Aktivität und Bedeutung der erythrozytären NOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Patrick Horn

aus

Düsseldorf

Berichter: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Malte Kelm

Herr Universitätsprofessor
Dr. med. Jürgen Floege

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **I**

Liste der Abkürzungen **III**

1. Einleitung **1**

1.1 Synthese von Stickstoffmonoxid und deren Regulation **2**

1.2 Stoffwechsel von Stickstoffmonoxid **6**

1.3 Erythrozytäre NO-Synthase **7**

1.4 Funktion von Stickstoffmonoxid **8**

2. Material und Methoden **11**

2.1 Untersuchung des NO-Stoffwechsels *in vitro* **11**

2.1.1 Studienkollektiv 11
2.1.2 Blutentnahme 12
2.1.3 Probenaufarbeitung 12
2.1.4 Aufarbeitung der Blutproben zur Erythrozytenseparation 12
2.1.5 Protokoll zur Untersuchung der eryNOS-Aktivität und der Erythrozyten-verformbarkeit 13
2.1.6 Protokoll zur Untersuchung des Einflusses von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit 14
2.1.7 Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels CLD 14
2.1.8 Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma mittels NR-FIA 15
2.1.9 Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mittels Filtrationsverfahren 17
2.1.10 Bestimmung der erythrozytären Arginaseaktivität 20
2.1.11 Immunzytochemische Untersuchung der Phosphorylierung der eryNOS 21

2.2 Untersuchung des Einflusses von NO auf die Mikrozirkulation *in vivo* **22**

2.2.1 Das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos als Mikrozirkulations-modell 22
2.2.2 Präparation der Eier 23
2.2.3 Intravitalmikroskop 23
2.2.4 Versuchsaufbau 24
2.2.5 Charakterisierung der Methodik 25
2.2.6 Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation 26
2.2.7 Einfluss von endogen gebildetem NO auf die Mikrozirkulation 26

2.3 Statistik **26**

3. Ergebnisse 27

3.1 Erythrozytärer NO-Stoffwechsel bei kardiovaskulären Risikofaktoren 27

3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation 27
3.1.2 Aktivität der eryNOS in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren 28
3.1.3 Veränderung der erythrozytären Arginaseaktivität in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren 31
3.1.4 Stimulation der eryNOS durch Phosphorylierung von Serin 1177 31
3.1.5 Einfluss erythrozytärer NO-Bildung auf die Erythrozytenverformbarkeit 32
3.1.6 Einfluss von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit 34
3.1.7 Korrelation zwischen der Nitritkonzentration als Metabolit des NO-Stoffwechsels und der Erythrozytenverformbarkeit 35

3.2 Einfluss von NO auf die Mikrozirkulation *in vivo* am Modell des Hühnerembryos 38

3.2.1 Sensitivität der etablierten Methode 38
3.2.2 Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation 39
3.2.3 Einfluss von endogen gebildetem NO auf die Mikrozirkulation 40

4. Diskussion 43

4.1 Erythrozytäre NO-Synthese bei kardiovaskulären Risikofaktoren 44

4.2 Veränderungen des L-Arginin-NO-Metabolismus bei kardiovaskulären Risikofaktoren 46

4.3 Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren 52

4.4 Etablierung eines extraembryonalen Mikrozirkulationsmodells 59

4.5 Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit *in vivo* 61

4.6 Ausblick 64

5. Zusammenfassung 65

6. Literaturverzeichnis 67

7. Danksagung 81

8. Lebenslauf 83

Liste der Abkürzungen

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AGE	Advanced Glycation End Products, fortgeschrittene Endprodukte der Glykierung
ATP	Adenosintriphosphat
BH_4	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body Mass Index, Körpermasseindex
Ca^{2+}	Calcium
CAT	Cationic Amino Acid Transporter, kationischer Aminosäurentransporter
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenzdetektion
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
GSNO	*S*-Nitrosoglutathion
HbO_2	oxygeniertes Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein, Lipoprotein hoher Dichte
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoprotein niedriger Dichte
L-NIO	N^5-(1-iminoethyl)-L-Ornithin
L-NMMA	N^G-Monomethyl-L-Arginin
MAP	Mean Arterial Pressure, mittlerer arterieller Druck
MCV	Mean Cellular Volume, mittleres Erythrozyteneinzelvolumen
MW	Mittelwert
$NADP^+$	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
$NO^{\cdot}$	Stickstoffmonoxid (im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)
NO_{2-}	Nitrit
NO_{3-}	Nitrat
NOS	NO-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eryNOS	erythrozytäre NO-Synthase
NR-FIA	Nitratreduktase-Flussinjektionsanalyse
O_2	molekularer Sauerstoff
O_2^-	Superoxidanion
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RF	Risikofaktor
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SE	Standard Error, Standardfehler

1. Einleitung

Herzkreislauferkrankungen stellen heutzutage die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar[1]. 2005 sind allein in Deutschland 367 361 Menschen (44,2 % aller Todesfälle) an den Folgeerkrankungen des Herzkreislaufsystems verstorben. Kardiovaskuläre Krankheiten haben im Jahr 2004 mit einem Anteil von 16 % der Gesamtkrankheitskosten insgesamt 35,3 Milliarden Euro für stationäre und ambulante Behandlungen, durch Arbeitsunfähigkeit, Invalidität und vorzeitigem Tod von Erwerbstätigen an Kosten verursacht (statistisches Bundesamt).

Pathophysiologisch bedeutsam bei der Entstehung von Herzkreislauferkrankungen ist eine Reihe von metabolischen und hämostatischen Veränderungen. Die Risikofaktoren für die Entstehung von Herzkreislauferkrankungen sind Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Nikotinabusus und höheres Alter[2]. Gemeinsames pathologisches Korrelat der Herzkreislauferkrankungen sind Veränderungen des Gefäßendothels und seiner Funktionen. Zahlreiche Arbeiten konnten die Bedeutung des L-Arginin-Stickstoffmonoxid-Stoffwechselweges für die physiologische, aber auch pathophysiologisch veränderte Endothelfunktion nachweisen[3]. Die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) ist gleicherweise beim Diabetes mellitus[4], bei der arteriellen Hypertonie[5], der Dyslipidämie[6], bei Rauchern[7] wie auch im Alter[8] verringert. Eine verminderte Menge an „bioverfügbarem“ NO führt zu einer Einschränkung der endothelabhängigen Vasodilatation, zu veränderten antikoagulativen, antiadhäsiven und antiinflammatorischen Eigenschaften des Endothels, zu einer beeinträchtigten Modulation des Gefäßwachstums und zu einer Dysregulation vaskulärer Anpassungsprozesse[9;10]. Diese Veränderungen werden unter dem Terminus der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst und als frühes Schlüsselereignis sowohl in der Entstehung als auch dem Fortschreiten einer Arteriosklerose angesehen[11].

Ursache einer reduzierten Bioverfügbarkeit von NO bei kardiovaskulären Krankheiten können Veränderungen der NO-Synthese sein (Abbildung 1). Ein Substratmangel, ein Kofaktor-Mangel, eine erhöhte Konzentration endogener Inhibitoren, eine verminderte Expression der NO-Synthase oder eine eingeschränkte Aktivierung des Enzyms können die Bildung und folglich die Bioverfügbarkeit von NO verringern[9]. Neben Veränderungen der Synthese kann auch ein beschleunigter Abbau des gebildeten NO die Verfügbarkeit von NO einschränken[9].

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass neben den Endothelzellen auch Erythrozyten eine NO-Synthase (eryNOS) besitzen, welche in physiologisch relevanten Mengen NO synthetisiert und exportiert[12]. Neben endothelial gebildetem NO beeinflusst auch erythrozytär gebildetes NO die Mikrozirkulation.

Ungeklärt ist, ob bei kardiovaskulären Krankheiten neben einer endothelialen Dysfunktion auch eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit, bedingt durch eine veränderte eryNOS-Aktivität, vorliegt. Ursachen hierfür könnten die Veränderungen des L-Arginin-Stoffwechsels sein, die für die endotheliale Dysfunktion bekannt sind. Die physiologische Konsequenz einer verminderten erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit für das kardiovaskuläre System ist bislang unbekannt.

Im folgenden Kapitel wird zunächst auf die enzymatische Synthese von NO und deren Regulation eingegangen. Diese wird einleitend für die Endothelzelle und nachfolgend für den Erythrozyten dargestellt. Anschließend werden der Stoffwechsel von NO sowie die Funktion des NO im Allgemeinen und für die Mikrozirkulation im Speziellen beschrieben.

1.1 Synthese von Stickstoffmonoxid und deren Regulation

NO wird mit L-Citrullin durch die NO-Synthase (NOS) enzymatisch unter Umsetzung der Aminosäure L-Arginin gebildet[13]. L-Arginin wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper durch den Harnstoffzyklus aus L-Citrullin gebildet[14]. An der Synthese von NO sind die Kofaktoren Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Flavin-Adenosin-Dinukleotid, Flavin-Mononukleotid und molekularer Sauerstoff (O_2) beteiligt[15]. Die NO-Synthase ist ein Dimer mit Oxygenase- und Reduktase-Domänen. NADPH bindet an die Reduktase-Domäne und gibt ein Elektron ab. Das Elektron wird mittels der Redox-Carrier Flavin-Adenosin-Dinukleotid und Flavin-Mononukleotid in Richtung Oxygenase-Domäne transportiert und gelangt nach Interaktion mit BH_4 und Häm zur aktiven Seite des Enzyms. An der aktiven Seite der Oxygenase-Domäne läuft dann die Reaktion von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO ab[16].

Bisher sind drei Isoformen der NOS bekannt, die alle als Homodimere vorliegen. Dabei handelt es sich um eine neuronale, eine induzierbare und eine endotheliale NOS-Isoform (eNOS), die sich hinsichtlich ihres genetischen Ursprunges, ihrer Lokalisation im Säugetierorganismus sowie ihrer Regulation und katalytischen Eigenschaften unterscheiden[17;18]. Darüber hinaus wurde eine weitere Isoform in Mitochondrien nachgewiesen[19].

Unter physiologischen Bedingungen wird NO im vaskulären System vor allem mittels der eNOS gebildet[20]. Die NO-Synthese wird von der Bereitstellung des Substrates L-Arginin, der Konzentration endogener Inhibitoren und der Ca^{2+}-abhängigen und -unabhängigen Aktivierung der NOS beeinflusst.

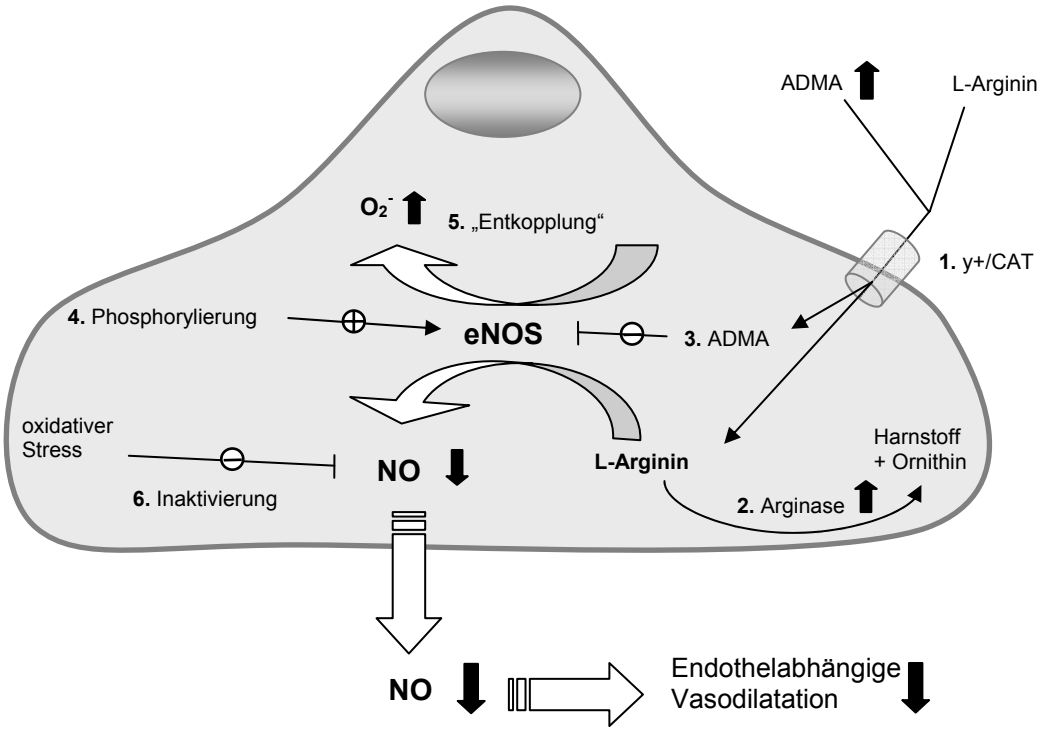

Abbildung 1
Schematische Darstellung der Auswirkungen kardiovaskulärer Krankheiten auf den NO-Stoffwechsel der Endothelzelle. Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit kann unter anderem verursacht werden durch **1)** einen verringerten Transport von L-Arginin in die Zelle, **2)** eine verringerte L-Argininverfügbarkeit durch eine erhöhte Arginaseaktivität, **3)** eine gesteigerte Inhibition der eNOS durch ADMA, **4)** eine veränderte Phosphorylierung, **5)** eine „Entkopplung“ der eNOS (eine reduzierte NO-Synthese bei gesteigerter O_2^--Bildung, **6)** eine Inaktivierung von gebildetem NO durch oxidativen Stress. Die Folge der verminderten NO-Verfügbarkeit ist eine eingeschränkte endothelabhängige Dilatation der Gefäßmuskelzelle.

Das *Substratangebot an intrazellulärem L-Arginin* wird bestimmt durch den Transport in die Zelle mittels L-Arginin-Transporter und der Aktivität des L-Arginin umsetzenden Enzyms Arginase. Die semiessentielle kationische Aminosäure L-Arginin gelangt hauptsächlich über das y+ System in die Endothelzelle[21]. Der Begriff y+ beschreibt die Aktivität und Expression der Gesamtheit der selektiv kationischen Aminosäurentransporter (CAT)[22]. Über ein negatives Membranpotential des Transporters kommt es zur Akkumulation und zum Transport der Aminosäuren[23]. eNOS und y+ sind in den Caveolae kolokalisiert. Neben der Annahme, dass es sich bei diesen Strukturen um eine funktionelle Einheit handelt, konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass diese auch regulativ Einfluss nimmt[24]. Der L-Arginintransport via y+/CAT ist eine Voraussetzung für die basale und stimulierte NO-Produktion[25]. Ist das intrazelluläre L-Argininangebot vermindert, wird die NOS-Aktivität und somit die NO-Synthese limitiert[26]. Durch Versuche mittels NO-Donatoren konnte gezeigt werden, dass die NO-Freisetzung selbst akut einen steigernden Effekt auf den

L-Arginintransport via y+ bewirkt. Hingegen übt eine längere Disposition eine inhibitorische Wirkung aus[27]. Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie konnte eine Verminderung des L-Arginintransportes in die Endothelzelle nachgewiesen werden[28].

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Bereitstellung des Substrates L-Arginin ist die intrazelluläre Arginase. Das Enzym katalysiert die Hydrolysierung von L-Arginin im letzten Schritt des Harnstoffzyklus unter Freisetzung von Harnstoff und L-Ornithin. Somit steht sie in Konkurrenz zur NO-Synthase um L-Arginin als gemeinsames Substrat[29]. Bislang sind zwei Isoformen der Arginase identifiziert worden. Die Arginase I als zytosolisches Enzym wird hauptsächlich in der Leber exprimiert. Die Arginase II ist in den Mitochondrien lokalisiert und kommt in diversen extrahepatischen Geweben vor[23]. Sowohl in glatten Muskelzellen als auch in der Endothelzelle ist eine konstitutive Aktivität der Arginase beschrieben worden[30]. Eine Überexpression der endothelialen Arginase im Alter[31], bei Diabetes mellitus[32] und arterieller Hypertonie[33] reduziert die NO-Produktion. Dies steht im Zusammenhang mit einer verminderten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasodilatation[34].

Endogene Inhibitoren können als autokrine Mediatoren die NOS-Aktivität regulieren. Die methylierten L-Arginin-Analoga asymmetrisches Dimethyl-Arginin (ADMA) und N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) hemmen die NOS kompetitiv[35]. Methylierte L-Arginin Analoga entstehen zum einen beim Abbau methylierter Proteine und zum anderen infolge des enzymatischen Umbaus durch *N*-Methyltransferasen[36]. ADMA liegt in 10x höherer Konzentration als L-NMMA vor und stellt den wichtigsten Inhibitor der NO-Synthese dar[37]. Das Verhältnis des intrazellulär vorhandenen L-Arginins zu ADMA reguliert die NOS-Aktivität. ADMA und L-NMMA werden in die Endothelzelle wie L-Arginin über y+/CAT transportiert und konkurrieren mit L-Arginin um den Transport in die Zelle[24;38]. Ein Teil des gebildeten ADMA und L-NMMA gelangt aus der Endothelzelle ins Plasma und wird dann über die Niere ausgeschieden. Der Hauptanteil des gebildeten ADMA und L-NMMA wird intrazellulär von der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH) abgebaut[39]. DDAH und eNOS sind kolokalisiert. Deshalb wird angenommen, dass die eNOS-Aktivität über intrazelluläres ADMA hauptsächlich durch die DDAH-Aktivität reguliert wird, während man von einer konstanten Syntheseleistung der *N*-Methyltransferasen ausgeht[40]. In Verbindung mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie der arteriellen Hypertonie[41], dem Diabetes mellitus[42], dem höheren Alter[43] und der Dyslipidämie[44] wurde eine erhöhte ADMA-Konzentration im Plasma nachgewiesen. Diese führt zu einer Inhibition der eNOS und ist mit einer eingeschränkten NO-vermittelten endothelabhängigen Vasodilatation assoziiert[45].

