELM, M. & GLADWIN, M. T. 2013. Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33, 1861-71.
- YANG, B. C., NICHOLS, W. W. & MEHTA, J. L. 1996. Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 1, 297-306.
- YANG, J., GONON, A. T., SJOQUIST, P. O., LUNDBERG, J. O. & PERNOW, J. 2013. Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 15049-54.
- YANG, J., ZHENG, X., MAHDI, A., ZHOU, Z., TRATSIKOVICH, Y., JIAO, T., KISS, A., KOVAMEES, O., ALVARSSON, M., CATRINA, S. B., LUNDBERG, J. O., BRISMAR, K. & PERNOW, J. 2018. Red Blood Cells in Type 2 Diabetes Impair Cardiac Post-Ischemic Recovery Through an Arginase-Dependent Modulation of Nitric Oxide Synthase and Reactive Oxygen Species. *JACC Basic Transl Sci*, 3, 450-463.
- YUSUF, S., HAWKEN, S. & OUNPUU, S. 2004. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study (vol 364, pg 937m 2004). *Lancet*, 364, 2020-2020.
- ZHOU, Z. C., MAHDI, A., TRATSIKOVICH, Y., ZAHORAN, S., KOVAMEES, O., NORDIN, F., GONZALEZ, A. E. U., ALVARSSON, M., OSTENSON, C. G., ANDERSSON, D. C., HEDIN, U., HERMESZ, E., LUNDBERG, J. O., YANG, J. N. & PERNOW, J. 2018. Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I. *Journal of the American College of Cardiology*, 72, 769-780.
- ZIOLO, M. T., KOHR, M. J. & WANG, H. 2008. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol*, 45, 625-32.

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Jung für die Ermöglichung dieser Dissertation und die Betreuung, genauso wie für die vielen Erfahrungen die ich im Rahmen der Erstellung dieser Arbeit sowie als Mitglied der Arbeitsgemeinschaft sammeln durfte.

Ebenso danke ich Frau Dr. Johanna Müssig für die exzellente Betreuung, die Beratung und Unterstützung während der Planung, Durchführung sowie der Fertigstellung meiner Dissertation. Sie stand mir jederzeit zur Seite und weckte in mir die Begeisterung für die Wissenschaft.

Auch der gesamten Arbeitsgemeinschaft um Prof. Dr. Jung - besonders Dr. Maryna Masyuk, Dr. Amir Nia und Dr. Nana-Yaw Bimpong-Buta - danke ich für die konstruktiven Diskussionen, praktische Unterstützung in der Klinik und die bereichernden Erfahrungen während meiner Zeit in der AG.

Weiter gilt mein Dank Stefanie Becher, VMTA, die mir allzeit mit Rat und Tat im Labor zur Seite stand und für so gut wie jedes Problem eine Lösung fand. Ebenso danke ich Dr. rer. nat. Frederik Barbarino für seine Hilfe bei den Versuchen am ENO-20.

Vor allem möchte ich aber meiner Familie - besonders meinen Eltern Susanne und Matthias Möllhoff sowie meinem Bruder Max Möllhoff - und meinen Freunden danken, die mich über die gesamte Zeit der Erstellung dieser Arbeit sowie während des Studiums unterstützt und immer motivierende und auch aufbauende Worte gefunden haben.