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

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

# Mechanismen der endothelialen Dysfunktion bei Anämie: Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies, endothelialer Arginase und dysfunktionalen Erythrozyten auf die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase

Dissertation

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

vorgelegt von

Paul Jonas Dahlmann

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter/in: PD Dr. med. Florian Simon

# Publikation

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Chennupati, R., Solga, I., Wischmann, P., Dahlmann, P., Gül Celik, F., Pacht, D., Şahin, A., Yogathasan, V., Rabiul Hosen, M., Gerdes N., Kelm M., Jung, C., (2023), Chronic anemia is associated with systemic endothelial dysfunction. Frontiers in Cardiovascular Medicine (Volume 10)

Teile dieser Arbeit wurden am 15.03.2023 auf dem Kongress der Medical Research School Düsseldorf vorgestellt.

# I ZUSAMMENFASSUNG

Bei Patienten mit akutem und chronischem Koronarsyndrom wird häufig eine Anämie diagnostiziert. Studien haben belegt, dass eine Anämie die Prognose bei akutem Myokardinfarkt (AMI) verschlechtert. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass eine Blutungsanämie die Bildung dysfunktionaler roter Blutkörperchen (RBK) induziert. Bisher ist nicht geklärt, ob neben der RBK-Dysfunktion eine veränderte Endothelfunktion im Zusammenhang mit den anämieassoziierten Komplikationen steht. Eine endotheliale Dysfunktion (ED), definiert durch reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), könnte die Prognose von anämischen Patienten mit AMI negativ beeinflussen. Diese Arbeit untersucht die Auswirkung der Anämie auf die Endothelfunktion großer Gefäße. Durch repetitive Blutentnahmen wurde in männlichen C57BL/6J-Mäusen (WT-Mäuse) eine subakute oder chronische Anämie induziert. Im Anschluss wurde die Endothelfunktion der thorakalen Aorta im Organbad quantifiziert. Aorten von subakut und chronisch anämischen Mäusen wiesen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine reduzierte NO-abhängige Relaxation auf. Die chronische Anämie erhöhte die Empfindlichkeit der glatten Muskulatur (GMZ) gegenüber exogenem NO in Mäusen, die die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase nicht exprimierten (eNOS-KO). Weder die Deletion der endothelialen Arginase I noch die pharmakologische Inhibition der Arginase I und II hat die Endothelfunktion anämischer Mäuse verbessert. Die Behandlung von chronisch anämischen WT-Mäusen mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) verbesserte die endothelabhängige Relaxation der isolierten Gefäße. In Summe implizieren die Daten, dass die subakute und chronische Anämie über erhöhte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies die Induktion einer ED bewirkt hat. Eine gesteigerte Arginaseaktivität scheint nicht in den Pathomechanismus der ED involviert gewesen zu sein. Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein Protokoll erarbeitet, um die Interaktion von RBK und dem Endothel messbar zu machen. Aortenringe von WT-Mäusen wurden mit humanen RBK inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Endothelfunktion im Organbad quantifiziert. Unterschiedliche Inkubationbedingungen wurden evaluiert und schließlich ein finales Protokoll formuliert. Gemäß diesem Protokoll wurden Gefäße mit RBK von Probanden mit AMI oder mit RBK von gleichalten, gesunden Probanden inkubiert. Nach Inkubation wiesen die Gefäße beider Kohorten eine eingeschränkte Relaxation auf, die auf eine gestörte Interaktion von NO und der löslichen Guanylatcyclase der GMZ hinweisen könnte.

# II Abstract

Anemia is frequently observed in patients with acute and chronic coronary syndromes. It is well known that anemia leads to poor prognosis in cases of acute myocardial infarction (AMI). In animal models, hemorrhagic anemia has been shown to induce the formation of dysfunctional red blood cells (RBCs). However, it remains unclear whether the complications related to anemia are restricted to RBC dysfunction or are also associated with systemic alterations of endothelial function. Altered endothelium-dependent nitric oxide (NO)-synthesis and associated decreased NO bioavailability are hallmarks of endothelial dysfunction (ED) and might contribute to poor prognosis of AMI in patients with anemia. This thesis outlines anemia-associated ED with a focus on large arteries. Sub-acute and chronic blood loss anemia was induced in C57BL/6J male mice (WT-mice) through repetitive blood withdrawal. Endothelial function was assessed in the thoracic aorta using tissue organ bath, which demonstrated that aortic rings from both sub-acute and chronic anemic mice showed reduced NO-dependent relaxation compared to non-anemic mice (Sham-mice). In addition, assessment of endothelial function in the aorta of anemic global endothelial nitric oxide-synthase knockout mice (eNOS-KO) demonstrated an enhanced smooth muscle sensitivity to exogenous NO compared to sham eNOS-KO mice. Neither the genetic deletion of endothelial arginase I nor the pharmacological inhibition of arginase I and II improved the endothelial function in anemic mice. The aortic rings from chronic anemic mice supplemented with the antioxidant N-Acetylcysteine showed improved endothelial-dependent relaxation responses. In summary, these results imply that both sub-acute and chronic anemia are associated with ED. Enhanced activity of arginases does not appear to be involved in the pathomechanism of ED. Increased production of reactive oxygen species in the aorta might contribute to ED in anemia. The second part of the thesis is aimed to establish a protocol to study the interaction between RBCs and the endothelium. Aortic rings from WT-mice were incubated with human RBCs. Following the incubation, endothelial function was assessed using an organ bath system. Various incubation conditions were evaluated, resulting in a final protocol. Based on the refined conditions, aortic rings were incubated with RBCs collected from both subjects with AMI and age-matched, healthy subjects. After incubation the aortic rings in both groups exhibited impaired relaxation, potentially by affecting the signaling pathway of NO and soluble guanylatecyclase.

# III Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzung | Bedeutung |
|---|---|
| α1-Rezeptor | Adrenerger Rezeptor Typ 1 |
| AA | Akut anämische Mäuse |
| ACh | Acetylcholin |
| ACS | Akutes Koronarsyndrom |
| ADMA | Asymmetrisches Dimethylarginin |
| Akt | Proteinkinase B |
| AMI | Akuter Myokardinfarkt |
| Arg I | Arginase I |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| $BH_4$ | Tetrahydrobiopterin |
| bspw. | beispielsweise |
| bzw. | beziehungsweise |
| c | Konzentration |
| $Ca^{2+}$ | Kalziumion |
| CA | Chronisch anämische Mäuse |
| $CaCl_2$ | Kalziumchlorid |
| cAMP | Zyklisches Adenosinmonophosphat |
| cGMP | Zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CLD | Chemilumineszenz-Detektoren |
| COX | Cyclooxygenase |
| DDAH | Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase |
| DMT2 | Diabetes mellitus Typ 2 |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DWK | Dosis-Wirkungs-Kurve |
| EC50 | Mittlere effektive Konzentration |
| ED | Endotheliale Dysfunktion |
| EDHF | Endothelialer hyperpolarisierender Faktor |
| EDR | Endothelium dependent relaxation |
| EDRF | Endothelialer relaxierender Faktor |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EIR | Endothelium independent relaxation |
| eNOS | Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| $Fe^{2+}$ | Zweiwertiges Eisenion |
| $Fe^{3+}$ | Dreiwertiges Eisenion |
| FMN | Flavin Mononucleotid |
| g | Gramm |
| GMZ | Glatte Muskelzellen |
| GPCR | G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| GSH | Glutathion |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| Hb | Hämoglobin |
| HWZ | Hallertszeit |
| $H_2O_2$ | Wasserstoffperoxid |
| ICD 10 | International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems |

| | |
|---|---|
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| IP3 | Inositol 1,4,5-Triphosphat |
| IRAG | IP3R-assoziierte cGMP Kinase Substrat |
| KCl | Kaliumchlorid |
| $KH_2PO_4$ | Kaliumhydrogenphosphat |
| KH-Puffer | Krebs-Henseleit-Puffer |
| KO | Knockout-Tiere |
| KVE | Kardiovaskuläre Erkrankungen |
| L-NAME | N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid |
| mAChR | Muskarinerger Acetylcholinrezeptor |
| $MgSO_4$ | Magnesiumsulfat |
| MI | Myokardinfarkt |
| ml | Milliliter |
| MLC | Myosin-leichte-Kette |
| MLCK | Myosin-leichte-Ketten-Kinase |
| MLCP | Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase |
| mN | Millinewton |
| MP | Mikropartikel |
| NAC | N-Acetylcystein |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| $NaHCO_3$ | Natriumhydrogencarbonat |
| $Na_2HPO_4$ | Dinatriumhydrogenphosphat |
| nNOS | Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| $NO_3^-$ | Nitrat |
| nor-NOHA | N-Hydroxy-nor-Arginin |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NSAID | Nichtsteroidales Antiphlogistikum |
| 4-OHT | 4-Hydroxy-Tamoxifen |
| $O_2^-$ | Superoxid-Anion |
| p | p-Wert |
| pEC50 | negativ dekadischer Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration |
| $PGI_2$ | Prostacyclin |
| PKG | Proteinkinase G |
| Phe | Phenylephrin |
| RBK | Rote Blutkörperchen/Erythrozyten |
| RG | Rotationsgeschwindigkeit |
| RW | Referenzwert |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| rpm | Rotationen pro Minute |
| SEM | Standardfehler |
| sGC | Lösliche Guanylatcyclase |
| SNP | Natrium-Nitroprussid |
| SR | Sarkoplasmatisches Retikulum |
| STEMI | ST-Hebungs-Myokardinfarkt |
| SZA | Sichelzellanämie |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |

| | |
|---|---|
| XOR | Xanthinoxidoreduktase |
| ZETT | Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben |
| $Zn^{2+}$ | Zinkion |

# INHALTSVERZEICHNIS


**1 EINLEITUNG 1**

**1.1 Einführung 1**

**1.2 Endothel 1**

**1.3 Regulation der vaskulären glatten Muskelzellen 2**

**1.4 NO-Funktion im kardiovaskulären System 5**

**1.5 Stickstoffmonoxid-Synthase 6**

**1.6 Endotheliale Dysfunktion 9**

**1.7 Erythrozyten 11**

**1.8 Anämie 12**

**1.9 Dysfunktionale Erythrozyten 13**

**1.10 Fragestellung 14**

**2 MATERIAL UND METHODEN 15**

**2.1 Versuchstiere 15**

**2.2 Pharmaka 15**

2.2.1 Allgemein 15

2.2.2 Acetylcholin 15

2.2.3 Phenylephrin 16

2.2.4 Nitroprussidnatrium 17

2.2.5 Indometacin 18

**2.3 Vorbereitung der verschiedenen Mauslinien 19**

2.3.1 Deletion der endothelialen Arginase 19

2.3.2 Anämieinduktion 20

2.3.3 N-Acetylcystein-Behandlung 21

**2.4 Messung der Gefäßfunktion 22**
2.4.1 Versuchsaufbau 22
2.4.2 Krebs-Henseleit-Puffer 24
2.4.3 Präparation der thorakalen Aorta 26
2.4.4 Versuchsprotokoll 27
2.4.5 Einfluss des Arginaseinhibitors 28

**2.5 Etablierung eines neuen Protokolls 30**
2.5.1 Konstante Bedingungen 30
2.5.2 Variable Bedingungen 31

**2.6 Auswertung und Statistik 35**

**3 ERGEBNISSE 37**

**3.1 Ergebnisse der verschiedenen Mauslinien 37**
3.1.1 Allgemein 37
3.1.2 Einfluss der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen 37
3.1.3 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen 39
3.1.4 Einfluss von N-Acetylcystein auf die Gefäßfunktion chronisch anämischer Wildtyp-Mäuse 41
3.1.5 Einfluss des N-Acetylcysteins auf die Gefäßfunktion in Sham-Wildtypmäusen 43
3.1.6 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion in globalen eNOS-KO-Mäusen 45
3.1.7 Einfluss der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion nach Deletion der endothelialen Arginase I 46
3.1.8 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion nach Deletion der endothelialen Arginase I 48
3.1.9 Einfluss des Arginaseinhibitors nor-NOHA auf die Gefäßfunktion im akuten Anämiemodell 50

**3.2 Inkubationsexperimente im Rahmen der Protokolletablierung 51**
3.2.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktion 51

3.2.2 Einfluss einer zweistündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion 53
3.2.3 Einfluss einer sechsstündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion 55
3.2.4 Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf die Gefäßfunktion 56
3.2.5 Einfluss des Lösungsmittels auf die Gefäßfunktion 58
3.2.6 Einfluss einer 16-stündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion 59

**3.3 Validierung der finalen Inkubationsbedingungen 60**
3.3.1 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von jungen, gesunden Probanden 61
3.3.2 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von alten, gesunden Probanden 63
3.3.3 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von Probanden mit STEMI 65

**4 DISKUSSION 67**

**4.1 Methodik 67**

**4.2 Auswirkungen der Anämie auf die Versuchstiere 68**
4.2.1 Auswirkung der Anämie auf die Gefäßfunktionen in Wildtypen 68
4.2.2 Effekt der NAC-Behandlung auf die Gefäßfunktion im chronischen Anämiemodell 70
4.2.3 Auswirkung der Anämie auf die Gefäßfunktion der eNOS-KO-Mäuse 72
4.2.4 Einfluss der Arginasedeletion auf die Endothelfunktion in anämischen Mäusen 72

**4.3 Auswertung der Inkubationsexperimente 74**
4.3.1 Hintergrund der Inkubationsexperimente 74
4.3.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktion 75
4.3.3 Überlegungen zur Optimierung des Protokolls 77
4.3.4 Überprüfung der 16-stündigen Inkubationszeit 78
4.3.5 Validierung der finalen Inkubationsbedingungen 78

**4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 81**

**4.5 Limitation der Arbeit 84**

**LITERATUR** **85**

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS** **93**

**TABELLENVERZEICHNIS** **95**

**MATERIALLISTE** **96**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

In der westlichen Welt zählt der akute Myokardinfarkt (AMI) zu den häufigsten Todesursachen [1]. Allein in Europa versterben jährlich nahezu zwei Millionen Menschen an den Folgen des akuten Koronarsyndroms [1]. Ein bedeutsamer prognostischer sowie therapeutischer Marker ist der Hämoglobingehalt des Blutes [2, 3]. Ein verminderter Hämoglobingehalt wird als Anämie bezeichnet und kann bei bis zu 31 % der Patienten mit AMI nachgewiesen werden [2]. Das Vorliegen einer Anämie bei AMI ist mit einer höheren Mortalität und Morbidität assoziiert [2-4]. Obwohl durch Bluttransfusionen eine Korrektur des Hämoglobingehaltes möglich ist, wird der Krankheitsverlauf dadurch nur unzureichend beeinflusst [5]. Aus welchen Gründen die Anämie trotz Transfusion zu einer erhöhten Mortalität beiträgt, ist indes nicht abschließend geklärt [6]. Für die Entwicklung zukünftiger Therapieansätze muss der Pathomechanismus der Anämie folglich weiter exploriert werden. Einige Autoren vertreten die Auffassung, dass die Anämie durch eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion zu einer erhöhten Mortalität beiträgt [7-9]. Aus diesem Grund wird im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Auswirkung der Anämie auf das Gefäßsystem untersucht. Darüber hinaus wird beleuchtet, welche Rolle die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, die endotheliale Arginase und der oxidative Stress im Pathomechanismus der Anämie spielen.

## 1.2 Endothel

Die Gefäßwand aller Gefäße weist einen dreischichtigen Aufbau auf [10]. Eine Ausnahme bilden an der Mikrozirkulation beteiligte Gefäße. Zum Lumen hin liegt das einschichtige Endothel, das aufgrund seiner Lage als *tunica intima* bezeichnet wird, die wiederum von der *tunica media* umgeben ist, die sich aus glatten Muskelzellen (GMZ), Elastin und Kollagen zusammensetzt. Die äußere Schicht der Gefäßwand enthält Nerven sowie Lymph- und Blutgefäße, die für die Innervation und metabolische Versorgung der Gefäße verantwortlich sind [10]. Diese bindegewebige Schicht wird als *tunica externa* bezeichnet [10] Das Endothel als innere Schicht bildet die Abgrenzung des Gefäßes zum Blut und ist für die vaskuläre Homöostase

verantwortlich. Über die Sekretion vasoaktiver Stoffe ist das Endothel zudem an der Blutdruckregulation beteiligt [11]. Über die Freisetzung von Thromboxan A2 und Endothelin vermittelt das Endothel eine Vasokonstriktion [12, 13]. Bereits seit dem Jahr 1980 ist bekannt, dass das Endothel in Abhängigkeit von Acetylcholin (ACh) eine Vasodilatation bewirkt [14]. Der in diesem Zusammenhang vom Endothel sezernierte *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) wurde in den darauffolgenden Jahren als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert [15, 16]. Neben NO sezerniert das Endothel weitere vasoaktive Substanzen, die eine Vasodilatation bewirken. Zu diesen Substanzen zählen Prostazyklin ($PGI_2$), dessen Vorstufe durch die Cyclooxygenase (COX) synthetisiert wird, sowie zahlreiche Substanzen, die von einigen Autoren unter dem Begriff *Endothelial-derived hyperpolarizing factor* subsumiert werden [17-19]. Diese vasodilatatorischen Mediatoren werden unter anderem als Antwort auf den durch den Blutfluss induzierten Scherstress freigesetzt [20]. Neben dem Blutdruck moduliert das Endothel außerdem inflammatorische Prozesse, die Angiogenese und die Koagulation des Blutes [21].

## 1.3 Regulation der vaskulären glatten Muskelzellen

Da in dieser Arbeit die Endothelfunktion im Fokus steht, wird im Folgenden ein Überblick über die vaskuläre Muskelzellregulation gegeben, der für das weitere Verständnis erforderlich ist. Die Ausführungen basieren überwiegend auf allgemein akzeptierten Lehrmeinungen und sind schematisch in Abb. 1 dargestellt [22]. Die durch das Endothel freigesetzten Substanzen regulieren durch Relaxation oder Konstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen den Gefäßdurchmesser und infolgedessen den Vasotonus. Die Kontraktion der GMZ basiert auf der Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin. Auf molekularer Ebene wird der Prozess der Wechselwirkung als Querbrückenzyklus bezeichnet. Ob der Querbrückenzyklus abläuft, ist von der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration innerhalb der Muskelzellen abhängig. Bei einer erhöhten Kalziumkonzentration ($> 10^{-7}$ M) bilden vier Kalziumionen ($Ca^{2+}$) mit dem Protein Calmodulin einen Komplex. Durch diesen wird ein Enzym aktiviert, das als Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) bezeichnet wird. Im aktivierten Zustand phosphoryliert dieses die regulatorische leichte Kette des Myosins (MLC), was die Voraussetzung für das Ablaufen des Querbrückenzyklus und der damit verbundenen Kontraktion der GMZ bildet. Dementsprechend bewirkt eine Dephosphorylierung der

MLC durch die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) eine verminderte Kontraktion. Die Kalziumkonzentration wird durch zwei Mechanismen beeinflusst. Bei der elektromechanischen Kopplung öffnen sich im Verlauf der Depolarisation spannungsabhängige $Ca^{2+}$-Kanäle. Im Zuge dessen gelangt $Ca^{2+}$ aus dem Extrazellularraum sowie dem sakroplasmatischem Retikulum (SR) in das Zytosol der Zelle. Die Freisetzung des $Ca^{2+}$ aus dem SR kann ebenfalls durch pharmakologisch aktive Substanzen beeinflusst werden. Pharmaka, die an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) der Gruppe Gq binden, bewirken über Stimulation der Phospholipase C einen Anstieg des Inositol-1,4,5-Trisphosphats (IP3). Das IP3 aktiviert den IP3-Rezeptor des SR und verursacht dadurch eine erhöhte Kalziumfreisetzung aus dem SR. Dies wird als pharmakomechanische Kopplung bezeichnet. Neben einer erhöhten Kalziumkonzentration kann die Modulation der Kalziumsensitivität auch einen Einfluss auf die Kontraktion haben. Eine Zunahme der Kalziumsensitivität führt bei gleichbleibenden Kalziumkonzentrationen zu einer gesteigerten Kontraktion und basiert auf einer Inhibition der MLCP durch *Second Messenger*.

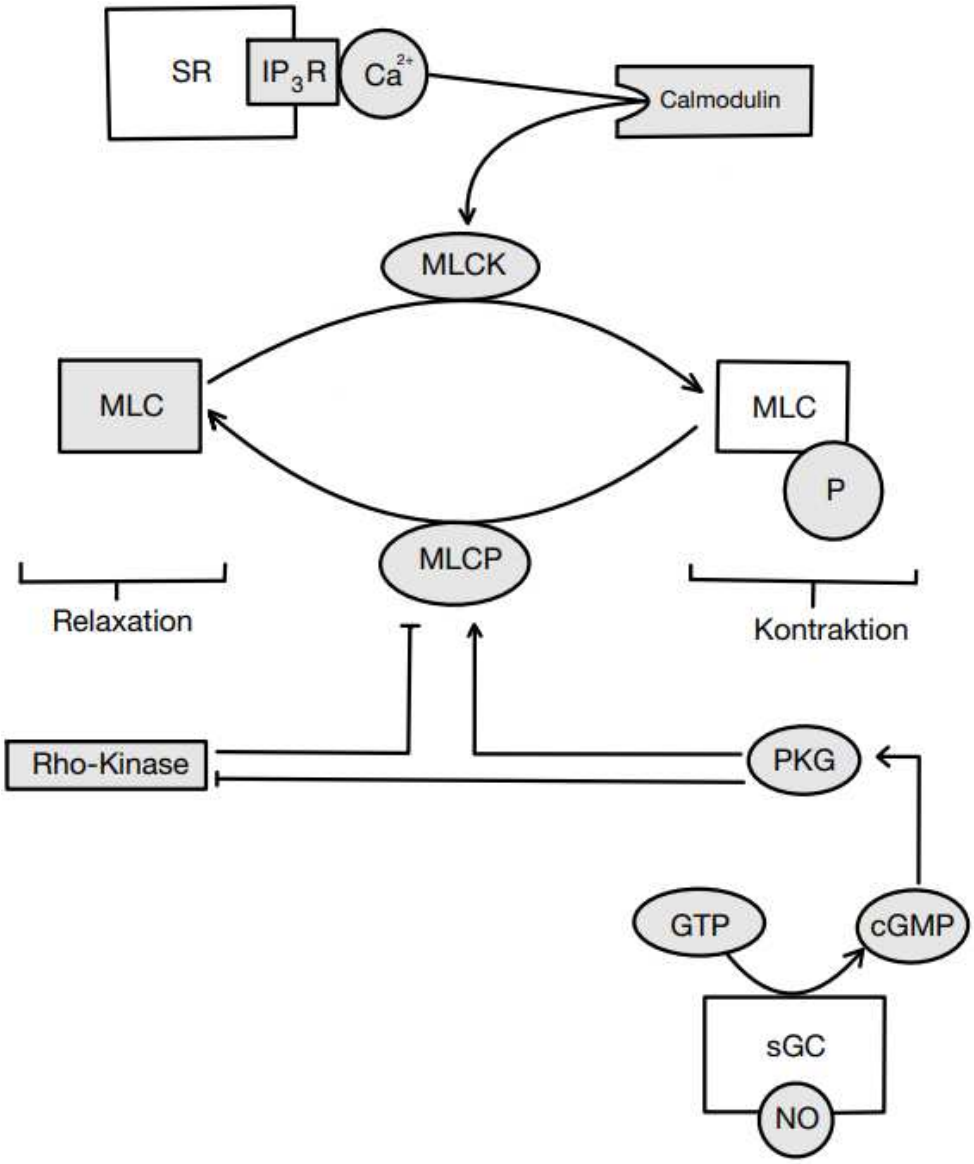



**Abb. 1: Regulation der glatten Muskelzellen modifiziert nach Kraft et al. [22]**
Kalziumionen ($Ca^{2+}$) strömen bei Stimulation des Inositol-Triphosphat-Rezeptors ($IP_3R$) aus dem sakroplasmatischem Retikulum (SR) in das Zytoplasma. Die $Ca^{2+}$ bilden mit Calmodulin einen Komplex, der die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) stimuliert. Die aktivierte MLCK resultiert über Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten (MLC) in einer Kontraktion. Dieser Prozess wird als kalziumabhängige Kontraktion bezeichnet. Ferner existiert eine kalziumunabhängige Regulation der glatten Muskelzellen (GMZ). Außerdem wird der Einfluss des Stickstoffmonoxids (NO) auf die Kalziumsensitivität dargestellt. Das NO bedingt über die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) einen Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP). Über die indirekte Inhibition der Rho-Kinase und Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) stimuliert cGMP die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) [23-25]. Im Zuge der gesteigerten Dephosphorylierung der MLC nimmt die Kalziumsensitivität ab und die GMZ relaxieren. Die NO-vermittelte Abnahme der Kalziumkonzentration ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt [26]. Inhibierende Beziehungen sind durch Querstriche und stimulierende Effekte durch Pfeile symbolisiert.

## 1.4 NO-Funktion im kardiovaskulären System

Im kardiovaskulären System wird NO im Endothel hauptsächlich durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aus L-Arginin hergestellt (siehe Kapitel 1.5 Stickstoffmonoxid-Synthase). Das Endothel dient demnach als Hauptlieferant von NO sowie dessen zirkulierenden und vaskulären Metaboliten [11]. Bereits vor 30 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass durch das vom Endothel produzierte NO eine Aktivierung der Thrombozyten verhindert wird [27, 28]. An dieser Stelle gilt es jedoch anzumerken, dass die antiaggregatorische Wirkung des Endothels nicht ausschließlich auf NO zurückzuführen ist. Auch $PGI_2$, das ebenfalls vom Endothel synthetisiert wird, inhibiert die Plättchenaktivierung [17, 29]. Des Weiteren inhibiert NO die Adhäsion der Leukozyten am Endothel und vermittelt über diesen Mechanismus einen antiinflammatorischen Effekt [30]. Dieser wird auch daran ersichtlich, dass NO zu einer Inhibition der NADPH-Oxidase in Immunzellen beiträgt, die im aktiven Zustand die Synthese von Superoxidanionen katalysiert [31, 32].

Zu den zentralen Wirkungen des NO zählt die Vasorelaxation (siehe Abb. 1). NO führt über eine Bindung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zu einer gesteigerten Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) [33-35]. Das cGMP fungiert als *Second Messenger* und stimuliert eine cGMP-abhängige Proteinkinase, die auch als Proteinkinase G bezeichnet wird (PKG) [36]. In PKG-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieser Vorgang essenziell für die NO-vermittelte Vasorelaxation ist [36, 37]. Die PKG bindet und phosphoryliert die myosinbindende Domäne der MCLP [38]. Die Phosphorylierung bzw. die Aktivierung der MCLP bewirkt über die Dephosphorylierung der MLC eine Abnahme der Kalziumsensitivität [23, 38]. Des Weiteren inhibiert die PKG I die Aktivität der Rho-Kinase [24]. Da diese die MLCP im aktiven Zustand inaktiviert, kommt es über diesen Signalweg ebenfalls zu einer verminderten Kalziumsensitivität [25]. Zusätzlich phosphoryliert PKG das Protein IP3R-assoziierte-cGMP-Kinase-Substrat (IRAG). Im phosphorylierten Zustand inhibiert IRAG die IP3-vermittelte Kalziumfreisetzung aus dem SR [26, 39]. Über die verminderte Kalziumsensitivität und -konzentration resultiert der NO-vermittelte Anstieg des cGMP in einer Vasorelaxation. Ferner bedingt NO über eine cGMP-abhängige Inhibition der Phosphodiesterasen 3 eine Akkumulation des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) [40]. Das cAMP vermittelt als *Second Messenger* eine Dilatation der Gefäße. Neben einer Vasodilatation reduziert NO die Synthese der Desoxyribonukleinsäure (DNA) in GMZ [41]. Da die Proliferation der

GMZ als ein Kennzeichen der Atherosklerose gilt, ist der inhibierende Effekt des NO auf die DNA-Synthese und demzufolge auch auf die Proliferation ein weiterer protektiver Effekt des NO [41, 42].

## 1.5 Stickstoffmonoxid-Synthase

Der Großteil des zirkulierenden NO wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert. Insgesamt existieren drei Isoformen der NOS. Die erste Isoform wird, da sie zuerst im Cerebellum nachgewiesen werden konnte, als neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) bezeichnet [43]. Die zweite Isoform ist die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die unter inflammatorischen Bedingungen von Immunzellen exprimiert wird [44]. Die dritte Isoform wird als endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) bezeichnet. Der Aufbau und die Funktionsweise der eNOS sind in Abb. 2 dargestellt.

Die eNOS ist ein Homodimer. Die Dimer-Struktur wird durch ein Zinkion ($Zn^{2+}$) stabilisiert, das mit vier Cysteinresten, d. h. zwei Cysteinresten je Monomer, einen tetrahydrischen Komplex bildet [45]. Das $Zn^{2+}$ trägt zur Stabilisierung bei, besitzt jedoch keine katalytische Funktion. Dies wird daran ersichtlich, dass die NOS nach Depletion des $Zn^{2+}$ weiterhin enzymatisch aktiv bleibt [46]. Die Monomere besitzen am C-Terminus des Proteins eine Reduktase-Aktivität. Am C-Terminus wird die reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphats (NADPH), Flavinmono-nukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), gebunden. Der N-Terminus des Proteins besitzt eine Oxidase-Aktivität und bindet den Cofaktor Tetrahydrobiopterin ($BH_4$) sowie die Substrate L-Arginin und molekularen Sauerstoff ($O_2$). Außerdem trägt der N-Terminus die eisenhaltige Häm-Gruppe [47]. Die Reduktase-Domäne überträgt das Elektron des NADPH über die integralen Flavoproteine FAD und FMN auf die Häm-Gruppe des gegenüberliegenden Monomers. Die Reduktion des dreiwertigen Eisenkations ermöglicht die Bindung von $O_2$. In einem weiteren Schritt wird ein zweites Elektron, das entweder vom $BH_4$ oder von der Reduktase-Domäne abgegeben wird, auf den Sauerstoff-Eisen-Komplex übertragen. Der dadurch aktivierte Sauerstoff ($O_2^-$) reagiert mit L-Arginin zum Zwischenprodukt Nώ-Hydroxy-L-Arginin. Im zweiten Schritt entsteht unter Abspaltung des L-Citrullins das NO [48].

Die Aktivität der eNOS wird über die Kalziumkonzentration modifiziert [49]. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt über Aktivierung des Calmodulins zu einem erleichterten Elektronenfluss innerhalb der Reduktase-Domäne [50], wodurch die NO-Synthese gefördert wird. Zusätzlich wird die Aktivität des Enzyms über den Phosphorylierungsgrad moduliert. Die Phosphorylierung des Serin 1177 geht mit einer gesteigerten NO-Synthese einher und kann als Endpunkt mehrerer Signalkaskaden betrachtet werden [51]. Scherstress verursacht über eine Stimulation der Proteinkinase B eine vermehrte Phosphorylierung an Serin 1177 [52]. Neben der Proteinkinase B sind noch andere Kinasen an der Phosphorylierung beteiligt [53]. Im Gegensatz zur Phosphorylierung an Serin 1177 führt eine Phosphorylierung an Threonin 495 zu einer verminderten Enzymaktivität [51]. Dies beruht darauf, dass eine Phosphorylierung am Threonin die Bindung des Calmodulins an der eNOS inhibiert [54]. Die physiologische Bedeutung der eNOS zeigt sich daran, dass sie für ca. 70 % des zirkulierenden NO-Pools verantwortlich ist [55]. Die Deletion der eNOS hat neben der Depletion des NO-Pools die Ausbildung einer arteriellen Hypertonie zur Folge [11, 56].

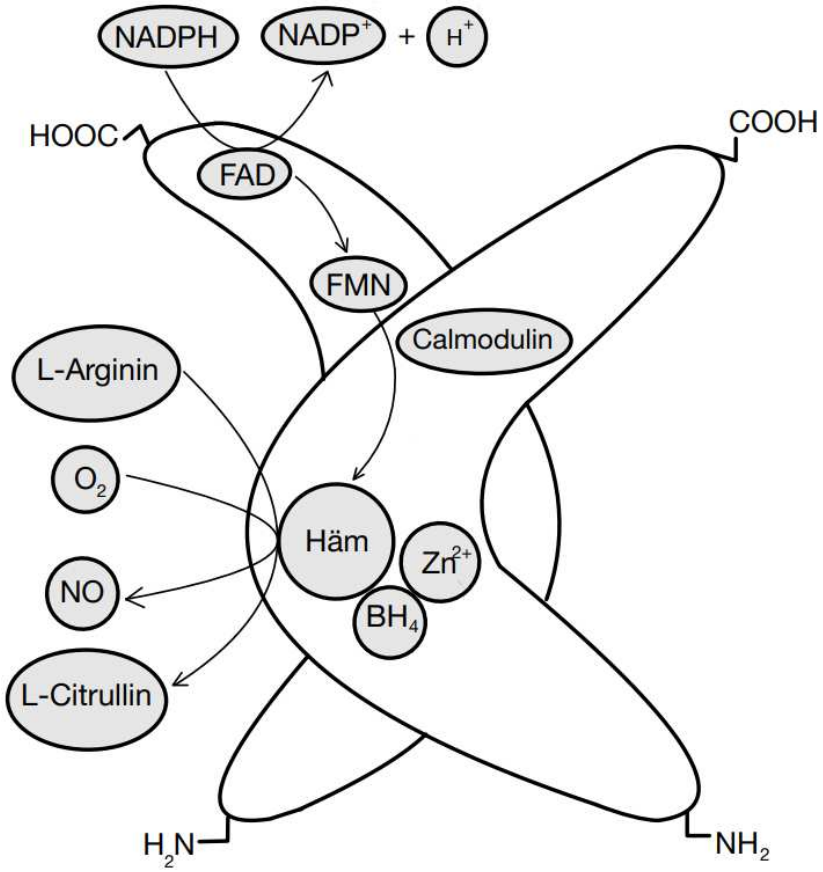



**Abb. 2: Aufbau und Funktionsweise der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) modifiziert nach Förstermann et al. [57]**
Am C-Terminus wird Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NAPDH) oxidiert, wodurch das integrale Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) reduziert wird. Der darauffolgende intermolekulare Elektronenfluss, der durch Calmodulin erleichtert wird, ist durch Pfeile visualisiert. Diesbezüglich gilt es zu beachten, dass das Elektron von Flavinmononukleotid (FMN) einer Untereinheit (UE) auf die Häm-Gruppe der benachbarten UE übertragen wird. Die Reduktion des Eisens ermöglicht die Bindung des Sauerstoffs ($O_2$). Das zweite Elektron für die Ausbildung des Superoxidanions ($O_2^-$) entstammt entweder der Oxidation eines zweiten NADPH oder des Cofaktors Tetrahydrobiopterin ($BH_4$). Die Oxidation des $BH_4$ zu Trihydrobiopterin-Radikal ist in Abb. 2 nicht aufgeführt. Über ein Zwischenprodukt reagiert dieses Molekül mit L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin.