Die *Aktivierung der konstitutiven NOS* erfolgt über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration[17]. Dieser kann einerseits durch einen Ca^{2+}-Einstrom aus der Umgebung über

Ionenkanäle in der Plasmamembran geschehen, die durch Liganden, Spannungsänderungen, mechanische Reize (Änderung der Schubspannung) oder intrazelluläre Faktoren aktiviert werden. Ebenso bedeutend ist die rezeptorvermittelte Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+}-Speichern. Die Bindung bestimmter Hormone und Neurotransmitter an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kann zu einer solchen intrazellulären Ca^{2+}-Freisetzung führen[46]. Als Folge kommt es zur einer Calmodulin-NOS-Assoziation[17]. Calmodulin ist ein Ca^{2+}-bindendes Protein. Es kontrolliert den Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne der NOS, so dass der Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration die NO-Bildung induziert[47].
Als Ca^{2+}-unabhängige Regulationsmechanismen werden Proteinmodifikationen der NOS wie Phosphorylierung, Alkylierung durch Myristoylierung und Palmitoylierung beschrieben. Die eNOS ist unter basalen Bedingungen an Serin- und Threoninresten schwach phosphoryliert[48]. Die Phosphorylierung an drei oder mehr Seiten des Enzyms beeinflusst die Aktivität der eNOS: am Serin 1177, Threonin 495, Serin 114 und am Serin 633[49]. Verschiedene Stimuli wie zum Beispiel Scherstress oder Insulin bewirken unabhängig von einer Ca^{2+}-Zunahme eine verstärkte Phosphorylierung von Serin 1177 und damit eine Aktivierung der eNOS[48]. Diese Regulation der eNOS über Serin 1177 wird über die Proteinkinase A und Aktin, die Proteinkinase C, die AMP-aktivierte Proteinkinase sowie über die zyklische AMP-abhängige Proteinkinase modifiziert[48;49]. Die Phosphorylierung von Serin 1177 hat eine zentrale Bedeutung in der NO-Produktion[49]. Dagegen geht eine Phosphorylierung von Threonin und Serin 114 mit einer Abnahme der Enzymaktivität einher[50]. Veränderungen der Phosphorylierung der eNOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren wurden im Zusammenhang mit einer Hyperglykämie, bei der arteriellen Hypertonie und im Alter nachgewiesen[51,52;53].
Neben NO kann auch Superoxidanion (O_2^-) von der eNOS synthetisiert werden. Das relative Verhältnis der Bildung beider Substanzen hängt von der Konzentration des Substrates L-Arginin und dem Redoxzustand der Kofaktoren ab. Der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie, die Dyslipidämie und der Nikotinabusus führen zu einem erhöhten oxidativen Stress[9]. Oxidativer Stress wird definiert als eine exzessive Bildung oder insuffiziente Entfernung von hoch reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie O_2^-, Hydroxylradikal, Wasserstoffperoxid und Peroxynitrit. Das im Rahmen des oxidativen Stresses vermehrt gebildete Peroxynitrit führt zu einer reduzierten NO-Synthese bei gesteigerter O_2^--Bildung. Dies wird als „Entkopplung“ der eNOS bezeichnet[54].

1.2 Stoffwechsel von Stickstoffmonoxid

NO ist ein hochreaktives freies Radikal. Endothelial gebildetes NO diffundiert frei über Zellmembranen in die Gefäßwand und in das Gefäßlumen. In biologischen Medien ist NO reaktiv und besitzt im Vollblut eine Halbwertszeit von 0,05 bis 1 Sekunde. Der NO-Metabolismus hängt von der Diffusionsgeschwindigkeit über biologische Membranen und von der jeweiligen Konzentration von NO, O_2 und anderen möglichen Reaktionspartnern ab. NO wird mit O_2 entweder zu Nitrosylanionen reduziert oder zu Nitrosoniumionen oxidiert[55]. Es kommt zur Bildung höherer Stickoxide wie Stickstoffdioxid und Distickstofftrioxid. Diese Stickoxide können entweder mit anderen Molekülen wie zum Beispiel Thiolen oder Aminen reagieren oder zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) hydrolysieren, deren relatives Verhältnis von den vorherrschenden Redoxbedingungen abhängt. Der größte Teil des endothelial gebildeten NO wird im Plasma unmittelbar zu Nitrit oxidiert[56]. Es wurde gezeigt, dass 70-90 % des im Blut zirkulierenden Nitrits aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel stammt und ein spezifischer und sensitiver Marker für akute Veränderungen der eNOS-Aktivität ist[57]. Nitrat stellt ein stabiles Abbauprodukt von NO *in vivo* da. Die Nitratkonzentration im Blut wird jedoch auch unabhängig vom NO-Stoffwechsel beeinflusst. Das endothelial gebildete NO hat trotz der kurzen Halbwertszeit nicht nur eine parakrine Wirkung lokal in der Gefäßwand. Eine endokrine Wirkung wird durch Speicherformen vermittelt; *S*-Nitrosothiole, die das NO in bioaktiver Form binden und vor dem direkten Abbau schützen, transportieren und systemisch wirksam werden lassen[58]. Die *S*-Nitrosothiole entstehen durch die nitrosative Reaktion mit plasmatischen Thiolgruppen von Albumin, Glutathion und Cystein. Neben Thiolen kann NO auch mit Aminen reagieren. Die entstehenden Nitrosamine bilden einen physiologischen Bestandteil des humanen Plasmas. Ihre Funktion ist noch nicht geklärt[59].

Erythrozyten wurden im Zusammenhang mit dem NO-Metabolismus lange Zeit lediglich als NO-abfangende Zellen betrachtet[60]. Sie nehmen jedoch nicht nur durch ihren großen Anteil am Blutvolumen von bis zu 50 % eine zentrale Rolle im vaskulären NO-Metabolismus ein[61]. Nitrit wird intraerythrozytär in Gegenwart von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2) unter Methämoglobinbildung zu Nitrat oxidiert[62]. Erreicht NO die Erythrozyten, reagiert es ebenfalls mit HbO_2 zu Methämoglobin und Nitrat. Dieser direkte Abbauweg hat vornehmlich in der Kapillarstrombahn eine Bedeutung, da hier die Distanz zwischen Endothelzellen und Erythrozyten geringer ist als in Leitungsarterien[63]. Eine zweite mögliche Reaktion von NO im Erythrozyten besteht in der Bildung von *S*-Nitrosohämoglobin durch eine Nitrosierungsreaktion des Cystein-93 der β-Kette des Hämoglobins[64]. Hämoglobin verändert die Affinität zu NO in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung[65]. In der Lunge nimmt Hämoglobin NO und O_2 auf, wohingegen in der peripheren Mikrozirkulation entlang des Sauerstoffgradienten O_2 und NO abgegeben wird. Dabei kommt der Interaktion des Hämoglobins mit dem in der

Erythrozytenmembran lokalisierten Protein AE1 (Bande 3 Protein) eine entscheidende Bedeutung zu[66]. Das aus *S*-Nitrosohämoglobin freigesetzte NO kann zu einer Dilatation der Blutgefäße sowie zu einer Beeinflussung der Thrombozytenaggregation führen[67]. In einer weiteren Reaktion kann intraerythrozytäres Hämoglobin im deoxygenierten Zustand endothelial gebildetes NO als Nitrosylhämoglobin binden[68]. Nitrosylhämoglobin führt wie natives Hämoglobin durch Abfangen von endothelialem NO zu einer Vasokonstriktion. Erythrozyten scheinen also nicht nur Abbauort von NO, sondern auch ein regulatorischer Bestandteil der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit zu sein. Nitrit wurde lange primär als intermediäres Zwischenprodukt im Abbau von NO betrachtet. Neueste Untersuchungen bestätigen jedoch eine ältere Hypothese, nach der auch im humanen Organismus, ähnlich der bakteriellen Nitrit-Reduktase aus Nitrit NO gebildet werden kann. Drei Mechanismen sind beschrieben, die Xanthinoxidoreduktase[67], die nicht-enzymatische Dysproportionierung oder Säure-Reduktion[69] und die nicht-enzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin[70].
Neben Sauerstoff nehmen Metaboliten des oxidativen Stresses wie O_2^- Einfluss auf den *Abbau von NO*. ROS können NO vorzeitig zu vasoinaktiven Metaboliten wie Nitrat abbauen[71]. Die proatherogene Wirkung von kardiovaskulären Risikofaktoren und die eingeschränkte NO-abhängige Vasodilatation wird zumindest zum Teil durch eine Einschränkung der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit durch oxidativen Stress verursacht[72].

1.3 Erythrozytäre NO-Synthase

Neben Endothelzellen besitzen auch Erythrozyten eine NOS, welche in physiologisch relevanten Mengen NO synthetisiert und exportiert[12;73;74]. Deliconstantinos et al. (1995) beschrieben erstmalig eine im Erythrozyten lokalisierte NOS[74]. Diese NOS konnte durch Ca^{2+} zu einer gesteigerten NO-Produktion angeregt werden, welche durch den NOS-Inhibitor L-NMMA hemmbar war. Die eryNOS wurde als konstitutiv exprimiert beschrieben und es konnte eine Abhängigkeit von Calmodulin, NADPH, den Kofaktoren BH_4 und Flavin-Adenosin-Dinukleotid gezeigt werden[74]. In anderen Studien konnte ebenfalls eine Ca^{2+}-Abhängigkeit der eryNOS nachgewiesen werden[12;73;75]. Kleinbongard et al. (2006) konnten am Modell der eNOS-Knock-Out Maus die eryNOS erstmals eindeutig als ein eNOS-ähnliches Protein charakterisieren[12]. Es konnte gezeigt werden, dass die eryNOS sowohl zytosolisch als auch membranständig lokalisiert sein kann. Die Aktivität der eryNOS wurde über die Bestimmung von Nitrit und L-Citrullin bestimmt. Durch Stimulation mit dem Substrat L-Arginin konnte eine gesteigerte erythrozytäre NO-Produktion nachgewiesen werden, welche durch Verwendung eines NOS-Inhibitors hemmbar war[12;73]. Die NO-Produktion des Erythrozyten nimmt konzentrationsabhängig mit steigenden L-Argininkonzentrationen zu[12]. Insulin stimuliert die Phosphorylierung an Serin 1177 als

auch die NO-Produktion der eryNOS. Diese Wirkung ist mit einem Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-Inhibitor hemmbar[12]. Die Regulationsmechanismen der eryNOS ähneln somit denen der eNOS.

Unbekannt ist, ob der für die eNOS beschriebene L-Arginin-NO-Stoffwechsel bei kardiovaskulären Krankheiten auch im Erythrozyten verändert ist, und dies zu einer verminderten erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit führt. Bislang ist unklar, inwieweit der L-Arginintransport in den Erythrozyten, die Arginaseaktivität, der erythrozytäre ADMA-Spiegel oder die Phosphorylierung der eryNOS in diesem Zusammenhang verändert ist. Ebenso ist noch offen, ob eine „entkoppelte" erythrozytäre NO-Synthese bei erhöhtem oxidativen Stress vorliegt, und eine vermehrte Inaktivierung von NO zu einer verminderten Bioverfügbarkeit führt.

1.4 Funktion von Stickstoffmonoxid

NO ist als intrazellulär und interzellulär wirkender Botenstoff an vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen im Nervensystem, Immunsystem und Herzkreislaufsystem beteiligt[76]. Viele dieser Vorgänge werden durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und einen daraus resultierenden Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) in der Zelle vermittelt[77].

Die Funktion von NO im Herzkreislaufsystem liegt in der Aufrechterhaltung der regionalen myokardialen Funktion und der vaskulären Homöostase durch Freisetzung von NO aus dem Endothel[78]. NO moduliert im vaskulären System verschiedene Funktionen in der luminalen und abluminalen Gefäßwand. In der Gefäßwand relaxiert NO die glatten. Die Folge ist eine Senkung des Gefäßtonus in den Leitungsarterien und in den präkapillären Widerstandsgefäßen. Es reguliert somit den Gefäßwiderstand und über diesen Mechanismus den Blutdruck und die Mikrozirkulation. Luminal hemmt NO die Adhäsion von Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten und Monozyten an die Gefäßwand[79]. Dieser Effekt wird zumindest zum Teil durch eine NO-induzierte Herunterregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 oder dem vaskulären Zelladhäsionsmolekül 1 vermittelt[80]. Durch Hemmung der Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors κB wirkt NO antiinflammatorisch[80]. NO beeinflusst zusätzlich die endotheliale Permeabilität[81]. Weiterhin scheint es sowohl die Proliferation und Migration, als auch die Produktion von Matrixproteinen der glatten Muskelzellen zu hemmen[82]. Auswirkungen einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit zeigen sich in einer verminderten Endothelfunktion und endothelabhängigen Vasodilatation bei Diabetes mellitus[4], der Dyslipidämie[6], der arteriellen Hypertonie[5], bei Rauchern[7] sowie im Alter[8].

Auch in der Mikrozirkulation hat NO eine regulatorische Bedeutung. Die Mikrozirkulation gewährleistet die Versorgung der Zellen mit O_2 und Nährstoffen. Bestimmende Faktoren der Mikrozirkulation sind vor allem die Plasmaviskosität sowie die Fließeigenschaften der Thrombozyten und Erythrozyten. Die Fließeigenschaften der Erythrozyten werden maßgeblich durch den Hämatokrit sowie deren Verformbarkeit und Aggregabilität bestimmt[83]. Die Aggregation der Thrombozyten und deren Adhäsion an die Gefäßwand wird durch endogen gebildetes NO und exogenes NO gehemmt[84;85]. Mononukleäre Leukozyten inhibieren ebenfalls abhängig vom NO-Stoffwechselweg die Endotheladhäsion der Thrombozyten[86].

NO beeinflusst die Aggregation und die Verformbarkeit der Erythrozyten. Unter *Erythrozytenaggregation* versteht man die Zusammenlagerung der Erythrozyten zu „Geldrollen“ (rouleaux). Diese formen sich durch Abstoßung negativ geladener Zellmembranen und Vernetzung mit hochmolekularen Plasmaproteinen (Fibrinogen, α_2-Makroglobulin)[87]. Die physiologische Aggregation ermöglicht die axiale Zellströmung in den Arterien und Venen, welche für den Blutfluss elementar ist[83]. NO reduziert die Aggregationsneigung der Erythrozyten und verbessert darüber die Mikrozirkulation[88]. Eine gesteigerte Erythrozytenaggregation ist an den Mikrozirkulationsstörungen zahlreicher Krankheiten wie koronarer Herzkrankheit (KHK), Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Sichelzellanämie beteiligt[89;90]. Zu den Ursachen zählt eine erhöhte Fibrinogenkonzentration im Plasma[91]. Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren führt eine veränderte Membranladung zu einer gesteigerten Erythrozytenaggregation[92].

Unter *Erythrozytenverformbarkeit* versteht man die Elongation der Erythrozyten, die eine Passage durch die kleinsten Gefäße ermöglicht. Humane Erythrozyten besitzen eine diskoide, bikonkave Form mit einem Durchmesser von circa 7-8 µm[93]. Der Durchmesser der kleinsten Kapillaren ist mit 2-3 µm deutlich kleiner als der Durchmesser des Erythrozyten. Eine Durchblutung im Bereich der Mikrozirkulation ist nur durch die Verformbarkeit des Erythrozyten möglich[94]. Die Verformbarkeit wird maßgeblich durch die Struktur der Erythrozytenmembran beeinflusst. Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht und einem Netzwerk von Strukturproteinen, welche sich an der Innenseite der Phospholipid-Doppelschicht befinden und in dieser verankert sind. Dieses Netzwerk wird hauptsächlich aus Spektrin-Verknüpfungen gebildet. Spektrin ist bis zu 250 % seiner Ursprungslänge dehnbar und bis zu 40 % kontrahierbar[95]. Die Verbindung zwischen dem Spektringerüst und der benachbarten Phospholipid-Doppelschicht wird durch weitere Protein-Interaktionen ermöglicht. Sechs Spektrinenden sind mit einem Aktin (Synonym: Bande 5) verbunden, welches über das Protein 4.1 und Adducin stabilisiert wird und mittels Ankyrin, Bande 3 und Glykophorin C in der Phospholipid-Doppelschicht verankert ist[96]. Diese

Strukturproteine erhalten nicht nur die Membranstabilität, sondern ermöglichen vor allem die Verformbarkeit[96]. Unter physiologischen Bedingungen kann NO die Membranfluidität[97] und Verformbarkeit[88;98] verbessern. Diese Wirkung wird nicht nur durch endothelial gebildetes, sondern auch durch erythrozytär gebildetes NO erzielt. Eine Stimulation der erythrozytären NO-Bildung *in vitro* verbesserte die Verformbarkeit, während durch eine Inhibition ein inverser Effekt verursacht wurde[12;98]. Eine Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit wurde bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes Mellitus[99], der arteriellen Hypertonie[100] und Dyslipidämie[101] nachgewiesen. Die Bedeutung des NO für die Verformbarkeit in diesen pathologischen Zuständen wurde noch nicht hinreichend untersucht. Für die arterielle Hypertonie[102] und Dyslipidämie[103] konnte gezeigt werden, dass exogen hinzugefügtes NO die in diesem Zusammenhang verminderte Membranfluidität und Verformbarkeit verbessern kann.

Bislang ist unbekannt, ob die erythrozytäre NO-Bildung bei kardiovaskulären Risikofaktoren vermindert ist und inwieweit NO *in vivo* die Erythrozytenverformbarkeit und die Mikrozirkulation beeinflusst.

Die Ziele dieser Arbeit waren deshalb

1) die Quantifizierung der NOS-Aktivität im Erythrozyten in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren und deren Einfluss auf die Erythrozytenverformbarkeit,
2) die biochemische und immunzytochemische Untersuchung zu Veränderungen in den Regulationsmechanismen der eryNOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren,
3) die Etablierung einer Methode, mit welcher der Einfluss von NO auf die Erythrozyten-verformbarkeit und Mikrozirkulation *in vivo* untersucht werden konnte.

2. Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen. Die Herstellung von oxygeniertem Hämoglobin (HbO_2) wurde nach Feelisch et al. (1996) durchgeführt[104].

2.1 Untersuchung des NO-Stoffwechsels *in vitro*

2.1.1 Studienkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden junge gesunde Personen und Patienten mit bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht. Für die Untersuchungen wurden Mitarbeiter des Labors und deren Freunde sowie Patienten der Kardiologie der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf rekrutiert. Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Votum Prof. Dr. med. M. Kelm). Die Probanden wurden zunächst im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs um ihre Einwilligung zur Studienteilnahme gebeten. Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden sowohl anamnestische Angaben, als auch die klinische Untersuchung und laborchemische Parameter herangezogen. Bei den Probanden wurde zusätzlich ein Ruhe- und Belastungs-EKG sowie eine Kontrolle des Routinelabors (Blutbild, Natrium, Kalium, Harnsäure, Gesamtcholesterin, High density (HDL)- und Low density (LDL)- Cholesterin, Triglyzeride, Glukose, HbA1c und C-Reaktive-Protein) durchgeführt.

Als Risikofaktoren erster Ordnung wurden die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, Rauchen, das Alter und eine Dyslipidämie gewertet. Eine arterielle Hypertonie wurde gemäß der Joint-National-Commitee-Kriterien[105] bzw. der Weltgesundheitsorganisations-Richtlinien[106] diagnostiziert, wenn arterielle Drücke an drei verschieden Tagen von >140/>90 mmHg gemessen wurden oder bereits eine antihypertensive Therapie bestand. Ein Diabetes mellitus wurde nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation[107] und der American Diabetes Association[108] diagnostiziert, wenn bei Messungen an zwei unterschiedlichen Tagen die Plasmaglukosespiegel nüchtern >126 mg/dl gemessen wurden, ein oraler Glukose-toleranztest mit 2 Stunden-Werten von >200 mg/dl oder zu einem beliebigen Zeitpunkt eine Diabetessymptomatik in Kombination mit Plasmaglukosewerten von >200 mg/dl bestanden. Ebenfalls wurden Personen, die bereits mit oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden, als Diabetiker klassifiziert. Als Raucher wurden diejenigen klassifiziert, die täglich mindestens 10 Zigaretten über ein Jahr rauchten. In Anlehnung an die Richtlinien der American Heart Association und des National Heart, Lung and Blood Institute wird eine Hypercholesterinämie definiert als das Vorliegen eines Gesamtcholesterins >240 mg/dl, eines

LDL-Cholesterins >160 mg/dl, eines HDL-Cholesterins <35 mg/dl oder einer bestehenden cholesterinsenkenden Therapie.

Ein Alter von >45 bei Männern und >55 bei Frauen wurde als ein zusätzlicher Risikofaktor für Herzkreislauferkrankungen klassifiziert. Alle Studienteilnehmer wurden unter Berücksichtigung folgender Ausschlusskriterien für die Untersuchungen ausgewählt:

- akute Entzündungen (C-Reaktive-Protein > 0,5 mg/dl)
- Nierenfunktionsstörungen oder Hämodialyse
- Herzinsuffizienz gemäß NYHA III. oder IV. Grades
- Malignom-Erkrankungen
- Body Mass Index (BMI) > 30 kg/m²

2.1.2 Blutentnahme

Blut von den Probanden wurde aus der Vena mediana cubiti über eine venöse Punktionskanüle (Butterfly®, Ø 0,6 mm, Abbott Ireland, Sligo, Irland) unter Vermeidung einer Hämolyse entnommen. Als Antikoagulanz wurde Hirudin (Refludan®, Schering; 0,4 mg/ml = 0,25 µl/ml Blut) eingesetzt. Bei den Proben zur späteren Arginase-Bestimmung (siehe 2.1.10) wurde stattdessen Heparin als Antikoagulanz verwendet (10 IE/ml, Liquemin 5000 IE, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland).

2.1.3 Probenaufarbeitung

Zur Kontrolle des pH-Wertes von Inkubationsmedien und Vollblutproben wurde dieser nach Ansetzen, vor und nach der Probenbestimmung mit Pufferlösungen der Werte pH 7 und pH 9 (Puffer 7,00; Puffer 9,00 Riedel-de Haën®, RdH Laborchemikalien, Seelze, Deutschland) gemessen. Bei allen durchgeführten Versuchen führte weder die Inkubation noch die Zugabe der verwendeten Reagenzien zum Vollblut zu messbaren Veränderungen des pH-Wertes.

2.1.4 Aufarbeitung der Blutproben zur Erythrozytenseparation

Erythrozytenkonzentrat wurde für die anschließende Verwendung im Filtrationsverfahren (siehe 2.1.7), für die immunzytochemische Untersuchung der Phosphorylierung der NOS (siehe 2.1.8) und für den Arginaseassay (siehe 2.1.9) hergestellt. Dafür wurde Vollblut in eine an der Spitze verschlossenen Spritze ohne Kolben 15 min bei 800 x g und 4 ºC zentrifugiert und der plasmatische Überstand vorsichtig entnommen, um das Zellsediment nicht zu beschädigen. Zur Separierung reiner Erythrozyten wurde nach Lösen des Verschlusses circa 1/3 der sedimentierten Erythrozytenschicht vorsichtig abgetropft, ohne dabei die leukozytäre Grenzschicht zu beschädigen. Die Reinheit des Erythrozytensediments wurde durch

Lichtmikroskopie und fluoreszenzaktivierte Zellzählung (Beckman Coulter Epics XL, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) kontrolliert. Bei der Erythrozytenseparation wurde ein Reinheitsgrad von >99 % erreicht. Die Erythrozyten wurden mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit einem pH von 7,3 (PBS) auf den gewünschten Hämatokrit eingestellt.

2.1.5 Protokoll zur Untersuchung der eryNOS-Aktivität und der Erythrozyten-verformbarkeit

Um die eryNOS-Aktivität bei Gesunden und bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zu untersuchen, wurde Vollblut direkt nach Blutentnahme aliquotiert und mit Inkubationsmedien versetzt. Inkubiert wurde mit dem Substrat der NOS L-Arginin (3 mmol/l, Verdünnung 1:99; V:V; Inkubationsmedium:Vollblut) und mit dem kompetitiven Inhibitor N^5-1-iminoethyl-L-Ornithin (L-NIO, 100 µmol/l) im Schüttel-Wasserbad bei 37 °C für 30 min. Parallel dazu wurde das Vollblut mit L-NIO (100 µmol/l) in Kombination mit HbO_2 (0,1 mmol/l) als „NO-Fänger“ inkubiert. HbO_2 wurde alle 5 min während der Inkubation zur aliquotierten Probe gegeben um ständig reaktives, NO-abfangendes Hämoglobin in Lösung zu haben. Unter der Vorstellung, dass NO nahezu vollständig abgefangen wird, sollte der Einfluss von endogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit untersucht werden. Als Kontrolle diente eine Inkubation mit PBS.

Das Vollblut wurde 1:5 mit gekühltem PBS (V/V; Probe:PBS) verdünnt und das Plasma zügig durch Zentrifugation (800 x g, 4 °C, 20 min) separiert um die Reaktion von NO mit dem Hämoglobin der Erythrozyten zu verhindern. Als Marker der eryNOS-Aktivität wurden die oxidativen Metabolite der NOS Nitrit (n=79) und Nitrat (n=12) im plasmatischen Überstand über die Chemilumineszenzdetektion (CLD) (siehe 2.1.7) und die Nitratreduktase-Flussinjektionsanalyse (NR-FIA) (siehe 2.1.8) gemessen. Für die Detektion von Nitrit mittels CLD wurde die Plasmaprobe direkt verwendet. Für die Bestimmung von Nitrat mittels NR-FIA wurden die Plasmaproben vorher zur Deproteinierung 2 h bei 4 °C und 4000 x g in einem Ultrazentrifugenröhrchen Centricon® YM 10 (cut off Filter 10 kDa, Millipore Corporation, Eschborn, Deutschland) ultrafiltriert. Das ultrafiltrierte Plasma wurde bis zur Durchführung der Messung bei -80 °C gelagert. Als Kontrolle wurde jeweils PBS anstatt Vollblut mit den Inkubationsmedien PBS, L-Arginin und L-NIO in den oben genannten Konzentrationen inkubiert, 1:5 verdünnt und nach Zentrifugation die Nitrit- und Nitratkonzentration gemessen. Die Kontamination der Inkubationsmedien wurde von der gemessenen Nitrit- und Nitratkonzentration nach Inkubation subtrahiert.

Zur Bestimmung des Einflusses der eryNOS-Aktivität auf die Erythrozytenverformbarkeit wurde das Erythrozytensediment aus dem inkubierten Vollblut wie unter 2.1.4 beschrieben gewonnen. Die Erythrozyten wurden mit PBS auf den standardisierten Hämatokrit von 7 % eingestellt. Die Erythrozytensuspension wurde im Filtrationsverfahren verwendet (siehe 2.1.9).

2.1.6 Protokoll zur Untersuchung des Einflusses von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit

Zur Untersuchung, inwieweit sich die Erythrozytenverformbarkeit basal und unter Einfluss von NO bei Gesunden und bei Personen mit kardiovaskulärem Risikoprofil unterscheidet, wurde humanes Vollblut direkt nach Blutabnahme aliquotiert und mit dem NO-Donor S-Nitrosoglutathion (GSNO; 600 nmol/l), mit HbO_2 als „NO-Fänger“ (0,1 mmol/l) und mit PBS als Kontrolle im lichtgeschützen Schüttelwasserbad für 30 min bei 37 °C inkubiert (n=26). Nach Inkubation der Proben wurde das Erythrozytensediment wie unter 2.1.4 beschrieben separiert. Die Erythrozyten wurden mit PBS auf den standardisierten Hämatokrit von 7 % eingestellt und die Erythrozytensuspension im Filtrationsverfahren verwendet (siehe 2.1.9).

2.1.7 Bestimmung der Nitritkonzentration im Plasma mittels CLD

Die Gasphasen-Chemilumineszenz stellt eine der sensitivsten und spezifischsten Methoden zur Messung von NO in flüssigen oder gasförmigen Proben dar. Die Methode beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Reaktion von NO mit Ozon freigesetzt werden. Die Messungen wurden an einer CLD-Anlage der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO e, Ecophysics, Schweiz) durchgeführt.

Zur Bestimmung des Nitritgehalts flüssiger Proben wurden je 100 µl dreifach mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) in die Lösungskammer (Verhees, Neuss, Deutschland) der Anlage injiziert. Das Reaktionsgefäß wurde von 60 °C warmem Wasser umspült. Durch eine Glasfritte strömte während der gesamten Messung mit konstantem Fluss Helium (Abbildung 2). In der Injektionskammer befanden sich 20 ml einer iodhaltigen, reduktiven Reaktionslösung. Diese Lösung setzte sich zusammen aus 1,62 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,57 g Iod (Sigma, Steinheim, Deutschland) gelöst in 15 ml Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographiewasser (Merck, Darmstadt, Deutschland) und versetzt mit 202,5 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland).

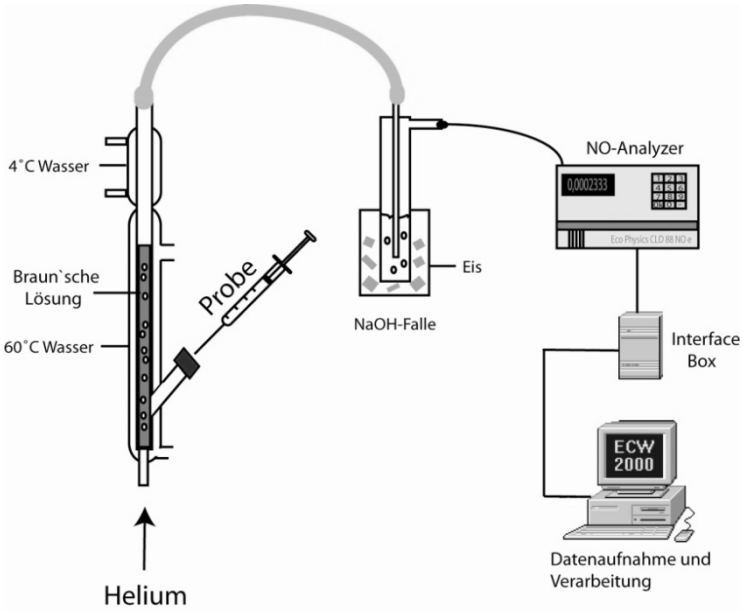

Abbildung 2
Schematische Darstellung der CLD. Die zu untersuchende Probe wurde in ein Reaktionsgefäß injiziert. NO trat in die Gasphase über und gelangte mit dem Heliumgasfluss in die Reaktionskammer des NO-Analysators, in der die Lichtreaktion mit Ozon stattfand.

Die Lösung diente der Freisetzung von NO aus Nitrit. Die Reaktionslösung setzte zunächst aus in der Probe enthaltenem Nitrit Nitrosoniumionen frei, die mit Iodid weiter zu NO reagierten:

$$NO_2^- + 2\,H^+ \rightarrow NO^+ + H_2O$$
$$NO^+ + I^- \rightarrow ONI$$
$$2\,ONI \rightarrow 2\,NO^{\cdot} + I_2$$

Das aus Nitrit gebildete NO konnte dann in einem NO-Analysator mittels oben beschriebener Photoreaktion bestimmt werden. Vor jeder Analyse wurde durch Aufgabe wässriger Nitritstandards eine Eichung der Anlage durchgeführt.

2.1.8 Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma mittels NR-FIA

Im ersten Schritt wurde Nitrat mittels Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Die zu untersuchenden Proben wurden mit NADPH sowie einer weiteren Lösung bestehend aus Nitratreduktase, Glucose-6-Phosphat (Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland) und Glucose-6-Phophat-Dehydrogenase (Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland) gelöst in Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland) und Tris-Hydroxymethylaminomethan-Salzsäure (BioRad, Kalifornien, USA) versetzt und in einem Wärmeschrank bei 25 °C für 1 Stunde inkubiert. Das in der Probe vorhandene Nitrat wurde so durch die Nitratreduktase unter Verbrauch von NADPH zu Nitrit reduziert. $NADP^+$, welches durch den

Verbrauch aus der Reaktion entstanden war, wurde durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu NADPH reduziert und permanent dem Gleichgewicht der Nitratreduktase-reaktion entzogen. Damit wurde eine vollständige Umwandlung des Nitrats zu Nitrit gewährleistet.

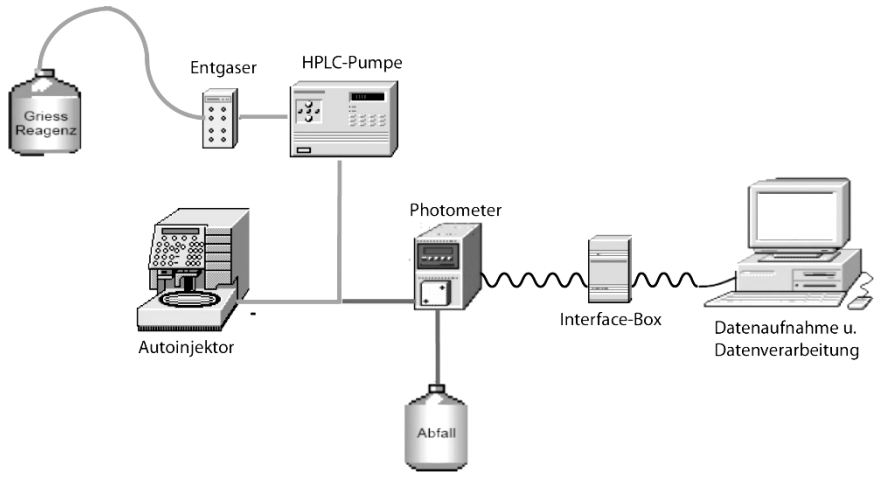

Abbildung 3
Anordnung der Flussinjektionsanalyse

Im zweiten Schritt wurde das zu Nitrit überführte Nitrat basierend auf der Griess-Reaktion photometrisch quantifiziert. Das Griess-Reagenz setzte sich zu gleichen Teilen aus 10 g/l Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 1 % Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,2 g/l N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamid gelöst in Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographiewasser (LiChrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammen. Das Messprinzip dieser Methode beruht auf einer Azokupplung von Nitrit an ein Naphthyl-ethylendiamin und der spektrophotometrischen Quantifizierung dieser Farbreaktion bei 540 nm (Abbildung 4).

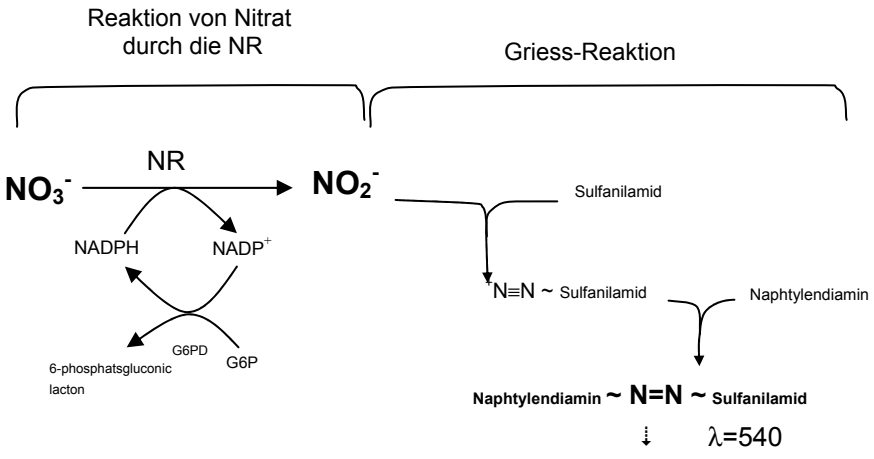

Abbildung 4
Nitratreduktase- und Griess-Reaktion

2.1.9 Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit mittels Filtrationsverfahren

Um die Verformbarkeit der Erythrozyten zu untersuchen, wurde die Filtrationsmethode nach Reid et al. (1976) verwendet[109]. Diese Methode wurde modifiziert, um sie für die Bestimmung der Verformbarkeit der Erythrozyten von Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren verwenden zu können und die Reproduzierbarkeit der Messung zu verbessern.

Filtrationsmethode nach Reid et al.

Die Orginalmethode von Reid et al. (1976) misst die Verformbarkeit, indem die Passage von Erythrozyten (Durchmesser im Mittelwert 7,6 µm) durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 5 µm gemessen wird. Die Passagezeit der Erythrozyten durch die Membran gilt als Maß der Verformbarkeit. Die in der Literatur beschriebene Methode wurde den Angaben entsprechend aufgebaut. Der Filterhalter verband die Spritze mit dem Vakuumsystem (Abbildung 5). Das Vollblut wurde über eine 1 ml Spritze ohne Stempel aufgegeben und mit einem Unterdruck von 10 cm H_20 durch den anschließenden Membranfilter filtriert. Es wurden Membranfilter (Isopore®, Millipore, Eschborn, Deutschland) mit einem Durchmesser von 13 mm und einer Porengröße von 5 µm, Kunststoff-Filterhalter (Swinnex®, Millipore, Eschborn, Deutschland) und 1 ml Tuberkulin-spritzen mit 100er-Verteilungsstrich BD-Plastipak (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Passagezeit des Blutes innerhalb einer Minute wurde als Flussrate in µl/sec angegeben und galt als Parameter für die Erythrozytenverformbarkeit.

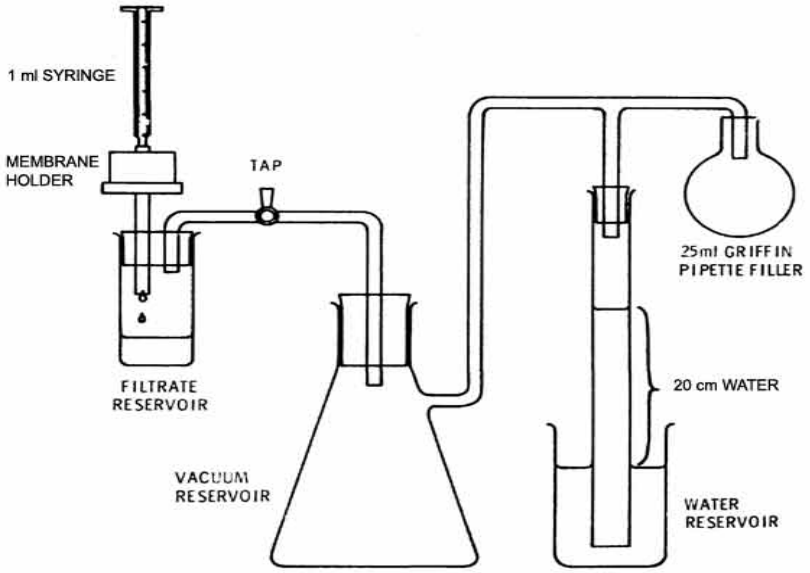

Abbildung 5
Schematische Darstellung der Filtrationsmethode. Originalabbildung aus Reid et al. (1976). Ein Membranfilter mit einer Porengröße von 5 µm und einem Durchmesser von 13 mm wurde in einen Filterhalter eingesetzt. Der Peleusball diente als Vakuumquelle. Eine Wassersäule wurde als Manometer für den angelegten Unterdruck verwendet. Ein Luftreservoir verminderte die Druckschwankung.

Modifizierung der Filtrationsmethode

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Modifizierungen der Methode bezogen sich auf die Probenaufarbeitung und die Filterporengröße. Die Methode nach Reid et al. erwies sich zur Bestimmung der Verformbarkeit der Erythrozyten von Personen mit kardiovaskulärem Risikoprofil als ungeeignet. Reid et al. verwendeten Vollblut zur Filtration. In Vorarbeiten dieser Arbeit passierte Vollblut von Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil nicht den Filter. Um eine hohe Validität zu gewährleisten, sollten alle Faktoren ausgeschaltet werden, die die Erythrozytenverformbarkeit beeinflussen können. Besonders die Leukozyten beeinflussen auf Grund ihrer Größe die Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit durch eine Verstopfung der Membranporen[110]. Des Weiteren beeinflusst der interindividuelle Hämatokrit des Vollblutes[111] und die Viskosität des Plasmas[112] die Durchflussgeschwindigkeit im Filtrationsverfahren. Die Viskosität selbst ist abhängig vom Plasmaproteingehalt[113]. Zur Entfernung der Leukozyten erfolgte eine Separation der Erythrozyten wie unter 2.1.4 beschrieben. Das durch diese Separationsmethode entstandene Erythrozytensediment wies einen Hämatokrit von 84 % auf. Mit Puffer wurde das Sediment auf einen gewünschten Hämatokrit exakt verdünnt. Somit konnte der Einfluss des Hämatokrits auf das Filtrationsergebnis ausgeschlossen werden. Durch Verwendung einer mit PBS gewaschenen Erythrozytensuspension anstatt Vollblut oder anstatt einer Erythrozyten-suspension mit endogenem Plasma wurden die Einflüsse einer Hyperglykämie, eines hyperviskösen Plasmas, von Leukozyten, Thrombozyten, Plasmacholesterin und Plasma-fibrinogen vermieden[114]. Durch die Verdünnung mit PBS (pH 7,4; Osmolalität 295-300 mmol/kg) wurde ein Einfluss des Puffers auf das mittlere Zellvolumen der Erythrozyten (MCV) verhindert[115]. Das MCV wurde immer kontrolliert, um einen Einfluss auf die Erythrozytenverformbarkeit auszuschließen. Das MCV unterschied sich nicht signifikant zwischen den untersuchten Kollektiven.

In Voruntersuchungen dieser Arbeit wurde die Flussrate unter Einstellung verschiedener Hämatokritwerte (Hämatokrit von 35 % bis 7 %) und Verwendung verschiedener Filtergrößen (Porengröße 5 µm bis 3 µm) gemessen. Es wurden Erythrozyten von gesunden Probanden und Erythrozyten von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren getestet. Ziel war es, die optimale Kombination aus Hämatokrit und Porengröße zu bestimmen, um vergleichende Untersuchungen der Erythrozytenverformbarkeit von gesunden Probanden und Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren durchführen zu können. Das von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren resuspendierte Erythrozytenkonzentrat mit eingestelltem Hämatokrit von 35 % passierte den Membranfilter mit der Porengröße 5 µm nicht. Mit niedriger eingestelltem Hämatokrit erhöhte sich die Flussrate. Aufgrund der hohen interindividuellen Varianz der Flussrate passierten die Erythrozyten erst bei der Verwendung

eines Hämatokrits von 20 % bei allen Probanden der kardiovaskulären Risikogruppe den Filter. Die Erythrozytensuspension von gesunden jungen Probanden passierte bei diesem eingestellten Hämatokrit so schnell den 5 µm Membranfilter, dass eine reproduzierbare Bestimmung der Passagezeit nicht möglich war. Daraufhin wurden Erythrozytensuspensionen unterschiedlichen Hämatokrits bei der Verwendung eines Membranfilters mit einer Porengröße von 3 µm getestet. Bei Verwendung von Filtern dieser Porengröße mussten Erythrozytensuspensionen mit einem niedrigeren Hämatokrit verwendet werden, um eine Passage durch den Filter zu gewährleisten. Bei einem eingestellten Hämatokrit von 7 % und Verwendung eines Filters mit 3 µm Porengröße lag die Flussrate der Erythrozytensuspension von Personen mit und von Personen ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren im ähnlichen Bereich (zwischen 9±1 µl/sec und 7,2±0,8 µl/sec, Abbildung 6) und wurde in den nachfolgenden Untersuchungen in dieser Arbeit vergleichend bestimmt.

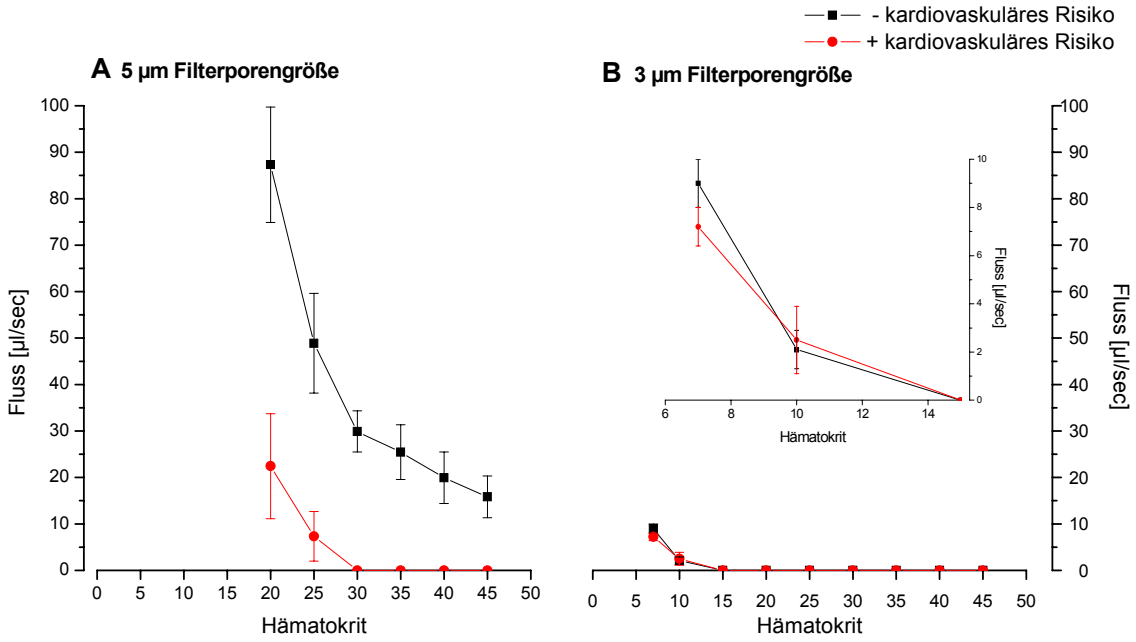

Abbildung 6
Filtrationsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Hämatokrit und kardiovaskulärem Risikoprofil. Es wurde Vollblut von gesunden Probanden und von Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil verwendet (jeweils n=6). **A** Filter mit 5 µm Porengröße, **B** Filter mit 3 µm Porengröße. Im Gegensatz zur Verwendung von 5 µm Filtern gab es bei der Verwendung von 3 µm Filtern keine signifikanten Unterschiede in der Verformbarkeit zwischen den Kohorten. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt, dass die mittlere Flussgeschwindigkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren bei Verwendung von 3 µm Filtern und einem Hämatokrit von 7 % nur um 1,8 µl/sec niedriger lag im Vergleich zu Gesunden.

Unter Verwendung der Filter mit 3 µm Porengröße und des Hämatokrits von 7 % wurden verschiedene Unterdrücke getestet, um den optimalen Unterdruck bezüglich der optimalen Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu ermitteln. Der von Reid et al. verwendete Unterdruck von -10 cm Wassersäule erzielte auch nach der Modifikation die niedrigsten Variationskoeffizienten.
Um Veränderungen der Erythrozyten durch den Vorgang der Filtration auszuschließen, wurde ihre Form vor und nach Passage des Filters lichtmikroskopisch untersucht. Sie behielten ihre bikonkave, diskoide Form und zeigten keine Anzeichen von Beschädigung oder Hämolyse. Die Bewegung der Zellen durch den Filter wurde nicht durch blockierte Poren beeinträchtigt.

2.1.10 Bestimmung der erythrozytären Arginaseaktivität

Die erythrozytäre Arginaseaktivität wurde bei Patienten ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren (n=8) und bei Patienten mit vier kardiovaskulären Risikofaktoren (n=6) gemessen. Zur Bestimmung der Arginaseaktivität im Erythrozyten wurde das Enzym aktiviert und der entstandene Harnstoff bestimmt. Zur Aufarbeitung der Proben wurde aus dem abgenommenen Vollblut wie unter 2.1.4 beschrieben ein reines Erythrozytensediment gewonnen. Die Erythrozyten wurden 1:100 mit PBS verdünnt. Um die Erythrozyten zu lysieren, wurde das verdünnte Erythrozytenkonzentrat mit Proteinlysepuffer (0,1 % Triton X-100, 10 ng/ml Aprotinin, 1 mM PMSF) 1:1 versetzt und für 2-5 min bei 4 °C inkubiert. Zum Proteinlysat wurde nun zu gleichem Volumen Manganpuffer (10 mM $MnCl_2$, 50 mM TrisHCl pH 7,5) hinzugegeben und das Enzym bei 55 °C aktiviert. Durch Zugabe von 0,5 M L-Arginin im pH Optimum der Arginase von 9,7 wurde die Reaktion gestartet. Nach 60 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe eines Säuregemischs (H_2SO_4:H_3PO_4:H_2O; Verhältnis: 1:3:7) gestoppt. Durch Zugabe von 9 % α-Isonitrosopropiophenon in 100 % Ethanol und Inkubation für 45 min bei 100 °C wurden die gebildeten Komplexe ausgefällt und nach einer Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur anschließend zentrifugiert (5 min, 5000 x g). In Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration bildete sich eine rot-violette Farbreaktion unterschiedlicher Intensität. Aus dem Reaktionsgefäß wurden 200 µl in eine Flachboden-Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption des entstandenen Harnstoffs konnte nun spektrophotometrisch bei 540 nm bestimmt werden. Zur Eichung wurden parallel Harnstoffstandards verwendet.
Die Proteinkonzentration wurde gemäß Herstellerangaben mit dem DC-Proteinbestimmungsassay (Biorad®, München, Deutschland) basierend auf der Biuretmethode über die Absorption bei 750 nm bestimmt. Der Harnstoffumsatz wurde auf die Proteinmenge bezogen und die Arginaseaktivität in µmol/mg*h angegeben.

2.1.11 Immunzytochemische Untersuchung der Phosphorylierung der eryNOS

Auf proteinbiochemischer Ebene sollte untersucht werden, ob sich die Stimulierbarkeit und immunzytochemisch nachweisbare Phosphorylierung an Serin 1177 bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren (n=4) und bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil (n=4) unterscheidet. Separierte Erythrozyten (siehe 2.1.4) wurden im zellfreien Überstand resuspendiert (1:1) und einer Stimulation mit Scherstress ausgesetzt, indem sie für 2 min nach der Filtrationsmethode von Reid et al. (siehe 2.1.9) mehrfach durch einen Membranfilter der Porengröße 5 µm filtriert wurden. Nach Stimulation mit Scherstress wurde diese Probe 1:10 mit PBS verdünnt. Als Kontrolle wurde ein zweiter Teil der Probe ohne Filtration direkt 1:10 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden die Erythrozyten auf Deckgläsern (24 x 32 mm) ausgestrichen und für 1 min mit Methanol/Paraformaldehyd 37 % (9:1, V:V) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden sie mit PBS/Triton-X-100 (0,1 %; V:V) für 5 min permeabilisiert. Danach wurden sie in Tris-Borsäure (0,1 M) nochmals gewaschen und für 20 min in eine Lösung, bestehend aus PBS, 2 % Wasserstoffperoxid und 80 % Methanol gegeben.

Die Ausstriche wurden mit Milchpulver 3 % (Roth, Karlsruhe, Deutschland), gelöst in Tris-Borsäure für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Es folgte eine Inkubation in Tris-Borsäure-Lösung mit 0,3 % Milchpulver, 0,03 % Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und dem primären polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen die phosphorylierte eNOS (Serin 1177) (1:500, Upstate, Lake Placid, USA). Nach Waschen der Proben mit Tris-Borsäure wurden die Ausstriche mit dem zweiten Antikörper (goat-anti-rabbit-antibody, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:400 für 30 min inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Erythrozyten ohne den primären Antikörper inkubiert. Ein Streptavidin-Peroxidase-konjugiertes-Antigen (Verdünnung 1:150; Amershan, Buckinghamshire, England) wurde den Ausstrichen für 30 min hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid gelöst in PBS durchgeführt. Die immunzytochemischen Untersuchungen der Erythrozytenausstriche wurden in Kooperation mit Prof. W. Bloch (Deutsche Sporthochschule Köln) durchgeführt.

2.2 Untersuchung des Einflusses von NO auf die Mikrozirkulation *in vivo*

2.2.1 Das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos als Mikrozirkulationsmodell

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos als *in vivo* Mikrozirkulationssystem verwendet, um die Wirkung von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit und Mikrozirkulation zu untersuchen. Nach der derzeitigen Gesetzeslage in der Bundesrepublik Deutschland gelten Experimente während der gesamten Bebrütungsphase nicht als Tierversuche. Föten oder embryonale Entwicklungsstadien sind im deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG, 1993) nicht erwähnt. Das extraembryonale Gefäßsystem selbst ist nicht innerviert und damit schmerzunempfindlich. Die Darstellung der schrittweise einsetzenden Funktionsfähigkeit des Nervensystems und der damit einhergehenden Sensitivität des Embryos zeigte, dass bei experimentellen Untersuchungen bis zum achten Bebrütungstag keine Sensitivität des Embryos vorliegt[116].