## 1.6 Endotheliale Dysfunktion

Zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert [58]. Unter oxidativem Stress wird ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der Oxidantien verstanden [59]. Der Überschuss der Oxidantien führt über Veränderungen der Redox-Signalwege zu Störungen der Proteinfunktion, Genmutation und Zellalterung [59]. Ein Effekt des erhöhten oxidativen Stresses ist die verminderte Bioverfügbarkeit des NO in kardiovaskulären Erkrankungen [58, 60], die als endotheliale Dysfunktion (ED) bezeichnet wird [60]. Sie beruht auf der verminderten Synthese von NO und der beschleunigten Degradation des gebildeten NO. Die ED wird unter anderem durch eine Entkopplung der eNOS vermittelt [48]. In diesem Zustand synthetisiert die eNOS nicht länger NO, sondern Superoxidanionen ($O_2^-$) [48, 61, 62]. Neben der Entkopplung der eNOS verursacht eine vermehrte Stimulation der NADPH-Oxidase und der Xanthinoxidoreduktase (XOR) einen Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [61-63]. Die Superoxidanionen reagieren mit dem NO zu Peroxinitrit [64], wodurch die Bioverfügbarkeit des NO weiter herabgesetzt wird [65, 66]. Gleichzeitig bedingt die Bildung des Peroxinitrits eine Depletion des $BH_4$ [64]. Da $BH_4$ ein essenzieller Cofaktor der eNOS ist, führt die Depletion des BH4 zu einer zunehmenden Entkopplung der eNOS [62, 64]. Des Weiteren bedingen ROS wie Peroxinitrit und Wasserstoffperoxid ($H_2O_2$) eine Stimulation des Rho-A- bzw. Rho-Kinase-Signalwegs [67, 68]. Daraus resultieren eine gesteigerte Aktivität und Expression der Arginase I [67, 68]. Durch die gesteigerte Aktivität der Arginase wird die Reduktion der NO-Synthese über die Entkopplung der eNOS begünstigt [67-69]. Diese Abnahme der NO-Freisetzung beruht darauf, dass beide Enzyme um das Substrat L-Arginin konkurrieren. Der Einfluss der vermehrten Arginaseaktivität auf die eNOS erscheint widersprüchlich und wird daher auch als Arginin-Paradoxon bezeichnet [69]. Die intrazelluläre Arginin-Konzentration liegt weit über der Sättigungskonzentration der eNOS [49, 70]. Außerdem ist das Endothel über den Abbau von Proteinen und das Recyceln von Citrullin in der Lage, neues Arginin zu generieren [71]. Obwohl die Konzentration des Arginins die Sättigungskonzentration der eNOS überschreitet und die Endothelzellen in der Lage sind, neues Arginin zu synthetisieren, geht eine Inhibition der Arginase in Gefäßen mit einer verbesserten Endothel-vermittelten Vasodilatation einher [69, 72]. Dies spricht dafür, dass Arginase und eNOS trotz ausreichender Substratverfügbarkeit um Arginin konkurrieren. Neben den bereits genannten Mechanismen kann der endogene eNOS-

Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion begünstigen [73, 74]. Es gibt Hinweise darauf, dass oxidativer Stress mit einer verminderten Aktivität der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) assoziiert ist [73]. Da die DDAH den enzymatischen Abbau der ADMA katalysiert, kommt es infolge der verminderten Enzymaktivität zu einer Akkumulation des ADMA [73]. Ferner bedingt oxidativer Stress über einen Anstieg der N-Methyltransferase, die die Synthese des ADMA katalysiert, eine zunehmende Anreicherung des endogenen eNOS-Inhibitors [74], was darauf hindeutet, dass oxidativer Stress über eine vermehrte Synthese sowie eine verminderte Degradation zu einem Anstieg des ADMA-Levels führt [73, 74].

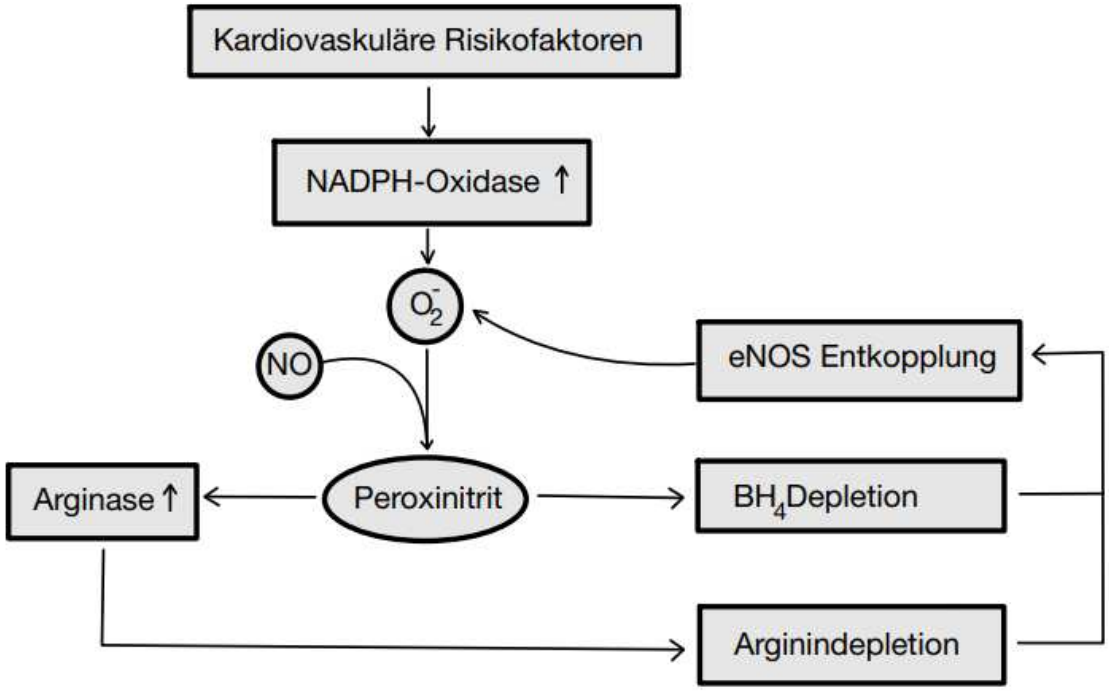



**Abb. 3: ROS-induzierte endotheliale Dysfunktion modifiziert nach Li et al. [60]**
Die NADPH-Oxidase und die entkoppelte endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) sind bedeutsame Quellen des Superoxidanions ($O_2^-$) [48, 60-62]. Dieses reagiert mit NO zu Peroxinitrit und führt zu einer Depletion des Tetrahydrobiopterins ($BH_4$) und des Arginins [64, 67, 68]. Im Zuge des (Co-)Substratmangels wird die Entkopplung der eNOS verstärkt [48, 51, 52]. Dies bedeutet, dass die Entstehung des Peroxinitrits den oxidativen Stress weiter erhöht und gleichzeitig die Bioverfügbarkeit des Stickstoffmonoxids vermindert [60].

## 1.7 Erythrozyten

Die roten Blutkörperchen (RBK) stellen die überwiegende Zellpopulation innerhalb des Blutes dar [75] und bestehen zum größten Teil aus Hämoglobin (Hb), das in erster Linie den lebensnotwendigen Atemgastransport ermöglicht [76]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass sowohl Hb als auch RBK neben dem Gasaustausch weitere Funktionen erfüllen. Die RBK sind bspw. in den NO-Metabolismus involviert und exprimieren eine katalytisch aktive eNOS [77]. Die physiologische Relevanz der erythrozytären eNOS für den globalen NO-Metabolismus zeigt sich bei Mäusen, die eNOS im Endothel, aber nicht in den RBK exprimieren. Die Deletion der erythrozytären eNOS bedingt einen Abfall des Nitritspiegels, einen Anstieg des Blutdrucks und eine Maladaptation des linken Ventrikels nach einem Myokardinfarkt [11, 78]. Das Hb ist ebenfalls in den NO-Metabolismus involviert. Das NO reagiert mit dem oxygenierten Hb zu Nitrat ($NO_3^-$) und Methämoglobin [79]. Im Methämoglobin liegt das Eisen als dreiwertiges Kation vor und verliert seine Funktion als Sauerstofftransporter [79]. Das NO kann jedoch auch mit dem desoxygenierten Hb interagieren [80, 81]. In diesem Fall bindet NO, anstelle des Sauerstoffs, am Eisenion der prosthetischen Gruppe [80], wodurch der Komplex Eisennitrosylhämoglobin entsteht [80, 81]. Die beiden erwähnten Mechanismen beschreiben die verminderte NO-Bioverfügbarkeit durch Hb und werden im Folgenden unter dem Begriff *NO-Absorption* subsumiert. Die Membran der RBK, der Flüssigkeitssaum um die RBK sowie die zellfreie Schicht zwischen RBK und Endothel gelten unter physiologischen Bedingungen als limitierende Faktoren der NO-Absorption [82-84]. Aus diesen Gründen reagiert NO um den Faktor 650–1000 langsamer mit einem intrazellulär gebundenen als mit einem extrazellulären Hb [82, 84].

Unter hypoxischen Bedingungen können RBK eine Vasodilatation vermitteln. Einige Arbeitsgruppen führen diese Relaxation auf die Funktion des S-Nitrosothiol-Hämoglobins als NO-Donor zurück [85, 86]. Im S-Nitrosothiol-Hämoglobin liegt NO gebunden am Cystein 93 der β-Untereinheit des Globins vor [85, 86]. Die physiologische Relevanz dieses Mechanismus wird gegenwärtig kontrovers diskutiert [87]. Andere Autoren favorisieren die Hypothese, dass Hb unter hypoxischen Bedingungen über die Reduktion von Nitrit eine NO-Freisetzung effiziert [77, 88-90]. Mithilfe von Chemilumineszenz-Detektoren (CLD) konnte gezeigt werden, dass Hb im desoxygenierten Zustand eine stärkere NO-Freisetzung bewirkt als im oxygenierten

[90]. Dies impliziert, dass Hb in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung eine Vasodilatation vermittelt und so als Sauerstoffsensor fungieren könnte.

Darüber hinaus wird ein dritter Mechanismus diskutiert, über den die RBK eine hypoxische Vasodilatation bewirken könnten. Hypoxische Bedingungen vermitteln über einen cAMP-Anstieg eine Sekretion von Adenosintriphosphat (ATP) aus den RBK [88, 91]. Das ATP wiederum stimuliert über eine Bindung an purinergen Rezeptoren des Endothels die eNOS [88].

## 1.8 Anämie

Eine verringerte Hämoglobinkonzentration im Blut wird als Anämie bezeichnet. Das Absinken des Hämoglobins ist häufig mit einer verminderten Anzahl an Erythrozyten assoziiert [92]. Der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zufolge gilt die Hämoglobinkonzentration als vermindert, wenn sie < 13,0 g/dl (< 8,06 mM) bei Männern bzw. < 12 g/dl (< 7,44 mM) bei nicht schwangeren Frauen liegt [93]. In diesem Kontext gilt es jedoch zu beachten, dass in neuen Studien für die Festlegung neuer Grenzwerte plädiert wird [94]. Obwohl es Studien gibt, in denen neue *Cut-off-Werte* empfohlen werden, orientiert sich das global anerkannte Klassifikationssystem, die *Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme* (ICD10), weiterhin an den von der WHO festgelegten Grenzwerten.

Die Anämie ist eine häufige Krankheit in einem höheren Lebensalter [95]. Meistens resultiert ein Substratmangel (Eisen, Vitamin B12, Tetrahydrofolat) oder das Vorliegen einer chronischen Erkrankung in der Entstehung einer Anämie [6, 95]. Bei 12–31 % der Patienten mit einem Myokardinfarkt (MI) tritt die Anämie als Komorbidität auf [2, 3]. Aufgrund der Tatsache, dass keine einheitlichen Grenzwerte im Hinblick auf die Anämie existieren, variiert die Prävalenz innerhalb der Studien und Populationen [2, 3]. Anhand der erhobenen Daten ist ersichtlich geworden, dass die Anämie mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität bei Patienten mit MI assoziiert ist [2-4]. Das negative klinische Outcome von Patienten mit Anämie ist unter anderem auf ein erhöhtes Blutungsrisiko zurückzuführen [2, 3]. Paradoxerweise wird durch eine vorliegende Anämie neben dem Blutungsrisiko auch die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse und Arrhythmien erhöht [3]. Obwohl bereits eine geringe Abnahme des Hämoglobinspiegels als Risikofaktor für ein negatives Outcome

bei einem akuten Koronarsyndrom (ACS) gilt, ist die Therapie der Anämie mittels Bluttransfusion nur eingeschränkt wirksam [6, 96]. In anderen Studien wurde herausgefunden, dass Patienten nur bei extrem niedrigen Hämoglobinspiegeln (Hb < 8 g/dl) von einer Bluttransfusion profitieren [5]. In einer anderen Studie wurde aufgezeigt, dass das Outcome bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) ab einem Hb-Wert von unter 12 g/dl durch eine Bluttransfusion positiv beeinflusst wird [96]. Derweil empfiehlt die Gesellschaft für Kardiologie-, Herz- und Kreislaufforschung e. V. ein nach Alter und Hämatokrit adaptiertes Vorgehen. Bei Patienten unter 65 Jahren wird bei einem infarktbedingten kardiogenen Schock ein Hb-Wert von 7–9 g/dl (bzw. Hkt > 25 %) angestrebt [97]. Sind Patienten älter als 65 Jahre, wird ein Hkt-Abfall auf unter < 30 % als Transfusionsindikation gewertet [97].

## 1.9 Dysfunktionale Erythrozyten

Da Bluttransfusionen bezüglich des klinischen Outcomes bei Patienten mit MI nur eine begrenzte Wirksamkeit aufweisen, wird vermutet, dass neben dem verminderten Hb-Gehalt weitere Faktoren für das negative Outcome bei anämischen Patienten verantwortlich sind [5]. Einer dieser Faktoren könnte eine durch eine Anämie induzierte Ausbildung dysfunktionaler RBK sein [98]. Im Tiermodell bewirkt ein repetitiver Blutverlust eine Entkopplung der erythrozytären eNOS [78, 98]. Der daraus resultierende Abfall der NO-Freisetzung führt im Zusammenhang mit der gesteigerten ROS-Synthese zu einem Verlust der kardioprotektiven Wirkung, der physiologisch von den RBK ausgeht [78, 80, 98]. Aufgrund des Verlustes des kardioprotektiven Effekts werden diese RBK als dysfunktionale RBK bezeichnet. In dieser Arbeit wird der Frage nachgegangen, ob die Funktion des Endothels durch den Verlust der kardioprotektiven Wirkung negativ beeinflusst wird, was einen Erklärungsansatz für die eingeschränkte Wirksamkeit der Bluttransfusionen darstellen könnte. Im Zusammenhang mit genetisch bedingten Störungen der Hämoglobinsynthese konnte bereits nachgewiesen werden, dass die RBK in den Pathomechanismus der ED involviert sind [7-9]. Die RBK von Patienten mit Sichelzellanämie (SZA) induzieren über die Freisetzung hämhaltiger Mikropartikeln (MP) einen Anstieg der ROS-Level [7]. Darüber hinaus wird vermutet, dass die MP eine TLR4-vermittelte Inflammation des Endothels bewirken [8]. Über diese Mechanismen tragen die MP der dysfunktionalen RBK zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion bei [7, 8]. Dass die Gefäßfunktion

durch erythrozytäre MP beeinträchtigt werden kann, zeigt sich auch in anderen Erkrankungen [99]. Die RBK von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) führen über die Freisetzung von Peroxinitrit zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion [100]. Die Wirkung des Peroxinitrits wird über eine Stimulation der Arginase in RBK und Endothel vermittelt [69, 100]. Des Weiteren bewirken die RBK von diabetischen Patienten über die Modulation des purinergen Signalweges die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion [101].

## 1.10 Fragestellung

In klinischen Studien konnte aufgezeigt werden, dass das Vorliegen einer Anämie mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate nach einem akuten MI assoziiert ist [2-4]. Als ein Mediator des negativen Outcomes werden dysfunktionale RBK, die bei einer Anämie nachgewiesen werden können, erachtet [78, 98]. Es ist noch nicht abschließend geklärt, wie sich die dysfunktionalen RBK auf die Endothelfunktion auswirken. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, den Einfluss der dysfunktionalen RBK auf die NO-Freisetzung des Endothels zu ermitteln.

Anhand der *ex vivo* analysierten Gefäßfunktion sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat die Induktion der Anämie einen messbaren Einfluss auf die Freisetzung des Stickstoffmonoxids durch die eNOS des Endothels? Werden die gemessenen Werte durch die Dauer der Anämie beeinflusst?
- Wird die Aktivität der eNOS durch die reaktiven Sauerstoffspezies, die im Zuge einer Anämie vermehrt gebildet werden, limitiert?
- Kommt es im Zuge der Anämie zu einer vermehrten Expression und Aktivität der endothelialen Arginase I? Moduliert die Deletion der Arginase I die Aktivität der eNOS in Mäusen mit einer Anämie?
- Ist die Ex-vivo-Inkubation muriner Gefäße mit humanen RBK möglich? Hat der Gesundheitszustand der Spender eine Auswirkung auf die Gefäßfunktion?

# 2 MATERIAL UND METHODEN

## 2.1 Versuchstiere

Die Tierversuchsgenehmigung wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen erteilt (Aktenzeichen: 81-02.04.2018.A234, 81-02.04.2020 A73 und 84-02.04.2015.A498). Die Kompetenz zur fachgerechten Tötung der Tiere mit anschließender Organentnahme wurde durch erfolgreichen Abschluss eines Kurses, der von der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich Heine Universität ausgerichtet wurde, erworben. Die Versuchstiere wurden nach gültigen Vorschriften in der ZETT der Heinrich-Heine-Universität gehalten.

Im Rahmen der Experimente wurden drei Mauslinien verwendet. Es handelte sich um Abkömmlinge der C57BL6/J-Wildtyp-Linie. Neben C57BL6/J-Wildtypmäusen (WT) wurden C57BL/6 (NOS3) TmPhänotyp -/- (eNOS-KO) und C57BL/6.Cg-Arg1tm1Pmu/J TgN(Cdh5/PAC)-CreERT2 (EC-ArgI-KO) genutzt. Die Tiere waren ausschließlich männlich und zu Beginn des Versuchsstarts elf bis zwölf Wochen alt.

## 2.2 Pharmaka

### 2.2.1 Allgemein

In diesem Abschnitt werden die Wirkungsweisen der verwendeten Pharmaka näher betrachtet und die Aufbereitung und Verwendung der jeweiligen Pharmaka erläutert. Die Produktnummer sowie die Hersteller sind in Tabelle 14 aufgelistet.

### 2.2.2 Acetylcholin

Acetylcholin (ACh) gilt als ein bedeutsamer Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem [102]. In ersterem wird er von Motoneuronen, allen präganglionären Neuronen des autonomen Nervensystems und postganglionären Neuronen des Parasympathikus als Transmitter genutzt. Im zentralen Nervensystem reguliert ACh den Schlaf-Wach-Rhythmus, Vigilanz sowie Lern- und Gedächtnisprozesse. Die vielfältige Wirkung des ACh ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass es viele verschiedene Rezeptoren für diesen Neurotransmitter gibt. Diesbezüglich wird zwischen nikotinischen und muskarinergen Rezeptoren

(mAChR) unterschieden. Bei ersteren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle. Da die Bindung des Liganden zu einem Einstrom von Kaliumkationen führt, werden Rezeptoren dieser Gruppe auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet [103], während die mAChR den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zugeordnet werden [102]. Insgesamt existieren fünf mAChR-Subtypen, die alle aus sieben Transmembrandomänen aufgebaut sind [102]. Die mAChR-Subtypen lassen sich in zwei funktionelle Gruppen aufteilen. Die muskarinergen Rezeptoren 1, 3 und 5 zählen zu den $G_q$-gekoppelten Rezeptoren, was bedeutet, dass die Bindung des ACh zu einer Aktivierung der Phospholipase β führt [102]. Bindet ACh hingegen an mAChR 2 oder 4, kommt es über die Aktivierung des $G_i$-Proteins zu einer Inhibition der Adenylatcyclase [102]. Am Endothel wirkt ACh über den $m_3$AChR und vermittelt die eNOS-abhängige Freisetzung des Stickstoffmonoxids [14, 104]. Da das Endothel bereits auf geringe Konzentrationen ACh reagiert, wird die ACh-induzierte Relaxation als Parameter für die Funktionalität des Endothels genutzt [14, 105].

Im Rahmen des Versuchsprotokolls wurden unter Verwendung einer Feinwaage 181,66 mg Ach-Chlorid abgewogen und in 10 ml Millipore-Wasser gelöst. Diese Stammlösung mit einer Konzentration von $10^{-1}$ M wurde gleichmäßig auf zehn Eppendorf Tubes aufgeteilt und bei -20 °C für maximal drei Monate gelagert. Die Stammlösung wurde genutzt, um für den jeweiligen Experimenttag eine Verdünnungsreihe von $10^{-2}$ M bis $10^{-6}$ M anzusetzen. Nach Beendigung des Versuchs wurde die gesamte Verdünnungsreihe inklusive der aufgetauten Stammlösung verworfen.

### 2.2.3 Phenylephrin

Phenylephrin (Phe) zählt zur Gruppe der Sympathomimetika. Dies bedeutet, dass Phe als unspezifischer Agonist am adrenergen 1-Rezeptor (α1-Rezeptor) wirkt [106]. Es gibt drei verschiedene Subtypen des α1-Rezeptors. Sie werden als $\alpha1_A$-, $\alpha1_B$- und $\alpha1_D$-Rezeptor bezeichnet [106] und finden sich auf den GMZ der Gefäße. Unter physiologischen Bedingungen werden die adrenergen Rezeptoren durch Noradrenalin, das aus den postganglionären Neuronen des Sympathikus freigesetzt wird, stimuliert [107]. Durch die Aktivierung der α1-Rezeptoren, die $G_{q/11}$-gekoppelt sind, wird die Stimulation der Phospholipase C bedingt [107]. Im aktivierten Zustand führt die Phospholipase C über die Bildung von $IP_3$ und Diacylglycerol zu einer

Erhöhung des intrazellulären $Ca^{2+}$ [107]. Darüber hinaus werden durch die Ligandenbindung die rezeptorgesteuerten $Ca^{2+}$-permeablen nichtselektiven Kationenkanäle (ROC) aktiviert [107]. Im Zuge des erhöhten intrazellulären $Ca^{2+}$ wird eine Vasokonstriktion initiiert und der Blutdruck steigt. Obwohl der vaskuläre Tonus maßgeblich durch α1-Rezeptoren moduliert wird, exprimieren die GMZ zusätzlich β-Rezeptoren [107].

Im Rahmen des Versuchsprotokolls wurden mithilfe einer Feinwaage 203,67 mg Phenylephrin-Hydrochlorid abgewogen und in 10 ml Millipore-Wasser gelöst. Diese Stammlösung mit einer Konzentration von $10^{-1}$ M wurde gleichmäßig auf zehn Eppendorf Tubes aufgeteilt und bei -20 °C für maximal drei Monate gelagert. Die Stammlösung wurde genutzt, um für den jeweiligen Experimenttag eine Verdünnungsreihe von $10^{-2}$ M bis $10^{-6}$ M anzusetzen. Nach Beendigung des Versuchs wurde die gesamte Verdünnungsreihe inklusive der aufgetauten Stammlösung verworfen.

### 2.2.4 Nitroprussidnatrium

Nitroprussidnatrium (SNP) gehört zur pharmakologischen Gruppe der Nitrovasodilatatoren. Innerhalb dieser Gruppe wird SNP den Metall-NO-Komplexen zugeordnet [108]. *In vivo* erfolgt die NO-Freisetzung sowohl enzymatisch als auch nichtenzymatisch [108]. Klinisch wird SNP aufgrund der kurzen Halbwertszeit (HWZ) und der Notwendigkeit einer intravenösen Applikation nur in Einzelfällen zur Regulierung des Blutdrucks genutzt [108]. Des Weiteren werden die zytotoxischen Moleküle Peroxinitrit und Cyanidionen bei der intravenösen Injektion des SNP frei [108]. Obwohl eine simultane Gabe von Natriumthiosulfat zur Entgiftung der Cyanidionen beiträgt, bleibt die infundierbare Dosis limitiert [109]. Im *Ex-vivo*-Experiment vermittelt SNP eine endothelunabhängige NO-Freisetzung [110]. Die dadurch initiierte Vasodilatation gibt Aufschluss über die NO-Sensitivität der glatten Gefäßmuskulatur [9].

Da SNP in Lösung photosensitiv ist, wurde die Stammlösung lichtgeschützt gelagert [108]. Zur Erstellung der Stammlösung wurden 297,95 mg SNP unter Verwendung einer Feinwaage abgewogen und in 10 ml Millipore-Wasser diluiert. Aus dieser Lösung ($10^{-1}$ M) wurde die Verdünnungsreihe (-$10^{-8}$ M) angesetzt.

### 2.2.5 Indometacin

Indometacin gilt als ein Vertreter der nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID). Dies bedeutet, dass Indometacin die Aktivität der Cyclooxygenase 1 und 2 (COX1/COX2) inhibiert [111]. Unter physiologischen Bedingungen katalysiert die COX die Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin G2 [111]. Das Prostaglandin G2 gilt als Vorläufermolekül sämtlicher Prostaglandinderivate. Zur heterogenen Gruppe der Prostaglandine gehört das Prostazyklin, das eine Vasodilatation bewirkt [18, 111]. Das Prostaglandin G2 ist jedoch auch Vorläufermolekül des Thromboxan A2, das über eine Vasokontraktion eine Abnahme der endothelabhängigen Relaxation bewirkt [13, 111].

Für das Experiment wurden 357,79 mg Indometacin mittels Feinwaage eingewogen und anschließend in 10 ml Ethanol gelöst. Die daraus resultierende Stammlösung mit einer Konzentration von $10^{-1}$ M wurde bei -20 °C gelagert. Insgesamt 100 µl dieser Stammlösung wurden genutzt, um mithilfe von 900 µl Ethanol eine Lösung von $10^{-2}$ M anzusetzen. Vor diesem Schritt musste die Stammlösung für mindestens zwei Minuten gevortext werden, da das Indometacin ein geringes Löslichkeitsprodukt aufweist.

## 2.3 Vorbereitung der verschiedenen Mauslinien

### 2.3.1 Deletion der endothelialen Arginase

Die endothelialen Arginase I-Knockout Mäuse (EC-ArgI–KO) wurden durch konditionelle Gen-Ausschaltung geschaffen, die auf der Verwendung eines Cre/LoxP-Rekombinationssystems basiert. Die gentechnisch manipulierten Mäuse exprimieren ein Fusionsprotein, das aus einer gentechnisch veränderten Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors und der Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 besteht [112]. Die Affinität zu Östrogen wird durch die Modulation der Ligandenbindungsdomäne des Östrogenrezeptors um den Faktor 1000 reduziert, wodurch eine endogene Aktivierung des Fusionsproteins verhindert wird [113]. Gleichzeitig bleibt die Affinität zu 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT), das in der Leber durch die Metabolisierung von Tamoxifen gebildet wird, erhalten [113]. Bis zur Bindung des 4-OHT ist das Fusionsprotein inaktiv, da es an einem inhibitorischen Komplex aus Polypeptiden gebunden ist. Durch die Bindung des Liganden löst sich das Fusionsprotein aus dem inhibitorischen Komplex [114]. Die Cre-Rekombinase des freien Fusionsproteins bindet an den LoxP-Sequenzen. Zwei LoxP-Sequenzen flankieren das Zielgen, das exzidiert wird. Durch die Bindung der Cre-Rekombinase an den LoxP-Sequenzen wird DNA, die zwischen den LoxP-Sequenzen liegt, aus dem Genom entfernt. Dieser Mechanismus ermöglicht in Abhängigkeit von Tamoxifen die Deletion der Arginase I [112].

Zur Erstellung der Tamoxifenlösung wurden 100 mg Tamoxifen in 2,5 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurden 17,5 ml Erdnussöl hinzugegeben. Die fertige Tamoxifen-Lösung wurde bis zur Injektion lichtgeschützt in 2 ml großen Eppendorf Safe-Lock Tubes bei -20 °C gelagert. Vor der Injektion wurden die Mäuse gewogen. Die Lösung wurde zudem auf 37 °C erwärmt. Den Mäusen wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen 200 µl der Tamoxifen-Lösung intraperitoneal injiziert, was einer Tagesdosis von 1 mg Tamoxifen entsprach. Da in fünf dieser Mäuse gleichzeitig eine chronische Anämie induziert wurde, wurde nach 21 Tagen erneut Tamoxifen injiziert. Ferner wurden die Tiere einmal pro Woche gewogen. In der Mauslinie C57BL/6 Cg-Arg1$^{tm1Pmu}$ /J TgN(Cdh5/PAC)-CreERT2 gab es neben den Mäusen, die das Fusionsprotein besaßen (Cre$^{+/+}$ bzw. EC-ArgI-KO), weitere Mäuse, die das Fusionsprotein nicht exprimierten (Cre$^{-/-}$-Mäuse), sodass die konditionelle Genausschaltung nicht bei allen

Mäusen dieser Mauslinie erfolgreich war. Dennoch wurden alle Mäuse mit Tamoxifen behandelt. Die $Cre^{-/-}$-Mäuse wurden als Kontrollen für die EC-ArgI-KO gewertet. Die Injektion des Tamoxifens, das wöchentliche Wiegen sowie die finale Tötung der Versuchstiere führte eine medizinisch-technische Assistentin durch.

### 2.3.2 Anämieinduktion

Die Induktion der akuten und chronischen Anämie erfolgte nach einem bereits etablierten Protokoll [98], wobei das Erreichen eines Hämoglobingehalts von ≤ 90 g/L als erfolgreiche Anämieinduktion gewertet wurde. Um den Einfluss einer kurzfristigen Anämie auf die thorakale Aorta zu messen, wurden WT-Mäuse und Mäuse der Linie C57BL/6 Cg-$Arg1^{tm1Pmu}$/J TgN (Cdh5/PAC)-CreERT2 entsprechend dem akuten Anämieprotokoll behandelt. In dessen Rahmen wurde den Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen durch Punktion des retrobulbären Sinus und Phlebotomie der *Vena facialis* Blut entnommen. Bei beiden Techniken handelt es sich um gängige Verfahren zur Blutentnahme bei Mäusen [115]. Für die Blutabnahme wurden nicht-heparinisierte Kapillare genutzt, wobei der Außendurchmesser der verwendeten Kapillare maximal 0,8 mm betrug. Je Blutabnahme wurden 200 µl Blut entnommen. Nach jeder Punktion erfolgte eine Volumensubstitution mit Kochsalzlösung. Den Tieren wurde intraperitoneal und subkutan je 200 µl 0,9 % Kochsalzlösung injiziert.

Die Induktion der chronischen Anämie erfolgte in WT-Mäusen, Mäusen der Linie C57BL/6 Cg-$Arg1^{tm1Pmu}$/J TgN(Cdh5/PAC)-CreERT2 und eNOS-KO. Den Versuchstieren wurde zu Beginn der sechswöchigen Versuchsreihe an drei aufeinanderfolgenden Tagen und anschließend jeden dritten Tag 200 µl Blut entnommen. Bei den repetitiven Punktionen wurde darauf geachtet, dass das gleiche Auge frühestens nach zwei Wochen erneut punktiert werden durfte. Um diesen zeitlichen Abstand einzuhalten, wurde bei Induktion der chronischen Anämie die *Vena caudalis mediana* zusätzliche zum retrobulbären Sinus und der *Vena facialis* punktiert. Die *Vena caudalis mediana* wurde vor der Blutentnahme mithilfe von Wärmelampen hyperämisiert, um die Punktion zu erleichtern [98]. Die Anämieinduktion durch Blutentnahme und die finale Tötung der Versuchstiere durch kardiale Punktion mit anschließender Blutentnahme führte eine medizinisch-technische Assistentin durch.

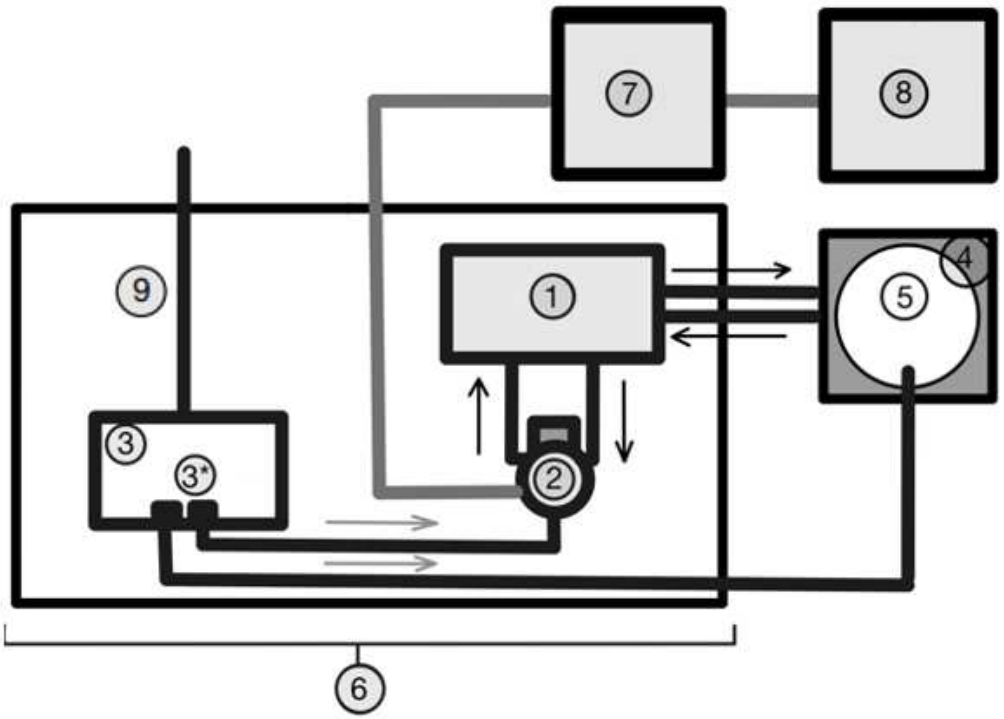
### 2.3.3 N-Acetylcystein-Behandlung

Bei N-Acetylcystein (NAC) handelt es sich um ein synthetisch hergestelltes Antioxidans, dessen antioxidative Wirkung unter anderem auf dessen Fähigkeit als direkter ROS-Fänger beruht [116]. Darüber hinaus stimuliert NAC die Biosynthese des Glutathions (GSH) [116, 117]. In Tierexperimenten konnte zudem nachgewiesen werden, dass NAC die GSH-Regeneration durch Stimulation der GSH-Reduktase und GSH-Peroxidase bewirkt [117]. Insgesamt wurden elf WT-Mäuse über einen Zeitraum von vier Wochen mit NAC behandelt, wobei die Applikation oral über das Trinkwasser erfolgte. Die Konzentration des NAC im Trinkwasser betrug 1 %. Das Trinkwasser und demzufolge das NAC wurden täglich gewechselt. Bei sieben Tieren wurde die Initiation der chronischen Anämie zwei Wochen vor Beginn der NAC-Behandlung gestartet. Die NAC-Applikation, die Anämieinduktion und die finale Tötung der Versuchstiere mit anschließender Blutentnahme führte eine medizinisch-technische Assistentin durch.

## 2.4 Messung der Gefäßfunktion

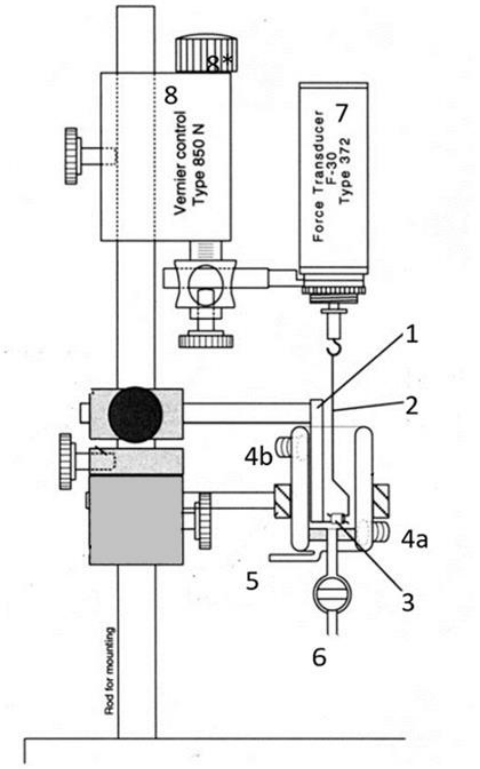
### 2.4.1 Versuchsaufbau

Die Gefäßfunktionen einzelner Ringsegmente wurden in einem Organbad (Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus GmbH, Deutschland) gemessen. Das Gerät bestand aus einer Plexiglasplatte mit sechs vertikalen Stäben, wobei jeder Stab als Gerüst für eine einzelne funktionelle Einheit diente (siehe Abb. 5 ). Neben den funktionellen Einheiten waren ein Gasverteilungsblock (siehe Abb. 4.3) und ein Verteilungsblock für temperiertes Wasser (siehe Abb. 4.1) auf der Plexiglasplatte befestigt. Jede funktionelle Einheit hatte ein 2 ml großes Becken und jedes Becken enthielt eine Fritte, die mit dem Boden des Beckens verschmolzen war, sowie einen Absperrhahn (siehe Abb. 5.6), durch den ein Pufferwechsel möglich war. Die jeweilige Fritte war über den Carbogenanschluss (siehe Abb. 5.5) mit dem Gasverteilungsblock verbunden. Über ein Nadelventil (siehe Abb. 4.3 *) wurde eine akkurate Adjustierung des Carbogenflusses gewährleistet. Des Weiteren besaßen die Becken eine Ummantelung, die über einen Zu- und einen Abflussschlauch (siehe Abb. 5.4) mit dem Verteilerblock des Wassers verbunden war. Der Verteilerblock wiederum war an den externen Thermozirkulator (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland, siehe Abb. 4.4) angeschlossen. Auf diese Weise wurde eine konstante Temperatur von 37 °C innerhalb der Becken erreicht. Außerdem diente der externe Thermozirkulator zur Erwärmung des Pufferreservoirs (siehe Abb. 4.5). Ein starrer Gewebehalter (siehe Abb. 5.1), der ebenfalls an der vertikalen Stange befestigt war, ragte in jedes Becken. Neben diesem starren Gewebebehälter wurde ein Verbindungsdraht (siehe Abb. 5.2) verwendet, der einen Durchmesser von 0,3 mm aufwies und in eine Messvorrichtung (siehe Abb. 5.7 - 8) eingehängt wurde. Über das Rad der Messvorrichtung (siehe Abb. 5.8) konnte die Höhe des Verbindungsdrahts eingestellt werden. Ein Kraftmesser (Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, Deutschland, siehe Abb. 5.7) war ebenfalls Bestandteil dieser Messvorrichtung. Über diesen wurde die isometrische Kraftentwicklung der Aorten-Segmente detektiert. Die Kraftmesser waren an das Powerlab (ADInstruments, Australien, Abb. 4.7) angeschlossen, das als Verstärkermodul der vom Kraftmesser gesendeten Signale fungierte. Die anschließend verstärkten Signale wurden über die Software LabChart 8 Reader am Computer dargestellt.