Das extraembryonale Blutgefäßsystem besteht aus einem Dottersack-Gefäßsystem und der Chorion-Allantois-Membran. Die Gefäße der Allantois vergrößern sich schnell vom 4.-10. Tag der Bebrütung. Während dieses Prozesses fusioniert die mesodermale Schicht der Allantois mit der angrenzenden mesodermalen Schicht des Chorions. Es bildet sich die Chorion-Allantois-Membran als eine doppelte Mesoderm-Schicht. Die Chorion-Komponente ist somatomesodermalen Ursprungs, die Allantois-Komponente ist splanchnomesodermalen Ursprungs. In dieser Doppelschicht bildet sich ein dichtes vaskuläres Netzwerk, welches mit der embryonalen Zirkulation über die Allantoisarterien und -venen verbunden ist. Dieses vaskuläre Netzwerk besteht aus schmalen, dünnwandigen Kapillaren mit einem luminalen Durchmesser von 7-15 µm[117]. Die Arterien bringen das deoxygenierte Blut in Kontakt mit der Chorion-Allantois-Membran, wo der Gasaustausch durch die Eierschale stattfindet. Die Vene transportiert das oxygenierte Blut wieder zurück zum Embryo. Diese Gefäße sind äquivalent zu den Nabelgefäßen der Säugetiere[118]. Der Embryo erhält seine Nährstoffe aus dem Eidotter über die Dottervene, während das Blut über die Dotterarterie wieder zurück zu dem Eidotter fließt. Die Geschwindigkeit des Blutflusses liegt bei 0,3–0,5 mm/s, und ist somit vergleichbar mit Flussgeschwindigkeiten in humanen Venolen und Kapillaren. Somit werden bezüglich des Zellflussverhaltens vergleichbare Verhältnisse im Säugerfetus und Hühnerembryo vermutet.

Bei Vögeln und bei Reptilien sind die Erythrozyten kernhaltig und haben eine ovale Form. Die adulten Erythrozyten sind elliptische Scheiben, deren Kern in der Mitte liegt und circa 5,5 × 3,5 µm misst. Die ersten entstehenden roten Blutzellen bilden eine primitive Zelllinie, welche das Blutbild vom 2. bis 4. Tag der Inkubation an dominiert. Diese wird ab dem 3. bis 5. Tag durch die definitive Zelllinie ersetzt. Einige Zellen der primitiven Zelllinie können aber

noch bis zu 2 Wochen nach dem Ausschlupf persistieren. In beiden Zelllinien werden vergleichbare unreife Zellen ausgebildet, bevor die endgültige Zelle, der Erythrozyt (primitiver oder definitiver) gebildet wird. Am siebten Bebrütungstag stammen 87,7 % der Erythrozyten von der definitiven Zelllinie ab[119].

2.2.2 Präparation der Eier

Die Untersuchungen wurden an embryonierten Eiern des Haushuhnes (*Gallusgallus f. domestica*) durchgeführt, die sich durch eine für precociale Vogelarten relativ kurze Bebrütungsdauer (21 Tage) auszeichnen. Die SPF-VALO Hühnereier wurden unbebrütet von der Firma Deindl GmbH & Co. KG, Rietberg geliefert.

Zum Erreichen des erforderlichen Entwicklungsstadiums wurden die Eier 7 Tage im Brutkasten bei konstanten 37,5 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60-70 % inkubiert. Am 7. Bebrütungstag war die Chorion-Allantois-Membran für die Untersuchungen der Mikrozirkulation am besten ausgebildet. Die Eier wurden zwei Tage vor Verwendung präpariert, da sich der 5. Inkubationstag bezüglich der Präparation als optimal herausstellte. Die Keimscheibe mit der Chorion-Allantois-Membran war in diesem Bebrütungsstadium noch klein genug, dass das Ei ohne Beschädigung der Membran geöffnet werden konnte. An der Oberseite des liegenden Eies wurde ein Fenster in die Schale geschnitten. Um ein Verkleben der Keimscheibe des Embryos am Deckelrand zu vermeiden, wurde vorher mit einer Kanüle vorsichtig 3 ml Eiklar entnommen. So wurde ein Absenken der Keimscheibe erreicht und deren Zerstörung bei der Öffnung des Schalendeckels vermieden. Für die letzten zwei Inkubationstage wurde das gefensterte Ei mit Parafilm verschlossen.

Nach Beendigung des Versuches wurden die Eier bei -20 °C bis -30 °C eingefroren. Diese Vorgehensweise garantierte ein schnelles und sicheres Absterben und ist aus ethischer Sicht empfehlenswert[116].

2.2.3 Intravitalmikroskop

Es wurde ein Intravitalmikroskop DML der Firma Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die binokulare Optik des Mikroskops selbst hatte eine 10x Vergrößerung. Bei der Übersicht und zur Injektion wurde ein 5x Objektiv verwendet. Die Aufnahmen mit Darstellung von Kapillare und Erythrozyten wurden mit einem 50x Objektiv gemacht. Die verwendeten Objektive gewährleisteten einen ausreichenden Arbeitsabstand. Auf Grund der stark spiegelnden Oberfläche des Hühnereies wurde eine Dunkelfeldbelichtung verwendet.

Die benutzte Kamera AVT B-C71 der Firma Horn-Imaging (Aalen, Deutschland) war eine Schwarz-Weiß-Digitalkamera mit einem sehr lichtempfindlichen 2/3“-CCD Bildaufnehmer.

Die Kamera hatte eine Aufnahmefrequenz von 50 Halbbildern/sec. Das digitale Videosignal konnte über einen DVD-Videorekorder Typ LQ MD 800 der Firma Panasonic (Hamburg, Deutschland) direkt aufgenommen werden. Zur Steuerung des DVD-Rekorders und zur Auswertung der Bilder wurde die für die Bildanalyse in der Mikrozirkulationsforschung entwickelte Software Cap-Image® 1.1 des Ingenieurbüros Dr. Zeintl GmbH, Heidelberg verwendet.

Um ein Auskühlen des Hühnereies und damit eine Einflussnahme auf die Mikrozirkulation zu vermeiden, wurde das Ei in einen Glasständer (Verhees, Neuss, Deutschland) gelegt, der mit 37 °C warmem Wasser durchspült wurde.

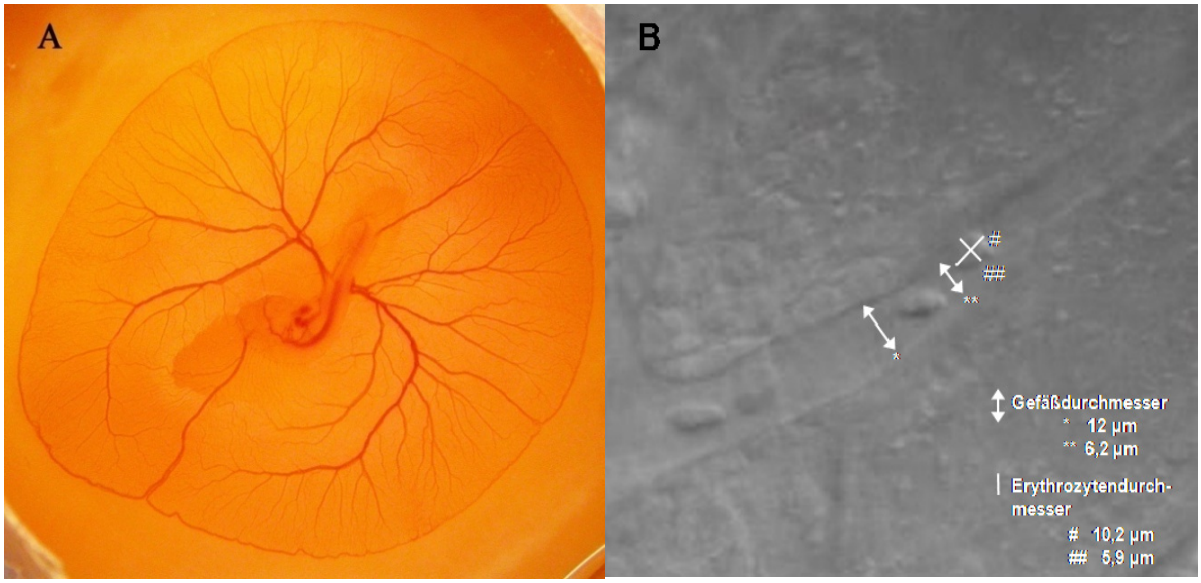

Abbildung 7
A Aufsicht auf die Chorion-Allantois-Membran am 7. Bebrütungstag des Hühnereies. **B** Mikrozirkulation bei 500facher Vergrößerung. In der Kapillare in der Bildmitte erkennt man die ungefärbten Erythrozyten.

2.2.4 Versuchsaufbau

Mit dem 50x Objektiv wurde unter insgesamt 500facher Vergrößerung ein geeigneter Ausschnitt der Mikrozirkulation des extraembryonalen Gefäßsystems gewählt. Es wurde eine Kapillare mit einer Engstelle mit einem Durchmesser von <7 µm eingestellt, welche die Erythrozyten nur einzeln und unter Verformung passieren konnten. Der Fluss der Erythrozyten durch diese Kapillare wurde für 2 min aufgenommen.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Cap-Image-Software ausgewertet. Vor der Auswertung der Videosequenzen wurde mit einer Bewegungskorrektur der Software der Messbereich mit Verwacklungen des gesamten Bildausschnittes durch Bewegungen des Embryos korrigiert. Folgende Parameter wurden jeweils in der Sequenz vor und nach unten beschriebener

Intervention bestimmt: Als Gefäßparameter wurde der *Kapillardurchmesser* sowie eine mögliche Vasomotion, dass heißt eine Änderung des Kapillardurchmessers über die Zeit erfasst. Zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit wurden die *Länge* und die *Breite* von 30 einzelnen Erythrozyten vor einer Engstelle und genau in der Engstelle einer Kapillare gemessen. Die *Geschwindigkeit*, mit der die Erythrozyten durch die Kapillare flossen wurde über Grauwertveränderungen durch Bewegungen der Erythrozyten entlang einer durch die Software gezogenen Linie gemessen. Die *Anzahl der Erythrozyten*, die in 1 min durch die Kapillare strömten wurde gezählt. Als Kontrolle wurde die Flussgeschwindigkeit in einem Leitungsgefäß gemessen.

Zur Intervention wurde ein Leitungsgefäß unter 50facher Vergrößerung (5x Objektiv) mit einer geschliffenen Glaskapillare (Borosilicate glass capillaries GC 120-100, Harvard Apparatus, Edenbridge, England) mit einem Außenlumen von 0,2 mm stromaufwärts punktiert und über ein Schlauchsystem (Aspirator Tube Resemply Sigma A-5177) Substanzen injiziert. Das Gefäß wurde dabei nicht perforiert. Zur Bestimmung der benötigten Konzentration der Substanzen wurde von einem Blutvolumen von ungefähr 250 µl im intra-embryonalen und 500 µl im extraembryonalen Gefäßsystem am 7. Bebrütungstag ausgegangen[120]. Nach Injektion wurde derselbe Ausschnitt der Mikrozirkulation wieder unter 500facher Vergrößerung eingestellt, und 10 min nach Injektion eine zweite Sequenz für 2 min aufgenommen. Mit den aufgenommenen Bildern wurden die gleichen Parameter wie vor der Injektion bestimmt und mit den Vorwerten verglichen. Alle Versuche wurden mit n=5 Eiern pro Substanz durchgeführt.

2.2.5 Charakterisierung der Methodik

Um die Sensitivität der Methode für die Erfassung von Veränderungen der Erythrozyten-verformbarkeit mit anderen Methoden zu vergleichen, wurden 10 µl Glutardialdehyd (100,12 g/mol; Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 0,75 % injiziert. Bei Annahme eines Blutvolumens von ungefähr 750 µl am 7. Bebrütungstag ergab sich eine Verdünnung von 0,01 % Glutardialdehyd im Kreislaufsystem. Für humane Erythrozyten ist bekannt, dass Glutardialdehyd die Erythrozytenmembran durch Vernetzung von Membran-proteinen rigider macht[121]. Unter Annahme eines analogen Effektes auf Vogelerythrozyten wurde Glutardialdehyd somit als positive Kontrolle der Methode benutzt. Um die Erythrozytenverformbarkeit zu verbessern, wurde Pentoxifyllin in einer Endkonzentration von 1 nmol/l injiziert. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS.

2.2.6 Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation

Um den Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation zu untersuchen, wurde der NO-Donor GSNO ($1{,}3 \times 10^{-3}$ mg/ml) injiziert. Um die Auswirkungen einer NO-Deletion auf die Mikrozirkulation zu untersuchen, wurden 10 µl HbO_2 in einer Konzentration von 7,5 mmol/l injiziert. Unter Annahme eines Blutvolumens von 750 µl am 7. Bebrütungstag ergab sich eine systemische Konzentration von 600 nmol/l GSNO und 0,1 mmol/l HbO_2. Als Kontrolle diente die Injektion von PBS.

2.2.7 Einfluss von endogen gebildetem NO auf die Mikrozirkulation

Um den Einfluss einer endogenen NOS-Aktivität auf die Erythrozytenverformbarkeit zu untersuchen, wurden 10 µl L-Arginin (4,7 mg/ml) als Substrat der NOS, 10 µl L-NIO (1,3 mg/ml) als kompetitiver Inhibitor und 10 µl PBS als Kontrolle injiziert. Bei einer Annahme von 750 µl Blutvolumen am 7. Bebrütungstag ergab sich eine systemische Konzentration von 3 mmol/l L-Arginin und 100 µmol/l L-NIO. Zur Untersuchung der Reversibilität wurde nach der Injektion von L-NIO und Messung der Parameter nach 10 min mit einer zweiten Injektion GSNO in das Mikrozirkulationssystem desselben Eies hinzugefügt (systemische Konzentration von 600 nmol/l) und die Parameter der Mikrozirkulation ein drittes Mal bestimmt.

2.3 Statistik

Alle Proben zur Nitritbestimmung mittels CLD, Nitratbestimmung mittels FIA, der Erythrozytenverformbarkeit mittels Filtrationsverfahren und der Arginasebestimmung wurden dreifach bestimmt und der Mittelwert aus den daraus resultierenden Werten gebildet. Deskriptive statistische Daten wurden, wenn nicht anders vermerkt, als Mittelwert±Standardfehler (SE) angegeben. Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Kollektive auf Normalverteilung geprüft. Gruppenmittelwerte wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) auf signifikante Unterschiede überprüft. Im konsekutiven Post-Hoc Test (Bonferroni) erfolgte der Einzelgruppenvergleich. Als statistisch relevant galt ein p-Wert $\leq 0{,}05$. Lineare Korrelationen wurden zweiseitig nach Pearson berechnet. Zur Varianzaufklärung wurde die schrittweise lineare Regression berechnet. Die statistische Datenverarbeitung wurde mit Hilfe des SPSS-Paketes SPSS® 14.0 für Windows (Chicago Ill., USA) durchgeführt. Die grafische Darstellung der Daten wurde mit Hilfe des Computerprogramms MicroCal Origin® (Version 7.0, MicroCal Software Inc., Northhampton, MA, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Erythrozytärer NO-Stoffwechsel bei kardiovaskulären Risikofaktoren

3.1.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die Aktivität der eryNOS und die Erythrozytenverformbarkeit wurden bei 79 Personen in Abhängigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren untersucht. Das Kontrollkollektiv setzte sich aus 24 gesunden jungen Normalpersonen (10 Frauen, 14 Männer) zusammen, bei denen die definierten kardiovaskulären Risikofaktoren (siehe Kapitel 1) ausgeschlossen werden konnten. Hier betrug das mittlere Lebensalter 27,2 Jahre, bei einer durchschnittlichen Körpergröße von 174±2 cm und einem mittleren Körpergewicht von 70±3 kg.

Tabelle 1
Charakterisierung der Normalpersonen und der Patienten mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren (RF). (MW±SE). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (RF=0) sind mit * für (p<0,05) und mit ** für (p<0,01) gekennzeichnet.

Parameter	Einheit	0 RF	1 RF	2 RF	3 RF	≥ 4 RF
n		24	6	9	17	23
Geschlecht	[w/m]	10/14	2/4	6/3	5/12	8/15
Alter	[Jahre]	27,2±1,3	63,8±3,2 **	60,7±2,2 **	59±1,6 **	65,2±1,2 **
Körpergröße	[cm]	174,2±1,3	174,4±2	168,8±1,9	173,6±1,3	170,7±1,1
Gewicht	[kg]	70,3±1,6	79,2±5,8	74,6±2,7	81,9±2,4 **	77,9±1,6 **
BMI	[kg/m²]	23,1±0,3	25,9±1,4 *	25,4±0,6 *	27,0±0,6 **	26,7±0,5 **
Natrium	[mmol/l]	140,2±0,3	139,6±1,2	141,3±0,8	139,8±0,7	141,0±0,5
Kalium	[mmol/l]	4,5±0,1	4,3±0,1	4,0±0,1	4,3±0,1	4,1±0
Hämatokrit	[%]	42,8±0,6	44,9±1,3	42,3±1,1	43,2±0,8	42,2±0,7
MCV	[μm^3]	91,6±0,8	89,2±1,4	93,8±0,9	91,7±0,9	92,8±0,8
Gesamtcholesterin	[mg/dl]	174,9±3,9	194,4±12,3	211,2±7,3 *	210,0±7 **	209,6±8,4 **
LDL	[mg/dl]	108,8±3,7	131,8±10,9	153,2±8,2 **	155,1±7,2 **	171,4±6,9 **
HDL	[mg/dl]	62,0±0,8	59,4±1,3	58,2±2,7	52,4±2,5 **	48,8±1,9 **
LDL/HDL		1,8 ± 0,1	2,3±0,3	2,7±0,2	3,1±0,3 **	3,6±0,3 **
Triglyzeride	[mg/dl]	118,8±5,3	163±18,3	162,3±16,5	181,4±15,3**	192,2±11 **
Glucose	[mg/dl]	106,6±4,3	97,4±2,2	112,9±6,2	139,6±9,2 **	144,0±7,5 **
HbA_{1c}	[%]	5,4±0,1	5,7±0,1	6,1±0,4	6,8±0,4	7,8±0,4 **
Harnsäure	[mg/dl]	4,3±0,2	5,2±0,3	5,3±0,3	5,4±0,2	5,6±0,2
C-Reaktive-Protein	[mg/dl]	<0,3	0,3±0,1	0,48±0,16	0,45±0,13	0,48±014
Fibrinogen	[mg/dl]	290,2±1,6	306,2±8,6	311,2±5,7	312,3±3,9	302,3±3,7
Leukozyten	[*1000/µl]	6,5±282	8±813	6,3±415	6,5±313	6,2±243
Arterielle Mitteldruck	[mmHg]	91,5±0,6	101,6±2,7	99,2±2,7 *	100,9±1,8 **	99,3±1,3 **
Packungsjahre	[Jahre]	0	0	0	15,9±5,1 **	30±3,7 **
Hypertoniedauer	[Jahre]	0	0	3,2±1,6	5,6±1,6 **	10,4±9,3 **
Diabetesdauer	[Jahre]	0	0	3,9±2	4,1±1,1	7,9±1,4 **

Die Gruppe der Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren (n=55) wurde in 4 Untergruppen unterteilt. Die Einteilung erfolgte anhand der kumulativen Anzahl an Risikofaktoren. Die Untergruppe der Personen mit einem Risikofaktor bestand aus 2 Frauen und 4 Männern im Alter von 64±3 Jahren (Größe: 174±2 cm; Gewicht: 79±6 kg). Die Untergruppe mit zwei Risikofaktoren setzte sich aus 3 weiblichen und 6 männlichen Probanden zusammen (Alter: 61±3 Jahre; Größe: 169±2 cm; Gewicht: 75±3 kg). Die Untergruppe mit drei Risikofaktoren setzte sich aus 5 weiblichen und 12 männlichen

Probanden zusammen (Alter: 59±2 Jahre; Größe: 174±1 cm; Gewicht: 82±4 kg). Die Untergruppe mit vier Risikofaktoren bestand aus 8 weiblichen und 15 männlichen Probanden (Alter: 65±1 Jahre; Größe: 171±1 cm; Gewicht: 78±2 kg). Von den Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren waren 35 Hypertoniker, 27 Raucher, 29 Diabetiker und 34 Hypercholesterinämiker. Bei den Diabetikern handelte es sich ausschließlich um Typ 2 Diabetiker. Die Therapie bestand bei 9 von ihnen aus oralen Antidiabetika, bei 18 aus Insulin, und die übrigen 2 wurden ausschließlich diätetisch behandelt. Zwischen dem gesunden Kontrollkollektiv und den Gruppen mit kardiovaskulären Risikofaktoren gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Körpergröße, der Natrium-, Kalium-, Harnsäure- und Fibrinogenkonzentration im Plasma. Auch hinsichtlich des C-reaktiven-Proteins, des Hämatokrits, des MCV und der Leukozytenanzahl im Blut waren alle untersuchten Gruppen vergleichbar. Mit steigender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich eine Zunahme des BMI, des Cholesterins, der LDL-Werte, des LDL/HDL-Quotienten, der Triglyzeride, des Glucosespiegels und des arteriellen Mitteldrucks (MAP). Auch bezüglich der gerauchten Packungsjahre, der Hypertoniedauer und der Diabetesdauer zeigte sich eine Zunahme mit steigender Anzahl der Risikofaktoren. Das HDL-Cholesterin war zunehmend vermindert. Alle genannten Veränderungen waren mit $p<0,05$ oder $p<0,01$ signifikant (Details Tabelle 1).

3.1.2 Aktivität der eryNOS in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren

Die Aktivität der eryNOS wurde über plasmatisches Nitrit und Nitrat bestimmt. Nach Vollblutinkubation unter Kontrollbedingungen (PBS) lag die Nitritkonzentration bei Gesunden ohne Risikofaktoren (0 RF) bei 51,9±6,7 nmol/l. Mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren wurde, mit Ausnahme bei Patienten mit 1 Risikofaktor, eine zunehmend verminderte Nitritkonzentration gemessen (nicht signifikant): 68,5±22,7 nmol/l (1 RF), 49±17,3 nmol/l (2 RF), 38,7±7,2 nmol/l (3 RF) und 32,8±5,2 nmol/l (4 RF) (Abbildung 8).

Durch Stimulation der eryNOS mit dem Substrat L-Arginin konnte in der Kontrollkohorte die Nitritbildung auf 74,9±9,9 nmol/l gesteigert werden. Diese Veränderung war statistisch signifikant ($p<0,05$). Auch bei den Gruppen mit kardiovaskulärem Risikoprofil konnte die Nitritkonzentration durch Inkubation mit L-Arginin gesteigert werden (signifikant für 3 RF mit $p<0,01$). Mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren wurde, mit Ausnahme bei Patienten mit 1 Risikofaktor, ein niedrigerer Anstieg der Nitritkonzentration nach Stimulation mit L-Arginin gemessen: 85,5±14,9 nmol/l (1 RF), 69±20 nmol/l (2 RF), 57,3±7,9 nmol/l (3 RF) und 37,9±5,7 nmol (4 RF). Im Post-hoc Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$) zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit 4

Risikofaktoren. Die relative Steigerung der Nitritkonzentration durch L-Arginin bezogen auf die Inkubation mit PBS betrug bei der Kontrollkohorte 44,3 %, bei der Gruppe mit 4 Risikofaktoren 15,5 %.

In der Gruppe ohne kardiovaskuläres Risikoprofil reduzierte eine Inkubation mit dem spezifischen NOS-Inhibitor L-NIO die Nitritkonzentration signifikant ($p<0,01$) auf 26,6±5 nmol/l. Das entsprach einer relativen Verminderung um 48,7 % im Vergleich zur Inkubation mit PBS. In Abhängigkeit von der Anzahl der Risikofaktoren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der verminderten Nitritkonzentration nach Inhibition mit L-NIO: 46,6±9,6 nmol/l (1 RF), 26,7±2,3 nmol/l (2 RF), 29,3±5,6 nmol/l (3 RF) und 21,6±6,7 nmol/l (4 RF).

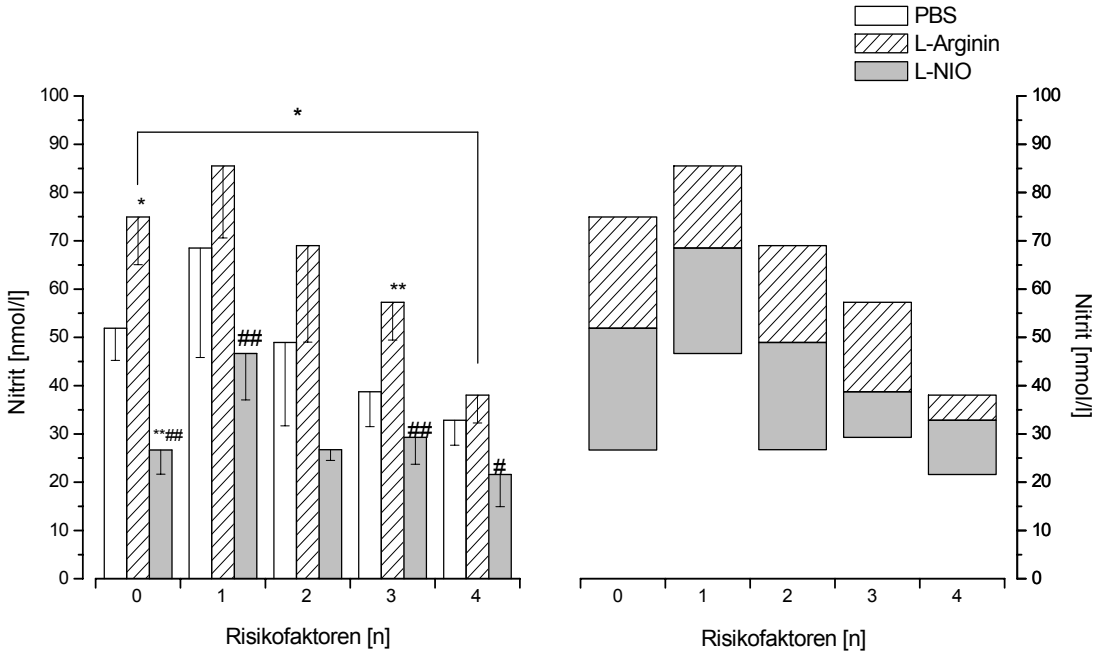

Abbildung 8
Plasmatisches Nitrit in Abhängigkeit erythrozytärer NO-Bildung. Bildung von Nitrit gemessen im Plasma mittels CLD nach Inkubation von humanem Vollblut mit PBS (Kontrolle), L-Arginin (Substrat) und L-NIO (als NOS-spezifischer Inhibitor). Mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich eine reduzierte Stimulation der eryNOS. Das Ausmaß der Inhibition blieb unverändert. Innerhalb einer Risikofaktorgruppe zeigt * einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ** mit $p<0,01$ zur Kontrolle (PBS) an, # einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ## mit $p<0,01$ der inhibierten zur stimulierten Probe. Zwischen den Risikofaktorgruppen zeigte sich zwischen den Gesunden (RF=0) und RF=4 eine signifikant ($p<0,05$) verminderte Stimulation der eryNOS.

Die Nitratkonzentration nach Inkubation unter Kontrollbedingungen (PBS) bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren wurde mit 25,6±8,3 µmol/l bestimmt. Im Gegensatz zum Nitrit zeigte sich mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren keine verminderte Nitratkonzentration: 28,1±7,5 µmol/l bei 4 Risikofaktoren (Abbildung 9). Nach Stimulation wie auch nach Inhibition der eryNOS wurde innerhalb einer Risikogruppe keine signifikante Änderung der Nitratkonzentration gemessen: Nach L-Argininstimulation betrug die Nitratkonzentration 27,0±8,7 µmol/l (RF=0) und 29,4±7,9 µmol/l (RF=4). Nach Inhibition mit L-NIO betrug die Nitratkonzentration 24,5±8,2 µmol/l (RF=0) und 26±7,1 µmol/l (RF=4).

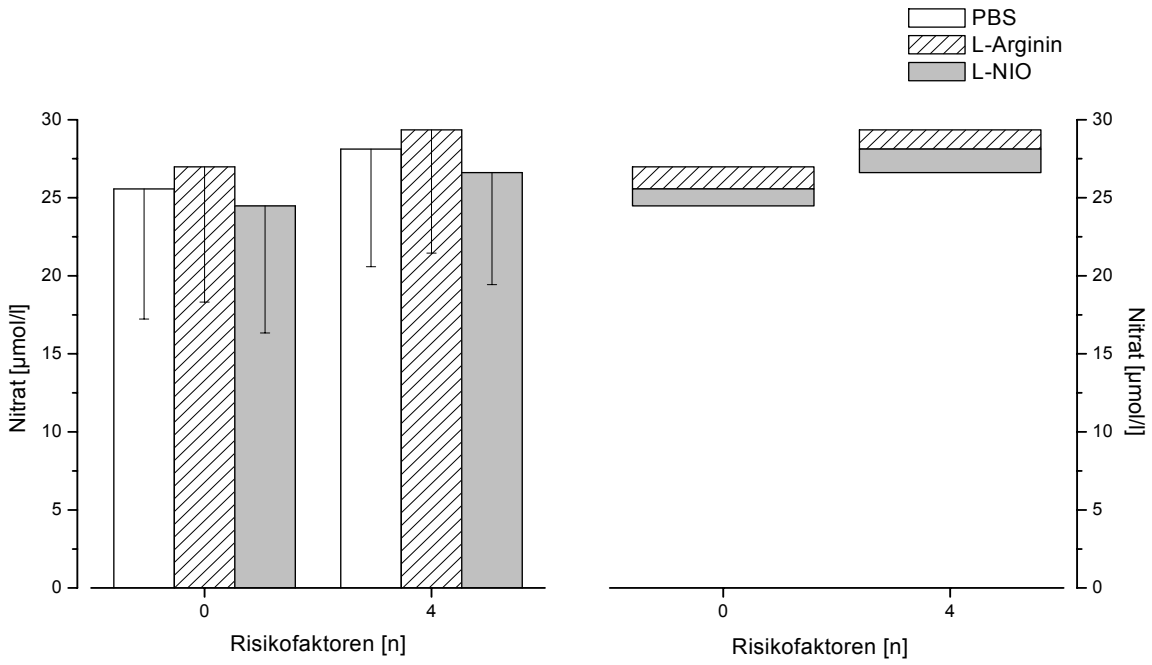

Abbildung 9
Plasmatisches Nitrat in Abhängigkeit erythrozytärer NO-Bildung. Bildung von Nitrat gemessen im Plasma mittels FIA nach Inkubation von humanem Vollblut mit PBS (Kontrolle), L-Arginin (Substrat) und L-NIO (als NOS-spezifischer Inhibitor). Innerhalb einer Risikofaktorgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied der stimulierten oder inhibierten Probe zur Kontrolle (PBS). Zwischen den Risikofaktorgruppen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

3.1.3 Veränderung der erythrozytären Arginaseaktivität in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren

Eine mögliche Ursache einer verminderten eryNOS-Aktivität bei kardiovaskulären Krankheiten könnte eine veränderte erythrozytäre Arginaseaktivität sein. Die erythrozytäre Arginaseaktivität wurde von Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren und von Patienten mit 4 Risikofaktoren gemessen (Abbildung 10). Die mittlere erythrozytäre Arginaseaktivität war bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil mit 5,0±0,7 µmol Harnstoff pro mg Protein^{-1} x h^{-1} erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 3,4±0,4 µmol Harnstoff pro mg Protein^{-1} x h^{-1}. Der Unterschied war mit $p<0,05$ signifikant.

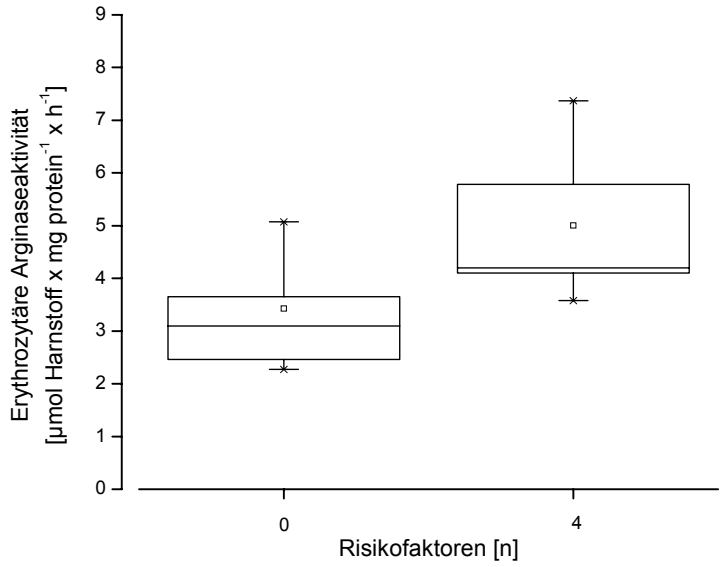

Abbildung 10
Erythrozytäre Arginaseaktivität in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren. Die erythrozytäre Arginaseaktivität war bei Patienten mit 4 kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich zu Probanden ohne Risikofaktoren signifikant erhöht ($p<0,05$).

3.1.4 Stimulation der eryNOS durch Phosphorylierung von Serin 1177

Eine weitere mögliche Ursache einer verminderten eryNOS-Aktivität bei kardiovaskulären Krankheiten könnte eine veränderte Stimulierbarkeit des Enzyms sein. Zur Untersuchung der Stimulierbarkeit der eryNOS-Aktivität wurde in Erythrozyten die NOS-Phosphorylierung von Serin 1177 durch Scherstress bei Probanden mit und ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren immunzytochemisch untersucht. Bei einer Detektion von phosphorylierten eNOS Serin 1177 zeigte sich unabhängig von kardiovaskulären Risikofaktoren eine gleichermaßen gesteigerte Phosphorylierung der eryNOS an Serin 1177 nach Scherstress. Die Kontrollen ohne NOS-spezifischen Antikörper waren jeweils negativ (ohne Abbildung).

3.1.5 Einfluss erythrozytärer NO-Bildung auf die Erythrozytenverformbarkeit

Die basale Erythrozytenverformbarkeit der Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren betrug nach Inkubation unter Kontrollbedingungen (PBS) 9±0,9 µl/sec. Mit Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren zeigte sich eine tendenzielle Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit (nicht signifikant): 8,6±2,2 µl/sec (1 RF), 8,8±0,9 µl/sec (2 RF), 8,4±1,2 µl/sec (3 RF), 7,6±0,6 µl/sec (4 RF) (Abbildung 11).

Die Inkubation mit L-Arginin erhöhte bei den Gesunden die Flussgeschwindigkeit signifikant ($p<0,01$) auf 11,6±1,4 µl/sec. Auch bei den Gruppen mit kardiovaskulärem Risikoprofil konnte die Verformbarkeit durch Inkubation mit L-Arginin gesteigert werden (signifikant für 2 RF und 3 RF mit $p<0,01$ im Vergleich zu PBS). Mit einer höheren Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren verringerte sich der stimulative Effekt von L-Arginin (nicht signifikant): 10,1±3,1 µl/sec (1 RF), 11±0,3 µl/sec (2 RF), 10,5±1,3 µl/sec (3 RF), 8,3±0,8 µl/sec (4 RF). Die relative Steigerung der Flussgeschwindigkeit durch L-Arginin bezogen auf die Inkubation mit PBS entsprach bei der Kontrollkohorte 28,9 %, und bei der Gruppe mit 4 Risikofaktoren 2,6 %.