(1) Verteilungsblock Wasser
(2) Funktionelle Einheit
(3) Gasverteilungsblock mit Nadelventil (*)
(4) Thermozirkulator LAUDA E100
(5) Pufferreservoir
(6) Plexiglasplatte
(7) Powerlab
(8) Computer
(9) Verbindung zum zentralen Gasanschluss

**Abb. 4: Versuchsaufbau zur Messung der Gefäßfunktion**
In dieser Abbildung wird der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Die einzelnen Elemente des Versuchsaufbaus sind entsprechend der Legende nummeriert. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Linien repräsentieren die Wasserschläuche, mit denen die einzelnen Elemente verbunden werden. Die mit grauen Pfeilen gekennzeichneten Linien entsprechen den Gasschläuchen. Mit den Pfeilen wird die Flussrichtung des Wassers und des Gases angegeben. Zugunsten der Übersicht ist nur eine der sechs funktionellen Einheiten visualisiert (eigene Abbildung).




(1) Starrer Gewebehalter
(2) Verbindungsdraht
(3) Aorta
(4) Zu- und Abfluss (Wasser)
(5) Gasanschluss
(6) Absperrhahn
(7) Kraftmesser
(8) Messvorrichtung mit höhenverstellbaren Rad (8 *)

**Abb. 5: Aufbau der funktionellen Einheit**
Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des Organbads. Die einzelnen Elemente sind entsprechend der Legende nummeriert. Durch das Lumen der Aorta (3) wurden der Verbindungsdraht (2) und der starre Gewebehalter (1) geführt. Durch Drehung des Rades (8 *) wurde eine Vordehnung der Aorta bewirkt. Die im Zuge der pharmakologischen Testung induzierte Änderung der Wandspannung wurde durch den Kraftmesser (7) detektiert. Der Zu- und Abfluss des warmen Wasser (4) hat eine konstante Temperatur während des Experiments gewährleistet. Über den Gasanschluss (5) wurde das Organbad mit Carbogen versorgt. Der Absperrhahn (6) hat den Wechsel des Puffers nach pharmakologischer Testung ermöglicht. Die Genehmigung zur Nutzung der Abbildung wurde durch Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH erteilt.

### 2.4.2 Krebs-Henseleit-Puffer

Bei dem Experiment handelte es sich um eine Ex-vivo-Technik. Um die physiologischen Bedingungen zu simulieren, wurden der Versuch und die Präparation in Anwesenheit des Krebs-Henseleit-Puffers (KH-Puffer) durchgeführt, der in seiner Zusammensetzung der physiologischen Elektrolytkonzentration des Plasmas ähnelt. Innerhalb des KH-Puffers lagen folgende Ionenkonzentrationen vor: 115 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,4 mM MgSO4, 5 mM NaHCO3, 1,2 mM K2HPO4, 1,1 mM Na2 HPO4, 1,0 mM CaCl2 und 5 mM Glucose.

Da bereits kleine Abweichungen der Ionenkonzentrationen zu veränderten Messwerten führen können, wurden Stammlösungen angesetzt (siehe Tabelle 1 und Tabelle 2) [118]. Die Stammlösung enthielt eine 20-mal höhere Konzentration als der finale KH-Puffer. Entsprechend der Konzentration wurden größere Mengen abgewogen, um den Einfluss möglicher Messfehler der Waage zu minimieren. Die Stammlösungen wurden für maximal drei Monate bei 4 °C gelagert. Sie wurden genutzt, um täglich einen frischen KH-Puffer anzusetzen. Kurz vor Beginn des Experiments wurde eine weitere Lösung aus Glucose und Natriumhydrogencarbonat angesetzt (siehe Tabelle 3). Da Glucose ein idealer Nährboden für Bakterien ist, musste diese Lösung täglich frisch zubereitet werden [104]. Diese Lösungen wurden verwendet, um den finalen KH-Puffer zu erstellen (siehe Tabelle 4). Erst nachdem die Lösung für mindestens 20 Minuten mittels Carbogen (95 % $O_2$ und 5 % $CO_2$) begast worden war, wurden 50 ml der 20-fachen Kalzium-Stammlösung hinzugegeben. Die Begasung der Lösung hatte den Effekt, dass ein näherungsweise physiologischer pH-Wert von 7,4 erreicht wurde. Des Weiteren war die Einstellung des pH-Werts notwendig, damit das Löslichkeitsprodukt der Kalzium- und Phosphationen ausreichend hoch war [119]. Dadurch wurde verhindert, dass sich schwer lösliche Hydroxylapatitkristalle bildeten.

**Tabelle 1: 20-fache Krebs-Henseleit-Stammlösung (2 l)**

| Stoff | Menge (in g) |
|---|---|
| NaCl | 278,16 |
| EDTA | 0,4 |
| KCl | 14,0 |
| $KH_2PO_4$ | 6,44 |
| $MgSO_4$ $7H_2O$ | 11,56 |

**Tabelle 2: 20-fache Kalzium-Stammlösung**

| Stoff | Menge (in g) |
|---|---|
| $CaCl_2$ $2H_20$ | 14,72 |

**Tabelle 3: Glucose-Natriumhydrogencarbonat-Lösung (500 ml)**

| Stoff | Menge (in g) |
|---|---|
| $C_6H_{12}O_6$ | 8,4 |
| $NaHCO_3$ | 10,9 |

**Tabelle 4: finale Krebs-Henseleit-Stammlösung (2 l)**

| Lösung | Volumen (in ml) |
|---|---|
| Millipore | 800 |
| 20x Krebs-Henseleit-Stammlösung | 50 |
| 20x Kalzium-Stammlösung | 50 |
| Glucose-Natriumhydrogencarbonat-Lösung | 100 |

### 2.4.3 Präparation der thorakalen Aorta

Vor Beginn der Präparation wurden die Mäuse mit dem Analgetikum Xylazin (10 mg/kg) und dem narkotisierenden Medikament Ketamin (100 mg/kg) behandelt. Die Wirkung der Anästhesie wurde durch Nachweis einer Areflexie bestätigt. Die Versuchstiere wurden auf dem Rücken liegend auf dem Operationstisch fixiert. Kurz vor Beginn der Präparation wurde den Mäusen 200 µL Heparin injiziert. Anschließend wurde den Mäusen mittels kardialer Punktion 1000 µL Blut entnommen. Nach der Blutentnahme wurde der Thorax entlang des Sternums eröffnet. Ausgehend vom medialen Schnitt folgten laterale Schnitte entlang des Rippenbogens. Daran schloss sich die gesamte Präparation in Anwesenheit des gekühlten KH-Puffers an. Da die *Aorta thoracalis* der *Columna vertebralis* ventral anliegt, mussten Herz und Lunge vorsichtig entfernt werden. Darüber hinaus wurden Leber, Milz, Diaphragma und der proximale Anteil des gastrointestinalen Traktes exzidiert. Dadurch wurde der kraniale Anteil der *Aorta abdominalis* freigelegt. Alle weiteren Präparationsschritte wurden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Pro-micron GmbH, Deutschland) durchgeführt. Da das umliegende Fettgewebe einen Einfluss auf die Messwerte gehabt hätte, wurde dieses unter 1,6-facher Vergrößerung entfernt [120]. Anschließend wurde die Aorta exzidiert. Für diesen Schritt wurde die *Aorta abdominalis* auf Höhe des oberen Nierenpols mit einer chirurgischen Pinzette fixiert und kaudal der Fixationsstelle durchtrennt. Anschließend wurde die Aorta nach kranial vorsichtig abgelöst. Als obere Resektionsgrenze wurde der *Arcus aortae* gewählt. Die Aorta wurde in eine Petrischale überführt, die mit dem gekühlten KH-Puffer befüllt war. In der Petrischale wurde die Aorta in 2 mm große ringförmige Segmente geteilt. Während dieses Schrittes wurde das kaudale Ende der Aorta durch eine chirurgische Pinzette fixiert, während ausgehend vom kranialen Ende sukzessiv 2 mm lange Segmente abgetrennt wurden. Die Ringsegmente, die an die Resektionsgrenze gegrenzt haben, wurden exkludiert. Da die untere Resektionsgrenze der kraniale Anteil der *Aorta abdominalis* war, musste der kaudale Anteil der *Aorta thoracalis* nicht exkludiert werden.

### 2.4.4 Versuchsprotokoll

Zu Beginn des Experiments wurde ein frischer KH-Puffer angesetzt (siehe Kapitel 2.4.2 Krebs-Henseleit-Puffer). Der Puffer wurde anschließend für 20 Minuten im Thermozirkulator erwärmt. Des Weiteren wurden die vom Kraftmesser eingehenden Daten mithilfe der Software *PowerLab8* kalibriert. Im Zuge der Kalibrierung wurde ein definiertes Gewicht (1,00 g) am Kraftmesser aufgehängt. Das Ruhesignal des Kraftmessers und das Signal, das bei der Aufhängung des definierten Gewichts generiert wurde, wurden als Referenzwerte für die Software genutzt.

Die entstandenen Segmente wurden im Organbad *aufgehängt*. Dieser Prozess wird im Englischen als *Mounting* bezeichnet. Im Zuge des *Mountings* wurde ein Verbindungsdraht durch das Lumen des Segmentes geführt. Anschließend wurde das Segment in eine Petrischale mit KH-Puffer überführt, der mit ACh angereichert war (Konz. $10^{-5}$ M). Im Anschluss an diesen Schritt wurde der metallene Draht des starren Gewebehalters ebenfalls durch das Lumen geführt (siehe Abb. 5.3). Der Verbindungsdraht wurde am Kraftmesser eingehängt. Die Messvorrichtung, zu der auch der *Kraftmesser* gehört, konnte durch ein Rad in der Höhe (siehe Abb. 5.8) verstellt werden. Durch das Drehen des Rades im Uhrzeigersinn wurde der Abstand zwischen Verbindungsdraht und Gewebehalter vergrößert. Da die Gefäßwand beide Drähte umschloss, hatte dies eine Zunahme der Wandspannung zur Folge. Die entstandene Wandspannung wurde über die Software grafisch dargestellt. Das Rad wurde gedreht, bis eine Spannung von 1 g bzw. 9,8 Millinewton ( mN) erreicht wurde.

Nach dem abgeschlossenen *Mounting* und der Initialisierung der Wandspannung begann die Equilibrierungsphase, in deren Rahmen alle 20 Minuten der Puffer gewechselt wurde. Im Anschluss an jeden Pufferwechsel wurde erneut die Wandspannung von 1 g eingestellt. Dieser Schritt wurde mindestens dreimal wiederholt. Nach dem dritten Pufferwechsel wurden jeweils 2 µl der Indometacin-Lösung ($10^{-2}$ M) zu den Becken pipettiert. Die Inkubationszeit des Indometacins betrug 20 Minuten. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK) mit Phe, das als α1-Agonist zu einer Vasokonstriktion führte, durchgeführt. Die DWK erfolgte nach den Vorgaben in Tabelle 5. Nach Applikation der jeweiligen Dosis wurde gewartet, bis die Wandspannung ein Plateau erreicht hatte. Nachdem durch Applikation des Phe eine Kontraktion erreicht wurde, erfolgte eine DWK mit ACh. Auch hier wurde das Schema aus Tabelle 5 genutzt. Nach Applikation der letzten ACh-

Konzentration wurde zwei Minuten gewartet, bevor der Puffer gewechselt wurde. Um die Entfernung der pharmakologisch aktiven Substanzen aus dem Organbad sicher gewährleisten zu können, wurde der Puffer mindestens dreimal ausgetauscht. Anschließend wurden die Segmente erneut mit Indometacin inkubiert. Zusätzlich wurde in jedes Becken 200 µM N-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester-Hydrochlorid (L-NAME) appliziert. Die Inkubationszeit der beiden Stoffe betrug 30 Minuten. Nach abgeschlossener Inkubation erfolgte erneut eine Phe- und ACh-DWK. Im Anschluss an die ACh-Applikation wurde der Einfluss des SNP ermittelt. Die SNP-DWK folgte dem Schema in Tabelle 6.

### 2.4.5 Einfluss des Arginaseinhibitors

Es wurde in sechs weiteren WT-Mäusen eine akute Anämie induziert. Diese wurden, wie bereits in Unterkapitel 2.4.3 dargelegt, präpariert und durchliefen das in Unterkapitel 2.4.4 beschriebene Protokoll, bis einschließlich der ersten ACh-DWK. Nachdem der Puffer mindestens dreimal ausgetauscht worden war, wurden die Segmente mit Indometacin (10 µM) und dem unspezifischen Arginaseinhibitor N-Hydroxy-nor-Arginin (100 µM) für einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert [72, 121]. Nach abgeschlossener Inkubation wurde erneut Phe in steigenden Konzentrationen in die Becken pipettiert (siehe Tabelle 5). Nach Erreichen der maximalen Kontraktion wurden ACh gemäß Tabelle 5 in die Organbäder appliziert. Zwei Minuten nach Applikation der letzten ACh-Lösung wurde der Versuch beendet.

**Tabelle 5: Pipettierschema Phenylephrine und Acetylcholin**

| Konzentration im 2 ml Becken (M) | Konzentration der pipettierten Lösung (M) | Volumen der pipettierten Lösung (µl) |
|---|---|---|
| **$10^{-9}$** | $10^{-6}$ | 2 |
| **$10^{-8,5}$** | $10^{-6}$ | 4 |
| **$10^{-8}$** | $10^{-6}$ | 14 |
| **$10^{-7,5}$** | $10^{-5}$ | 4 |
| **$10^{-7}$** | $10^{-5}$ | 14 |
| **$10^{-6,5}$** | $10^{-4}$ | 4 |
| **$10^{-6}$** | $10^{-4}$ | 14 |
| **$10^{-5,5}$** | $10^{-3}$ | 4 |
| **$10^{-5}$** | $10^{-3}$ | 14 |

**Tabelle 6: Pipettierschema Natrium-Nitroprussid**

| Konzentration im 2 ml Becken (M) | Konzentration der pipettierten Lösung (M) | Volumen der pipettierten Lösung (µl) |
|---|---|---|
| **$10^{-10}$** | $10^{-8}$ | 20 |
| **$10^{-9,5}$** | $10^{-7}$ | 4 |
| **$10^{-9}$** | $10^{-7}$ | 14 |
| **$10^{-8,5}$** | $10^{-6}$ | 4 |
| **$10^{-8}$** | $10^{-6}$ | 14 |
| **$10^{-7,5}$** | $10^{-5}$ | 4 |
| **$10^{-7}$** | $10^{-5}$ | 14 |
| **$10^{-6,5}$** | $10^{-4}$ | 4 |
| **$10^{-6}$** | $10^{-4}$ | 14 |
| **$10^{-5,5}$** | $10^{-3}$ | 4 |
| **$10^{-5}$** | $10^{-3}$ | 14 |

## 2.5 Etablierung eines neuen Protokolls

### 2.5.1 Konstante Bedingungen

Der translationale Ansatz, der diesem Versuchsansatz zu Grunde liegt, erfordert den Einsatz humanen Materials, in Form von Blut. Die Blutentnahme sowie die anschließende Weiterverarbeitung der Proben wurden im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Darüber hinaus liegt die erforderliche Genehmigung seitens der regionalen Ethikkommission vor (Genehmigungsnummer: 5903R, 5481R und 2018-14).

Im folgenden Abschnitt werden die für sämtliche Inkubationsexperimente geltenden Bedingungen beschrieben. Zu den konstanten Bedingungen zählen die Aufbereitung der Blutproben, die Präparation der Aorta und die Einstellung des Inkubators. Den Probanden mit Myokardinfarkt wurde innerhalb von 24 Stunden nach Einsetzen des kardialen Ereignisses Blut entnommen. Um die Hämostase des Blutes zu verhindern, wurden Lithiumheparin-Röhrchen genutzt. Jedem Probanden wurden zwei Röhrchen Blut entnommen, was näherungsweise 8 ml Blut entsprach. Die weitere Aufbereitung der Blutproben erfolgte schnellstmöglich. Die Proben wurden in 15 ml CELLSTAR® Polypropylen-Röhrchen überführt und danach für zehn Minuten bei 4 °C und 800 G (Eppendorf AG, Deutschland) zentrifugiert. Der entstandene Überstand aus Plasma wurde unter Verwendung einer Pipette entfernt. Zusätzlich wurde der Leukozytenfilm, der auch als Buffy-Coat bezeichnet wird, großzügig abgetragen. Das verbleibende RBK-Pellet wurde mit einem gekühlten KH-Puffer auf das Ausgangsvolumen von 8 ml diluiert. Das entstandene Gemisch wurde nach den bereits beschriebenen Einstellungen erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt. Die Verdünnung mit KH-Puffer mit anschließender Zentrifugation erfolgte insgesamt dreimal. Vom aufgereinigten RBK-Pellet wurden 2 ml mit 3 ml Lösungsmittel versetzt. Auf diese Weise wurde ein Hämatokrit von 40 % innerhalb der entstandenen Suspension eingestellt. Das Gemisch wurde durch 100 µl Heparin (5000 IE/ml) komplementiert.

Für die Etablierung des Protokolls wurden ausschließlich unbehandelte WT-Mäuse verwendet. Die Präparation der Maus erfolgte nach dem in Unterkapitel 2.4.3 beschriebenen Vorgehen, mit dem einzigen Unterschied, dass die exzidierte Aorta im Rahmen der Inkubationsexperimente in eine CELLSTAR®-6-Well-Zellkultur-Multiwell-

Platte überführt wurde. Im Anschluss wurde das Gemisch aus gereinigten RBK und Lösungsmittel vorsichtig in das Well pipettiert, in dem sich die Aortensegmente befanden. Um stabile Inkubationskonditionen von 37 °C und 5 % $CO_2$ zu gewährleisten, wurde ein Inkubator (Thermo Electron Corporation, USA) genutzt. Die verschiedenen Inkubationsbedingungen werden in Kapitel 2.5.2 näher erläutert.

### 2.5.2 Variable Bedingungen

Wie bereits erwähnt, wurden viele Parameter des Protokolls variiert, so etwa die Inkubationszeit, die Wahl des Lösungsmittels und der Einsatz einer Rührplatte (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland). Um diese zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten der Parameter übersichtlich darzustellen, wurde der folgende Abschnitt der Methodik in die Unterpunkte 1 bis 4 gegliedert. Innerhalb eines Unterpunkts sind mehrere Ansätze mit ähnlichen Inkubationskonditionen zusammengefasst.

- Unterpunkt 1: In den ersten drei Ansätzen der Etablierung wurde der KH-Puffer zur Dilution des RBK-Pellets genutzt.
    - Im ersten Ansatz wurde der Einfluss der RBK, die von gesunden Probanden stammten, in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelt. Der Einfluss der gesunden RBK wurde nach zwei, sechs und 16 Stunden Inkubation gemessen. Probandenanzahl, Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden sind in Tabelle 7 aufgeführt.
    - Im zweiten Ansatz wurde die Auswirkung von RBK von Patienten mit kardiovaskulären VE auf die Gefäßfunktion ermittelt. Die Gefäßfunktion wurde nach einer zweistündigen Inkubation gemessen. Probandenanzahl, Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden sind in Tabelle 8 aufgeführt.
    - Im dritten Ansatz wurde der Einfluss von RBK, die aus dem Blut von STEMI-Patienten gewonnen wurden, ermittelt. Ferner wurden in diesem Ansatz die Segmente zweier Mäuse ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert. In Abgrenzung zum zweiten Ansatz betrug die Inkubationszeit in dieser

Protokollvariante sechs Stunden. Probandenanzahl, Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden sind in Tabelle 9 dargestellt.

- Unterpunkt 2: Im Verlauf der Etablierung wurden der Einsatz einer Rührplatte und die Verwendung alternativer Lösungsmittel (*HUVEC-Medium*) erprobt. Für die folgenden Ansätze gilt, dass ausschließlich RBK von gesunden Spendern (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11) verwendet wurden. Für diese Ansätze wurde die Inkubationszeit auf 16 Stunden festgelegt. Insgesamt wurden drei verschiedene Ansätze überprüft, um mehrere Bedingungen gleichzeitig zu testen.
    - Im ersten Ansatz wurde an der Rührplatte eine Rotationsgeschwindigkeit (RG) von 30 Rotationen pro Minute (rpm) gewählt. Drei Segmente wurden mit RBK inkubiert, die mit einem Gemisch aus *HUVEC-Medium* und KH-Puffer (im Verhältnis 1:1) auf einen Hämatokrit von 40 % diluiert wurden.
    - Im zweiten Ansatz wurde die RG auf 40 rpm festgelegt. Bei drei Segmenten wurde ausschließlich *HUVEC-Medium* als Lösungsmittel für die RBK genutzt. Drei weitere Segmente wurden mit RBK inkubiert, die mit der 1:1-Lösung von *HUVEC-Medium* und KH-Puffer diluiert wurden.
    - Der dritte Ansatz entspricht annähernd dem zweiten Ansatz, allerdings wurde die RG auf 50 rpm erhöht.

- Unterpunkt 3: Die Segmente aus drei Mäusen wurden mit RBK von STEMI-Patienten inkubiert. Bei zwei der drei Patienten bestand zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein DMT2. Das RBK-Pellet wurde mittels einer Lösung aus KH-Puffer und HUVEC-Medium (1:1) diluiert. Während der gesamten Inkubationszeit von 16 Stunden wurde die Rotationsgeschwindigkeit von 50 rpm aufrechterhalten. Probandenanzahl, Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden sind in Tabelle 12 aufgeführt.

- Unterpunkt 4: Basierend auf den gesammelten Daten wurde ein finales Protokoll entwickelt, anhand dessen das RBK-Pellet mittels KH-Puffer diluiert wurde. Die sechsstündige Inkubation erfolgte unter Einsatz einer Rührplatte mit einer RG von 50 rpm. Der Einfluss der RBK von jungen Probanden (< 25 Jahre), alten gesunden Probanden und STEMI-Probanden wurde mithilfe des finalen

Protokolls gemessen. Probandenanzahl, Geschlechts- und Altersverteilung der Probanden sind in Tabelle 13 aufgeführt. Zur Generierung eines Referenzwerts wurden die Segmente aus fünf Mäusen mit KH-Puffer in Abwesenheit von RBK inkubiert. Diese Segmente wurden ebenfalls für sechs Stunden bei einer RG von 50 rpm inkubiert.

**Tabelle 7: Probandencharakteristika I**

| Inkubationszeit | 2 h | 6 h | 16 h |
|---|---|---|---|
| Anzahl | 2 | 5 | 2 |
| Mann | 2 | 3 | 1 |
| Frau | 0 | 2 | 1 |
| Alter (Ø) in Jahren | 63,5 | 42,2 | 22 |
| Alter ($\bar{x}$) in Jahren | 63,5 | 53 | 22 |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden auf, deren rote Blutkörperchen zur Überprüfung verschiedenen Inkubationszeiten (in Stunden (h)) verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 8: Probandencharakteristika II**

| Kohorte | Gesund | DMT2 | Anämie |
|---|---|---|---|
| Anzahl | 2 | 1 | 1 |
| Mann | 2 | 0 | 1 |
| Frau | 0 | 1 | 0 |
| Alter (Ø) in Jahren | 63,5 | 34* | 41* |
| Alter ($\bar{x}$) in Jahren | 63,5 | 34* | 41* |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden, Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) und anämischer Probanden auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung einer zweistündigen Inkubation verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$)wurde zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Mit Stern (*) markierte Altersangabe entspricht Alter der Probandin, da Angabe von Ø bei n = 1 nicht möglich ist. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø und $\bar{x}$ ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 9: Probandencharakteristika III**

| Kohorte | Gesund | STEMI |
|---|---|---|
| Anzahl | 5 | 4 |
| Mann | 3 | 2 |
| Frau | 2 | 2 |
| Alter (Ø) in Jahren | 42,2 | 64.25 |
| Alter ($\bar{x}$) in Jahren | 53 | 65 |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden und Probanden mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung einer sechsstündigen Inkubation verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 10: Probandencharakteristika IV**

| Rotationsgeschwindigkeit | 30 rpm | 40 rpm | 50 rpm |
|---|---|---|---|
| Anzahl | 1 | 2 | 2 |
| Mann | 0 | 2 | 2 |
| Frau | 1 | 0 | 0 |
| Alter (Ø) in Jahren | 23* | 22 | 22 |
| Alter ($\bar{x}$) in Jahren | 23* | 22 | 22 |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung verschiedener Rotationsgeschwindigkeiten (in rpm) bei Inkubation verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Mit Stern (*) markierte Altersangabe entspricht Alter der Probandin, da Angabe von Ø und $\bar{x}$ bei n = 1 nicht möglich ist. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 11: Probandencharakteristika V**

| Lösungsmittel | Medium | Medium + KH-Puffer |
|---|---|---|
| Anzahl | 2 | 2 |
| Mann | 2 | 2 |
| Frau | 0 | 0 |
| Alter (Ø) in Jahren | 22 | 22 |
| Alter ($\bar{x}$) in Jahren | 22 | 22 |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung der Lösungsmittel verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 12: Probandencharakteristika VI**

| Kohorte | STEMI | Gesund |
|---|---|---|
| Anzahl | 3 | 1 |
| Mann | 3 | 1 |
| Frau | 0 | 0 |
| Alter in Jahren (Ø) | 64 | 22* |
| Alter in Jahren ($\bar{x}$) | 65 | 22* |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden und Probanden mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung einer sechzehnstündigen Inkubation verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Mit Stern (*) markierte Altersangabe entspricht Alter des Probanden, da Angabe von Ø und $\bar{x}$ bei n = 1 nicht möglich ist. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

**Tabelle 13: Probandencharakteristika VII**

| Kohorte | STEMI | Kontrolle (alt) | Kontrolle (jung) |
|---|---|---|---|
| Anzahl | 4 | 5 | 6 |
| Mann | 3 | 2 | 3 |
| Frau | 1 | 3 | 3 |
| Alter in Jahren (Ø) | 60,25 | 63,4 | 22,33 |
| Alter in Jahren ($\bar{x}$) | 61 | 65 | 22,5 |

Die Tabelle führt Anzahl, Geschlecht und Altersstruktur gesunder Probanden und Probanden mit ST-Hebungsinfarkt (STEMI) auf, deren roten Blutkörperchen zur Überprüfung einer sechsstündigen Inkubation verwendet wurden sind. Arithmetische Mittel (Ø) und Median ($\bar{x}$) der Probandengruppe

wurden zur Darstellung der Altersstruktur gewählt. Auf Grund niedriger n-Zahlen wird Ø ohne Standardabweichung angegeben.

## 2.6 Auswertung und Statistik

Die pharmakologische Gefäßreagibilität ergab sich aus der Wandspannung, die während des gesamten Versuchsprotokolls durch die Kraftmesser detektiert wurde. Die Applikation der Pharmaka hat eine isometrische Kraftänderung der Gefäßringe bewirkt. Phe hat über Stimulation der α1-Rezeptoren eine Zunahme der Wandspannung bzw. eine Kontraktion (in mN) vermittelt. Eine Abnahme der Wandspannung wurde durch ACh und SNP induziert. Eingesetzt in die Formeln aus Abb. 6 ergaben sich aus der gemessenen Wandspannung die Werte für die Dilatation in Prozent. Auf diese Weise wurde die Gefäßfunktion der einzelnen Gefäßringe bzw. Segmente berechnet. Die Auswertung der Mauslinien differiert von der Auswertung der Inkubationsprotokolle. Daher werden beide Vorgehensweisen separat beschrieben.

Für die Auswertung der Mauslinien wurde die Gefäßfunktion der drei Segmente, die von der thorakalen Aorta einer Maus stammen, gewertet. Von der Gefäßfunktion der drei Segmente wurde das arithmetische Mittel gebildet. Dieser Mittelwert wurde mit der Gefäßfunktion der entsprechenden Maus gleichgesetzt. Im weiteren Auswertungsprozess wurden diese Mittelwerte genutzt, um unter Verwendung von GraphPad Prism 8 die Dosis-Wirkungs-Kurven der verschiedenen Gruppen anzufertigen. Die Software errechnete den Mittelwert (μ) und Standardfehler (SEM) für pEC50 und die maximale Kontraktion bzw. Dilatation der jeweiligen Mauslinie. Der pEC50 entspricht dem negativ dekadischen Logarithmus der mittleren effektiven Konzentration und wird dementsprechend ohne SI-Einheit angegeben. Der pEC50 ist eine pharmakologische Kenngröße, die die Sensitivität einer Reaktion auf ein Pharmakon quantitativ charakterisiert [122]. Basierend auf diesen Werten wurden die verschiedenen Mauslinien miteinander verglichen. Die p-Werte (p) wurden mit einem t-Test ermittelt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde dabei als signifikante Abweichung und ein p-Wert $< 0,01$ als hoch signifikante Abweichung bezeichnet.

Die Auswertung der Inkubationsprotokolle weicht in zwei Punkten vom zuvor beschrieben Vorgehen ab. Erstens wurde kein arithmetisches Mittel aus den drei Segmenten einer Aorta gebildet, da sich die Gefäßfunktionen der einzelnen Segmente, die aus einer Aorta gewonnen wurden, trotz identischer Inkubationsbedingungen voneinander unterschieden. Von den Segmenten einer Aorta, wurde nur das Segment

gezählt, dass die höchste Maximaldilatation aufgewiesen hat, sofern es eine maximale Kontraktion von über 1 mN gezeigt hatte. Basierend auf diesem Auswahlverfahren wurde mittels GraphPad der Mittelwert und der Standardfehler für die maximale Kontraktion bzw. Dilatation der jeweiligen Gruppe ermittelt. Anschließend wurden SEM und µ genutzt, um die Gruppen mittels t-Test hinsichtlich der maximalen Kontraktion bzw. Dilatation zu vergleichen. Ein p-Wert < 0,05 wurde dabei als signifikante Abweichung und ein p-Wert < 0,01 als hoch signifikante Abweichung bezeichnet. Zweitens wurde aufgrund niedriger n-Zahlen (siehe Tabelle 7 bis Tabelle 12) nur eine orientierende Auswertung der Datensätze vorgenommen. Auf eine Auswertung der SNP-DWK und Gefäßfunktionen in Anwesenheit von L-NAME wurde indes verzichtet. Ausgenommen davon sind die Daten, die im Zuge des finalen Protokolls erhoben wurden. Auf Grund ausreichender Größe der Kohorte (siehe Tabelle 13) wurden die Daten hinsichtlich des ACh-, Phe- und SNP-Antwortverhaltens in An- und Abwesenheit von L-NAME ausgewertet. Sowohl die maximale Antwort als auch die Sensitivität, in Form des pEC50, wurden miteinander verglichen.

1) $$Dilatation\ (X) = 100\ x\ \frac{max.Kontraktion - (Wandspannung\ (X)\ - Wandspannung\ BL)}{max.Kontraktion}$$

2) $$max.\ Kontraktion = Wandspannung\ (10\ \mu M\ Phe)\ - Wandspannung\ (0\ \mu M\ Phe)$$

**Abb. 6: Berechnung der Dilatation basierend auf der ermittelten Wandspannung modifiziert nach Wenceslau et al. [118].**
Mithilfe der ersten Formel wurde die konzentrationsabhängige Dilatation [Dilatation (X)] in Prozent errechnet. Sie resultiert aus der Wandspannung, die nach Applikation der entsprechenden Konzentration gemessen wurde [Wandspannung (X)], der basalen Wandspannung (Wandspannung BL), die vor Applikation von Phenylephrin (Phe) gemessen wurde, und der maximalen Kontraktion. Die maximale Kontraktion (in mN) entspricht der Differenz aus der Wandspannung, die vor der ersten Phe-Konzentration (0 µM) und nach der letzten Phe-Konzentration (10 µM) gemessen wurde.

.

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Ergebnisse der verschiedenen Mauslinien

### 3.1.1 Allgemein

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der verschiedenen Mauslinien dargelegt, wobei pro Abschnitt die Gefäßfunktionen zweier Mauslinien miteinander verglichen werden. Dabei gelten die Vasokontraktion (in mN) und die Vasorelaxation (in %) als Parameter der Gefäßfunktion. Diese sind auf der Ordinatenachse gegen die logarithmische Konzentration der pharmakologisch aktiven Substanzen (in M) der Abszissenachse aufgetragen. Die daraus resultierenden DWK werden in den zugehörigen Abbildungen dargestellt.

### 3.1.2 Einfluss der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen

In Abb. 7 sind die Ergebnisse der akut anämischen Mäuse (AA) sowie die der unbehandelten Tiere (Sham-Mäuse) in Form von DWK dargestellt. Die maximale Kontraktion unter Phe betrug in den Sham-Mäusen 5,76 ± 0,66 mN und in den AA 7,33 ± 0,95 mN; p = 0,18. Die Phe-Sensitivität unterschied sich zwischen der Sham-Gruppe (pEC50 = 7,04 ± 0,15) und der anämischen Gruppe (pEC50 = 7,01 ± 0,14; p = 0,89) nicht (siehe Abb. 7 A). Nach Inkubation mit L-NAME bestand zwischen den beiden Gruppen weiterhin kein signifikanter Unterschied bezüglich der maximaler Kontraktion (Sham = 18,16 ± 1,2 mN; AA = 19,61 ± 1,19 mN; p = 0,41) und der Sensitivität (pEC50(Sham) = 7,14 ± 0,08; pEC50(AA) = 7,23 ± 0,07; p = 0,43). Die Phe-DWK nach Inkubation mit L-NAME wird in Panel B dargestellt. Im Hinblick auf die ACh-Antwort wiesen die Gruppen hingegen signifikante Unterschiede auf (Abb. 7 C). Die Sham-Mäuse zeigten eine signifikant höhere Maximalrelaxation (84,55 ± 3,86 %) als die AA (71,46 ± 2,34 %; p = 0,02). Im Vergleich zur Kontrollgruppe besaßen die anämischen Tiere eine signifikant verringerte ACh-Sensitivität (pEC50(Sham) = 6,86 ± 0,08; pEC50(AA) = 6,61 ± 0,05; p = 0,02). Die signifikanten Unterschiede sind in Panel C in Abb. 7 markiert. Nach Inkubation der Segmente mit L-NAME war dieser Unterschied im Antwortverhalten sowohl im Hinblick auf die Sensitivität (pEC50(Sham) = 8,45 ± 0,34; pEC50(AA) = 8,13 ± 0,56; p = 0,62) als auch in Bezug auf die maximale Relaxation (Sham = -8,15 ± 1,16 %; AA = -6,1 ± 2,20 %; p = 0,40) nicht länger nachweisbar (siehe Abb. 7 D). Das SNP-

Antwortverhalten unterschied sich nicht voneinander. Die maximale Relaxation der Sham-Gruppe (104,07 ± 0,99 %) und die der AA (106,60 ± 1,75 %) waren vergleichbar (p = 0,20). Auch der pEC50-Wert der anämischen Gruppe (8,05 ± 0,06) wich nicht von dem der Kontrolle (8,12 ± 0,04) ab (siehe Abb. 7 E). Aus den aufgeführten Daten geht hervor, dass die akute Anämie in WT-Mäusen eine Reduktion der ACh-induzierten Relaxation bewirkt hat.