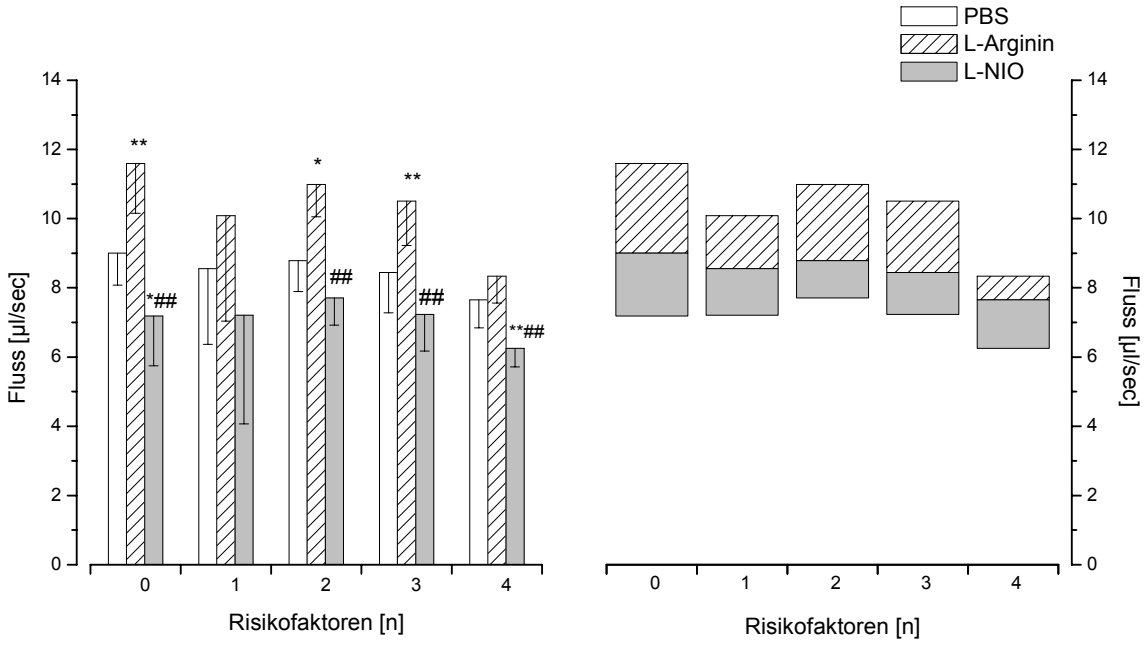

Abbildung 11
Erythrozytenverformbarkeit in Abhängigkeit erythrozytärer NO-Bildung. Flussrate gemessen mittels Filtrationsverfahren nach Inkubation von humanem Vollblut mit PBS (Kontrolle), L-Arginin (Substrat) und L-NIO (als NOS-spezifischer Inhibitor). Innerhalb einer Risikofaktorgruppe zeigt * einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ** mit $p<0,01$ zur Kontrolle (PBS) an, # einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ## mit $p<0,01$ der inhibierten zur stimulierten Probe.

Die Inhibition der eryNOS durch L-NIO verringerte die Flussrate signifikant auf 7,2±1,4 µl/sec ($p<0,05$) bei den Probanden ohne kardiovaskuläres Risikoprofil. Das entsprach einer relativen Verminderung von 20 % bezogen auf die Inkubation mit PBS. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Risikogruppen nach Inkubation mit L-NIO: 7,2±3,1 µl/sec (1 RF), 7,7±0,8 µl/sec (2 RF), 7,2±1,1 µl/sec (3 RF), 6,3±0,5 µl/sec (4 RF, $p<0,01$ im Vergleich zu PBS).

Die Addition eines NO-Fängers (HbO_2) zu L-NIO verhinderte in der Kohorte ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren bei einer Flussrate von 4,3±0,6 µl/sec nahezu vollständig den Durchtritt der Erythrozyten durch die Filterporen ($p<0,01$). In Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren verminderte sich dieser Effekt: 4,6±1,5 µl/sec (RF=1), 6,2±1,4 µl/sec (RF=2), 6,2±1 µl/sec (RF=3) und 5,0±0,7 µl/sec (RF=4). Vergleicht man die Mittelwerte der relativen Veränderung der Flussrate jeder Probe in Bezug zur Inkubation mit PBS zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollkohorte (-54 %) und der Kohorte mit 3 Risikofaktoren (-35 %) (Abbildung 12).

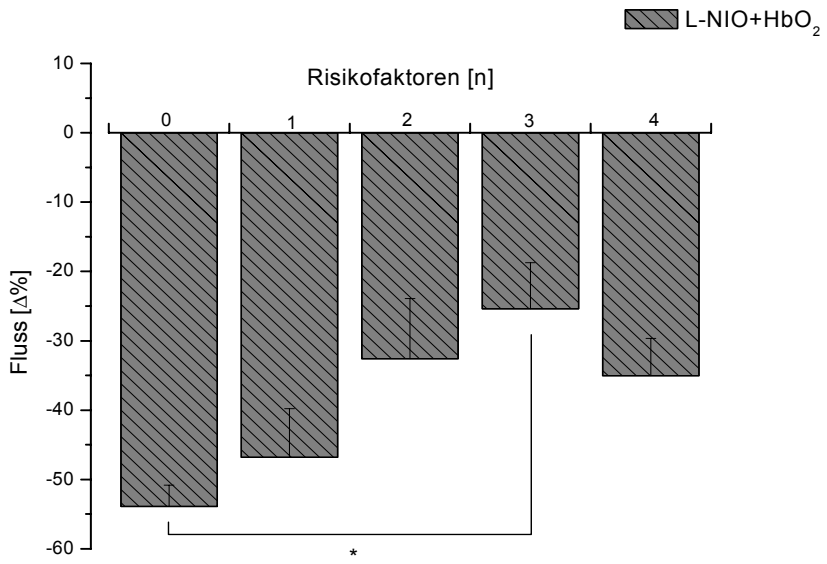

Abbildung 12
Erythrozytenverformbarkeit in Abhängigkeit erythrozytärer NO-Bildung. Durchschnittliche relative Veränderung der Flussrate gemessen mittels Filtrationsverfahren nach Inkubation von humanem Vollblut mit L-NIO und HbO_2 (als „NO-Fänger“). Zwischen den Risikofaktorgruppen zeigte sich zwischen RF=0 und RF=3 ein signifikant ($p<0,05$) verminderter Effekt von L-NIO + HbO_2.

3.1.6 Einfluss von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit

Neben einer Einschränkung der Freisetzung von bioaktivem NO besteht auch die Möglichkeit, dass freigesetztes NO bei Erythrozyten kardiovaskulär erkrankter Patienten anders als bei Erythrozyten gesunder Probanden wirkt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Untersuchung neben der Wirkung von erythrozytär gebildetem NO auch die Wirkung von exogen hinzugefügtem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit untersucht.

Durch Inkubation mit dem NO-Donor GSNO stieg die Flussrate sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil signifikant an: auf 9,4±2 µl/sec in der Kohorte ohne Risikofaktoren und auf 9,9±1,1 µl/sec in der Kohorte mit 4 Risikofaktoren. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse entsprachen einer Erhöhung der Flussrate um 17,5 % (0 RF) bzw. 19,3 % (4 RF) im Vergleich zur Inkubation unter Kontrollbedingungen (PBS).

Nach Zugabe von 0,1 mmol/l HbO_2 verminderte sich die Flussrate in der Kontrollgruppe auf 7,1±1,1 µl/sec, in der Gruppe mit 4 Risikofaktoren auf 7,6±0,9 µl/sec. Das entsprach einer durchschnittlichen Reduzierung im Vergleich zur Inkubation mit PBS von 11,3 % für die Kohorte mit 0 RF und um 8,4 % für die Kohorte mit 4 RF (Abbildung 13).

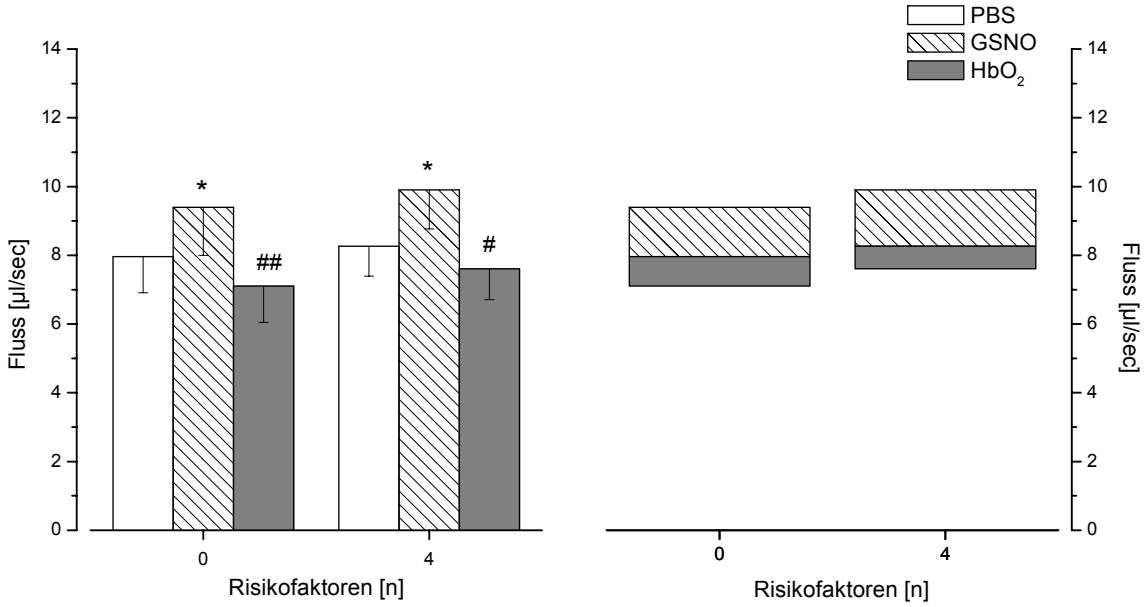

Abbildung 13
Erythrozytenverformbarkeit in Abhängigkeit von exogenem NO. Flussrate gemessen mittels Filtrationsverfahren nach Inkubation von humanem Vollblut mit PBS (Kontrolle), GSNO (NO-Donor) und L-NIO + HbO_2 (NOS-Inhibitor + „NO-Fänger“). Innerhalb einer Risikofaktorgruppe zeigt * einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ** mit $p<0,01$ zur Kontrolle (PBS) an, # einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ## mit $p<0,01$ der inhibierten zur stimulierten Probe mit GSNO. Zwischen den Risikofaktorgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

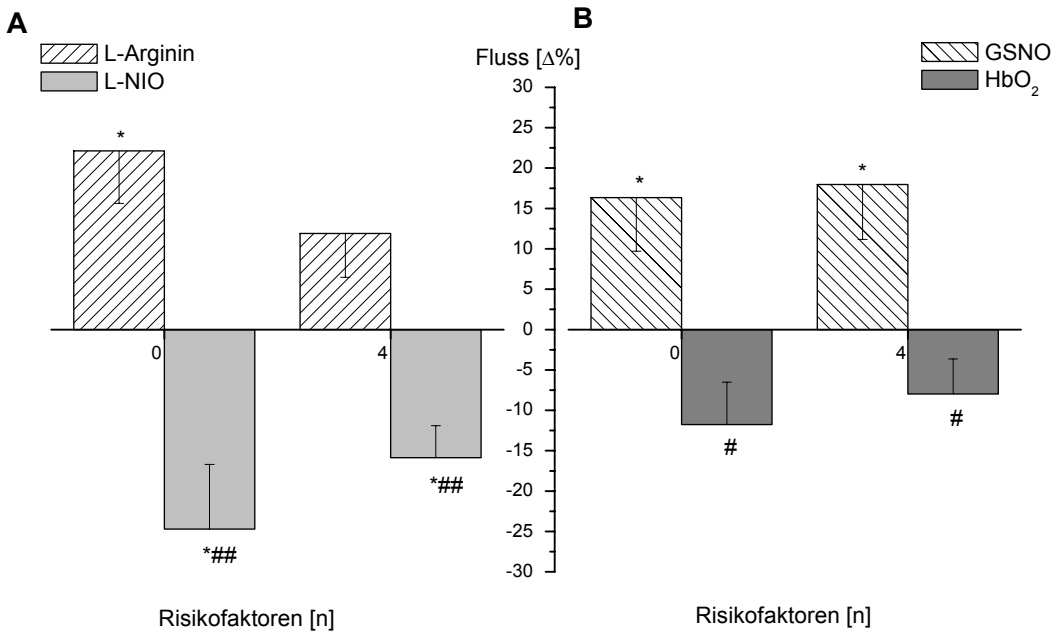

Abbildung 14
Differenz der Flussrate in Abhängigkeit der erythrozytären NO-Bildung (A) und exogenem NO (B). Die Flussrate wurde als Δ% im Vergleich zur Kontrolle mit PBS dargestellt. Im Gegensatz zu erythrozytär gebildetem NO zeigte sich die Wirkung von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren (4 RF) nicht eingeschränkt. Innerhalb einer Risikofaktorgruppe zeigt * einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ** mit $p<0,01$ zur Kontrolle (PBS) an, # einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ und ## mit $p<0,01$ der inhibierten zur stimulierten Probe.

Im Gegensatz zur tendenziell eingeschränkten Wirkung erythrozytär gebildeten NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wurden bei der Wirkung von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit keine Unterschiede in Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren gemessen.

3.1.7 Korrelation zwischen der Nitritkonzentration als Metabolit des NO-Stoffwechsels und der Erythrozytenverformbarkeit

Da sowohl die Konzentration von Nitrit nach Stimulation der eryNOS als auch die Filtrationsrate der Erythrozyten nach Stimulation der eryNOS mit zunehmender Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren eingeschränkt war, wurden beide auf Korrelation überprüft. Die Veränderung der Konzentration von Nitrit nach Stimulation oder Inhibition der eryNOS korrelierte mit der Veränderung der Flussgeschwindigkeit mit $r=0,71$ ($p<0,01$).

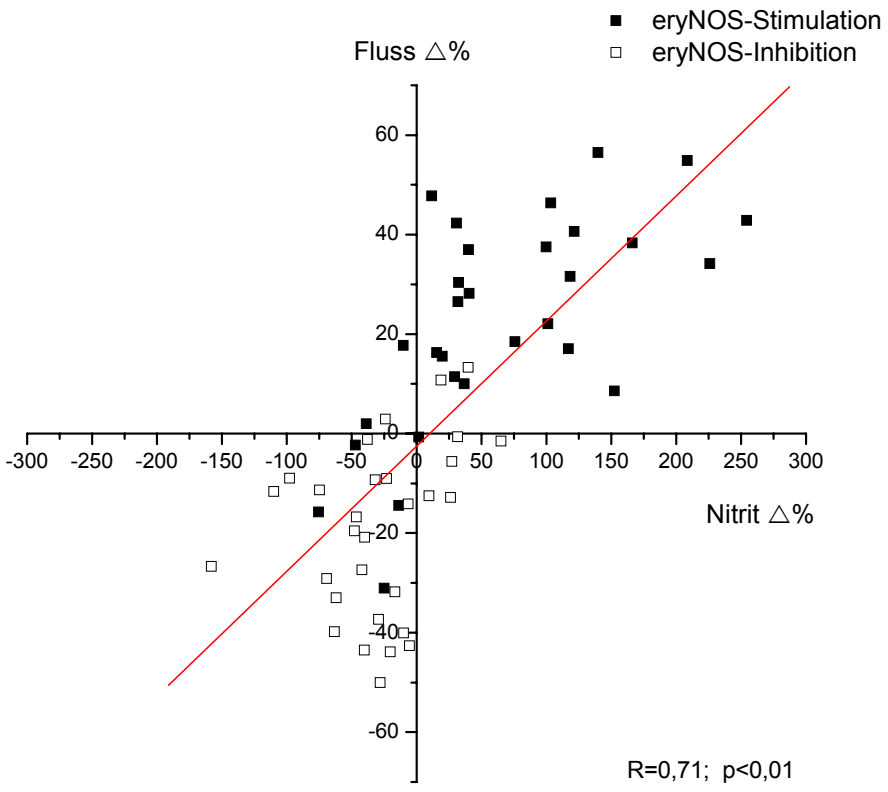

Abbildung 15
Lineare Korrelation zwischen der relativen Veränderung des Nitritwertes und der relativen Veränderung der Flussgeschwindigkeit nach Stimulation (mit L-Arginin) oder Inhibition (mit L-NIO) der eryNOS bezogen auf die Inkubation mit PBS.

Es zeigten sich inverse bivariate Korrelationen zwischen der Nitritkonzentration nach Inkubation unter Kontrollbedingungen (PBS) und der Anzahl der Risikofaktoren (n=79; r=-0,3; p<0,05), dem BMI (n=79; r=-0,27; p<0,05), dem LDL-Cholesterin (n=79; r=-0,28 p<0,05), den Triglyzeriden (n=79; r=-0,33; p<0,05) und dem mittleren arteriellen Blutdruck (n=79; r=-0,28; p<0,05).

Weiterhin bestanden inverse Korrelationen zwischen der Nitritkonzentration nach Stimulation der eryNOS mit L-Arginin und der Anzahl der Risikofaktoren (n=79; r=-0,4; p<0,01), dem BMI (n=79; r=-0,4; p<0,01), den Triglyzeriden (n=79; r=-0,29; p<0,05), der Glukose (n=79; r=-0,31; p<0,05), der Diabetesdauer (n=79; r=-0,3; p<0,05), den Packungsjahren (n=79; r=-0,28; p<0,05) und eine positive Korrelation mit dem HDL-Cholesterin (n=79; r=0,32; p<0,05).

Zur Bestimmung der Größe des Einflusses von einzelnen Parametern des kardiovaskulären Risikoprofils (bestehende KHK, bestehender Diabetes mellitus, bestehende Hypertonie, bestehende Dyslipidämie, Nikotinabusus, Alter und Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren) auf die plasmatische Nitritkonzentration wurde eine schrittweise, lineare

Regressionsanalyse durchgeführt. Der zusätzliche Einfluss der plasmatischen Nitritkonzentration (als Marker der eryNOS-Aktivität) auf die Erythrozytenverformbarkeit wurde ergänzend bestimmt (Tabelle 2).