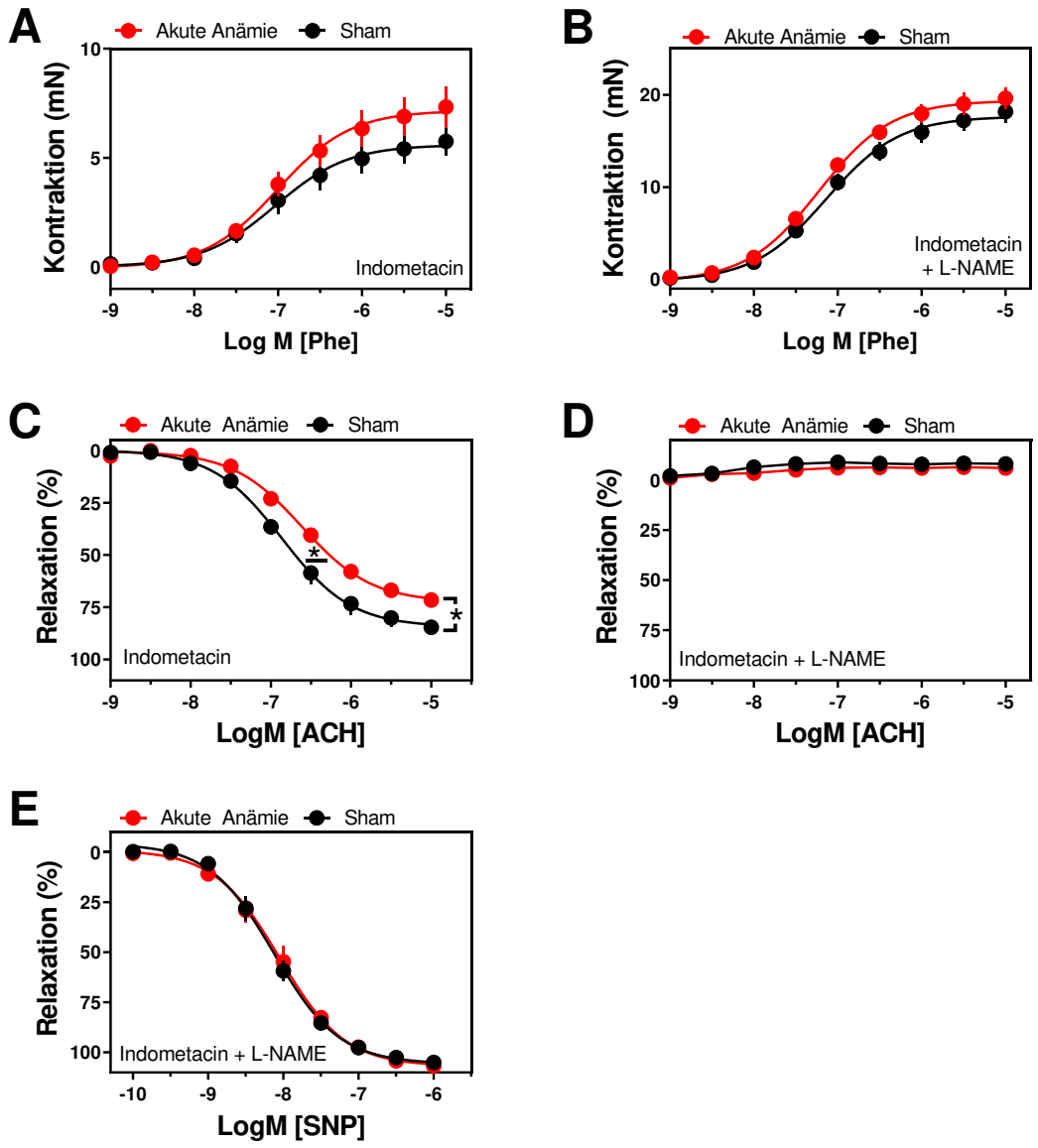



**Abb. 7: Auswirkung der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen**
Aortenringe wurden aus akut anämischen Mäusen (rot, n = 8) und Sham-Mäusen (schwarz, n = 10) isoliert, um die Gefäßfunktion mittels Organbad zu quantifizieren. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern (* für p < 0,05) markiert. Die Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.3 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen

Im Folgenden werden unbehandelte Mäuse weiterhin als Sham-Mäuse bezeichnet. Die Mäuse, in denen eine chronische Anämie induziert wurde, werden im Folgenden mit CA abgekürzt. Beide Gruppen besaßen eine vergleichbare Phe-Sensitivität (pEC50(Sham) = 7,04 ± 0,15; pEC50(CA) = 6,91 ± 0,08; p = 0,50). In Anwesenheit von 10 µM Phe wurde für die Sham-Gruppe eine maximale Kontraktion von 5,76 ± 0,66 mN ermittelt (siehe Abb. 8 A) Die chronisch anämischen WT erreichten eine maximale Kontraktion von 8,04 ± 0,88 mN. Der t-Test ergab für die maximale Kontraktion einen p von 0,0504. Panel B in Abb. 8 repräsentiert die Phe-DWK beider Gruppen nach Inkubation mit L-NAME. Die maximale Kontraktion der CA (19,82 ± 1,2 mN) ähnelte der maximalen Kontraktion der Kontrollgruppe (18,16 ± 1,2 mN; p = 0,35). Auch in Anwesenheit von L-NAME konnte keine Verschiebung des pEC50-Wertes der CA (7,17 ± 0,07) im Vergleich zu dem der Kontrollgruppe (7,14 ± 0,08; p = 0,76) festgestellt werden. Die Mäuse, in denen eine chronische Anämie induziert worden war, wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe (84,55 ± 3,86 %) eine statistisch signifikant verminderte maximale Relaxation (68,12 ± 3,67 %, p = 0,008) auf (siehe Abb. 8 C). Auch im Hinblick auf die Sensitivität unterschieden sich beide Gruppen. In den Aortenringen der Tiere mit einer chronischen Anämie wurde eine statistisch signifikante Rechtsverschiebung der ACh-DWK (p = 0,02) ermittelt. Der pEC50-Wert der CA (6,55 ± 0,09) war im Vergleich zur Sham-Gruppe (6,86 ± 0,08) signifikant erhöht. Die ACh-DWK der beiden Gruppen variierten nach Inhibition der eNOS nicht länger (siehe Abb. 8 D). Die maximale Relaxation (Sham = -8,15 ± 1,16 %; CA = -6,64 ± 2,38 %; p = 0,55) und die Sensitivität (pEC(Sham) = 8,45 ± 0,34; pEC50(CA) = 8,05 ± 0,41; p = 0,46) der beiden Gruppen wichen statistisch nicht voneinander ab. Die chronische Anämie hatte keinen Einfluss auf die SNP-abhängige Relaxation, die in Panel E in Abb. 8 dargestellt ist. Die maximale Relaxation der unbehandelten Gruppe (104,07 ± 0,99 %) war mit der Maximalrelaxation der CA (101,96 ± 0,90 %; p = 0,14) vergleichbar. Des Weiteren konnte keine Verschiebung der SNP-DWK (pEC(Sham) = 8,12 ± 0,04; pEC50(CA) = 8,06 ± 0,03) nachgewiesen werden (p = 0,27). Die Messwerte zeigen,

dass die ACh-induzierte Relaxation durch die chronische Anämie in WT-Mäusen reduziert wurde.

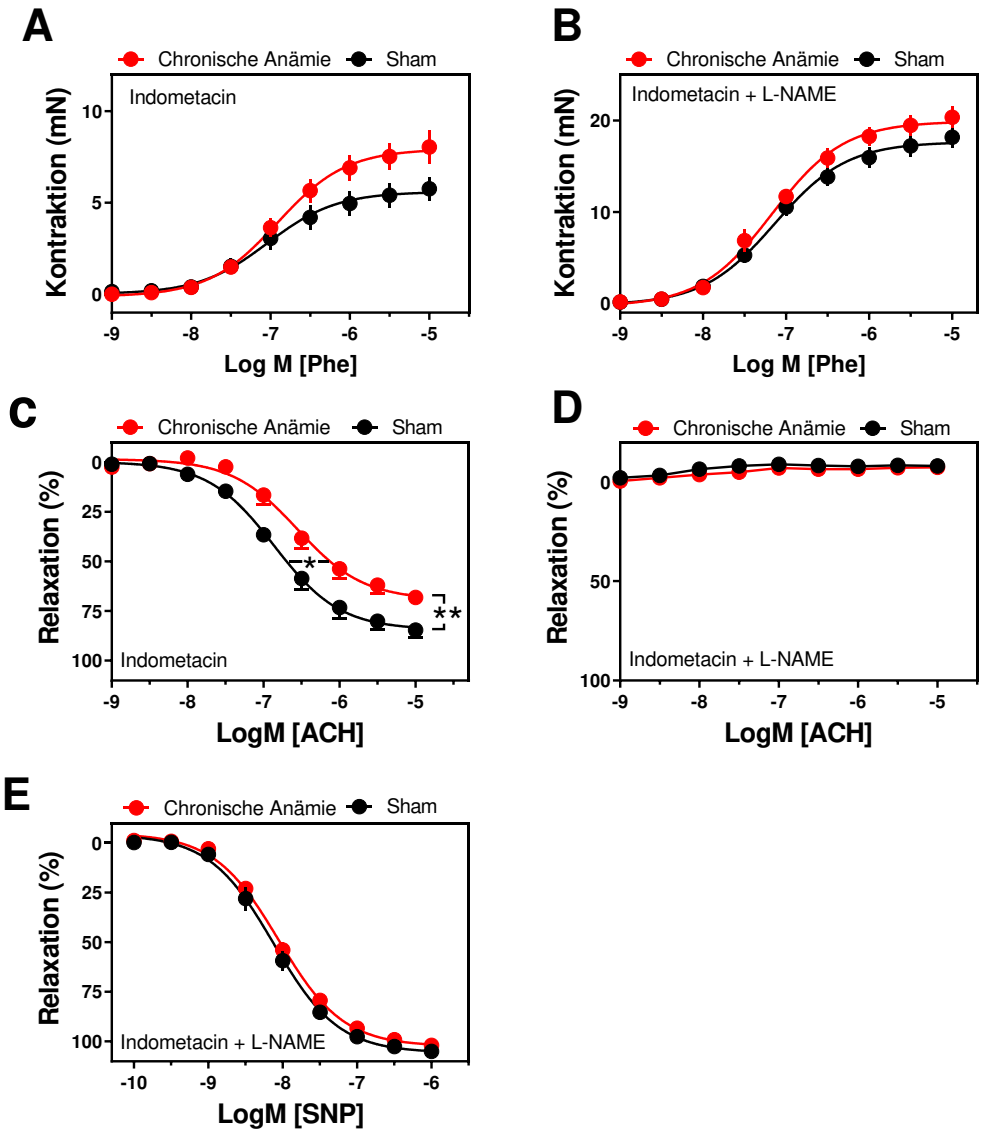



**Abb. 8: Auswirkung der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen**
Aortenringe wurden aus chronisch anämischen Mäusen (rot, n = 8) und Sham-Mäusen (schwarz, n = 10) isoliert, um die Gefäßfunktion mittels Organbad zu quantifizieren. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$). Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.4 Einfluss von N-Acetylcystein auf die Gefäßfunktion chronisch anämischer Wildtyp-Mäuse

Sieben WT-Mäuse mit einer chronischen Anämie wurden mit dem Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) behandelt (siehe Kapitel 2.3.3). Diese Mäuse werden im Folgenden als *behandelte Gruppe* bezeichnet und mit *CA+NAC* abgekürzt. Sie werden in Abb. 9 mit unbehandelten chronisch anämischen Mäusen (CA) verglichen. Obwohl beide Gruppen eine ähnliche Phe-Sensitivität aufwiesen (pEC50(CA) = 6,91 ± 0,08; pEC50(CA+NAC) = 6,89 ± 0,07; p = 0,86), war ein statistischer Unterschied bezüglich der maximalen Kontraktion feststellbar (siehe Abb. 9 A). Mit einer maximalen Kontraktion von 5,78 ± 0,36 mN kontrahierten die behandelten Tiere signifikant schwächer (p = 0,04) als die unbehandelten (8,04 ± 0,88 mN). Nach einer 20-minütigen Inkubation mit L-NAME wiesen behandelte Tiere (18,88 ± 1,29 mN) ein vergleichbares Kontraktionsmaximum wie unbehandelte Tiere (CA = 19,82 ± 1,2 mN; p = 0,60) auf (siehe Abb. 9 B). Nach der Inkubation wurde keine Verschiebung der Sensitivität nachgewiesen (pEC(CA) = 7,17 ± 0,07; pEC50(CA+NAC) = 7,27 ± 0,1; p = 0,42). Die Verabreichung des NAC führte zu einer statistisch signifikant erhöhten Maximalrelaxation im Zuge der ACh-Applikation (CA = 68,12 ± 3,67 %; CA+NAC = 81,06 ± 2,68 %; p = 0,02). Dieser Unterschied ist in Panel C in Abb. 9 durch einen Stern gekennzeichnet. Mit einem p von 0,08 war die Linksverschiebung des Graphen der behandelten Gruppe (pEC50(CA) = 6,55 ± 0,09; pEC50(CA+NAC) = 6,76 ± 0,06) nicht signifikant. Nach Inkubation mit L-NAME, dargestellt in Panel D der Abb. 9, bestand weder bezüglich der maximalen Relaxation (CA = -6,64 ± 2,38 %; CA+NAC = -6,02 ± 1,04 mN; p = 0,82) noch der Sensitivität (pEC50(CA) = 8,05 ± 0,41; pEC50(CA+NAC) = 8,60 ± 0,5; p = 0,40) ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Zusätzlich reduzierte NAC die SNP-Sensitivität signifikant (pEC50(CA) = 8,06 ± 0,03; pEC50(CA+NAC) = 7,94 ± 0,04; p = 0,03). Die statistisch signifikante Verschiebung der DWK wurde in Panel E in Abb. 9 nicht mit einem Stern markiert. Die Maximalrelaxation in beiden Gruppen ist vergleichbar (CA = 101,96 ± 0,9 %; CA+NAC = 103,90 ± 2,43 %; p = 0,44). Die Behandlung chronisch anämischer WT mit NAC bewirkte in Abwesenheit von L-NAME eine Reduktion der Kontraktilität sowie eine gesteigerte Dilatation in Anwesenheit von ACh.

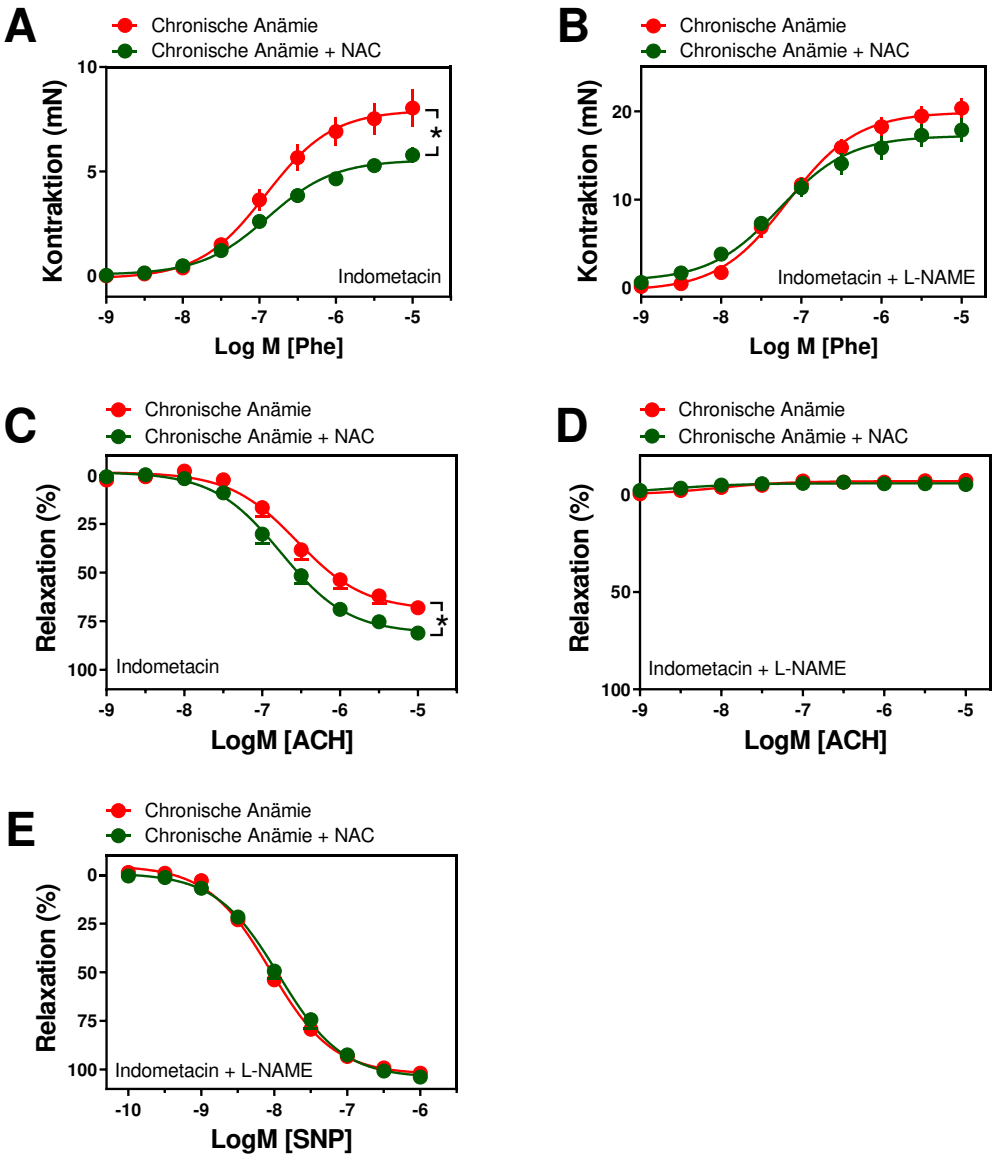



**Abb. 9: Einfluss des N-Acetylcysteins (NAC) auf die Gefäßfunktion chronisch anämischer Wildtyp-Mäuse (CA).**
Die Gefäßfunktion der Aortenringe aus CA (rot, n = 8) und CA, die mit NAC behandelt wurden (grün, n = 7), wurde mithilfe eines Organbads gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert (* für $p < 0,05$). Nur in Panel E ist die signifikante Rechtsverschiebung der mit NAC behandelten Gruppe nicht aufgeführt. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.5 Einfluss des N-Acetylcysteins auf die Gefäßfunktion in Sham-Wildtypmäusen

Entsprechend dem in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Vorgehen wurden vier Sham-Mäuse mit NAC behandelt. Die Messwerte der behandelten Tiere werden in Abb. 10 mit den Messwerten der unbehandelten Sham-Mäuse verglichen .Das adrenerge Antwortverhalten beider Gruppen wird in Form von DWK in Abb. 10 A visualisiert. Die NAC-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die maximale Kontraktion (Sham = 5,76 ± 0,66 mN; Sham + NAC = 4,21 ± 0,68 mN; p = 0,20). Auch im Hinblick auf die Sensitivität existierte kein statistisch signifikanter Unterschied (pEC50(Sham) = 7,04 ± 0,15; pEC50(Sham + NAC) = 6,69 ± 0,14; p = 0,20). Nach Inkubation mit L-NAME (siehe Abb. 10 B) zeigte die behandelte Gruppe mit einer maximalen Kontraktion von 17,16 ± 1,22 mN eine weiterhin vergleichbare Kontraktion (Sham = 18,16 ± 1,2 mN; p = 0,64). Ferner zeichneten sich keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität (pEC50(Sham) = 7,14 ± 0,08; pEC50(Sham + NAC) = 7,18 ± 0,11) ab. Der errechnete p-Wert lag bei 0,79. Mit dem Graphen C in Abb. 10 sind die ACh-DWK beider Gruppen dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten ergab mit einem p-Wert von 0,29 keinen statistischen Unterschied bezüglich der ACh-Sensitivität (pEC50(Sham) = 6,86 ± 0,08; pEC50(Sham + NAC) = 7,03 ± 0,14). Die unbehandelte Gruppe (84,55 ± 3,86 %) und die behandelte Gruppe (86,46 ± 6,97 %) dilatierten in einem vergleichbaren Maß (p = 0,80). In der ACh-DWK zeigten sich nach Inkubation mit L-NAME (Abb. 10 D) vergleichbare Werte für Sensitivität (pEC50(Sham) = 8,45 ± 0,34; pEC50(Sham + NAC) = 9,26 ± 1; p = 0,34) und maximale Relaxation (Sham = -8,15 ± 1,16 %; Sham + NAC = -4,11 ± 0,97 %; p = 0,06). Panel E in Abb. 10 enthält die SNP-DWK beider Gruppen. Für die pEC50-Werte der NAC-Gruppe (8,23 ± 0,02) und der unbehandelten Gruppe (8,12 ± 0,04) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,12). Darüber hinaus war die endothelunabhängige Maximaldilatation beider Gruppen gleich groß (Sham = 104,07 ± 0,99; Sham + NAC = 103,69 ± 0,65 %; p = 0,82). Diese Messwerte belegen, dass die Behandlung mit NAC in Sham-Mäusen keinen Einfluss auf die Gefäßfunktion hatte.

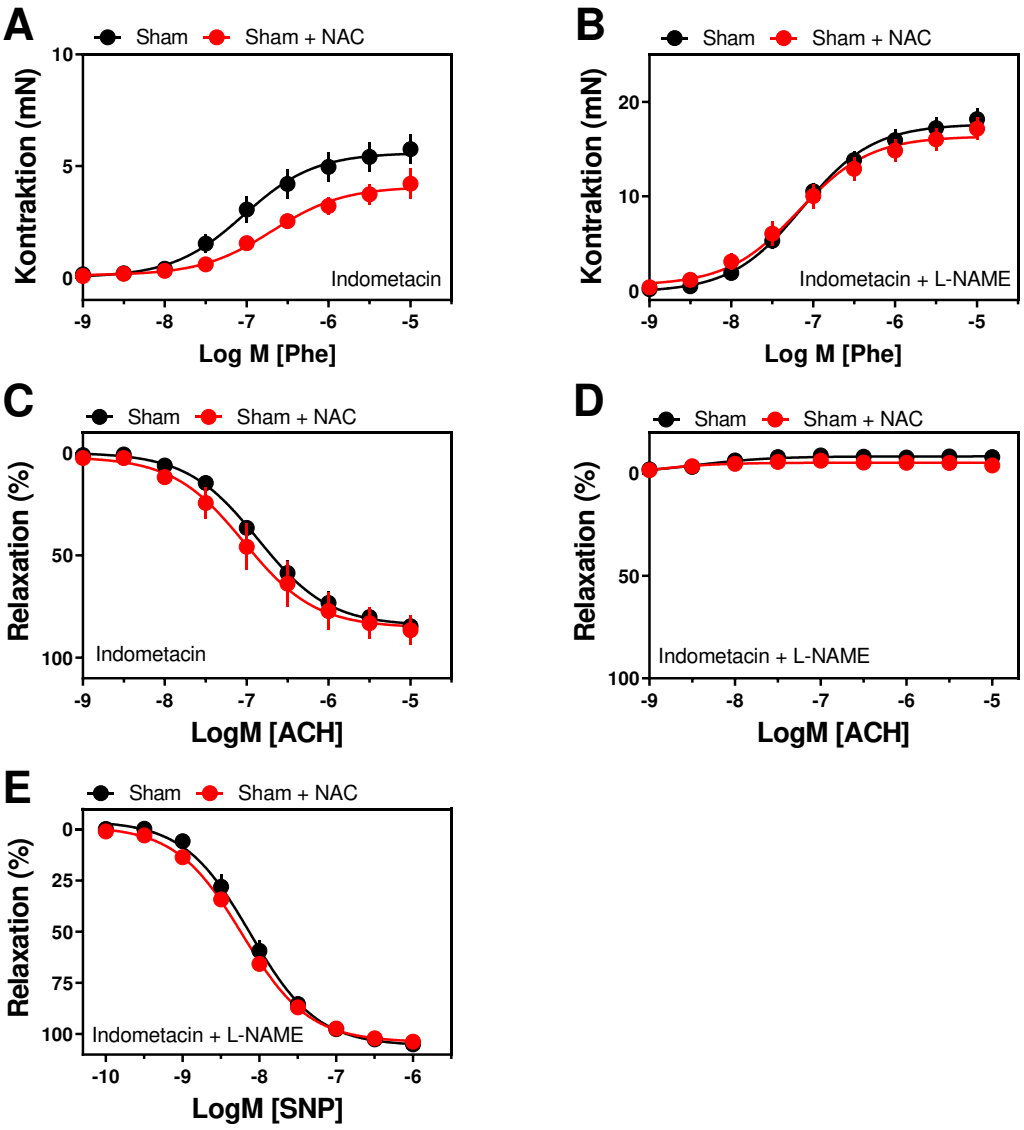



**Abb. 10: Einfluss des N-Acetylcysteins (NAC) auf die Gefäßfunktion von Sham-Wildtypen**
Mittels Organbads wurde die Gefäßfunktion der Aortenringe von Sham-WT (schwarz, n = 10) und Sham-WT, die mit NAC behandelt wurden (rot, n = 4), gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM; Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM; Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.6 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion in globalen eNOS-KO-Mäusen

Es wurde in vier eNOS-KO-Mäusen eine chronische Anämie (CA-eNOS) induziert. Die Gefäßfunktion der anämischen Tiere wird in Abb. 11 mit der Funktion unbehandelter eNOS-KO (Sham-eNOS) verglichen. Die Phe-DWK beider Gruppen sind in Abb. 11 A dargestellt. Die maximale Kontraktion der unbehandelten Gruppe betrug 10,55 ± 0,22 mN und war damit gleich groß wie die Maximalkontraktion der chronisch anämischen Gruppe mit 11,86 ± 0,83 mN ($p = 0,10$). Des Weiteren fand sich eine nicht signifikante Rechtsverschiebung ($p = 0,06$) der anämischen Gruppe (pEC50 = 6,11 ± 0,10) im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe (pEC50 = 6,39 ± 0,09). Eine Inkubation mit L-NAME hatte keinen messbaren Unterschied zur Folge (siehe Abb. 11 B). Das ACh-Antwortverhalten der Gefäße ist in Abb. 11.C dargestellt. Weder die Gefäße der unbehandelten noch die Gefäße der anämischen Gruppe dilatierten in Anwesenheit von ACh. Die maximale Dilatation war in beiden Gruppen < 0 (Sham-eNOS = -10,63 ± 3,12 %; CA-eNOS = -11,67 ± 1,76 %; $p = 0,81$). Die Inkubation mit L-NAME beeinflusste das Relaxationsverhalten beider Gruppen nicht (Sham-eNOS = 5,63 ± 1,99 %; CA-eNOS = 12,74 ± 2,75 %; $p = 0,06$). Panel E in Abb. 11 zeigt die SNP-DWK beider Gruppen. Für die pEC50-Werte der beiden Gruppen (Sham-eNOS = 7,67 ± 0,05; CA-eNOS = 8,26 ± 0,06) wurde ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) ermittelt. Trotz der veränderten Sensitivität bestand kein Unterschied bezüglich der maximalen Relaxation (Sham-eNOS = 108,23 ± 2,50 %; CA-eNOS = 109,93 ± 3,15 %; $p = 0,68$). Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass die chronische Anämie in eNOS-KO eine isolierte Linksverschiebung der SNP-DWK induziert hat.

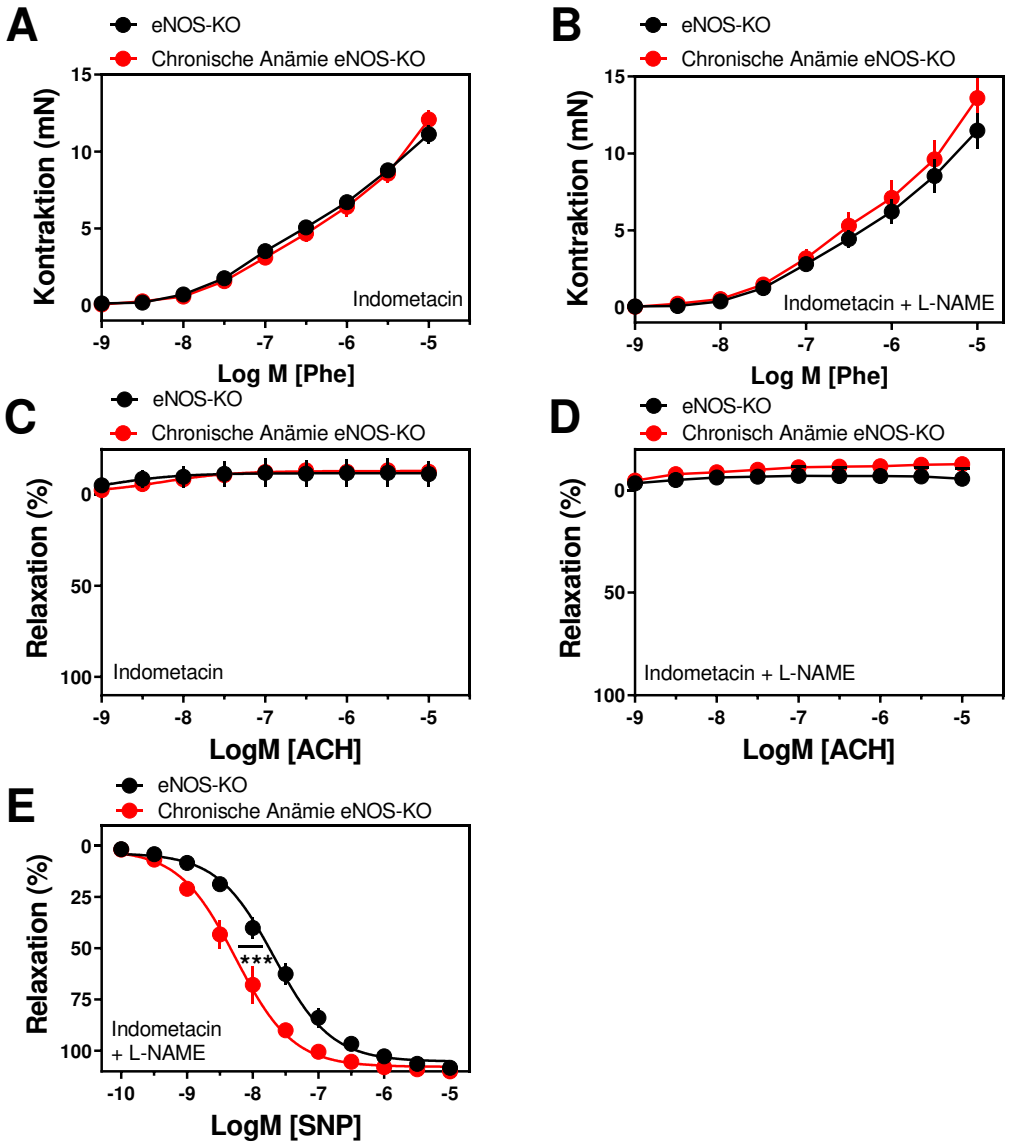



**Abb. 11: Auswirkung der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von eNOS-Knockout-Mäusen (eNOS-KO)**
Aortenringe wurden aus chronisch anämischen eNOS-KO (rot, n = 4) und unbehandelten eNOS-KO (schwarz, n = 6) isoliert, um die Gefäßfunktion mittels Organbad zu quantifizieren. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert (*** für $p < 0{,}001$). Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.7 Einfluss der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion nach Deletion der endothelialen Arginase I

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erläutert, wurde die Genexzision der endothelialen Arginase I in fünf $Cre^{+/+}$-Mäusen durch Tamoxifen erreicht (EC-ArgI-KO). Neben dieser Gruppe wurden fünf $Cre^{-/-}$-Mäuse mit Tamoxifen behandelt. In dieser Gruppe wurde aufgrund des Fehlens des Cre-Enzyms keine Exzision der Arginase I erreicht. Daher handelt es sich bei diesen Mäusen faktisch um Tamoxifen-behandelte Wildtypen. Sie werden daher im Folgenden als Kontrolle-TF bezeichnet. In beiden Gruppen wurde eine akute Anämie induziert und im Anschluss die Reaktivität der Gefäße bestimmt. In Panel A der Abb. 12 werden die Phe-DWK beider Gruppen veranschaulicht. Mit einer maximalen Kontraktion von 6,37 ± 0,56 mN erreichen die EC-ArgI-KO ähnliche Werte wie die Kontrollgruppe (Kontrolle-TF = 5,35 ± 0,49 mN; p = 0,21). Der p-Wert, der für pEC50 der Kontrollgruppe (6,81 ± 0,08) und EC-ArgI-KO (6,79 ± 0,10) ermittelt wurde, lag bei 0,86. Auch nach der Inkubation mit L-NAME zeigte sich kein statistischer Unterschied bezüglich der Sensitivität (pEC50 (Kontrolle-TF) = 7,16 ± 0,09; pEC50 (EC-Arg I-KO) = 7,22 ± 0,09; p = 0,64). Nach der Inkubation betrug die maximale Kontraktion 17,14 ± 1,22 mN in der Kontrollgruppe und 18,10 ± 1,41 mN in den EC-Arg I-KO (p = 0,62). Panel C zeigt die ACh-DWK in Abwesenheit von L-NAME. Die Segmente der Kontrollgruppe dilatierten um bis zu 68,29 ± 2,5 %. Die EC-ArgI-KO ließen mit einer maximalen Relaxation von 64,47 ± 4,57 % vergleichbare Werte erkennen (p = 0,60). Auch bezüglich der pEC50-Werte wiesen die Kontrolle (6,47 ± 0,08) und die EC-ArgI-KO (6,65 ± 0,15) keine statistische Abweichung auf (p = 0,32). Wie aus Panel D in Abb. 12 hervorgeht, führte die Inkubation in beiden Gruppen zu einem Ausbleiben der ACh-vermittelten Relaxation. Bezüglich des SNP-Antwortverhaltens wurde weder für die Maximalrelaxation (Kontrolle-TF = 100,01 ± 2,44 %; EC-ArgI-KO = 104,1 ± 1,22 %; p = 0,15) noch für die Sensitivität (pEC50 (Kontrolle-TF) = 7,94 ± 0,06; pEC50 (EC-ArgI-KO) = 8,00 ± 0,03; p = 0,35) ein signifikanter Unterschied ermittelt (Abb. 12 E). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion der endothelialen Arginase im akuten Anämiemodell keinen signifikanten Einfluss auf die Gefäßfunktion der Tiere hatte.

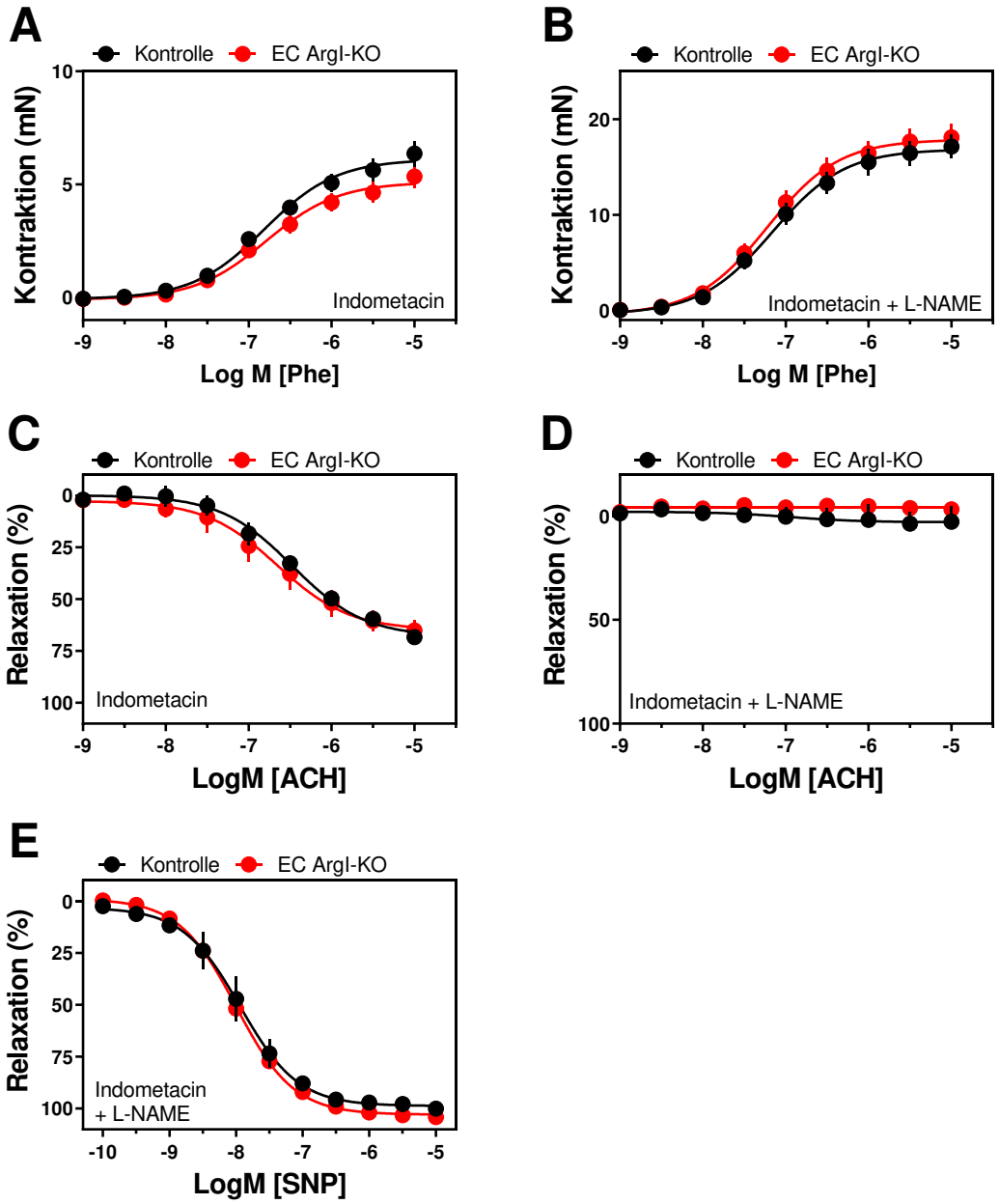



**Abb. 12: Einfluss der Deletion der endothelialen Arginase I auf die Gefäßfunktion im akuten Anämiemodell**

Im Organbad wurde nach Induktion der akuten Anämie in mit Tamoxifen behandelten Kontrollen ($Cre^{-/-}$, schwarz, n = 5) und in Mäusen, die nach Injektion von Tamoxifen eine Deletion der endothelialen Arginase I ($Cre^{+/+}$, EC-ArgI-KO, rot, n = 5) aufwiesen, die Gefäßfunktion gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.8 Einfluss der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion nach Deletion der endothelialen Arginase I

Analog zu Kapitel 3.1.7 werden die $Cre^{+/+}$-Mäuse als EC-ArgI-KO bezeichnet und die $Cre^{-/-}$-Mäuse als Kontroll-TF. Pro Gruppe durchliefen fünf Tiere das chronische Anämieprotokoll. Die Messdaten der im Anschluss erhobenen Gefäßfunktion sind in Abb. 13 dargestellt. Graph A in Abb. 13 veranschaulicht das adrenerge Antwortverhalten beider Gruppen. Für die pEC50 wurden für die Kontrollgruppe (6,86 ± 0,12) und EC-ArgI-KO (6,88 ± 0,11) vergleichbare Werte ermittelt (p = 0,91). Die Segmente der Kontrollgruppe erreichten bei 10 µM Phe eine maximale Kontraktion von 6,29 ± 0,71 mN. Mit 6,87 ± 0,59 mN erzielten die EC-Arg I-KO einen vergleichbaren Wert (p = 0,55). In Abb. 13 .B ist die Phe-DWK der Gefäße nach Inkubation mit L-NAME dargestellt. Sowohl für die Maximalkontraktion (Kontrolle-TF = 15,8 ± 0,93 mN; EC-ArgI-KO = 16,66 ± 0,75 mN; p = 0,49) als auch für die Sensitivität (pEC50 (Kontrolle-TF) = 7,22 ± 0,1; pEC50 (EC-ArgI-KO) = 7,24 ± 0,07; p = 0,87) ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die ACh-DWK sind in Graph C dargestellt. Die Sensitivität beider Gruppen (pEC50 (Kontrolle-TF) = 6,91 ± 0,1; pEC50 (EC-ArgI-KO) = 6,72 ± 0,11) unterschied sich nicht signifikant (p = 0,24). Die maximale Relaxation der EC-ArgI-KO (73,75 ± 6,56 %) war mit der Maximalrelaxation der Kontrollgruppe (76,93 ± 4,33 %; p = 0,70) vergleichbar. Die Inhibition der eNOS führte in beiden Gruppen dazu, dass die ACh-vermittelte Relaxation ausblieb (Kontrolle-TF = -2,03 ± 3,79 %; EC-ArgI-KO = -1,41 ± 1,28 %; p-Wert = 0,86). Graph E in Abb. 13 repräsentiert die endothelunabhängige Vasorelaxation durch SNP. Der pEC50-Wert der Kontrolle (7,76 ± 0,03) wich nicht vom pEC50-Wert der EC-ArgI-KO ab (7,68 ± 0,04; p = 0,16). Bezüglich der maximalen Dilatation waren keine Unterschiede messbar (Kontrolle = 107,34 ± 1,42 %; EC-ArgI-KO = 109,36 ± 3,57 %; p = 0,62). In Summe deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Deletion der endothelialen Arginase im chronischen Anämiemodell keinen signifikanten Einfluss auf die Gefäßfunktion der Tiere hatte.

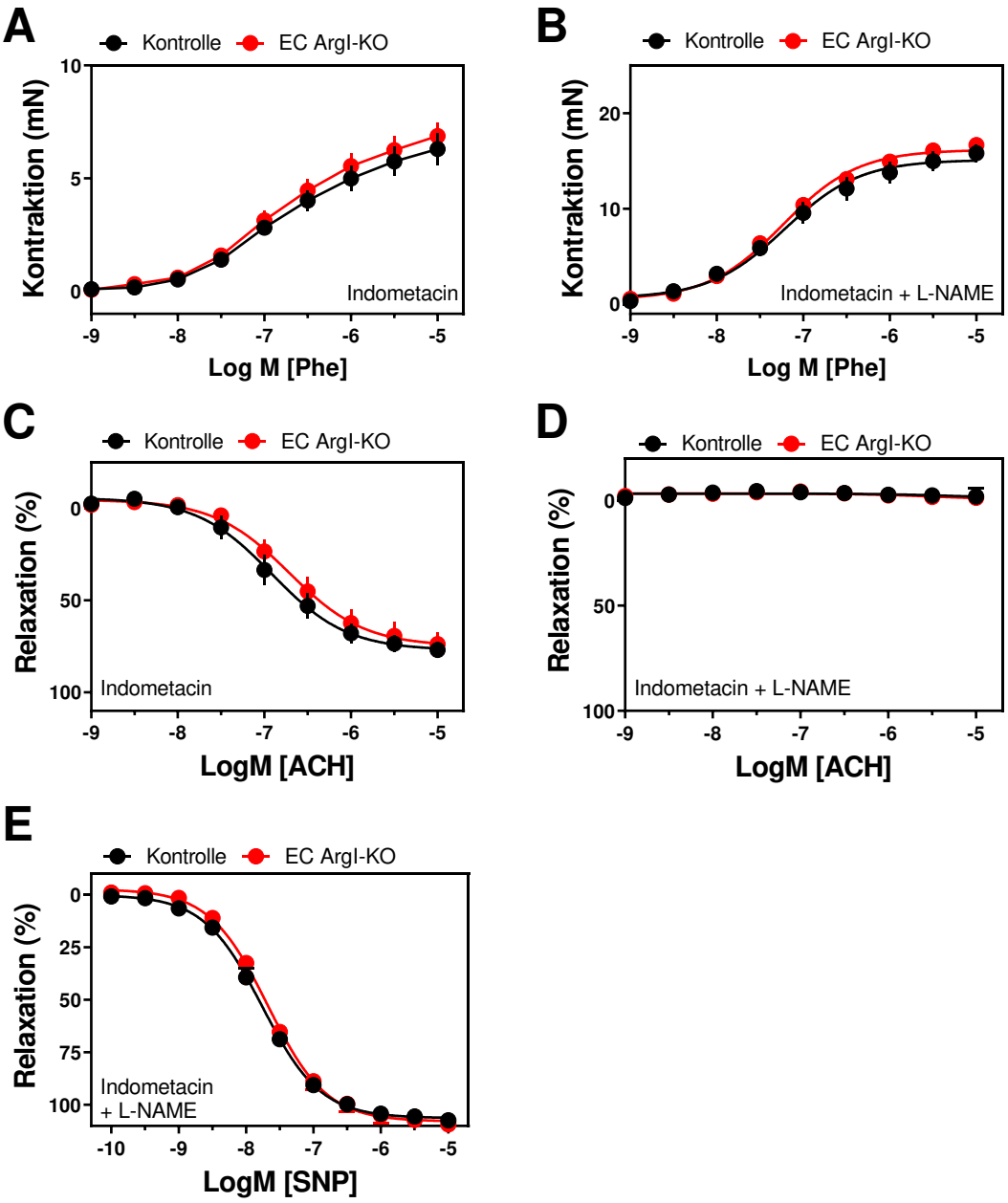



**Abb. 13: Einfluss der Deletion der endothelialen Arginase I auf die Gefäßfunktionen im chronischen Anämiemodell**

Im Organbad wurden nach Induktion der chronischen Anämie in mit Tamoxifen behandelten Kontrollen ($Cre^{-/-}$, schwarz, n = 5) und in Mäusen, die nach Injektion von Tamoxifen eine Deletion der endothelialen Arginase I ($Cre^{+/+}$, EC-ArgI-KO, rot, n = 5) aufwiesen, die Gefäßfunktionen gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren gemessen: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.1.9 Einfluss des Arginaseinhibitors nor-NOHA auf die Gefäßfunktion im akuten Anämiemodell

Sechs akut anämische Mäuse wurden entsprechend dem in Unterkapitel 2.4.5 beschriebenen Protokoll mit N-Hydroxy-nor-Arginin (nor-NOHA) behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Die roten Graphen repräsentieren die Gefäßfunktionen der akut anämischen Mäuse (AA) vor der Inkubation mit dem Arginaseinhibitor. Die hellblauen Graphen stellen die Gefäßfunktionen derselben Segmente nach der Inkubation mit nor-NOHA (AA+ nor-NOHA) dar. Panel A zeigt die Phe-DWK der beiden Gruppen. Vor der Inkubation erreichten die Segmente der WT-Mäuse eine maximale Kontraktion von 7,87 ± 1,12 mN und nach der Inkubation einen Wert von 7,20 ± 0,75 mN (p = 0,63). Der pEC50 betrug vor der Inkubation 7,06 ± 0,17 und nach der Inkubation 6,98 ± 0,12 (p = 0,71). In Abb. 14 B sind die ACh-DWK beider Gruppen aufgeführt. In Abwesenheit von nor-NOHA wurde eine maximale Relaxation von 67,66 ± 4,87 % gemessen. Nach der Inkubation nahm die maximale Relaxation der Gefäße auf 52,87 ± 2,84 % ab (p = 0,03). Durch die Inkubation mit dem Arginaseinhibitor wurde die ACh-Sensitivität der Gefäße nicht beeinflusst (pEC50 (AA) = 6,59 ± 0,08; pEC50 (AA + nor-NOHA) = 6,51 ± 0,07, p = 0,47).

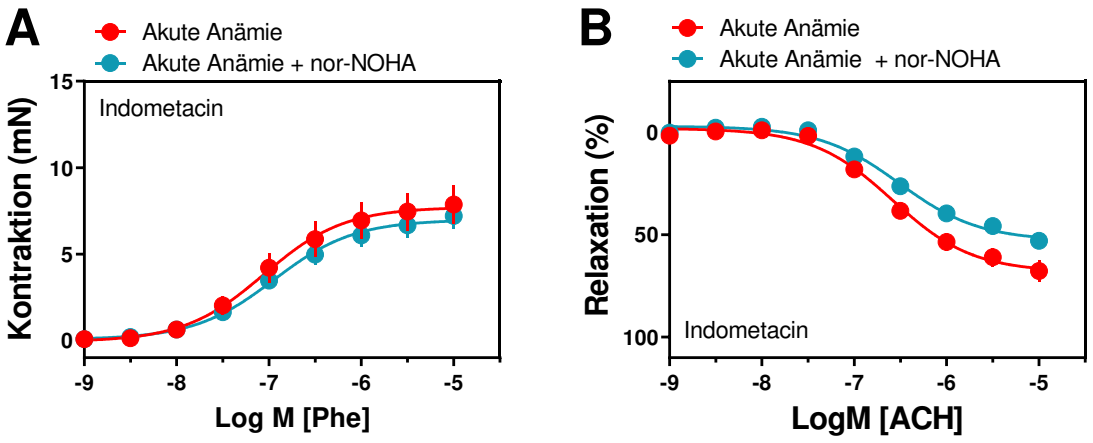



**Abb. 14: Gefäßfunktionen akut anämischer Wildtyp-Mäuse vor und nach der Inkubation mit dem Arginaseinhibitor nor-NOHA.**
Die Gefäßfunktionen akut anämischer WT-Mäuse wurden vor der Inkubation mit 100 µM nor-NOHA (rot) und nach der Inkubation (blau) im Organbad gemessen. In Panel A ist die Kontraktion im Zuge steigender Phenylephrin-Konzentrationen (1 nM–10 µM) dargestellt. Panel B repräsentiert die ACh-vermittelte Relaxation (1 nM–10 µM). Panel A und B in Anwesenheit von Indometacin (10 µM). Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern (* für p < 0,05) markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben (n = 6).

## 3.2 Inkubationsexperimente im Rahmen der Protokolletablierung

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse der Inkubationsexperimente beschrieben. Wie bereits in Kapitel 2.6 erwähnt, wurde aufgrund geringer n-Zahlen eine orientierende Auswertung vorgenommen. Dementsprechend ist die wissenschaftliche Aussagekraft dieser Daten deutlich limitiert. Im Rahmen der orientierenden Auswertung wurden die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze mit einem Referenzwert verglichen. Dieser Referenzwert entspricht der basalen Gefäßfunktion, die als Gefäßfunktion unbehandelter WT-Mäuse definiert wurde. Da ausschließlich das beste Segment einer Maus gewertet wurde, ergab sich für die maximale Relaxation ein Wert von 95,85 ± 2,98 %. Im weiteren Verlauf wird die maximale Relaxation als Basalwert II (BW II) bezeichnet. Für die maximale Kontraktion wurde ein Wert von 4,15 ± 0,85 mN ermittelt. Die maximale Kontraktion wird im Folgenden als Basalwert I (BW I) bezeichnet. Die Ergebnisse der Inkubationsexperimente sind in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Panel A repräsentiert die maximale Kontraktion (in mN) nach Applikation von 10 µM Phe. Panel B gibt die maximale Relaxation (in %) bei einer ACh-Konzentration von 10 µM an.

### 3.2.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktion

Im Folgenden wird der Einfluss der RBK auf die Gefäßfunktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit näher betrachtet. Die Segmente der Sham-Mäuse, deren Gefäßfunktionen unmittelbar nach der Präparation gemessen wurden, werden im Folgenden als $T_{0h}$ bezeichnet und entsprechen der basalen Gefäßfunktion. Graph A der Abb. 15 zeigt die maximale Kontraktion bei einer Phenylephrin-Konzentration von 10 µM. Die erreichte Kontraktion ist auf der Ordinatenachse in mN gegen die verschiedenen Inkubationszeiten auf der Abszissenachse aufgetragen. Verglichen mit BW I (4,15 ± 0,85 mN) wurde die Maximalkontraktion durch eine zweistündige Inkubation (4,11 ± 0,75 mN) nicht beeinflusst ($p = 0,98$). Mit einer zunehmenden Inkubationsdauer stieg die Kontraktionsamplitude signifikant. Die Segmente, die über sechs Stunden inkubiert worden waren, wiesen eine maximale Kontraktion von 7,46 ± 0,94 mN auf ($p = 0,03$). Mit einer Maximalkontraktion von 11,17 ± 2,89 mN wichen die Segmente, die für 16 Stunden inkubiert worden waren, ebenfalls signifikant vom BW I ab ($p = 0,01$). Panel B repräsentiert die maximale endothelabhängige Relaxation nach Applikation von ACh (10 µM). Nach einer Inkubationszeit von zwei

Stunden wurde eine Relaxation von über 80 % ($T_{2h}$ = 84,78 ± 21,85 %) erreicht. Demzufolge wich die Relaxationsfähigkeit des Endothels nach einer zweistündigen Inkubation nicht vom BW II (95,85 ± 2,98; p = 0,31) ab. Nach einer sechsstündigen Inkubation erreichten die Segmente eine Maximalrelaxation von 49,98 ± 8,82 %. Im Vergleich mit dem BW II stellt dies eine hoch signifikante Abnahme (p = 0,0001) dar. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden betrug die maximale Relaxation 2,3 ± 5,98 % und wich damit ebenfalls hoch signifikant vom BW II ab. Die Daten deuten darauf hin, dass eine Inkubation mit gesunden RBK nach sechs Stunden zu Veränderungen der Gefäßfunktionen führt. Ob diese Veränderungen auf die RBK, das Lösungsmittel oder die Zeit selbst zurückzuführen sind, geht aus diesen Daten indes nicht hervor.

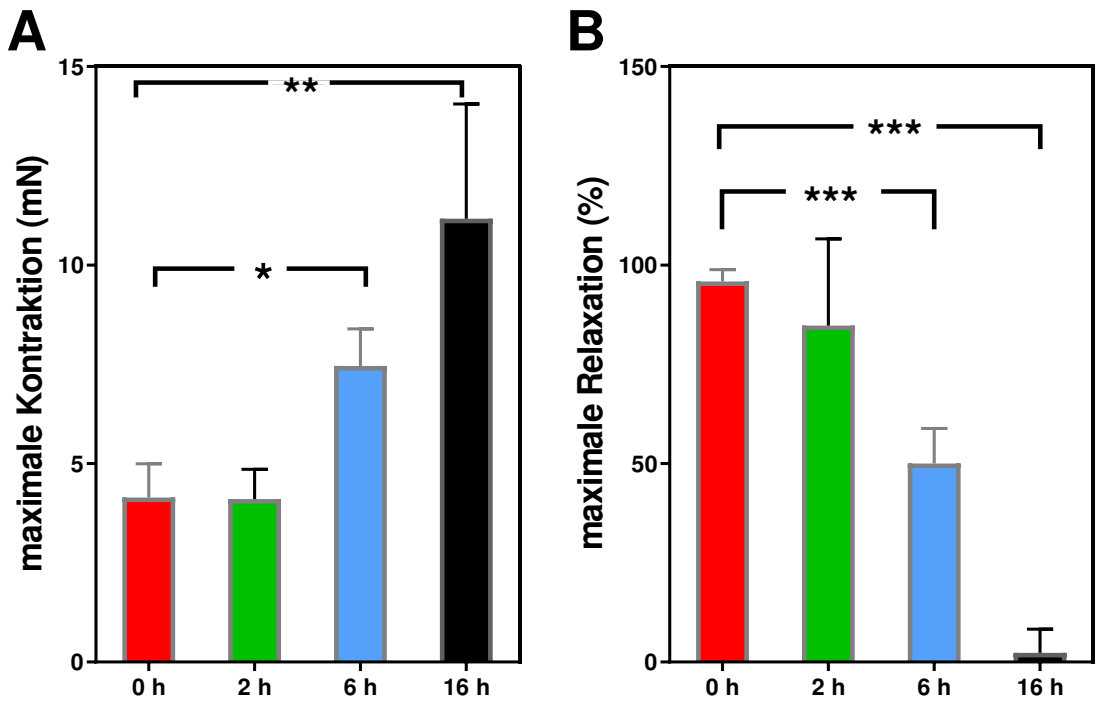



**Abb. 15: Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktionen der WT-Mäuse**
Aortenringe wurden aus WT-Mäusen isoliert und mit RBK von gesunden Probanden, die mittels KH-Puffer diluiert wurden (40 % Hkt.), inkubiert. Die maximale Relaxation (c(ACh)= 10 µM, Panel B) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (10 µM, Panel A) nach einer Inkubationszeit von null (rot, n = 10), zwei (grün, n = 2), sechs (blau, n = 5) und 16 (schwarz, n = 2) Stunden (h) im Organbad gemessen. Panel A und B in Anwesenheit von Indometacin (10 µM). Signifikante Abweichungen von der basalen Gefäßfunktion sind mit einem Stern (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001) markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.2.2 Einfluss einer zweistündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion

Im folgenden Abschnitt wird die Gefäßfunktion der Segmente nach einer zweistündigen Inkubation in Abhängigkeit vom Gesundheitszustand der Spender beschrieben. In Abb. 16 sind die Kontraktion (Panel A) und Relaxation (Panel B) gegen die unterschiedlichen *Patientenkohorten* der Abszissenachse aufgetragen. Aufgrund niedriger n-Zahlen (siehe Tabelle 8) konnte kein t-Test durchgeführt werden. Die Maximalkontraktion des Segments, das mit RBK von einem Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2) inkubiert worden war, betrug 2,85 mN. Das Segment, das mit RBK von dem anämischen Probanden inkubiert worden war, kontrahierte auf 3,1 mN. Für die Segmente, die mit RBK von gesunden Probanden inkubiert worden waren, ergab sich ein Maximalwert von 4,11 ± 0,75 mN.

Das Segment, das mit RBK von dem Probanden mit DMT2 inkubiert worden war, dilatierte um bis zu 79 %. Das Segment, das mit RBK von dem Probanden mit Anämie inkubiert worden war, erreichte eine maximale Relaxation von 87,27 %. Damit zeigten die Segmente, die mit RBK von kardiovaskulär vorerkrankten Probanden inkubiert worden waren, eine vergleichbare Maximalrelaxation wie die Segmente, die mit RBK von gesunden Probanden inkubiert worden waren (84,78 ± 21,85 %), auf. Obwohl kein t-Test durchgeführt wurde und damit keine statistisch belastbaren Daten vorliegen, lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Gesundheitszustand der Probanden nach einer zweistündigen Inkubation keinen Einfluss auf die Gefäßfunktion hatte.

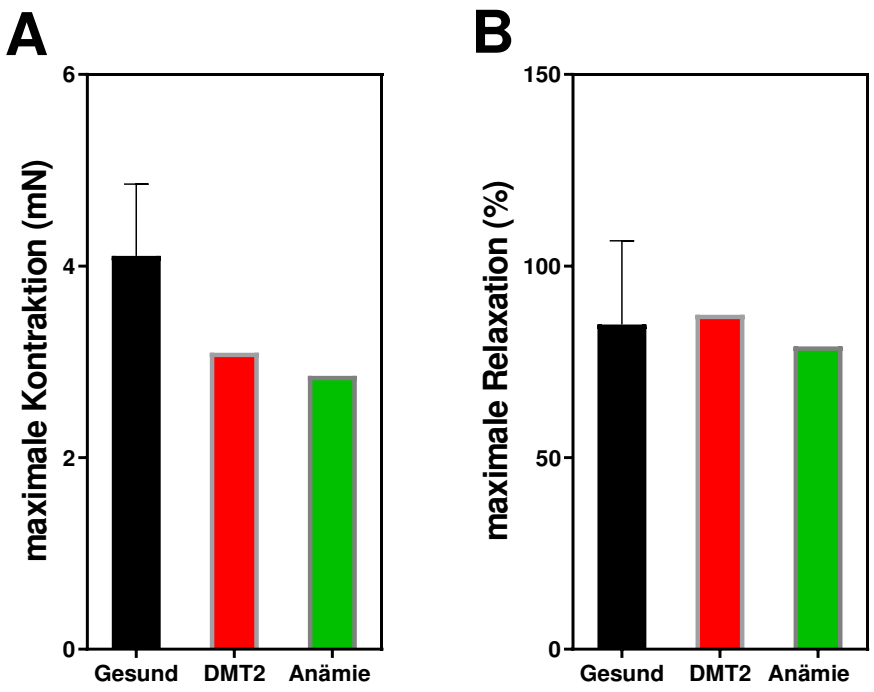



**Abb. 16: Einfluss der RBK auf die Gefäßfunktion nach einer zweistündigen Inkubation**
Aortenringe wurden aus Wildtypen isoliert. Die Gefäßfunktionen der Segmente, die für zwei Stunden mit RBK von gesunden Probanden (schwarz, n = 2), Probanden mit Diabetes mellitus Typ 2 (DMT2, rot; n = 1) oder Anämie (grün, n = 1) inkubiert worden waren, wurden im Organbad gemessen. Die maximale Relaxation (c(ACh)= 10 µM, Panel B) und Kontraktion (c(Phe)= 10 µM, Panel A) wurden in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) ermittelt. RBK wurden mittels KH-Puffer diluiert (40 % Hkt.). Werte der schwarzen Säule sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.2.3 Einfluss einer sechsstündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion

Im Folgenden werden die Gefäßfunktionen der Segmente beschrieben, die mit KH-Puffer, RBK von gesunden Probanden oder RBK von STEMI-Probanden über einen Zeitraum von sechs Stunden inkubiert wurden. Panel A in Abb. 17 repräsentiert die maximale Kontraktion (mN) bei einer Phe-Konzentration von 10 µM. Segmente, die ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert worden waren, erreichten eine maximale Kontraktion von 3,25 ± 0,45 mN. Segmente, die mit RBK von gesunden Probanden versetzt worden waren, erzielten eine maximale Kontraktion von 7,46 ± 0,94 mN und wichen damit signifikant ($p = 0,03$) vom BW I (4,15 ± 0,85 mN) ab. Segmente, die mit RBK von STEMI-Patienten inkubiert worden waren, erreichten eine maximale Kontraktion von 11,98 ± 2,65 mN. Der t-Test ergab eine hoch signifikante Abweichung ($p = 0,003$) vom BW I. Die ACh-bedingte Vasorelaxation der Gefäße ist in Panel B veranschaulicht. Segmente, die ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert worden waren, dilatierten um bis 92,17 ± 4,62 %. Damit ließen diese Segmente im Vergleich zu BW II (95,85 ± 2,98 %) keine Abnahme der Maximalrelaxation erkennen ($p = 0,62$). Die Segmente, die mit RBK von gesunden Probanden inkubiert worden waren, wiesen im Vergleich zum BW II eine verminderte Relaxationsfähigkeit von 49,98 ± 8,82 % auf ($p = 0,0001$). Auch bei den Segmenten der STEMI-Gruppe konnte mit einem Wert von -4,84 ± 7,16 % eine verminderte Relaxation festgestellt werden ($p < 0,0001$). Beim Vergleich der Segmente, die mit dem RBK von gesunden oder kardiovaskulär vorerkrankten Probanden (bzw. STEMI-Patienten) inkubiert worden waren, ergab die Auswertung eine signifikante Abweichung ($p = 0,04$). In Summe wird anhand dieser Daten deutlich, dass eine sechsstündige Inkubation mit RBK eine gesteigerte Kontraktilität und eine reduzierte Dilatation bewirkt. Dieser Effekt war bei Segmenten stärker ausgeprägt, die mit RBK von STEMI-Probanden inkubiert worden waren.

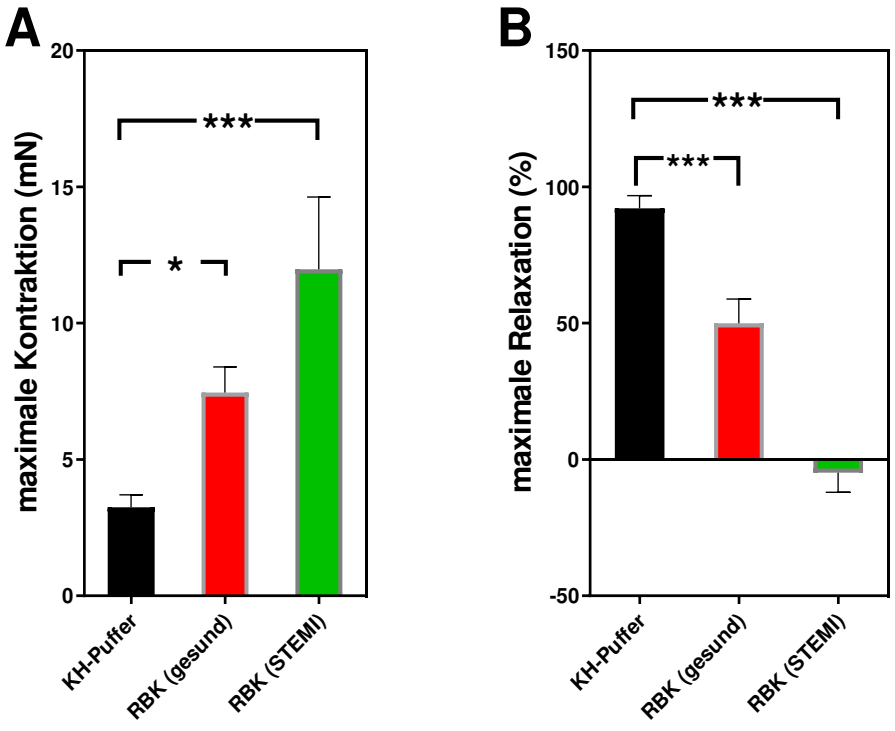



**Abb. 17: Einfluss der RBK auf die Gefäßfunktion in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus der Probanden nach sechsstündiger Inkubation**
Aortenringe wurden aus Wildtypen isoliert. Die Gefäßfunktionen der Segmente, die mit KH-Puffer (schwarz, n = 2), RBK von gesunden Spendern (rot, n = 5) oder RBK von STEMI-Patienten (grün, n = 4) über einen Zeitraum von sechs Stunden inkubiert worden waren, wurden im Organbad gemessen. Die maximale Relaxation (c(ACh)= 10 µM, Panel B) und die Kontraktion (c(Phe)= 10 µM; Panel A) wurden in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) ermittelt. RBK wurden mittels KH-Puffer diluiert (40 % Hkt.). Signifikante Abweichungen der Gefäßfunktion sind mit einem Stern markiert (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). Werte der einzelnen Gruppen sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.2.4 Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf die Gefäßfunktion

In Abb. 18 ist die Gefäßfunktion nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden in Form von Säulendiagrammen dargestellt. Die Inkubation erfolgte unter Einsatz einer Rührplatte. An der Abszissenachse kann abgelesen werden, welche Rotationsgeschwindigkeit (RG) an der Rührplatte eingestellt worden war. Diesbezüglich gilt es zu berücksichtigen, dass in den Gruppen 40 rpm und 50 rpm im Rahmen der Auswertung keine Aufteilung nach Wahl des Lösungsmittels (Medium oder Medium-KH-Puffer-Gemisch) erfolgte. Aufgrund der niedrigen n-Zahlen (1–2) wurde auf eine statistische Auswertung mittels t-Test verzichtet. Panel A repräsentiert die maximale Kontraktion der Segmente nach Applikation von Phe (10 µM). Das Segment, das bei 30 rpm inkubiert worden war, kontrahierte auf 5,8 mN. Für die

Segmente, die bei 40 rpm inkubiert worden waren, wurde eine maximale Kontraktion von 6,05 ± 1,87 mN ermittelt. Die Maximalkontraktion der Segmente, die bei 50 rpm inkubiert worden waren, betrug 6,16 ± 1,42 mN. Panel B repräsentiert die maximale Vasorelaxation bei einer ACh-Applikation von 10 µM. Das Segment, das bei einer RG von 30 rpm inkubiert worden war, zeigte eine Relaxation von 39,56 %. Die Segmente, die bei 40 rpm inkubiert worden waren, wiesen eine maximale Relaxation von 66,24 ± 3,31 % auf. Segmente, die bei 50 rpm inkubiert worden waren, dilatierten um bis zu 88,02 ± 0,14 %. Damit erzielten diese Segmente eine maximale Relaxation, die dem BW II (95,85 ± 2,98 %) am nächsten kommt. Anhand dieser Daten wird ersichtlich, dass die Endothelfunktion unter Verwendung mediumhaltiger Lösungsmittel auch nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden anteilig erhalten bleibt. Ferner deuten die Daten darauf hin, dass die RG während der Inkubation positiv mit der Endothelfunktion korreliert.

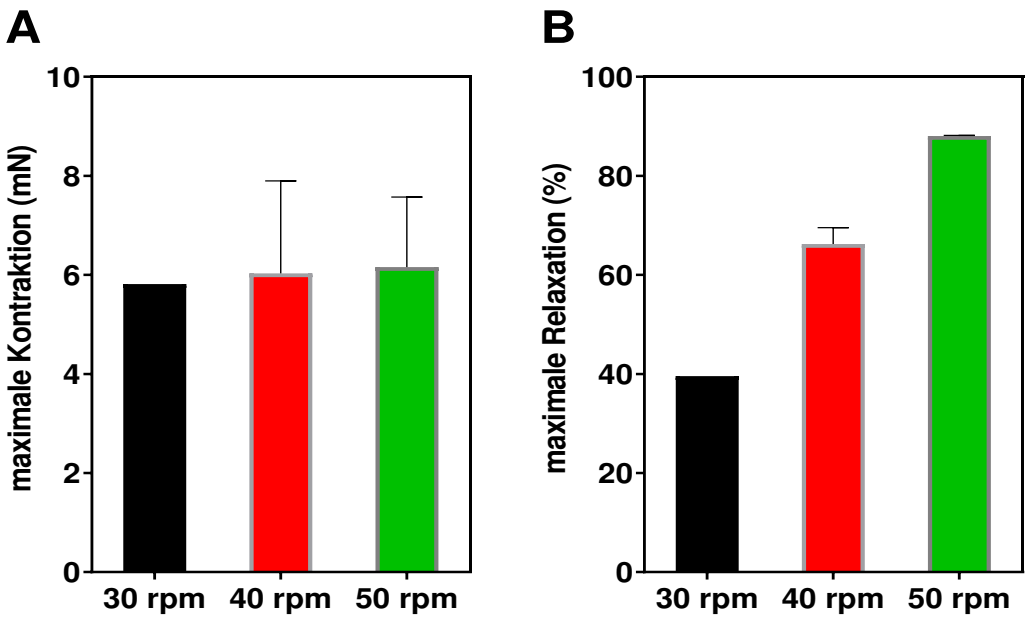



**Abb. 18: Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit (RG) auf die Gefäßfunktion**
Aortenringe wurden aus Wildtypen isoliert. Die Gefäßfunktionen der Segmente, die mit RBK von gesunden Spendern bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 30 rpm (schwarz, n = 1), 40 rpm (rot, n = 2) oder 50 rpm (grün, n = 2) für 16 Stunden inkubiert worden waren, wurden im Organbad gemessen. Die maximale Relaxation (c(ACh)= 10 µM, Panel B) und die Kontraktion (c(Phe)= 10 µM, Panel A) wurden in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) ermittelt. Die RBK wurden mithilfe eines KH-Puffer-Medium-Gemischs oder Mediums diluiert (40 % Hkt.). Werte der Gruppen, die bei 40–50 rpm inkubiert worden waren, sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.2.5 Einfluss des Lösungsmittels auf die Gefäßfunktion

Neben der Aufteilung anhand der verwendeten Rotationsgeschwindigkeit lassen sich die Daten der Ansätze des zweiten Unterpunktes (siehe Kapitel 2.5.2) auch nach der Wahl des Lösungsmittels aufteilen. Diese Aufteilung der Daten wurde bei Erstellung der Säulendiagramme in Abb.19 gewählt. In beiden Gruppen sind Segmente enthalten, die bei 40 rpm und 50 rpm inkubiert wurden. Aufgrund der niedrigen n-Zahlen (siehe Tabelle 11) wurde auf eine statistische Auswertung mittels t-Test verzichtet. In Diagramm A der Abb. 19 ist die maximale Kontraktion (mN) auf der Ordinatenachse gegen die verschiedenen Lösungsmittel aufgetragen. Segmente, die mit dem Medium KH-Puffer-Gemisch inkubiert worden waren, erreichten eine maximale Kontraktion von 7,74 ± 0,16 mN. Für Segmente, bei denen das Medium als Lösungsmittel für die RBK verwendet worden war, wurde eine maximale Kontraktion von 4,45 ± 0,29 mN ermittelt. Panel B in Abb. 19 repräsentiert die maximale Relaxation bei einer ACh-Konzentration von 10 µM. Segmente, die mit einem Medium inkubiert worden waren, dilatierten um bis zu 78,86 ± 9,3 %. Segmente, die mit dem KH-Puffer-Medium-Gemisch inkubiert worden waren, führten zu einer maximalen Relaxation von 75,40 ± 12,48 %.

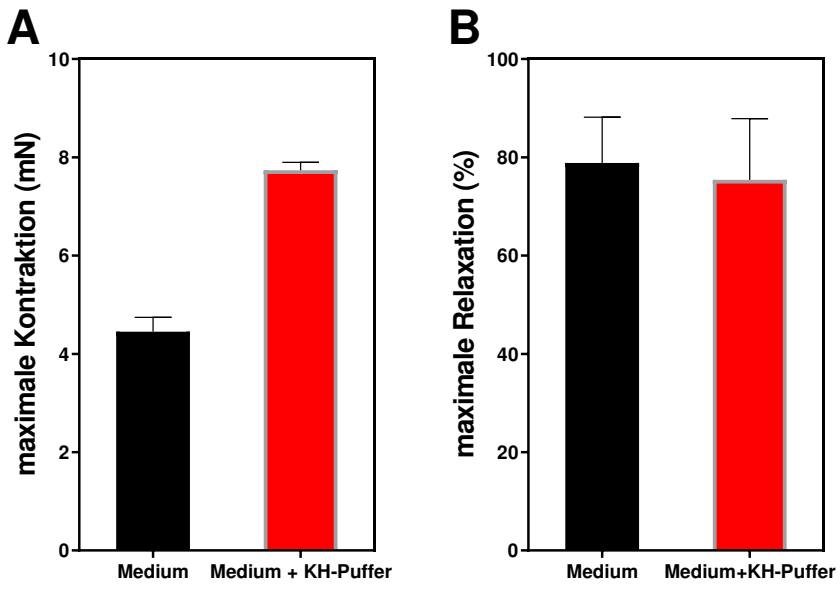



**Abb. 19: Einfluss des Lösungsmittels auf die Gefäßfunktion**
Aortenringe wurden aus Wildtypen isoliert. Die Segmente wurden für 16 Stunden mit RBK von gesunden Spendern, die mittels Mediums (schwarz, n = 2) oder KH-Puffer-Medium-Gemisch (rot, n = 2) auf einen Hämatokrit von 40 % diluiert worden waren, bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 40–50 rpm inkubiert. In Anwesenheit von Indometacin (10 µM) wurde die maximale ACh-induzierte Relaxation (10 µM, Panel B) in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (10 µM, Panel A) im Organbad gemessen. Werte der einzelnen Gruppen sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.2.6 Einfluss einer 16-stündigen Inkubation auf die Gefäßfunktion

In Abb. 20 sind die Gefäßfunktionen der Segmente, die für 16 Stunden, entweder mit RBK von gesunden Probanden (Kontrolle) oder RBK von STEMI-Probanden, inkubiert wurden, dargestellt. Als Lösungsmittel wurde das Medium KH-Puffer-Gemisch verwendet. Da die n-Zahl der Kontrolle 1 beträgt, war deren statistische Auswertung nicht möglich. Daher wurden Segmente, die mit RBK von STEMI-Probanden inkubiert worden waren, mit der zuvor beschriebenen basalen Gefäßfunktion verglichen. Die Segmente, die mit RBK von STEMI-Probanden inkubiert worden waren, erreichten bei Phe 10 µM eine maximale Kontraktion von 3,01 ± 0,86 mN. Demzufolge bestand kein signifikanter Unterschied zu BW I (4,15 ± 0,85 mN; p = 0,51). Das Segment, das mit RBK von dem gesunden Probanden inkubiert worden war, erzielte eine maximale Kontraktion von 4,74 mN. Im rechten Teil der Abb. 20 ist die ACh-induzierte Dilatation dargestellt. Nach der 16-stündigen Inkubation dilatierten die Segmente, die mit RBK von STEMI-Patienten inkubiert worden waren, um bis zu 87,87 ± 0,94 %. Damit wichen diese Segmente nicht signifikant (p = 0,18) vom BW II (95,85 ± 2,98 %) ab. Das Segment, das mit RBK von dem gesunden Spender inkubiert worden war, dilatierte um bis zu 87,88 %. Diese Daten lassen vermuten, dass die Inkubation mit RBK von STEMI-Probanden und einem Medium-KH-Puffer-Gemisch kaum Einfluss auf die Gefäßfunktion hatte. Diese Einschätzung ergibt sich daraus, dass die Gefäßfunktion dieser Segmente nach der Inkubation mit RBK annähernd der basalen Gefäßfunktion (BW I & II) entsprach.

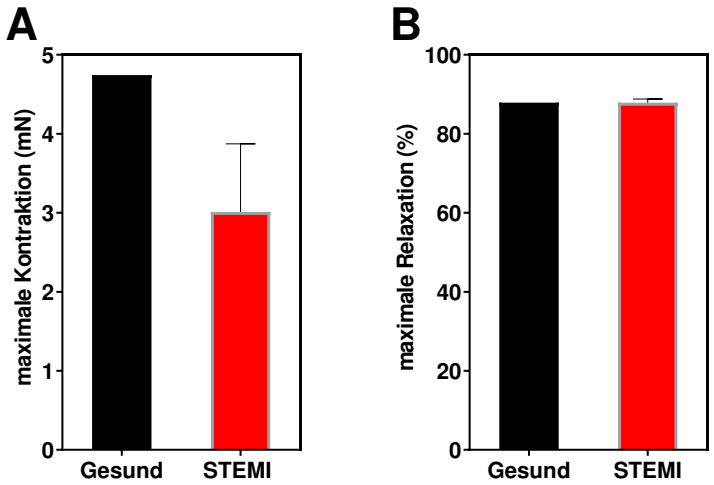



**Abb. 20: Einfluss der 16-stündigen Inkubation mit RBK auf die Gefäßfunktion in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus der Probanden**
Aortenringe wurden aus Wildtypen isoliert. Die Gefäßfunktionen der Segmente, die für 16 Stunden entweder mit RBK von gesunden Spendern (schwarz, n = 1) oder RBK von STEMI-Patienten (rot, n = 3) bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 50 rpm inkubiert worden waren, wurde mittels Organbad quantifiziert. In Anwesenheit von Indometacin (10 µM) wurde die maximale Relaxation (c(ACh)= 10 µM, Panel B) in den mit 10 µM Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (Panel A) gemessen. Die RBK-Pellets wurden mittels KH-Puffer-Medium-Gemisch auf einen Hämatokrit von 40 % diluiert. Werte der einzelnen Gruppen sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben.

## 3.3 Validierung der finalen Inkubationsbedingungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben, die der Überprüfung der finalen Inkubationsbedingungen dienen. Basierend auf den Ergebnissen der vorausgegangenen Ansätze wurde ein finales Protokoll entwickelt. Darin war vorgesehen, dass das RBK-Pellet mittels KH-Puffer diluiert wird, die Inkubationszeit sechs Stunden beträgt und eine Rührplatte (50 rpm) verwendet wird. Da diese Konditionen an einer ausreichend großen Probandenanzahl überprüft wurden, werden die Ergebnisse in Form von DWK dargestellt. Für die Auswertung gilt, dass die Segmente, die nur mit KH-Puffer inkubiert wurden, als Kontrolle (K) definiert werden.

### 3.3.1 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von jungen, gesunden Probanden

In Abb. 21 sind die Messwerte der Segmente, die mit RBK von jungen gesunden Probanden ($RBK_{<25J}$) inkubiert wurden, und die Messwerte der mit KH-Puffer inkubierten Segmente dargestellt. Die Inkubation mit RBK hatte keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten in Abwesenheit von L-NAME (Abb. 21 A). Die mit RBK inkubierten Segmente zeigten eine maximale Kontraktion von 2,92 ± 0,58 mN. Da die Kontrolle Werte von bis zu 2,25 ± 0,16 mN erreichte, war die Abweichung nicht signifikant (p = 0,33). Auch auf die Sensitivität hatten die RBK keinen signifikanten Einfluss ($pEC50(RBK_{<25J}) = 6,98 \pm 0,22$; $pEC50(K) = 6,50 \pm 0,07$; p = 0,08). Die Anwesenheit von L-NAME hatte zur Folge, dass die mit RBK inkubierten Segmente eine maximale Kontraktion von 15,21 ± 1,1 mN erzielten (Abb. 21 B). Damit wichen sie statistisch signifikant von der Kontrolle ab (10,47 ± 1,41 mN; p = 0,02). Ferner wurde eine signifikante Linksverschiebung der mit RBK inkubierten Segmente detektiert ($pEC50(RBK_{<25J}) = 7,31 \pm 0,16$; $pEC50(K) = 6,75 \pm 0,18$). Panel C repräsentiert die ACh-DWK beider Gruppen. Die mit RBK inkubierten Segmente dilatierten um bis zu 84,36 ± 6,39 %. Die Segmente, die ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert worden waren, zeigten vergleichbare Werte für die Maximalrelaxation (86,42 ± 6,36 %; p = 0,86). Die Inkubation mit RBK hatte keinen Einfluss auf die ACh-Sensitivität ($pEC50(RBK_{<25J}) = 7,24 \pm 0,16$; $pEC50(K) = 7,01 \pm 0,12$; p = 0,28). In beiden Gruppen blieb die ACh-vermittelte Relaxation nach Inkubation mit L-NAME aus (siehe Abb. 21 D). Das ermittelte SNP-Antwortverhalten ist in Panel E dargestellt. Die Segmente, die mit RBK inkubiert worden waren, zeigten eine maximale Relaxation von 108,5 ± 2,02 %. Damit bestand keine statistische Abweichung im Vergleich zur Kontrolle (103,42 ± 1,61 %; p = 0,09). Die Inkubation mit RBK hatte keinen Einfluss auf die SNP-Sensitivität ($pEC50(RBK_{<25J}) = 8,25 \pm 0,07$; $pEC50(K) = 8,40 \pm 0,04$; p = 0,13). Diese Daten deuten darauf hin, dass die RBK von jungen gesunden Spendern unter den angegebenen Konditionen kaum Einfluss auf die Gefäßfunktion hatten. Von dieser Beobachtung ausgenommen ist die Phe-induzierte Kontraktilität in Anwesenheit von L-NAME.

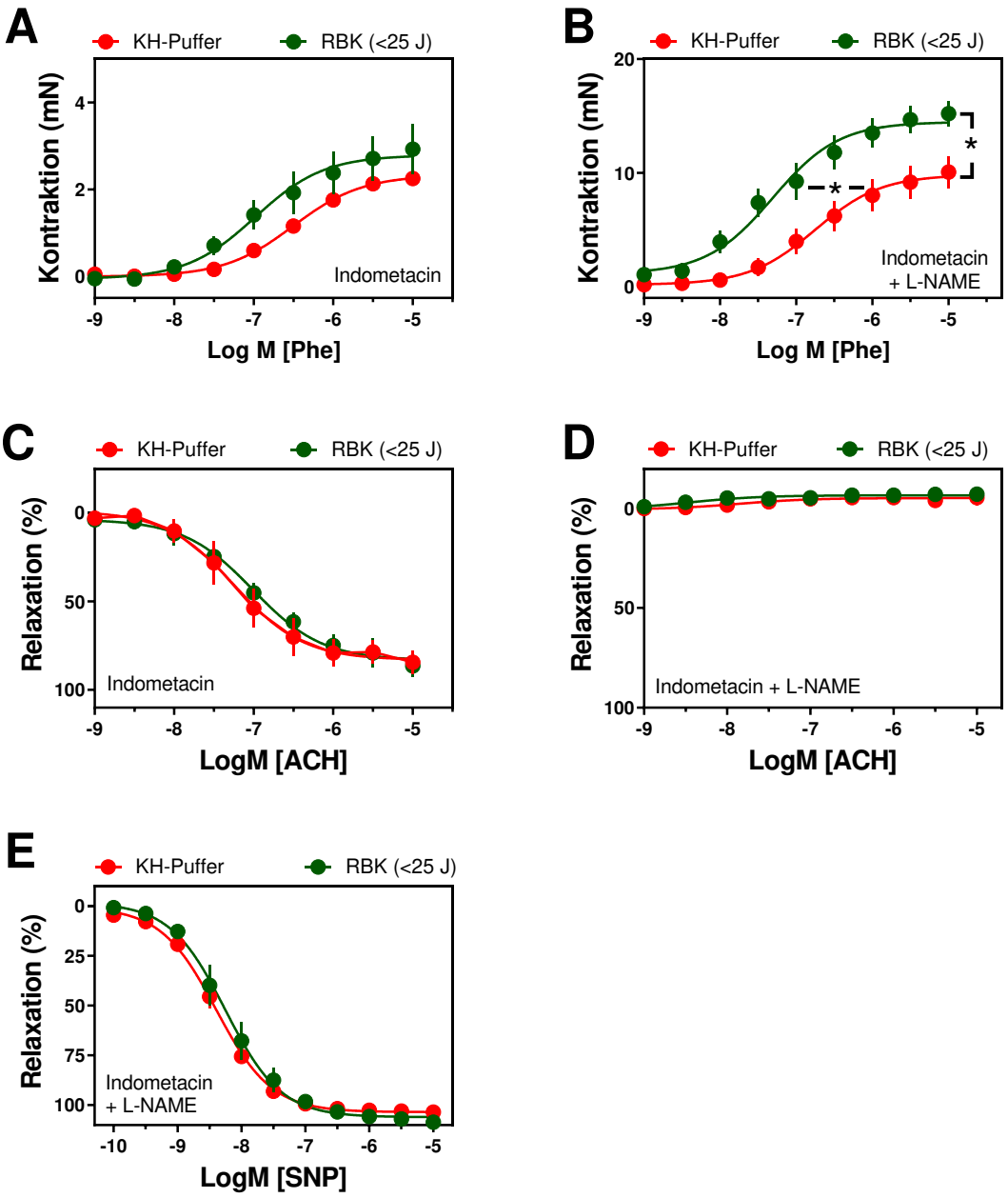



**Abb. 21: Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von jungen gesunden Probanden unter finalen Bedingungen.**
Aortenringe aus WT-Mäusen wurden für sechs Stunden bei 50 rpm mit KH-Puffer (Kontrolle, rot, n = 5) oder RBK von jungen, gesunden Probanden ($RBK_{<25J}$, grün, n = 6), die mittels KH-Puffer diluiert worden waren (Hkt. 40 %), inkubiert. Die Gefäßfunktionen wurden im Organbad gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren ermittelt: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern (* $p < 0,05$) markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.3.2 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von alten, gesunden Probanden

In Abb. 22 sind die Messwerte der mit KH-Puffer inkubierten Segmente (Kontrolle) sowie die Werte der Segmente, die mit RBK von gesunden alten Patienten inkubiert wurden, dargestellt. Diese Gruppe wird im Folgenden als *$RBK_{alt}$-Gruppe* bezeichnet und abgekürzt. In Panel A der Abb. 22 ist die Kontraktion im Zuge der Phe-Applikation dargestellt. Bei einer Phe-Konzentration von 10 µM wurde in der $RBK_{alt}$-Gruppe eine Kontraktion von 4,82 ± 1,23 mN gemessen. Damit wich sie nicht signifikant von der maximalen Kontraktion der Kontrolle ab (2,25 ± 0,16 mN; p = 0,07). Die Inkubation mit den RBK hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität (pEC50($RBK_{alt}$) = 6,93 ± 0,26; pEC50(K) = 6,50 ± 0,07; p = 0,15). Nach Inkubation mit L-NAME war kein signifikanter Unterschied messbar (siehe Abb. 22 B). Die $RBK_{alt}$-Gruppe wies eine Maximalkontraktion von 13,39 ± 1,07 mN auf. Damit kontrahierten diese Segmente ähnlich stark wie die Segmente der Kontrollgruppe (10,47 ± 1,41 mN; p = 0,10). Auch bezüglich der Sensitivität unterschieden sich die Segmente der Gruppen nicht signifikant (pEC50($RBK_{alt}$ = -7,11 ± 1,10; pEC50(K) = 6,75 ± 0,18; p = 0,1). Panel C repräsentiert die Vasorelaxation im Zuge der ACh-Applikation. Die $RBK_{alt}$-Gruppe erreichte mit einer maximalen Relaxation von 64,5 ± 4,49 % einen Wert, der signifikant niedriger (p = 0,02) war als der Wert der Kontrolle (86,42 ± 6,36 %). Im Hinblick auf die Sensitivität zeigte sich eine nicht signifikante Rechtsverschiebung der $RBK_{alt}$-Gruppe (pEC50 ($RBK_{alt}$) = 6,69 ± 0,15; pEC50(K) = 7,01 ± 0,12; p = 0,13). In Anwesenheit von L-NAME blieb die Dilatation in beiden Gruppen aus (Abb. 22 D). In Panel E sind die SNP-DWK beider Gruppen dargestellt. Die DWK der Segmente, die mit RBK inkubiert worden waren, ist signifikant nach rechts verschoben. Der pEC50-Wert der $RBK_{alt}$-Gruppe (7,68 ± 0,04) war signifikant höher als der Wert der Kontrolle (pEC50(K) = 8,4 ± 0,04; p < 0,0001). Bezüglich der maximalen Relaxation ($RBK_{alt}$ = 104,28 ± 1,34 %; K = 103,42 ± 1,61 %; p = 0,69) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die Inkubation mit RBK von gesunden alten Menschen hat im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion der ACh- und SNP-induzierten Dilatation bewirkt.

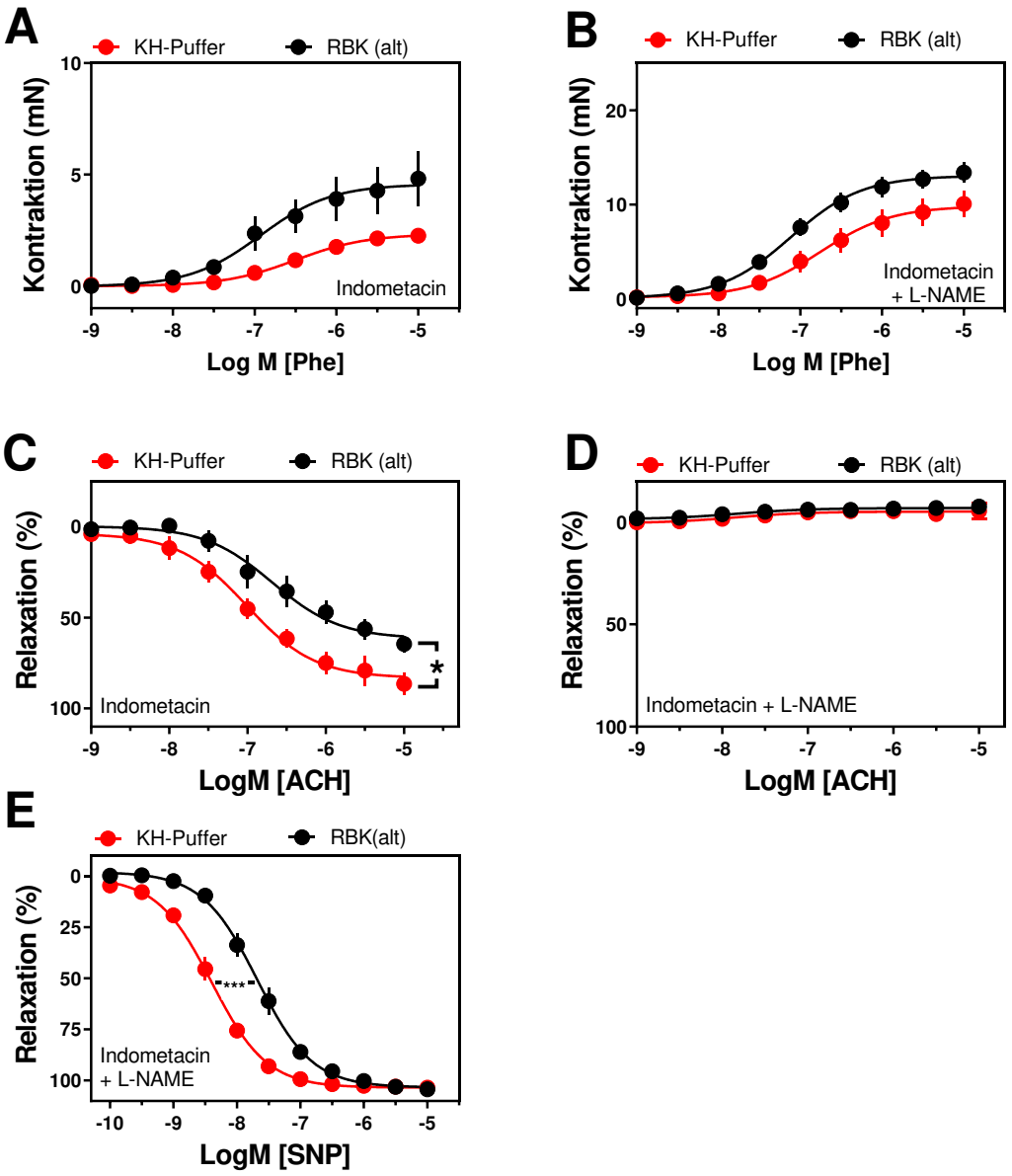



**Abb. 22: Gefäßfunktionen nach Inkubation mit RBK von gesunden alten Probanden unter finalen Bedingungen**

Aortenringe aus WT wurden für sechs Stunden bei 50 rpm mit KH-Puffer (Kontrolle, rot, n = 5) oder RBK von gesunden alten Probanden ($RBK_{alt}$, schwarz, n = 5), die mittels KH-Puffer diluiert worden waren (Hkt. 40 %), inkubiert. Die Gefäßfunktionen wurden im Organbad gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren ermittelt: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

### 3.3.3 Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von Probanden mit STEMI

Im folgenden Abschnitt werden die Segmente, die mit RBK von Patienten mit Myokardinfarkt stammen, als STEMI-Gruppe bezeichnet. Die Gefäßfunktion dieser Gruppe wird in Abb. 23 mit der Gefäßfunktion von Segmenten, die mit Puffer inkubiert wurden und als Kontrollgruppe (K) bezeichnet wird, verglichen. In Panel A der Abb. 23 wird das adrenerge Antwortverhalten in Form von DWK graphisch veranschaulicht. Die STEMI-Gruppe zeigte mit 6,28 ± 2,37 mN eine maximale Kontraktion, die mit Werten der Kontrolle (2,25 ± 0,16 mN) vergleichbar war (p = 0,1). Die Inkubation mit den RBK hatte keinen Einfluss auf die Sensitivität (pEC50 (STEMI) = 7,01 ± 0,41; pEC50(K) = 6,05 ± 0,18; p = 0,21). In Anwesenheit von L-NAME kontrahierten die Segmente der STEMI-Gruppe signifikant stärker als die Segmente, die nur mit KH-Puffer inkubiert worden waren (STEMI = 15,07 ± 1,19 mN; K = 10,47 ± 1,41 mN; p = 0,03). Der pEC50-Wert der STEMI-Gruppe (7,31 ± 0,1) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (6,75 ± 0,18) signifikant nach links verschoben (p = 0,04). Diese statistischen Abweichungen werden in Panel B der Abb. 23 durch Sterne (*) verdeutlicht. Wie bereits aus der Betrachtung von Panel C hervorgeht, unterscheiden sich die beiden Gruppen bezüglich der ACh-vermittelten Relaxation. Mit einer Maximalrelaxation von 67,33 ± 3,86 % wich die STEMI-Gruppe signifikant von der Kontrolle ab (86,42 ± 6,36 %; p = 0,048). Mithilfe des t-Tests wurde für die pEC50-Werte (pEC50 (STEMI) = 6,70 ± 0,1; pEC50(K) = 7,01 ± 0,12) ein p-Wert von 0,09 ermittelt. Durch die Inkubation mit L-NAME wurde die ACh-vermittelte Relaxation in beiden Gruppen unterdrückt (siehe Abb.23 D). Die in Panel E ersichtliche Rechtsverschiebung der SNP-DWK der STEMI-Gruppe ist hoch signifikant (p < 0,0001). Der pEC50 der STEMI-Gruppe war mit 7,58 ± 0,06 größer als der pEC50 der Kontrolle (8,4 ± 0,04). Bezüglich der maximalen Relaxation konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (p = 0,58). Die Segmente, die mit RBK von STEMI-Probanden inkubiert worden waren, dilatierten um 105,37 ± 2,94 % und die Segmente, die ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert worden waren, um 103,42 ± 1,61 %. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde die ACh- und SNP-induzierte Dilatation durch die Inkubation mit RBK von STEMI-Patienten reduziert. Zugleich wurde die Kontraktilität, die in Anwesenheit von L-NAME gemessen wurde, erhöht.

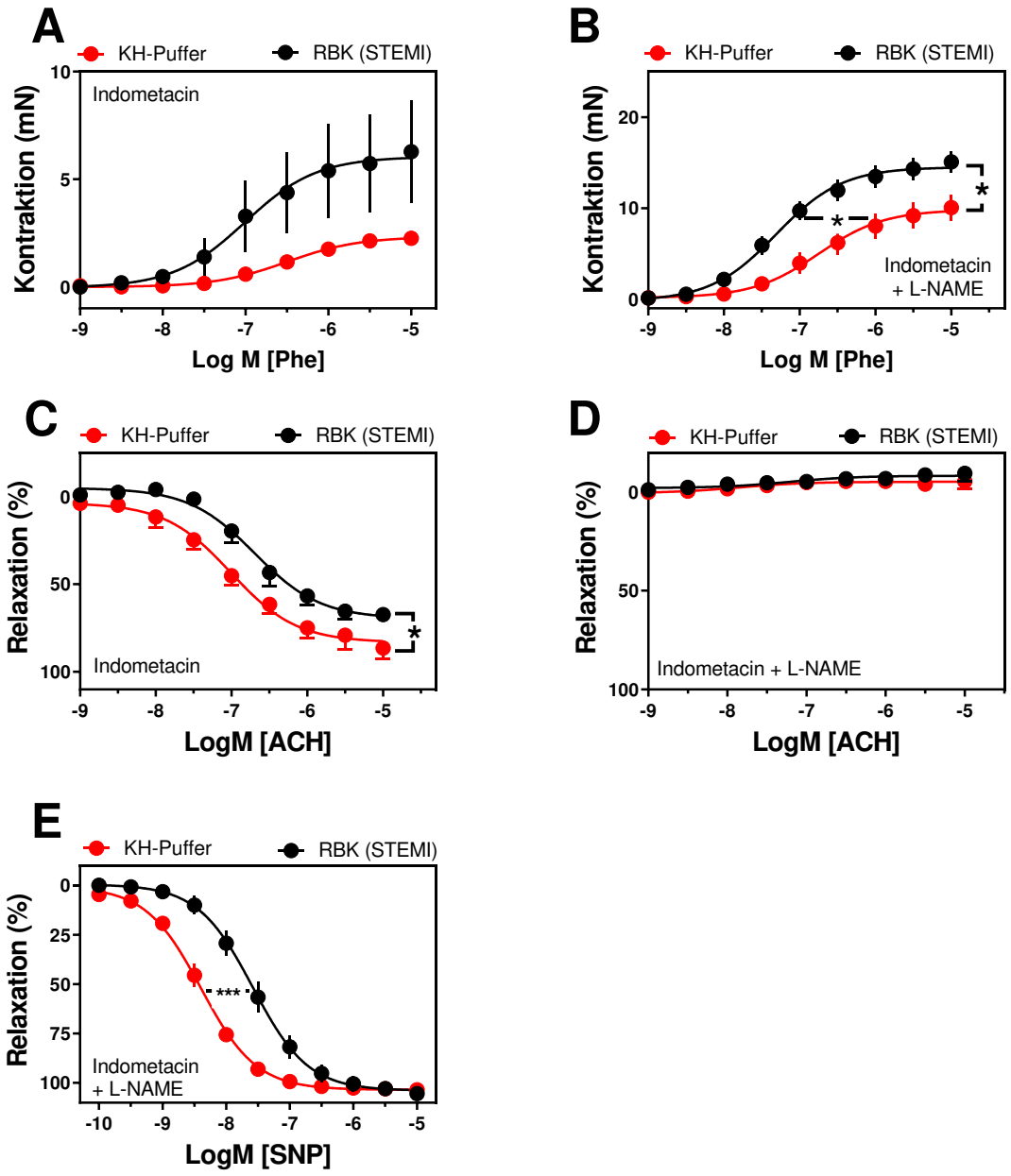



**Abb. 23: Gefäßfunktionen nach Inkubation mit RBK von STEMI-Patienten unter finalen Bedingungen**

Aortenringe aus WT wurden für sechs Stunden bei 50 rpm mit KH-Puffer (Kontrolle; rot, n = 5) oder RBK von Patienten mit STEMI (STEMI, schwarz, n = 4), die mittels KH-Puffer diluiert worden waren (Hkt. 40 %), inkubiert. Die Gefäßfunktionen wurden im Organbad gemessen. Die Relaxation im Zuge der Applikation von ACh (1 nM–10 µM, Panel C–D) wurde in den mit Phenylephrin vorkontrahierten Arterien (1 nM–10 µM, Panel A–B) in An- bzw. Abwesenheit der angegebenen Inhibitoren ermittelt: Panel A und C in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und Panel B, D sowie E in Anwesenheit von Indometacin (10 µM) und L-NAME (100 µM). Panel E repräsentiert die endothelunabhängige Relaxation, die durch den NO-Donor SNP induziert wird. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) markiert. Werte sind in Form von Mittelwert und Standardfehler angegeben.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 Methodik

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der eNOS, der endothelialen Arginase und des oxidativen Stresses im Pathomechanismus der Anämie betrachtet. Sowohl eine Aktivitätsänderung der beiden Enzyme als auch eine Störung des Redoxsystems können die Gefäßfunktion beeinflussen [123]. Aus diesem Grund wurde in verschiedenen Mauslinien eine Anämie induziert. Im Anschluss wurde die Gefäßfunktion unter Zuhilfenahme eines Organbads gemessen. Es wurde ein *Ex-vivo*-Ansatz gewählt, da *in vivo* zahlreiche Einflüsse die Gefäßfunktion modulieren [120, 124]. Mithilfe des Organbads ist es möglich, den Einfluss potenzieller Störgrößen zu minimieren [118]. Die pharmakologisch induzierte Vasorelaxation und -kontraktion gelten im Organbad als Parameter der Gefäßfunktion. Seit der Entdeckung, dass ACh eine endothelabhängige Vasorelaxation bedingt, wird die Relaxation im Zuge der ACh-Applikation als Maßstab für die Endothelfunktion gewertet [14]. Dieser Mechanismus der Relaxation wird im Englischen als *Endothelium dependent relaxation* bezeichnet und entsprechend abgekürzt (EDR). Die ACh-vermittelte Vasorelaxation beruht auf einer Stimulation der eNOS und der damit verbundenen NO-Freisetzung. Dieser Mechanismus wird durch eine fehlende ACh-Reagibilität nach der Inhibition der eNOS mittels L-NAME nachgewiesen [125]. Bei der Ermittlung der Endothelfunktion in einem *Ex-vivo*-Modell besteht die Möglichkeit, dass das Endothel während der Präparation oder des *Mountings* beschädigt wird [118, 124]. Aus einer mechanischen Schädigung des Endothels resultiert eine Abnahme der ACh-bedingten Relaxation [14, 118]. Dass eine mechanische Schädigung einen Einfluss auf die hier erhobenen Daten hatte, lässt sich nicht sicher ausschließen. Allerdings ist die in dieser Arbeit gemessene Maximalrelaxation der Sham-WT (84,55 ± 3,86 %) in Anwesenheit von ACh (10 µM) mit Werten vergleichbar, die in der Literatur beschrieben wurden [110]. In Aorten, die ebenfalls aus C57BL6/J-Mäusen stammen, wurde bei annähernd identischen Bedingungen eine maximale Relaxation von 86 ± 4 % ermittelt [110]. Die Validierung der Sham-WT impliziert, dass die Präparation und das *Mounting* der Aortenringe ohne mechanische Schädigung des Endothels durchgeführt wurden. Das Ausmaß der ACh-induzierten Vasorelaxation wird unter anderem durch die NO-Sensitivität der GMZ

moduliert. Im Organbad wurde die NO-Sensitivität mittels SNP ermittelt. Da SNP als NO-Donor eine endothelunabhängige Vasorelaxation vermittelt [34, 110], ist die SNP-DWK ein Maßstab für die NO-Sensitivität der GMZ [9, 110]. Diese Form der Relaxation wird im Englischen als *Endothelium independent relaxation* bezeichnet und dementsprechend abgekürzt (EIR).

## 4.2 Auswirkungen der Anämie auf die Versuchstiere

### 4.2.1 Auswirkung der Anämie auf die Gefäßfunktionen in Wildtypen

Um die Auswirkung der Anämie auf die Funktionalität der eNOS zu bestimmen, wurden Mäuse gemäß des akuten bzw. chronischen Anämieprotokolls behandelt (siehe Kapitel 2.3.2). Nach Induktion der akuten Anämie wurde die Gefäßfunktion ermittelt und mit der Gefäßfunktion unbehandelter Wildtypen (Sham) verglichen. Die Auswertung hat ergeben, dass beide Gruppen sowohl vor als auch nach der Inkubation mit L-NAME vergleichbare Kontraktionen aufwiesen (siehe Abb. 7 A–B). Andererseits führte die Induktion der akuten Anämie zu einem verminderten Ansprechen auf ACh (siehe Abb. 7 C). Sowohl die maximale Relaxation als auch die Sensitivität waren in akut anämischen Mäusen signifikant verringert. Das vollständige Ausbleiben der EDR in Anwesenheit von L-NAME beweist, dass die EDR allein durch die Stimulation der eNOS ausgelöst wurde (siehe Abb. 7 D). Die SNP-DWK beider Gruppen, die in Panel E in Abb. 7 dargestellt sind, weißen keine signifikanten Unterschiede für die maximale Relaxation ($p = 0{,}20$) und Sensitivität ($p = 0{,}33$) auf. Die verminderte EDR bei einer gleichzeitig unveränderten EIR spricht dafür, dass in akut anämischen Mäusen eine endotheliale Dysfunktion vorlag [9, 61, 66]. Der endothelialen Dysfunktion liegen die Entkopplung der eNOS und eine beschleunigte Degradation des NO zugrunde (siehe Kapitel 1.6). Die Mäuse, die gemäß dem chronischen Anämieprotokoll behandelt worden waren, zeigten ein ähnliches Kontraktions- und Relaxationsverhalten wie die akut anämischen Tiere. In Abwesenheit von L-NAME wurde für die maximale Kontraktion der chronisch anämischen Mäuse (8,04 ± 0,88 mN) und der Sham-WT (5,76 ± 0,66 mN) ein p-Wert von 0,0504 ermittelt (siehe Abb. 8 A). Per definitionem ist diese Abweichung nicht signifikant, da ein Signifikanzniveau von 5 % gewählt wurde. Dennoch besteht ein Trend, der die Interpretation zulässt, dass die chronisch anämische WT-Mäuse stärker kontrahierten als unbehandelte WT-Mäuse. Eine

Inkubation mit L-NAME hat bewirkt, dass sich die beiden Gruppen nicht länger bezüglich der Phe-induzierten Kontraktion unterschieden (siehe Abb. 8 B). Da der Einfluss der eNOS durch Inkubation mit L-NAME inhibiert wurde, weisen diese Ergebnisse in die Richtung, dass der beobachtete Unterschied auf eine verminderte basale NO-Bioverfügbarkeit der anämischen Gruppe zurückzuführen ist [99, 126]. Da für die ACh-bedingte Maximalrelaxation beider Gruppen ein p-Wert < 1 % ermittelt wurde, kann von einer signifikanten Abweichung gesprochen werden. Ebenso wie im akuten Anämiemodell lässt sich in Panel C in Abb. 8 eine signifikante Rechtsverschiebung der anämischen Gruppe erkennen. Eine Rechtsverschiebung der DWK ist auf eine Abnahme der Affinität zurückzuführen [118]. Im Gegensatz dazu weisen die SNP-DWK beider Gruppen, die in Panel E in Abb. 8 dargestellt sind, keine statistisch signifikante Abweichung auf. Die gesteigerte Kontraktilität in Abwesenheit von L-NAME und die verminderte EDR im Zusammenhang mit einer unveränderten EIR deuten darauf hin, dass die chronische Anämie zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion geführt hat [99, 126]. Dieser Interpretation stehen gleichwohl in der Literatur beschriebene Daten gegenüber. In Studien wurde aufgezeigt, dass es im Zuge einer Eisenmangelanämie und der damit einhergehenden Steigerung der Scherkräfte zu einer gesteigerten eNOS-Expression kommt [127]. Die erhöhte eNOS-Expression hat eine Desensitisierung der GMZ bewirkt [127]. Eine NO-Desensitisierung äußert sich in einer Affinitätsabnahme gegenüber ACh und SNP [36, 128, 129]. Wie bereits erwähnt, impliziert die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobene Konstellation aus einer verminderten EDR und einer unveränderten EIR, dass der repetitive Blutverlust in einer Abnahme der eNOS-Aktivität resultiert hat [61, 66]. Diese Daten stehen im Einklang damit, dass der Eisenmangel, der aus dem repetitiven Blutverlust resultiert, mit der Entkopplung der eNOS vereinbar ist [98, 130]. Überdies wurde in anderen Anämiemodellen wie der Sichelzell- und β-Thalassämie ebenfalls das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion nachgewiesen [7-9]. Vor dem Hintergrund der hier erhobenen Daten sowie der wissenschaftlichen Literatur ist es wahrscheinlich, dass sowohl das akute als auch das chronische Anämiemodell die Ausbildung einer Endotheldysfunktion bewirkt hat. Die Mäuse mit einer chronischen Anämie wichen hinsichtlich der maximalen EDR und Phe-Kontraktion stärker von den Gefäßfunktionen der unbehandelten Wildtypen ab als Mäuse, die das akute Anämiemodell durchliefen. Folglich scheint die Dauer einer Anämie einen Einfluss auf den Ausprägungsgrad der endothelialen Dysfunktion gehabt zu haben.

### 4.2.2 Effekt der NAC-Behandlung auf die Gefäßfunktion im chronischen Anämiemodell

Es liegen zahlreiche Daten vor, mit denen ein Zusammenhang zwischen erhöhten ROS-Spiegeln und einer endothelialen Dysfunktion belegt werden kann [61, 62, 64, 67, 131]. Die Induktion der chronischen Anämie mittels des hier beschriebenen Protokolls ist mit einer Akkumulation von ROS in der Gefäßwand assoziiert [132]. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Anämieinduktion über erhöhte ROS-Level die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion bewirkt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden Sham-WT und chronisch anämische WT-Mäuse mit NAC behandelt (siehe Unterkapitel 2.3.3). Da das Substrat NAC antioxidative Eigenschaften besitzt, kann auf diesem Weg nachgewiesen werden, ob ein erhöhter oxidativer Stress in die Ausbildung der endothelialen Dysfunktion involviert ist [116, 117].

Die Auswertung der erhobenen Daten hat ergeben, dass chronisch anämische Mäuse, die mit NAC behandelt worden waren (*behandelte Gruppe*), signifikant schwächer kontrahierten als chronisch anämische Mäuse, die nicht mit NAC behandelt worden waren (*unbehandelte Gruppe*). Nach Inkubation mit L-NAME waren hinsichtlich der Phe-induzierten Kontraktion keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (siehe Abb. 9 B). Da der Einfluss der eNOS durch Inkubation mit L-NAME inhibiert wurde, sprechen diese Ergebnisse dafür, dass der beobachtete Unterschied auf einer verminderten basalen NO-Bioverfügbarkeit innerhalb der unbehandelten Gruppe beruht [99, 126]. Darüber hinaus führte die Behandlung mit NAC zu einer signifikanten Zunahme der endothelabhängigen Maximalrelaxation (siehe Abb. 9 C). Die Behandlung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ACh-Affinität (p-Wert von 0,08). Im Zusammenhang mit der erhöhten Maximalrelaxation lässt sich die nicht signifikante Linksverschiebung der behandelten Gruppe als positiver Trend bzw. erhöhte ACh-Sensitivität interpretieren. Des Weiteren bewirkte die NAC-Behandlung chronisch anämischer Mäuse eine Abnahme der NO-Sensitivität der GMZ (siehe Abb. 9 E). Eine Abnahme der NO-Sensitivität wird im Zuge einer vermehrten NO-Freisetzung beschrieben [129]. Eine verbesserte EDR trotz einer verminderten NO-Sensitivität impliziert, dass die Ausbildung einer Endotheldysfunktion, die durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit charakterisiert ist, im chronischen Anämiemodell durch die NAC-Behandlung verhindert wurde. Die erhobenen Daten sind mit Ergebnissen aus Tierversuchen vereinbar, die aufgezeigt haben, dass eine GSH-Depletion über eine

Erhöhung des oxidativen Stresses eine erhöhte Phe-Kontraktilität bei verminderter EDR bedingt [126]. Ferner wird diese Interpretation durch eine klinische Studie gestützt, in deren Rahmen der positive Einfluss der NAC-Applikation bei Patienten mit einer Sichelzellanämie belegt wurde [133]. Um ausschließen zu können, dass dieser protektive Effekt nicht unabhängig von der Anämie auftritt, wurden Sham-WT mit NAC behandelt. Wie anhand von Abb. 10 ersichtlich, hatte die NAC-Applikation keinen Einfluss auf die Gefäßfunktion von Sham-WT. Die Relaxations- und Kontraktionsverhalten beider Gruppen wiesen keine statistisch signifikanten Abweichungen auf. Der protektive Effekt des NAC, der nur in anämischen Mäusen nachweisbar war, sowie die zuvor beschriebene ROS-Akkumulation implizieren, dass die Anämie aufgrund des erhöhten ROS-Levels die Ausbildung der endothelialen Dysfunktion verursacht hat [126]. Aus dieser Erkenntnis kann die Frage abgeleitet werden, über welchen Mechanismus die Anämie zur ROS-Akkumulation im Endothel führt. Um diese Frage beantworten zu können, muss die Auswirkung der Anämie auf die RBK berücksichtigt werden. Die Induktion einer Anämie gemäß dem vorgestellten Protokoll resultiert in einer Entkopplung der erythrozytären eNOS [98]. In diesem Zustand synthetisiert eNOS weniger kardioprotektives NO und mehr ROS (siehe Abb. 3). Daher ist es denkbar, dass die RBK über die vermehrte Freisetzung des ROS eine endotheliale Dysfunktion induziert haben. Ferner bewirkt der repetitive Blutverlust in den RBK einen Anstieg des intrazellulären ROS-Spiegels sowie eine gesteigerte Externalisierung des Phosphatidylserin (PS) [98]. Diese charakteristische Veränderung zeigt sich ebenfalls in RBK von Patienten mit SZA [8]. Bei Patienten mit SZA wird vermutet, dass dysfunktionale RBK über die Sekretion hämhaltiger MP einen Anstieg des oxidativen Stresses im Endothel bewirken [7, 8]. Ob die Freisetzung von MP in diesem Anämiemodell eine funktionelle Bedeutung hat, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sicher beantworten. Neben diesen beiden Mechanismen könnten die Hämolyse über NO-Absorption durch freies Hb, Inflammation und Inhibition der eNOS durch die Freisetzung von ADMA und Arginase zu einem erhöhten oxidativen Stress beitragen [98, 134, 135]. Die Hypothese, dass die entkoppelte erythrozytäre eNOS in die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion involviert ist, könnte durch eine Anämieinduktion in Mäusen überprüft werden, die ausschließlich eine endotheliale und keine erythrozytäre eNOS exprimieren. Wäre die erythrozytäre eNOS in den Pathomechanismus der anämieassoziierten endothelialen

Dysfunktion involviert, würde in diesen Knock-out-Mäusen die anämieassoziierte Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit ausbleiben oder nur abgeschwächt auftreten.

### 4.2.3 Auswirkung der Anämie auf die Gefäßfunktion der eNOS-KO-Mäuse

Die verminderte EDR der anämischen Wildtypen lässt darauf schließen, dass die Anämie die Entkopplung der eNOS vermittelt hat. Daher wurde in eNOS-Knock-out-Tieren eine chronische Anämie induziert. Durch die Induktion der chronischen Anämie wurden, unabhängig von der Anwesenheit von L-NAME, weder das adrenerge Antwortverhalten noch die ACh-induzierte Relaxation beeinflusst (siehe Abb. 11 A-D). Im Hinblick auf die SNP-DWK lässt sich eine signifikante Linksverschiebung der chronisch anämischen eNOS-KO feststellen ($p < 0{,}0001$). Dies bedeutet, dass die Induktion der chronischen Anämie eine Sensibilisierung der GMZ gegenüber NO bewirkt hat. Eine Sensibilisierung gegenüber NO ist mit einem Absinken des NO-Pools assoziiert [110]. Da die eNOS-Deletion bereits vor Induktion der Anämie mit einem Abfall des Nitrat- und Nitrit-Spiegels einhergeht, implizieren die Ergebnisse, dass der repetitive Blutverlust unabhängig von der Entkopplung der eNOS zu einem Absinken des NO-Pools beitragen muss [55, 56]. Über welchen Mechanismus die Anämie eine Depletion des bereits reduzierten NO-Pools bewirkt hat, lässt sich auf Basis der bislang vorliegenden Daten jedoch nicht sicher bestimmen.

### 4.2.4 Einfluss der Arginasedeletion auf die Endothelfunktion in anämischen Mäusen

Die bisher beschriebenen Ergebnisse sprechen dafür, dass die Anämie über den Anstieg des oxidativen Stresses die Manifestation einer endothelialen Dysfunktion vermittelt hat. Anhand der erhobenen Daten ist jedoch keine Aussage darüber möglich, wie genau die gesteigerte ROS-Produktion eine Entkopplung der eNOS bewirkt hat. In zahlreichen Krankheitsmodellen führt die vermehrte Aktivität der Arginase zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion [67-69, 100, 136]. In einigen dieser Modelle wird die vermehrte Expression der Arginase auf erhöhte ROS-Level zurückgeführt [67, 136]. Um zu eruieren, ob die gesteigerten ROS-Spiegel in anämischen WT-Mäusen über eine Stimulation der Arginaseexpression zur Ausbildung der Endotheldysfunktion beitragen, wurden EC-ArgI-KO entsprechend dem akuten und chronischen Anämieprotokoll behandelt. Wie bereits in Kapitel 2.3.1

erläutert, wurde die Deletion der Arginase I durch Tamoxifeninjektion initialisiert. In Studien konnte belegt werden, dass Tamoxifen antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [137, 138]. Darüber hinaus kann die akute Applikation von Tamoxifen über die Phosphorylierung des Serins 1177 an der eNOS eine Stimulation der EDR bedingen [139]. Aufgrund der potenziell protektiven Wirkung des Tamoxifens wurde sowohl $Cre^{-/-}$- als auch $Cre^{+/+}$-Mäusen Tamoxifen injiziert. Die Deletion der endothelialen Arginase I hatte weder im akuten noch im chronischen Anämiemodell einen signifikanten Einfluss auf die adrenerge Kontraktion, die EDR oder die IDR (Abb. 12 und Abb. 13). Da die Gefäßfunktion nicht durch die Deletion der Arginase I beeinflusst wurde, ist es unwahrscheinlich, dass eine gesteigerte Arginase I-Expression oder -Aktivität im Endothel für die Ausbildung der endothelialen Dysfunktion in anämischen WT-Mäusen verantwortlich ist. Die unveränderte Gefäßfunktion in den $Cre^{+/+}$-Mäusen könnte durch die Aktivität der Arginase II erklärt werden. In einigen Tiermodellen ist diese Isoform der Arginase über gesteigerte Enzymaktivität in den Pathomechanismus der endothelialen Dysfunktion involviert [72, 121, 140]. Aus diesem Grund wurde die Gefäßfunktion akut anämischer WT-Mäuse vor und nach Inkubation mit dem Arginaseinhibitor nor-NOHA erhoben. Da Nor-NOHA als unspezifischer Inhibitor beide Isoformen inhibiert, kann auf diesen Weg überprüft werden, ob die Inhibition der Arginase II einen Einfluss auf die Endothelfunktion hat [72, 121]. Wie anhand von Panel A in Abb. 14 ersichtlich, hat nor-NOHA keine signifikante Veränderung der adrenergen Kontraktion bewirkt. Bezüglich des ACh-Antwortverhaltens wurde nach Inkubation mit nor-NOHA eine verminderte maximale EDR gemessen (siehe Abb. 14 B). Die Anwesenheit des Arginaseinhibitors hatte keinen Einfluss auf die ACh-Sensitivität der Gefäße. Bei der Interpretation der Messwerte muss darauf geachtet werden, dass eine repetitive Stimulation mit ACh in einem argininfreien Medium zu einer Arginindepletion führen kann [125]. Diese äußert sich in einer verminderten EDR [125]. Daher ist es möglich, dass die verminderte Maximalrelaxation, die nach der Inkubation mit nor-NOHA gemessen wurde, auf einer Depletion des Argininpools beruht. Dennoch sollte dem fehlenden Einfluss des nor-NOHA ein hoher Stellenwert eingeräumt werden. Durch potenzielle Störfaktoren wie etwa die Beschädigung des Endothels während der Präparation wurden die Messdaten nicht beeinflusst, da die Endothelfunktion am selben Gefäß vor und nach der Inkubation ermittelt wurde. Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass weder die Deletion der endothelialen Arginase I noch die pharmakologische Inhibition beider Isoformen durch nor-NOHA

eine Verbesserung der EDR im Anämiemodell bewirkt hat. Im Umkehrschluss bedeuten diese Messwerte, dass der erhöhte oxidative Stress wahrscheinlich unabhängig von einer Stimulation der Arginase die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion in anämischen WT-Mäusen bedingt. Das Ausbleiben des protektiven Effektes der Arginasedeletion ist mit den Daten von Chennupati et al. vereinbar [125].

## 4.3 Auswertung der Inkubationsexperimente

### 4.3.1 Hintergrund der Inkubationsexperimente

Hintergrund der Inkubationsexperimente waren im kardialen Ischämie-Reperfusion-Modell erhobene Daten, anhand derer ersichtlich wurde, dass RBK von anämischen Patienten eine verminderte kardioprotektive Wirkung aufweisen [98]. Aus dieser Erkenntnis ergab sich die Fragestellung, ob RBK von anämischen Patienten über eine Modifikation der Gefäßfunktion zu einem negativen Outcome anämischer Patienten mit MI beitragen. Um den Einfluss von RBK auf das Gefäßsystem messbar zu machen, können Inkubationsexperimente durchgeführt werden [100, 101, 141], in deren Rahmen Gefäße mit RBK und Lösungsmitteln inkubiert werden, um im Anschluss die Gefäßfunktionen und Proteinexpression bzw. -aktivität zu ermitteln [100]. Initial sollte die Fragestellung mithilfe von Inkubationsexperimenten nach dem von Mahdi et al. beschriebenen Protokoll beantwortet werden. Die Inkubationszeit von 18 Stunden, die für aus Ratten stammende Aortenringe gilt, war jedoch nicht auf Mäuse übertragbar [100]. Dies zeigte sich an der fehlenden ACh-Reagibilität der Aortenringe nach 16 Stunden (siehe Abb. 15 B). Aufgrund dieser Diskrepanz musste das beschriebene Protokoll abgeändert werden. Basierend auf den in der Literatur publizierten Ergebnissen wurden zwei Prämissen abgeleitet, die bei der Etablierung eines neuen Protokolls berücksichtigt wurden. Die erste Prämisse besagt, dass gesunde RBK die Endothelfunktion nicht beeinflussen [100, 141]. Dies bedeutet, dass die Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von gesunden Probanden der Gefäßfunktion unbehandelter WT-Mäuse (BW I-II) entsprechen sollte (siehe Kapitel 3.2). Die zweite Prämisse besagt, dass dysfunktionale RBK von kardiovaskulär vorerkrankten Probanden eine endotheliale Dysfunktion induzieren [100, 141]. Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine verminderte EDR bei einer unveränderten IDR charakterisiert [9, 61, 66]. Im Zuge der Protokolletablierung wurden verschiedene Konditionen, wie die Wahl der Inkubationszeit, die Wahl des Lösungsmittels und der Einsatz einer Rührplatte,

überprüft (siehe Kapitel 2.5.2). Die Überprüfung einer bestimmten Kondition erfolgte anhand weniger Tiere. Daher muss bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass die Aussagekraft aufgrund der niedrigen n-Zahlen gering ist [142]. Ferner wurde für diese Gruppen nur eine orientierende Auswertung im Hinblick auf die maximale Kontraktion und maximale EDR vorgenommen (siehe Kapitel 2.6). Bei der Interpretation der EDR muss bedacht werden, dass eine verminderte EDR das Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion nur im Zusammenhang mit einer unveränderten EIR beweist [9, 61, 66]. Gleichzeitig impliziert eine unveränderte EDR, dass die Endothelfunktion nicht durch die Inkubation beeinflusst wurde. Primär soll anhand der folgenden Daten Auskunft über die Auswirkungen der verschiedenen Inkubationsbedingungen gegeben und darüber hinaus erläutert werden, wie diese zur Entwicklung des Protokolls beigetragen haben.

### 4.3.2 Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktion

Um den potenziellen Effekt dysfunktionaler RBK zu maximieren, wurde eine möglichst lange Inkubationszeit angestrebt. Gleichzeitig sollte die Endothelfunktion der Segmente, die mit RBK von gesunden Patienten inkubiert werden, im gleichen Zeitraum nicht beeinflusst werden [100, 141]. Daher erfolgte eine zweistufige Ermittlung der optimalen Inkubationszeit. Im ersten Schritt wurde hierzu das Blut gesunder Probanden genutzt, wodurch gemäß der ersten Prämisse Bedingungen geschaffen wurden, um die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion zu verhindern. Im zweiten Schritt wurde untersucht, ob die Inkubationszeit ausreichend lang ist, um bei einer Inkubation mit dysfunktionalen RBK eine Abnahme der EDR zu generieren. Demzufolge diente der zweite Schritt der Überprüfung der zweiten Prämisse.

Im ersten Ansatz wurden Aortenringe mit KH-Puffer und RBK von gesunden Spendern inkubiert. Die Gefäßfunktion wurde nach zwei, sechs und sechzehn Stunden Inkubation gemessen. Aus den Ergebnissen des ersten Ansatzes geht hervor, dass die EDR nach einer zweistündigen Inkubationszeit vollständig erhalten geblieben ist (siehe Abb. 15 B), während eine Inkubationsdauer von sechs Stunden zu einer statistisch signifikant verminderten EDR und einer Zunahme der Kontraktilität geführt hat. Aus den Daten von Mahdi et al. geht hervor, dass die Inkubation mit gesunden RBK und KH-Puffer auch nach 18 Stunden keine Abnahme der Endothelfunktion bewirkt hat [100]. Die Diskrepanz im Hinblick auf die beschriebenen Ergebnisse könnte

darauf zurückzuführen sein, dass in diesem Ansatz Mäuse anstelle von Ratten verwendet wurden [100]. Vor dem Hintergrund, dass eine möglichst lange Inkubationszeit angestrebt wurde, ohne dass es unter optimalen Bedingungen zu einer veränderten Endothelfunktion kommt, erfüllte die Inkubationszeit von zwei Stunden die Bedingungen, um in der zweiten Phase getestet zu werden.

Aus diesem Grund wurden im zweiten Ansatz die Aorten-Segmente über zwei Stunden mit RBK von Patienten mit einer Anämie oder DMT2 inkubiert. Die anschließende Messung der Gefäßfunktion ergab, dass Segmente, die mit RBK von Patienten mit kardiovaskulären Komorbiditäten inkubiert worden waren, eine vergleichbare Maximalrelaxation erreichten wie die Segmente, die mit RBK von gesunden Probanden inkubiert worden waren (siehe Abb. 16 B). Vor dem Hintergrund, dass RBK von DMT2 die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion vermitteln, wurde eine Inkubationszeit von zwei Stunden als unzureichend gewertet [100, 101]. Um durch Inkubation mit dysfunktionalen RBK eine endotheliale Dysfunktion zu induzieren, muss die Inkubationszeit eine Dauer von zwei Stunden überschreiten. Diese Erkenntnis ist vereinbar mit der Tatsache, dass sich in anderen Inkubationsexperimenten eine Inkubationszeit von einer Stunde als nicht ausreichend lang erwiesen hat [141, 143].

Daher erfolgte die Testung einer sechsstündigen Inkubation. Wie bereits erwähnt, hat eine sechsstündige Inkubation mit RBK von gesunden Spendern eine Abnahme der EDR bedingt. Um zu eruieren, ob diese Abnahme auf die RBK, das Lösungsmittel oder die Zeit selbst zurückzuführen ist, wurden die Segmente zweier Mäuse ausschließlich mit KH-Puffer inkubiert. Im Vergleich zur basalen Gefäßfunktion (BW II) wiesen diese Segmente eine unveränderte maximale Relaxation auf (siehe Abb. 17 B). Dass die Inkubation mit einem KH-Puffer kaum Einfluss auf die Gefäßfunktion hat, steht im Einklang mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen [100]. Die Inkubationszeit von sechs Stunden zuzüglich der experimentellen Dauer von etwa drei Stunden wird in der Literatur als der Zeitraum angegeben, in dem Gefäße *ex vivo* ihre volle Funktionalität beibehalten [118]. Dieses Ergebnis impliziert, dass weder die Zeit noch das Lösungsmittel für die Reduktion der EDR verantwortlich war. Folglich hat die Abnahme der Endothelfunktion in den Segmenten, die mit der Suspension aus KH-Puffer und RBK inkubiert worden waren, auf dem Einfluss der RBK beruht. Ein weiterer Aspekt, der für diese Interpretation spricht, ist der, dass die RBK von STEMI-Patienten eine wesentlich stärkere Abnahme der EDR induziert haben als RBK von gesunden

Probanden (siehe Abb. 17 B). Gleichzeitig sollte berücksichtigt werden, dass die STEMI-Probanden im Vergleich zu den gesunden Probanden älter gewesen sind (siehe Tabelle 9). Ergebnisse des finalen Protokolls implizieren, dass ein höheres Probandenalter mit einer reduzierten Gefäßdilatation nach Inkubation assoziiert ist (siehe Abb. 22, detaillierte Interpretation erfolgt in Kapitel 4.3.5). Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Inkubation über einen Zeitraum von sechs Stunden ausreichend lang war, damit RBK einen messbaren Einfluss auf die EDR ausüben konnten. Nach Inkubation mit gesunden RBK zeigte sich jedoch eine Abnahme der EDR, die nicht physiologisch begründet werden kann und somit möglicherweise auf eine artifizielle Ursache zurückgeführt werden könnte. Daher mussten weitere Verbesserungen vorgenommen werden. Denn aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen geht hervor, dass die Inkubation mit RBK von gesunden Patienten unter optimalen Bedingungen keinen Einfluss auf die Endothelfunktion hat [100, 101, 141].

### 4.3.3 Überlegungen zur Optimierung des Protokolls

Bei einer Inkubationszeit von sechs Stunden konnte eine Sedimentation der RBK beobachtet werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese Sedimentation die artifizielle Abnahme der EDR bedingt hat. Ferner könnte die inhomogene Verteilung erklären, weshalb Segmente einer Maus, die mit der gleichen Suspension inkubiert worden waren, eine variable Gefäßfunktion aufgewiesen haben. Um der Sedimentation vorzubeugen, wurde der Einsatz einer Rührplatte erwogen. Da eine möglichst lange Inkubationszeit angestrebt wurde, erschien die Verwendung eines Nährmediums ein vielversprechender Ansatz zu sein, da in Anwesenheit eines Nährmediums Inkubationszeiten von über 18 Stunden möglich sind [99, 141].

Die Verifizierung des potenziellen Nutzens einer Rührplatte und eines abgeänderten Lösungsmittels erfolgte gemäß dem in Kapitel 2.5.2 angeführten Vorgehen (Unterpunkt 2). Die Aorten-Segmente wurden für 16 Stunden mit einem mediumhaltigen Lösungsmittel und RBK von gesunden Probanden in Anwesenheit einer Rührplatte inkubiert. Die Auswertung lässt vermuten, dass die Geschwindigkeit der Rührplatte mit der maximalen ACh-abhängigen Vasorelaxation korreliert hat (siehe Abb. 18 B). Segmente, die bei hohen Geschwindigkeiten (50 rpm) inkubiert worden waren, wiesen eine maximale EDR von 88,02 ± 0,14 % auf. Damit betrug die maximale Relaxation einen Wert, der annähernd der BW II (95,85 ± 2,98 %) entsprach, während

es bei RG von 40 rpm zu einer Abnahme der EDR kam. Daraus lässt sich schließen, dass die Sedimentation, die im Zuge niedriger RG (< 50 rpm) aufgetreten war, zur artifiziellen Reduktion der EDR geführt hat. Da die Endothelfunktion bei einer RG von 50 rpm nahezu vollständig erhalten geblieben ist, wurde die Einstellung für die darauffolgenden Experimente auf 50 rpm festgelegt.

Die Datenerhebung mittels des Protokolls aus Unterpunkt 2 ermöglicht eine Aufteilung nach Wahl des Lösungsmittels (siehe Tabelle 11). Wurden die RBK mit dem Medium-KH-Puffer-Gemisch anstelle des Mediums diluiert, zeigten die Segmente eine erhöhte Kontraktion (siehe Abb. 19 A). Hinsichtlich des ACh-Antwortverhaltens ähnelten sich die Gruppen. Bei der Interpretation muss jedoch berücksichtigt werden, dass beiden Gruppen Segmente zugeordnet wurden, die bei 40 rpm oder 50 rpm inkubiert worden waren. Auf Basis dieser Daten wurde das KH-Puffer-Medium-Gemisch als Lösungsmittel für weitere Experimente verwendet.

### 4.3.4 Überprüfung der 16-stündigen Inkubationszeit

Nachdem aufgezeigt werden konnte, dass die Inkubation mit gesunden RBK über 16 Stunden unter Verwendung des KH-Puffer-Medium-Gemischs und der Rührplatte (50 rpm) die erste Prämisse zu erfüllen schien, musste zur Verifizierung des Protokolls nachgewiesen werden, dass dysfunktionale RBK unter identischen Bedingungen eine Reduktion der EDR induzieren. Aus diesem Grund wurden die RBK von STEMI-Patienten für die Inkubation aufbereitet. Bei zwei Probanden lag ein DMT2 vor. Unter Einhaltung der bereits beschriebenen Inkubationsbedingungen hatten dysfunktionale RBK kaum einen Einfluss auf die Gefäßfunktion (siehe Abb. 20). Dementsprechend wurde die zweite Prämisse der Etablierung nicht erfüllt [100, 101, 141]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Medium die Induktion einer endothelialen Dysfunktion inhibiert hat. Daher wurden in darauffolgenden Experimenten ausschließlich KH-Puffer zur Dilution der RBK-Pellets verwendet.

### 4.3.5 Validierung der finalen Inkubationsbedingungen

Im Folgenden werden die bisher erhobenen Ergebnisse und deren Interpretation zusammengefasst. Nach einer Inkubationsdauer von sechs Stunden konnte der Einfluss der RBK auf das Endothel nachweisen werden. Ein Teil dieses Einflusses war möglicherweise auf artifizielle Ursachen wie die Sedimentation der RBK

zurückzuführen. Der Einsatz einer Rührplatte scheint diesem Prozess effektiv entgegen gewirkt zu haben. Durch die Verwendung eines Nährmediums waren längere Inkubationszeiten möglich. Zugleich wurde dadurch jedoch die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion verhindert, sodass es sich nicht als Lösungsmittel geeignet hat. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden die Konditionen des *finalen* Protokolls definiert. Zu den Inkubationsbedingungen zählt, dass die RBK mit KH-Puffer diluiert wurden. Des Weiteren wurde die Inkubationszeit auf sechs Stunden festgelegt. Die Inkubation erfolgte unter Einsatz einer Rührplatte (50 rpm). Diese Inkubationsbedingungen wurden mithilfe von drei Kohorten validiert: junge, gesunde Probanden, alte, gesunde Probanden und STEMI-Patienten (siehe Tabelle 13). Die Messwerte der Kohorten wurden mit Segmenten verglichen, die in Abwesenheit von RBK unter ansonsten identischen Konditionen inkubiert worden waren. Die ausschließlich mit KH-Puffer inkubierten Segmente dienten als Kontrolle, da nachgewiesen worden war, dass der KH-Puffer keinen Einfluss auf die basale Gefäßfunktion gehabt hat (siehe Kapitel 4.3.2). Analog zur Auswertung der verschiedenen Mauslinien erfolgte die Auswertung auf Grund ausreichend hoher n-Zahlen in Form von DWK.

Durch die Inkubationsbedingungen des finalen Protokolls war die Messung des Einflusses möglich, der von den RBK ausgegangen ist. Der ersten Prämisse zufolge sollte die Inkubation mit RBK von gesunden Patienten keinen Einfluss auf die Gefäßfunktion haben. Anhand der in dieser Studie erhobenen Daten konnte belegt werden, dass die Inkubation mit RBK von gesunden, jungen Probanden keinen Einfluss auf die EDR und EIR gehabt hat (Abb. 21 C und E). Es sollte jedoch angemerkt werden, dass die mit RBK-inkubierten Segmente in Anwesenheit von L-NAME stärker kontrahierten (Abb. 21 B). Eine potenziell fehlerhafte Applikation des L-NAME kann kategorisch ausgeschlossen werden, da die EDR nach Inkubation mit L-NAME ausgeblieben ist (Abb. 21 D). Die vergleichbare Phe-Kontraktilität in Abwesenheit von L-NAME (Abb. 21 A) lässt die Annahme zu, dass diese Abweichung in Anwesenheit des Inhibitors auf niedrige n-Zahlen und die damit verbundene statistische Ungenauigkeit zurückzuführen ist [142]. Das Protokoll hat die erste Prämisse daher unter Vorbehalt erfüllt.

Die Segmente, die mit RBK von alten, gesunden Probanden und Patienten mit STEMI inkubiert worden waren, zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant verminderte

Maximalrelaxation im Zuge der ACh-Applikation (Panel C in Abb. 22 und Abb. 23). Außerdem konnte in beiden Kohorten eine nicht signifikante Rechtsverschiebung der ACh-DWK beobachten werden. Gleichzeitig waren die SNP-DWK beider Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe hoch signifikant nach rechts verschoben (siehe Panel E in Abb. 22 und Abb. 23). Das verminderte Ansprechen auf SNP impliziert, dass die Inkubation mit den RBK zu einer reduzierten NO-Sensibilität geführt hat [36, 129]. Da eine endotheliale Dysfunktion als eine verminderte EDR bei einer unveränderten EIR definiert ist, kann in diesem Fall nicht von der Induktion einer endothelialen Dysfunktion gesprochen werden [9]. Daher erfüllt das Protokoll die zweite Prämisse nicht. Die Ergebnisse implizieren, dass dysfunktionale RBK sowohl das Endothel als auch die GMZ beeinflusst haben. Vor dem Hintergrund der in dieser Studie erhobenen Daten stellt sich die Frage, weshalb durch die Inkubation eine Desensibilisierung der GMZ hervorgerufen wurde. Es ist bekannt, dass eine erhöhte NO-Freisetzung *in vivo* zu einer Desensibilisierung der GMZ führt [36, 129]. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten überein, die belegt haben, dass eine Inkubation mit NO über eine Aktivitäts- und Expressionsabnahme der sGC eine NO-Desensibilisierung bewirkt [144]. Da dysfunktionale RBK als RBK mit einer verminderten NO-Freisetzung definiert sind, ist es unwahrscheinlich, dass die Abnahme der Sensitivität aus einer vermehrten NO-Freisetzung während der Inkubation resultiert hat [98]. Eine vielversprechende Hypothese ist, dass die RBK über die Freisetzung von ROS eine Abnahme der NO-Sensitivität verursacht haben. Es ist bekannt, dass dysfunktionale RBK vermehrt ROS freisetzen [98, 100, 141]. Gleichzeitig wurde im Rahmen mehrerer Inkubationsexperimente nachgewiesen, dass oxidativer Stress eine Inaktivierung der sGC, die für die NO-vermittelte Relaxation verantwortlich ist, bewirkt hat [144-146]. Mit diesem Mechanismus könnten die beschriebenen Daten erklärt werden. Diesem Erklärungsansatz schließt sich jedoch die Frage an, warum andere Autoren nicht über Auswirkungen auf die GMZ berichtet haben. Ein Erklärungsansatz könnte der Einsatz eines Mediums als Lösungsmittel sein [141]. Andererseits kamen Mahdi et al. unter Verwendung von KH-Puffer als Lösungsmittel zu dem Ergebnis, dass dysfunktionale RBK über die Freisetzung von Peroxinitrit zu einer endothelialen Dysfunktion geführt haben [100]. Gleichzeitig liegen Daten vor, die eine Inaktivierung der sGC bei Inkubation mit KH-Puffer, der mit Peroxinitrit angereichert gewesen ist, beschreiben [144]. Diese beiden Beobachtungen scheinen nicht miteinander vereinbar zu sein. Daher ist es fraglich, ob die zweite Prämisse, die eingangs formuliert wurde, in

Anwesenheit eines KH-Puffers tatsächlich gilt. Die Inkubation der Segmente mit RBK von älteren gesunden Probanden hat zu einer Abnahme der EDR und IDR geführt (siehe Abb. 22 C und E). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Alterungsprozess, unabhängig von kardiovaskulären Komorbiditäten, mit der Ausbildung dysfunktionaler RBK assoziiert sein könnte. Diese Überlegung steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass es im Zuge des Alterungsprozesses zu einer Akkumulation von ROS kommt [147]. Obwohl die RBK über ein ausgeprägtes antioxidatives System verfügen, sind sie ebenfalls von diesem Prozess betroffen [80, 148, 149]. Dies wird daran ersichtlich, dass in RBK älterer Probanden erhöhte Level an Malondialdehyd, das als Biomarker für oxidativen Stress gilt, nachgewiesen werden konnten [148, 150]. Ferner ist bekannt, dass eine erhöhte Exposition gegenüber ROS zur Induktion dysfunktionaler RBK führt [8]. Die zunehmende ROS-Synthese im Alterungsprozess könnte die Ausbildung dysfunktionaler RBK bedingen, wodurch die im Rahmen der vorliegenden Studie erhobenen Ergebnisse erklärt werden könnten.

## 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den Ergebnissen der Tiermodelle geht hervor, dass eine Anämie zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion geführt hat. Die zuvor beschriebene Akkumulation von ROS-Metaboliten innerhalb der Gefäßwand sowie der protektive Effekt der Behandlung mit NAC lassen die Annahme zu, dass die Anämie über oxidativen Stress die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion begünstigt hat [126, 132]. Diese Daten stehen im Einklang mit der zuvor beschriebenen Erkenntnis, dass ein Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion und erhöhtem oxidativen Stress besteht [61, 62, 64]. Ob der erhöhte oxidative Stress direkt auf die Entkopplung der erythrozytären eNOS zurückzuführen ist oder die RBK über die Freisetzung hämhaltiger MP eine indirekte Erhöhung der ROS-Spiegel in der Gefäßwand bewirkt haben, lässt sich auf Basis der vorliegenden Daten nicht bestimmen. Ferner sollte berücksichtigt werden, dass die Anämie aufgrund einer erhöhten Hämolyse zu einer verstärkten Freisetzung des intrazellulären Hämoglobins geführt hat [83, 98]. Daher besteht die Möglichkeit, dass neben den dysfunktionalen RBK das freie Hämoglobin über NO-Absorption zur Manifestation der endothelialen Dysfunktion beigetragen hat [9]. Des Weiteren deuten die Daten der EC-ArgI-KO sowie der akut anämischen WT, die mit nor-NOHA inkubiert worden waren, darauf hin, dass die endotheliale Arginase nicht maßgeblich in die

Entstehung der endothelialen Dysfunktion im Zuge der Anämie involviert war. Auch hier sollte bedacht werden, dass eine Anämieinduktion zu einer Hämolyse geführt hat [98]. Die gesteigerte Hämolyse könnte über Freisetzung der intrazellulären Arginase, die Depletion des Argininpools verursacht haben [135, 151]. Die Depletion des Argininpools ist mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert [67-69, 136]. Die Frage, ob die Freisetzung der erythrozytären Arginase in diesem Anämiemodell die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion bedingt hat, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt unbeantwortet. Sie könnte jedoch möglicherweise durch die Messung der Argininplasmaspiegels sowie eine Bestimmung des Arginin-Ornithin-Verhältnisses geklärt werden [72, 135]. Ferner besteht die Möglichkeit, dass RBK unabhängig von einer Hämolyse über eine gesteigerte Arginaseaktivität zur Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion beigetragen haben [100, 141]. Zusammenfassend implizieren die tierexperimentellen Daten, dass die kompromittierte Endothelfunktion als Mediator für die erhöhte Mortalität und Morbidität anämischer Patienten in Frage kommt. So könnte die verminderte Bioverfügbarkeit des antiaggregatorischen NO in Folge einer Anämie das in klinischen Studien dokumentierte erhöhte Risiko für thrombembolische Ereignisse bei Anämie erklären [3, 27].

Um die Auswirkung der RBK auf die endotheliale Funktion in Zukunft umfassender nachweisen zu können, wurde in Anlehnung an bestehende Protokolle ein neues Versuchsprotokoll erarbeitet. Im Verlauf dieses Prozesses wurden zahlreiche Inkubationsbedingungen evaluiert. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde das finale Protokoll entwickelt, welches die Inkubation von Aortenringen aus WT-Mäusen mit RBK, die zuvor mit einem KH-Puffer verdünnt wurden, über einen Zeitraum von sechs Stunden unter Einsatz einer Rührplatte vorsah. Unter diesen Bedingungen hatten RBK von jungen, gesunden Spendern kaum einen Einfluss auf die Gefäßfunktion. Dieser Umstand entspricht den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [100, 141]. Durch die Inkubation mit RBK von älteren sowie STEMI-Probanden wurde die Gefäßfunktion hingegen signifikant beeinflusst. Die mit dysfunktionalen RBK inkubierten Segmente wiesen eine signifikante Rechtsverschiebung der SNP-DWK auf. Dies impliziert eine Abnahme der NO-Sensitivität innerhalb der GMZ [36, 129]. Die gemessene Reduktion der NO-Sensitivität könnte auf eine ROS-induzierte Inhibition der sGC zurückgeführt werden [144-146]. Ob die RBK über die Freisetzung von ROS eine Inhibition der sGC bewirkt haben, lässt sich gegenwärtig nur vermuten. Eine Überprüfung der Hypothese könnte

erfolgen, indem die NO-abhängige cGMP-Synthese im Anschluss an die sechsstündige Inkubation überprüft wird [146]. Die Beobachtung, dass die NO-Sensitivität der GMZ durch dysfunktionale RBK beeinträchtigt wurde, steht in einem Widerspruch zu Ergebnissen, die besagen, dass die RBK von diabetischen Patienten über die Sekretion von Peroxinitrit zu einer isolierten Abnahme der EDR geführt haben [100, 143]. Ob RBK in dem hier beschriebenen Versuchsaufbau eine Beeinträchtigung der Endothelfunktion verursacht haben, lässt sich aufgrund der veränderten NO-Sensitivität nicht ausschließen oder beweisen. Dies bedeutet, dass die gemessene Abnahme der EDR nicht zwangsläufig auf eine endotheliale Dysfunktion zurückgeführt werden kann. Daher sollte für zukünftige Experimente der Einsatz zusätzlicher Methoden erwogen werden. Im Anschluss an die Inkubation könnte mittels CLD die Funktionalität der eNOS über eine Messung der ACh-vermittelten NO-Freisetzung quantifiziert werden [36]. Alternativ könnte mithilfe einer Elektronenspinresonanz überprüft werden, ob die Inkubation über die Ausbildung einer endothelialen Dysfunktion einen Anstieg von Superoxiden bewirkt [61].

## 4.5 Limitation der Arbeit

Für sämtliche erhobene Daten gilt, dass die Daten ausschließlich auf *Ex-vivo*-Versuchen beruhen. E*x vivo* wurde in chronisch anämischen Mäusen die Ausbildung eine endotheliale Dysfunktion beobachtet. Als Korrelat der kompromittierten Endothelfunktion wurde in chronisch anämischen Mäusen *in vivo* eine Reduktion der flussvermittelte Dilatation ermittelt [132]. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Untersuchungsmodalitäten scheinen daher miteinander vereinbar.

Ferner muss bei der Interpretation berücksichtigt werden, dass ausschließlich männliche Versuchstiere verwendet wurden. Es ist bekannt, dass Östrogen einen protektiven Effekt auf das kardiovaskuläre System ausübt [152, 153]. Ob die Manifestation einer endothelialen Dysfunktion in weiblichen Versuchstieren durch die erhöhten Östrogenspiegel verhindert werden würde, muss in zukünftigen Experimenten kritisch evaluiert werden [152]. Darüber hinaus sollte bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass in dieser Arbeit nur die Auswirkung auf die *Aorta thoracalis* erfasst wurde. Da das Gefäßsystem im Hinblick auf Aufbau, Physiologie und Pathophysiologie jedoch nicht einheitlich ist, können die Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf anderweitige Aortenabschnitte übertragen werden [10, 118]. Die Untersuchung der Endothelfunktion in anderen Abschnitten des Gefäßsystems erscheint daher ratsam, um die Auswirkungen der Anämie auf das gesamte Gefäßsystem in Zukunft besser zu verstehen.

In Bezug auf die Etablierung des Protokolls ergeben sich aufgrund niedriger n-Zahlen Limitationen (siehe Tabelle 7 bis Tabelle 13). Es kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass basierend auf niedrigen n-Zahlen und der daraus resultierenden statistischen Unsicherheit Fehlannahmen getroffen wurden. Unter anderem kann angemerkt werden, dass nur drei Inkubationszeitpunkte untersucht wurden. Die Untersuchung alternative Inkubationszeitpunkte mit höheren n-Zahlen könnte zu einer weiteren Optimierung des bestehenden Protokolls beitragen.

# LITERATUR


1. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update.* Eur Heart J, 2014. **35**(42): p. 2950-9.
2. Dauerman, H.L., et al., *Bleeding complications in patients with anemia and acute myocardial infarction.* Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1379-83.
3. Westenbrink, B.D., et al., *Anemia predicts thromboembolic events, bleeding complications and mortality in patients with atrial fibrillation: insights from the RE-LY trial.* J Thromb Haemost, 2015. **13**(5): p. 699-707.
4. Anker, S.D., et al., *Prevalence, incidence, and prognostic value of anaemia in patients after an acute myocardial infarction: data from the OPTIMAAL trial.* Eur Heart J, 2009. **30**(11): p. 1331-9.
5. Aronson, D., et al., *Impact of red blood cell transfusion on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction.* Am J Cardiol, 2008. **102**(2): p. 115-9.
6. Stucchi, M., et al., *Anemia and acute coronary syndrome: current perspectives.* Vasc Health Risk Manag, 2018. **14**: p. 109-118.
7. Camus, S.M., et al., *Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease.* Blood, 2015. **125**(24): p. 3805-14.
8. Nader, E., et al., *Association Between Nitric Oxide, Oxidative Stress, Eryptosis, Red Blood Cell Microparticles, and Vascular Function in Sickle Cell Anemia.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 551441.
9. Stoyanova, E., et al., *Vascular endothelial dysfunction in β-thalassemia occurs despite increased eNOS expression and preserved vascular smooth muscle cell reactivity to NO.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38089.
10. Lüllmann-Rauch, R., *Kreislauforgane*, in *Taschenlehrbuch Histologie*. 2015, Thieme: Kiel. p. 271-286.
11. Wood, K.C., et al., *Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(8): p. 1861-71.
12. Kiowski, W., et al., *Endothelin-1-induced vasoconstriction in humans. Reversal by calcium channel blockade but not by nitrovasodilators or endothelium-derived relaxing factor.* Circulation, 1991. **83**(2): p. 469-75.
13. Raees, A., et al., *Altered cyclooxygenase-1 and enhanced thromboxane receptor activities underlie attenuated endothelial dilatory capacity of omental arteries in obesity.* Life Sci, 2019. **239**: p. 117039.
14. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
15. Furchgott, R.F. and P.M. Vanhoutte, *Endothelium-derived relaxing and contracting factors.* Faseb j, 1989. **3**(9): p. 2007-18.
16. Palmer, R.M., A.G. Ferrige, and S. Moncada, *Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.* Nature, 1987. **327**(6122): p. 524-6.
17. MacIntyre, D.E., J.D. Pearson, and J.L. Gordon, *Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells.* Nature, 1978. **271**(5645): p. 549-51.
18. Parkington, H.C., H.A. Coleman, and M. Tare, *Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization.* Pharmacol Res, 2004. **49**(6): p. 509-14.
19. Félétou, M. and P.M. Vanhoutte, *EDHF: an update.* Clin Sci (Lond), 2009. **117**(4): p. 139-55.

20. Rubanyi, G.M., J.C. Romero, and P.M. Vanhoutte, *Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor.* Am J Physiol, 1986. **250**(6 Pt 2): p. H1145-9.
21. Sumpio, B.E., J.T. Riley, and A. Dardik, *Cells in focus: endothelial cell.* Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1508-12.
22. Kraft, T. and B. Brenner, *Muskulatur*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2014, Thieme: Stuttgart, Baden-Württemberg. p. 133-168.
23. Rapoport, R.M., M.B. Draznin, and F. Murad, *Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation.* Nature, 1983. **306**(5939): p. 174-6.
24. Sauzeau, V., et al., *Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca2+ sensitization of contraction in vascular smooth muscle.* J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21722-9.
25. Kimura, K., et al., *Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase).* Science, 1996. **273**(5272): p. 245-248.
26. Schlossmann, J., et al., *Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta.* Nature, 2000. **404**(6774): p. 197-201.
27. Azuma, H., M. Ishikawa, and S. Sekizaki, *Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation.* Br J Pharmacol, 1986. **88**(2): p. 411-5.
28. Furlong, B., et al., *Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation.* Br J Pharmacol, 1987. **90**(4): p. 687-92.
29. Moncada, S., et al., *An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.* Nature, 1976. **263**(5579): p. 663-5.
30. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
31. Park, J.W., *Attenuation of p47phox and p67phox membrane translocation as the inhibitory mechanism of S-nitrosothiol on the respiratory burst oxidase in human neutrophils.* Biochem Biophys Res Commun, 1996. **220**(1): p. 31-5.
32. Zhang, Y., et al., *NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets.* Nat Rev Cardiol, 2020. **17**(3): p. 170-194.
33. Katsuki, S., et al., *Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine.* J Cyclic Nucleotide Res, 1977. **3**(1): p. 23-35.
34. Rapoport, R.M. and F. Murad, *Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP.* Circ Res, 1983. **52**(3): p. 352-7.
35. Förstermann, U., et al., *Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries.* Circ Res, 1986. **58**(4): p. 531-8.
36. Yamashita, T., et al., *Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase.* Hypertension, 2000. **36**(1): p. 97-102.
37. Pfeifer, A., et al., *Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice.* Embo j, 1998. **17**(11): p. 3045-51.
38. Surks, H.K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha.* Science, 1999. **286**(5444): p. 1583-7.

39. Desch, M., et al., *IRAG determines nitric oxide- and atrial natriuretic peptide-mediated smooth muscle relaxation.* Cardiovascular Research, 2010. **86**(3): p. 496-505.
40. Stehlik, J. and M.A. Movsesian, *Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 and 5 as therapeutic agents in heart failure.* Expert Opin Investig Drugs, 2006. **15**(7): p. 733-42.
41. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells.* J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
42. Goldberg, I.D., et al., *In vivo aortic muscle cell growth kinetics. Differences between thoracic and abdominal segments after intimal injury in the rabbit.* Circ Res, 1980. **47**(2): p. 182-9.
43. Mayer, B., M. John, and E. Böhme, *Purification of a Ca2+/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin.* FEBS Lett, 1990. **277**(1-2): p. 215-9.
44. Stuehr, D.J., et al., *Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(17): p. 7773-7.
45. Raman, C.S., et al., *Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center.* Cell, 1998. **95**(7): p. 939-50.
46. Hemmens, B., et al., *Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase.* J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 35786-91.
47. Crane, B.R., et al., *Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate.* Science, 1998. **279**(5359): p. 2121-6.
48. Stuehr, D., S. Pou, and G.M. Rosen, *Oxygen reduction by nitric-oxide synthases.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 14533-6.
49. Pollock, J.S., et al., *Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10480-4.
50. Abu-Soud, H.M. and D.J. Stuehr, *Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(22): p. 10769-72.
51. Chen, Z.P., et al., *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase.* FEBS Lett, 1999. **443**(3): p. 285-9.
52. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.* Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-605.
53. Schleicher, M., et al., *The Akt1-eNOS axis illustrates the specificity of kinase-substrate relationships in vivo.* Sci Signal, 2009. **2**(82): p. ra41.
54. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity.* Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
55. Kleinbongard, P., et al., *Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals.* Free Radic Biol Med, 2003. **35**(7): p. 790-6.
56. Gödecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice.* Circ Res, 1998. **82**(2): p. 186-94.
57. Förstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function.* Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
58. Senoner, T. and W. Dichtl, *Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?* Nutrients, 2019. **11**(9).

59. Sies, H. and D. Jones, *Oxidative Stress**, in *Encyclopedia of Stress (Second Edition)*, G. Fink, Editor. 2007, Academic Press: New York. p. 45-48.
60. Li, H., S. Horke, and U. Förstermann, *Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention.* Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(6): p. 313-9.
61. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus.* Circ Res, 2001. **88**(2): p. E14-22.
62. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension.* J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
63. Kelley, E.E., et al., *Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells.* Free Radic Biol Med, 2006. **40**(6): p. 952-9.
64. Laursen, J.B., et al., *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin.* Circulation, 2001. **103**(9): p. 1282-8.
65. Gryglewski, R.J., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor.* Nature, 1986. **320**(6061): p. 454-6.
66. Pieper, G.M., G. Moore-Hilton, and A.M. Roza, *Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat.* Life Sci, 1996. **58**(9): p. PI147-52.
67. Chandra, S., et al., *Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway.* Br J Pharmacol, 2012. **165**(2): p. 506-19.
68. Romero, M.J., et al., *Diabetes-induced coronary vascular dysfunction involves increased arginase activity.* Circ Res, 2008. **102**(1): p. 95-102.
69. Berkowitz, D.E., et al., *Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels.* Circulation, 2003. **108**(16): p. 2000-6.
70. Baydoun, A.R., et al., *Substrate-dependent regulation of intracellular amino acid concentrations in cultured bovine aortic endothelial cells.* Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 940-8.
71. Simon, A., et al., *Role of neutral amino acid transport and protein breakdown for substrate supply of nitric oxide synthase in human endothelial cells.* Circ Res, 2003. **93**(9): p. 813-20.
72. Grönros, J., et al., *Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **300**(4): p. H1174-81.
73. Lin, K.Y., et al., *Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase.* Circulation, 2002. **106**(8): p. 987-92.
74. Böger, R.H., et al., *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases.* Circ Res, 2000. **87**(2): p. 99-105.
75. Walzog, B. and J. Fandrey, *Zusammensetzung und Volumen des Blutes*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
76. Walzog, B. and J. Fandrey, *Zelluläre Bestandteile des Blutes*, in *Physiologie*, H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.

77. Cortese-Krott, M.M., et al., *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease.* Blood, 2012. **120**(20): p. 4229-37.
78. Gorressen, S., et al., *Circulating NOS3 modulates left ventricular remodeling following reperfused myocardial infarction.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0120961.
79. Doyle, M.P. and J.W. Hoekstra, *Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins.* J Inorg Biochem, 1981. **14**(4): p. 351-8.
80. Dei Zotti, F., et al., *Redox regulation of nitrosyl-hemoglobin in human erythrocytes.* Redox Biol, 2020. **34**: p. 101399.
81. Rassaf, T., M. Feelisch, and M. Kelm, *Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues.* Free Radic Biol Med, 2004. **36**(4): p. 413-22.
82. Liu, X., et al., *Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes.* J Biol Chem, 1998. **273**(30): p. 18709-13.
83. Huang, K.T., et al., *Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11771-6.
84. Liao, J.C., et al., *Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8757-61.
85. Pawloski, J.R., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity.* Nature, 2001. **409**(6820): p. 622-6.
86. Zhang, R., et al., *Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection.* J Clin Invest, 2016. **126**(12): p. 4654-4658.
87. Isbell, T.S., et al., *SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation.* Nat Med, 2008. **14**(7): p. 773-7.
88. Crawford, J.H., et al., *Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation.* Blood, 2006. **107**(2): p. 566-74.
89. Liu, C., et al., *Mechanisms of human erythrocytic bioactivation of nitrite.* J Biol Chem, 2015. **290**(2): p. 1281-94.
90. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation.* Nature Medicine, 2003. **9**(12): p. 1498-1505.
91. Sprague, R.S., et al., *A selective phosphodiesterase 3 inhibitor rescues low PO2-induced ATP release from erythrocytes of humans with type 2 diabetes: implication for vascular control.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011. **301**(6): p. H2466-72.
92. Androne, A.S., et al., *Hemodilution is common in patients with advanced heart failure.* Circulation, 2003. **107**(2): p. 226-9.
93. *Nutritional anaemias. Report of a WHO scientific group.* World Health Organ Tech Rep Ser, 1968. **405**: p. 5-37.
94. Beutler, E. and J. Waalen, *The definition of anemia: what is the lower limit of normal of the blood hemoglobin concentration?* Blood, 2006. **107**(5): p. 1747-1750.
95. Guralnik, J.M., et al., *Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia.* Blood, 2004. **104**(8): p. 2263-8.
96. Sabatine, M.S., et al., *Association of hemoglobin levels with clinical outcomes in acute coronary syndromes.* Circulation, 2005. **111**(16): p. 2042-9.
97. Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. *S3 Leitlinie „Infarktbedingter kardiogener Schock - Diagnose, Monitoring Therapie“*. 2019

98. Wischmann, P., et al., *Anaemia is associated with severe RBC dysfunction and a reduced circulating NO pool: vascular and cardiac eNOS are crucial for the adaptation to anaemia.* Basic Res Cardiol, 2020. **115**(4): p. 43.
99. Poisson, J., et al., *Erythrocyte-derived microvesicles induce arterial spasms in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm.* J Clin Invest, 2020. **130**(5): p. 2630-2643.
100. Mahdi, A., et al., *Red Blood Cell Peroxynitrite Causes Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus via Arginase.* Cells, 2020. **9**(7).
101. Mahdi, A., et al., *Erythrocytes Induce Endothelial Injury in Type 2 Diabetes Through Alteration of Vascular Purinergic Signaling.* Front Pharmacol, 2020. **11**: p. 603226.
102. Wess, J., R.M. Eglen, and D. Gautam, *Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development.* Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(9): p. 721-733.
103. Böhm, S., *Cholinerge Systeme*, in *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 2020, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 131-135.
104. Bény, J.L., et al., *Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries.* J Cardiovasc Pharmacol, 2008. **51**(5): p. 505-12.
105. Wilson, C., M.D. Lee, and J.G. McCarron, *Acetylcholine released by endothelial cells facilitates flow-mediated dilatation.* J Physiol, 2016. **594**(24): p. 7267-7307.
106. Methven, L., P.C. Simpson, and J.C. McGrath, *Alpha1A/B-knockout mice explain the native alpha1D-adrenoceptor's role in vasoconstriction and show that its location is independent of the other alpha1-subtypes.* Br J Pharmacol, 2009. **158**(7): p. 1663-75.
107. Behrends, J., *Mechanismen der Signalübertragung im pVNS*, in *Duale Reihe Physiologie*, J. Behrends, et al., Editors. 2016, Georg Thieme Verlag.
108. Wang, P.G., et al., *Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications.* Chem Rev, 2002. **102**(4): p. 1091-134.
109. Offermanns, S., *Pharmaka mit Wirkung auf die glatte Muskulatur*, in *Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*. 2020, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 447-468.
110. Brandes, R.P., et al., *Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase.* Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 231-6.
111. Majed, B.H. and R.A. Khalil, *Molecular mechanisms regulating the vascular prostacyclin pathways and their adaptation during pregnancy and in the newborn.* Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 540-82.
112. Metzger, D., et al., *Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(15): p. 6991-5.
113. Feil, R., et al., *Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **237**(3): p. 752-7.
114. Whitfield, J., T. Littlewood, and L. Soucek, *Tamoxifen administration to mice.* Cold Spring Harb Protoc, 2015. **2015**(3): p. 269-71.
115. Teilmann, A.C., et al., *Physiological and pathological impact of blood sampling by retro-bulbar sinus puncture and facial vein phlebotomy in laboratory mice.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113225.

116. Aldini, G., et al., *N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why.* Free Radic Res, 2018. **52**(7): p. 751-762.
117. Charron, M.J., et al., *Antioxidant Effects of N-Acetylcysteine Prevent Programmed Metabolic Disease in Mice.* Diabetes, 2020. **69**(8): p. 1650-1661.
118. Wenceslau, C.F., et al., *Guidelines for the measurement of vascular function and structure in isolated arteries and veins.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2021. **321**(1): p. H77-h111.
119. Newesely, H., *Über die Löslichkeit schwerlöslicher Salze, insbesondere gefällter Calciumphosphate.* Monatshefte für Chemie und verwandte Teile anderer Wissenschaften, 1966. **97**(2): p. 468-483.
120. Szasz, T. and R.C. Webb, *Perivascular adipose tissue: more than just structural support.* Clin Sci (Lond), 2012. **122**(1): p. 1-12.
121. Gonon, A.T., et al., *Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production.* PLoS One, 2012. **7**(7): p. e42038.
122. Buus, N.H., E. VanBavel, and M.J. Mulvany, *Differences in sensitivity of rat mesenteric small arteries to agonists when studied as ring preparations or as cannulated preparations.* Br J Pharmacol, 1994. **112**(2): p. 579-87.
123. Vanhoutte, P.M., et al., *Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update.* Acta Physiol (Oxf), 2017. **219**(1): p. 22-96.
124. Schubert, R., *Isolated Vessels*, in *Practical Methods in Cardiovascular Research*, S. Dhein, F.W. Mohr, and M. Delmar, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 198-211.
125. Chennupati, R., et al., *Deletion of endothelial arginase 1 does not improve vasomotor function in diabetic mice.* Physiol Rep, 2018. **6**(11): p. e13717.
126. Ford, R.J., et al., *Glutathione depletion in vivo enhances contraction and attenuates endothelium-dependent relaxation of isolated rat aorta.* Free Radic Biol Med, 2006. **40**(4): p. 670-8.
127. Ni, Z., S. Morcos, and N.D. Vaziri, *Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in iron-deficiency anemia.* Kidney Int, 1997. **52**(1): p. 195-201.
128. Kaul, D.K., et al., *Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in transgenic sickle mouse,* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(6): p. H1799-806.
129. Ohashi, Y., et al., *Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase.* J Clin Invest, 1998. **102**(12): p. 2061-71.
130. Inserte, J., et al., *Implications of Iron Deficiency in STEMI Patients and in a Murine Model of Myocardial Infarction.* JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(7): p. 567-580.
131. Zou, M.H., C. Shi, and R.A. Cohen, *Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite.* J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 817-26.
132. Chennupati, R., et al., *Chronic anemia is associated with systemic endothelial dysfunction.* Front Cardiovasc Med, 2023. **10**: p. 1099069.
133. Nur, E., et al., *N-acetylcysteine reduces oxidative stress in sickle cell patients.* Ann Hematol, 2012. **91**(7): p. 1097-105.
134. Kato, G.J., M.H. Steinberg, and M.T. Gladwin, *Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease.* J Clin Invest, 2017. **127**(3): p. 750-760.
135. Morris, C.R., et al., *Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease.* Jama, 2005. **294**(1): p. 81-90.

136. Ryoo, S., et al., *Oxidized low-density lipoprotein-dependent endothelial arginase II activation contributes to impaired nitric oxide signaling.* Circ Res, 2006. **99**(9): p. 951-60.
137. Ma, X.L., et al., *Endothelial protective and antishock effects of a selective estrogen receptor modulator in rats.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H876-84.
138. Grigoryants, V., et al., *Tamoxifen up-regulates catalase production, inhibits vessel wall neutrophil infiltration, and attenuates development of experimental abdominal aortic aneurysms.* Journal of Vascular Surgery, 2005. **41**(1): p. 108-114.
139. Leung, H.S., et al., *Tamoxifen dilates porcine coronary arteries: roles for nitric oxide and ouabain-sensitive mechanisms.* British journal of pharmacology, 2006. **149**(6): p. 703-711.
140. Ryoo, S., et al., *Endothelial arginase II: a novel target for the treatment of atherosclerosis.* Circ Res, 2008. **102**(8): p. 923-32.
141. McCann Haworth, S.M., et al., *Red blood cells from patients with pre-eclampsia induce endothelial dysfunction.* J Hypertens, 2021. **39**(8): p. 1628-1641.
142. Fitts, D.A., *Ethics and animal numbers: informal analyses, uncertain sample sizes, inefficient replications, and type I errors.* J Am Assoc Lab Anim Sci, 2011. **50**(4): p. 445-53.
143. Zhou, Z., et al., *Erythrocytes From Patients With Type 2 Diabetes Induce Endothelial Dysfunction Via Arginase I.* J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(7): p. 769-780.
144. Weber, M., et al., *The effect of peroxynitrite on the catalytic activity of soluble guanylyl cyclase.* Free Radic Biol Med, 2001. **31**(11): p. 1360-7.
145. Stasch, J.P., et al., *Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels.* J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2552-61.
146. Zhou, Z., et al., *Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide.* Pharmacol Res, 2016. **111**: p. 556-562.
147. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
148. Rizvi, S.I. and P.K. Maurya, *Markers of oxidative stress in erythrocytes during aging in humans.* Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 373-82.
149. Kuhn, V., et al., *Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia.* Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.
150. Gomez, S.A., et al., *The oxidative stress induced in vivo by Shiga toxin-2 contributes to the pathogenicity of haemolytic uraemic syndrome.* Clin Exp Immunol, 2013. **173**(3): p. 463-72.
151. Morris, C.R., et al., *Hemolysis-associated pulmonary hypertension in thalassemia.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1054**: p. 481-5.
152. Iorga, A., et al., *The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy.* Biol Sex Differ, 2017. **8**(1): p. 33.
153. Hohmann, N., et al., *Estrogen Receptor Signaling and the PI3K/Akt Pathway Are Involved in Betulinic Acid-Induced eNOS Activation.* Molecules, 2016. **21**(8).

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS


Abb. 1: Regulation der glatten Muskelzellen modifiziert nach Kraft et al. [22] 4

Abb. 2: Aufbau und Funktionsweise der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) modifiziert nach Förstermann et al. [57] 8

Abb. 3: ROS-induzierte endotheliale Dysfunktion modifiziert nach Li et al. [60] 10

Abb. 4: Versuchsaufbau zur Messung der Gefäßfunktion 23

Abb. 5: Aufbau der funktionellen Einheit 24

Abb. 6: Berechnung der Dilatation basierend auf der ermittelten Wandspannung modifiziert nach Wenceslau et al. [118]. 36

Abb. 7: Auswirkung der akuten Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen 38

Abb. 8: Auswirkung der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von Wildtyp-Mäusen 40

Abb. 9: Einfluss des N-Acetylcysteins (NAC) auf die Gefäßfunktion chronisch anämischer Wildtyp-Mäuse (CA). 42

Abb. 10: Einfluss des N-Acetylcysteins (NAC) auf die Gefäßfunktion von Sham-Wildtypen 44

Abb. 11: Auswirkung der chronischen Anämie auf die Gefäßfunktion von eNOS-Knockout- Mäusen (eNOS-KO) 45

Abb. 12: Einfluss der Deletion der endothelialen Arginase I auf die Gefäßfunktion im akuten Anämiemodell 47

Abb. 13: Einfluss der Deletion der endothelialen Arginase I auf die Gefäßfunktionen im chronischen Anämiemodell 49

Abb. 14: Gefäßfunktionen akut anämischer Wildtyp-Mäuse vor und nach der Inkubation mit dem Arginaseinhibitor nor-NOHA. 50

Abb. 15: Einfluss der Inkubationszeit auf die Gefäßfunktionen der WT-Mäuse 52

Abb. 16: Einfluss der RBK auf die Gefäßfunktion nach einer zweistündigen Inkubation 54

Abb. 17: Einfluss der RBK auf die Gefäßfunktion in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus der Probanden nach sechsstündiger Inkubation 56

Abb. 18: Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit (RG) auf die Gefäßfunktion 57

Abb. 19: Einfluss des Lösungsmittels auf die Gefäßfunktion 58

Abb. 20: Einfluss der 16-stündigen Inkubation mit RBK auf die Gefäßfunktion in Abhängigkeit vom Gesundheitsstatus der Probanden 60

Abb. 21: Gefäßfunktion nach Inkubation mit RBK von jungen gesunden Probanden unter finalen Bedingungen. 62
Abb. 22: Gefäßfunktionen nach Inkubation mit RBK von gesunden alten Probanden unter finalen Bedingungen 64
Abb. 23: Gefäßfunktionen nach Inkubation mit RBK von STEMI-Patienten unter finalen Bedingungen 66

# TABELLENVERZEICHNIS


Tabelle 1: 20-fache Krebs-Henseleit-Stammlösung (2 l) 25
Tabelle 2: 20-fache Kalzium-Stammlösung 25
Tabelle 3: Glucose-Natriumhydrogencarbonat-Lösung (500 ml) 25
Tabelle 4: finale Krebs-Henseleit-Stammlösung (2 l) 26
Tabelle 5: Pipettierschema Phenylephrine und Acetylcholin 28
Tabelle 6: Pipettierschema Natrium-Nitroprussid 29
Tabelle 7: Probandencharakteristika I 33
Tabelle 8: Probandencharakteristika II 33
Tabelle 9: Probandencharakteristika III 33
Tabelle 10: Probandencharakteristika IV 34
Tabelle 11: Probandencharakteristika V 34
Tabelle 12: Probandencharakteristika VI 34
Tabelle 13: Probandencharakteristika VII 34
Tabelle 14: Verwendete Pharmaka 96
Tabelle 15: Verwendete Chemikalien 96
Tabelle 16: Verwendete Mauslinien 96
Tabelle 17: Verwendete Geräte 97
Tabelle 18: Verwendete Software 97

# MATERIALLISTE

**Tabelle 14: Verwendete Pharmaka**

| Medikamente | Produktnummer | Hersteller |
|---|---|---|
| Acetylcholinchlorid | A6625-100G | SIGMA Aldrich |
| Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride | N5751-10G | SIGMA Aldrich |
| Erdnussöl/Arachisol | P2144-250ML | SIGMA Aldrich |
| (R) - (-) - Phenylephrinhydrochlorid | P6126-25G | SIGMA Aldrich |
| Sodium nitroprusside dihydrate | S0501 | SIGMA Aldrich |
| Indometacin | 17378-10G | SIGMA Aldrich |
| Heparin Natrium 25.000 IE/5 ml Braun | | B. Braun Melsungen AG |
| Ketaset | 794-523 | Zoetis Deutschland GmbH |
| Xylazinhydrochlorid | | Bayer |
| NaCl 0,9 % (Isotonische Kochsalzlösung) | NR:1313044 | Fresenius Kabi Deutschland GmbH |
| Endothelial Cell Growth Medium (500 ml) | C22010 | Promo Cell GmbH |
| Isofluran-Piramal | | Piramal-Critical-Care B.V. |

**Tabelle 15: Verwendete Chemikalien**

| Chemikalien | Produktnummer | Hersteller |
|---|---|---|
| Natriumchlorid | S9888-1KG | SIGMA Aldrich |
| Kaliumchlorid | | SIGMA Aldrich |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | NR:1.05886.1000 | EMSURE |
| Natriumhydrogencarbonat | NR:1.06329.1000 | Supleco/SIGMA Aldrich |
| Kaliumdihydrogenphosphat | | KMI optiChem |
| D-(+)-Glucose | G 7021-1KG | SIGMA |
| Kalziumchlorid-Dihydrat | NR:1.02382.1000 | MERCK KGaA |
| Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate | E 4884-500G | SIGMA |
| Carbogen (95 % $O_2$, 5 % $CO_2$) | | Linde |

**Tabelle 16: Verwendete Mauslinien**

| Maustyp | Bezeichnung | Züchter |
|---|---|---|
| C57BL/6J | Wildtyp | Janvier Labs |
| C57BL/6 (NOS3) TmPhänotyp -/- | Globale eNOS KO | ZETT HHU |
| C57BL/6.Cg-Arg1tm1Pmu/J TgN(Cdh5/PAC)-CreERT2 | EC-Arg I-KO | ZETT HHU |

**Tabelle 17: Verwendete Geräte**

| Gerät | Produktbezeichnung | Hersteller |
|---|---|---|
| Zentrifuge | Centrifuge 5810 R | Eppendorf |
| $CO_2$-Inkubator | Heracell 240 | Thermo Electron Corporation |
| Organbad | Grazer Glasgewebebad, 73-2273 | HUGO-Sachs-Elektorink |
| Spannungsmesser des Organbads | F30 Force Kraftmesser Type 372 | HUGO-Sachs-Elektorink |
| Metallpin | Sup. Set for Rings 0,3 µmm | HUGO-Sachs-Elektorink |
| Rührplatte | Polymax 1040 Plattformschüttler | Heidolph |
| Verstärkermodul | Powerlab 8/30 | AD Instruments |
| Wasserbad | LAUDA E100 | Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG |
| Mikroskop | Leica MZ 9.5 | Pro micron |
| Feinwaage | BP210 D | Sartorius AG |
| Waage | L 2200 P | Sartorius AG |
| OP-Besteck | 15005-08, 11253-25, 14575-11,14088-10 | Fine Science Tools GmbH |

**Tabelle 18: Verwendete Software**

| Software | Produktbezeichnung | Hersteller |
|---|---|---|
| Excel | Excel 2013 | Microsoft Corporation |
| Word | Word 2013 | Microsoft Corporation |
| LabChart | LabChart 8 Reader | AD Instruments |
| GraphPad Prism | GraphPad Prism 8 | GraphPad Software |
| EndNote | EndNote X9 | Clarivate Analytics |

# Danksagung

Ich möchte mich bei Professor Kelm für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken, ebenso wie für die Bereitstellung eines spannenden Forschungsthemas und die Anregungen während der AG-Treffen. Einen großen Dank möchte ich meinem Co-Betreuer, Privatdozent Dr. med. Florian Simon, aussprechen. Seine wertvollen Ratschläge und Hilfe bei der Finalisierung meiner Dissertationsschrift waren von unschätzbarem Wert.

Darüber hinaus gilt PD Dr. Ramesh Chennupati mein Dank. Seine umfangreiche Expertise auf dem Gebiet der Gefäßreaktivitätsforschung war eine enorme Hilfestellung, gerade im Hinblick auf die Etablierung eines neuen Protokolls. Selbstverständlich danke ich Frau Dr. med. Patricia Wischmann für Ihre Hilfe. Ohne ihr Engagement hätte ich nicht den Weg in diese Arbeitsgruppe gefunden. Auch bei Stefanie Becher möchte ich mich für die freundliche Einarbeitung im Labor bedanken. Dank Ihrer liebevoll kuratierten Playlist verging die Wartezeit zwischen den einzelnen Experimenten wie im Flug. Meinen Ko-Doktoranden Isabella Solga und Caroline Langebein danke ich für die netten und unterhaltsamen Kaffeepausen. Schließlich möchte ich betonen, dass mein Dank nicht nur diesen oben aufgeführten Personen gilt, sondern der gesamten Arbeitsgruppe. Die Zusammenarbeit und der Austausch mit allen Kollegen und Kolleginnen waren äußerst wertvoll für mich.

Insbesondere meinen Eltern möchte ich für die bedingungslose Unterstützung während der Promotion sowie während des gesamten Studiums danken. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Freundin bedanken. Ihre Geduld und ihr Verständnis in all den stressigen Zeiten haben mir geholfen, mein Ziel zu erreichen.