Tabelle 2
Schrittweise lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung des Einflusses der einzelnen Parameter eines kardiovaskulären Risikoprofils auf die Aktivität der eryNOS und auf Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit

	R	**R^2**	Veränderung von **R^2**	Veränderung in **F**	**p**
Nitritkonzentration nach Inkubation mit PBS					
Triglyzeride (1)	0,3	0,09	0,09	5,9	0,02
(1) + KHK	0,44	0,2	0,11	4,15	0,12
Nitritkonzentration nach Stimulation der eryNOS					
Anzahl der Risikofaktoren (1)	0,39	0,15	0,15	8,18	0,01
(1) + KHK	0,49	0,24	0,09	5,49	0,02
(1) + (2)+ HbA_{1c}	0,56	0,31	0,06	4,23	0,05
Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit nach Stimulation der eryNOS					
Veränderung der Nitritkonzentration (1)	0,65	0,42	0,42	21,06	0,00
(1) + Anzahl der Risikofaktoren	0,69	0,48	0,06	12,32	0,01
(1) + (2)+ KHK	0,76	0,56	0,08	6,8	0,05
Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit nach Inhibition der eryNOS					
Veränderung der Nitritkonzentration (1)	0,45	0,2	0,21	6,24	0,02
(1) + arterielle Hypertonie	0,6	0,36	0,16	6,17	0,02

Für die plasmatische Nitritkonzentration erreichten die in der Tabelle 2 aufgeführten Parameter ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,2 nach Inkubation mit PBS bzw. 0,31 nach Inkubation mit L-Arginin. Das heißt die Parameter konnten 20 % bzw. 31 % der Gesamtvarianz der plasmatischen Nitritkonzentration in dieser Studie erklären.

Für die Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit erreichten die Veränderungen der Nitritkonzentration und die in der Tabelle 2 aufgeführten Risikofaktoren ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,56 für die Stimulation bzw. 0,36 für die Inhibition der eryNOS, dass heißt sie konnten 56 % bzw. 36 % der Gesamtvarianz der Veränderungen in der Erythrozytenverformbarkeit in dieser Studie erklären.

Die Aufnahme der übrigen Parameter des Schweregrades des kardiovaskulären Risikoprofils erbrachte keine signifikante Änderung in R^2 und wurde deshalb aus dem Modell ausgeschlossen.

3.2 Einfluss von NO auf die Mikrozirkulation *in vivo* am Modell des Hühnerembryos

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos als *in vivo* Mikrozirkulationssystem verwendet, um die Wirkung von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit und die Mikrozirkulation zu untersuchen.

Die Erythrozyten waren im Mittel 14,8±0,7 µm lang und 7,8±0,9 µm breit. Die Fähigkeit des Erythrozyten, sich in einer Engstelle zu verformen zeigt sich in einer Verringerung der Breite. Damit erhöht sich der Quotient aus Länge/Breite in der Engstelle. Verschlechtert sich diese Fähigkeit, verändert sich die Breite in der Engstelle weniger. Damit bleibt der Quotient aus Länge/Breite in der Engstelle niedrig. Durch Verformung der Erythrozyten betrug die durchschnittlichen Länge 16,6±0,6 µm und die durchschnittliche Breite 6,2±0,9 µm in einer Engstelle. Das entsprach einer durchschnittlichen Veränderung des Quotienten aus Länge/Breite von 2,05±0,06 vor der Engstelle zu 2,89±0,05 in der Engstelle. Der Durchmesser der Arterie sowie der Kapillare blieb während der Versuche stets unverändert.

Nach Injektion von PBS in das extraembryonale Gefäßsystem wurde keine signifikante Veränderung des Quotienten aus Länge/Breite in der Engstelle vor und nach Injektion gemessen (Anstieg in der Engstelle auf 2,89±0,08 vor Injektion von PBS, und auf 2,90±0,08 nach Injektion von PBS). Auch veränderte sich weder die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare (0,33±0,03 mm/sec vor Injektion, 0,30±0,03 mm/sec nach Injektion), noch die in der Arterie (0,73±0,03 mm/sec vorher, 0,7±0,03 mm/sec nachher).

3.2.1 Sensitivität der etablierten Methode

Um die Verformbarkeit der Erythrozyten zu steigern wurde Pentoxifyllin injiziert. Der Quotient aus Länge/Breite in der Engstelle nach Injektion veränderte sich nicht (Abbildung 16): 2,96±0,05 vor Injektion und 3,00±0,04 nach Injektion von Pentoxifyllin. Es veränderte sich weder die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare (0,37±0,02 mm/sec vor Injektion, 0,35±0,02 mm/sec nach Injektion von Pentoxifyllin), noch die in der Arterie (0,76±0,02 mm/sec vorher und 0,75±0,02 mm/sec nachher).

Zur Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit wurde Glutardialdehyd injiziert. Die Breite der Erythrozyten verringerte sich in der Engstelle weniger als sie sich vor der Injektion verringerte. Der Quotient aus Länge/Breite war in der Engstelle mit 2,42±0,19 nach Injektion niedriger im Vergleich zu 2,96±0,04 vor der Injektion. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p<0,05$). Die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare verringerte sich von 0,35±0,02 mm/sec auf 0,22±0,03 mm/sec ($p<0,01$). Die Flussgeschwindigkeit in der Leitungsarterie blieb mit 0,73±0,02 mm/sec vor und nach Injektion konstant.

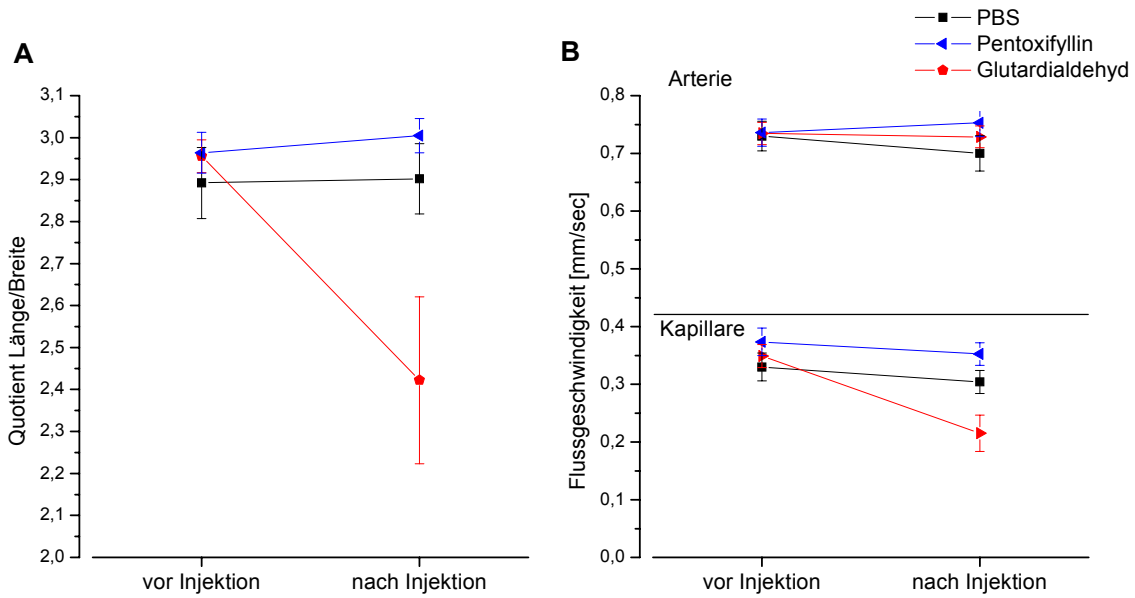

Abbildung 16
Einfluss von Pentoxifyllin und Glutardialdehyd auf die Mikrozirkulation *in vivo*. A Veränderung des Quotienten Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle nach Injektion der Substanzen, **B** Veränderung der Flussgeschwindigkeit nach Injektion der Substanzen gemessen in Leitungsarterie und in Kapillare. Im Gegensatz zur Injektion von PBS und Pentoxifyllin verschlechterte Glutardialdehyd sowohl die Erythrozytenverformbarkeit in der Engstelle ($p<0,05$) wie auch die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare ($p<0,01$).

3.2.2 Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation

Nach Injektion des NO-Donors GSNO veränderte sich der Quotient aus Länge/Breite in der Engstelle nicht (Abbildung 17): 2,93±0,06 vor Injektion und 2,87±0,05 nach Injektion von GSNO. Die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare und in der Arterie blieb unverändert (Kapillare: 0,32±0,02 mm/sec vor und nach Injektion; Arterie: 0,71±0,04 mm/sec vorher und 0,72±0,03 mm/sec nachher).

Nach Injektion von HbO_2 verringerte sich die Erythrozytenbreite in der Engstelle weniger als vor der Injektion. Der Quotient aus Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle verringerte sich durch HbO_2 signifikant von 2,85±0,08 auf 2,32±0,17 ($p<0,05$). Die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare verlangsamte sich von 0,3±0,02 mm/sec auf 0,16±0,05 mm/sec ($p<0,05$). Die Flussgeschwindigkeit in der Arterie wurde mit 0,72±0,02 mm/sec vor und 0,74±0,03 mm/sec nach Injektion gemessen.

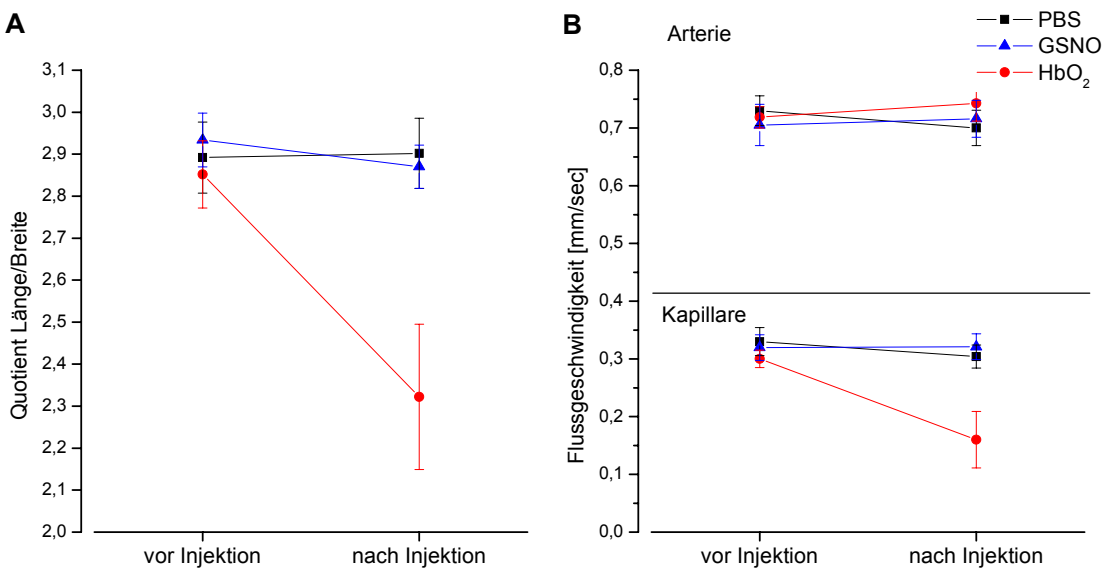

Abbildung 17
Einfluss von exogenem NO auf die Mikrozirkulation *in vivo*. **A** Veränderung des Quotienten Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle nach Injektion der Substanzen, **B** Veränderung der Flussgeschwindigkeit nach Injektion der Substanzen gemessen in Leitungsarterie und in Kapillare. Im Gegensatz zur Injektion von PBS und GSNO (NO-Donor) verschlechterte HbO_2 (als „NO-Fänger") sowohl die Erythrozytenverformbarkeit in der Engstelle ($p<0,05$) wie auch die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare ($p<0,05$) im Vergleich zu basal.

3.2.3 Einfluss von endogen gebildetem NO auf die Mikrozirkulation

Nach Stimulation der NOS mit injiziertem L-Arginin wurde kein Unterschied im Quotienten aus Länge/Breite in der Engstelle vor und nach Injektion gemessen (Abbildung 18): 2,85±0,04 vor L-Arginin und 2,82±0,04 nach L-Arginin. Die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare veränderte sich nicht: 0,35±0,02 mm/sec vor Injektion und 0,34±0,01 mm/sec nach Injektion. Auch die Flussgeschwindigkeit in der Arterie blieb mit 0,69 ±0,03 mm/sec vorher und 0,71 ±0,05 mm/sec nachher unverändert.

Nach Inhibition der NOS mit L-NIO verschlechterte sich die Fähigkeit der Erythrozyten, sich in der Engstelle zu verformen von einem Quotienten aus Länge/Breite von 2,8±0,11 auf 2,52±0,16 nach Injektion. Die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare verlangsamte sich von 0,31±0,02 mm/sec auf 0,23±0,05 mm/sec. In der Arterie blieb sie mit 0,74±0,03 mm/sec unverändert.

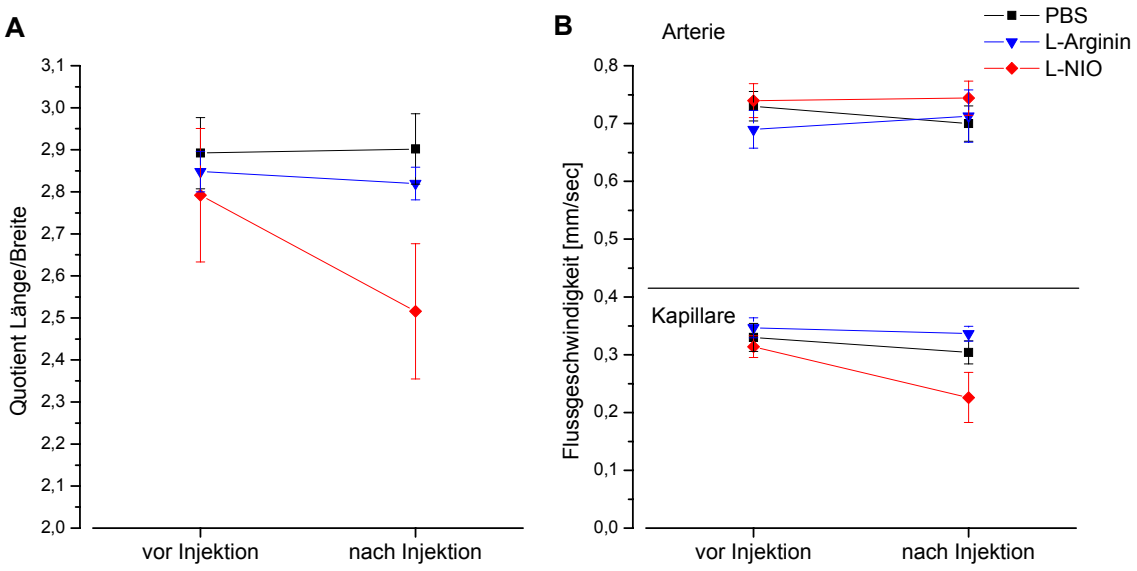

Abbildung 18
Einfluss der NOS auf die Erythrozytenverformbarkeit *in vivo*. **A** Veränderung des Quotienten Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle nach Injektion der Substanzen, **B** Veränderung der Flussgeschwindigkeiten nach Injektion der Substanzen gemessen in Leitungsarterie und in Kapillare. Im Gegensatz zur Injektion von PBS und L-Arginin (Substrat der NOS) verschlechterte L-NIO (Inhibitor der NOS) sowohl die Erythrozytenverformbarkeit in der Engstelle wie auch die Flussgeschwindigkeit in der Kapillare (nicht signifikant).

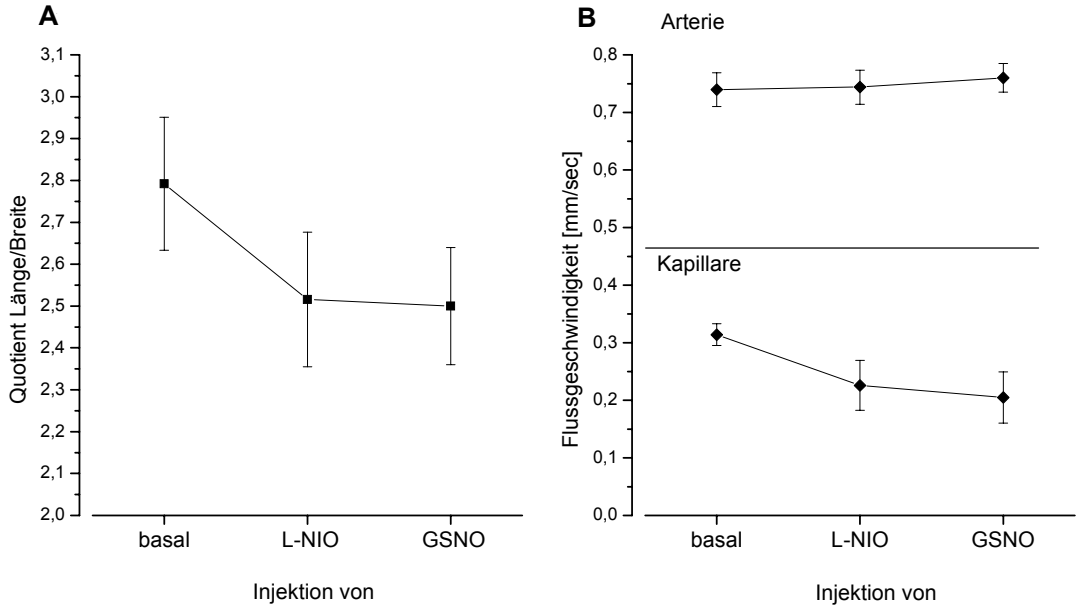

Abbildung 19
Reversibilität der verschlechterten Erythrozytenverformbarkeit nach NOS-Inhibition *in vivo*. **A** Veränderung des Quotienten Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle nach Injektion der Substanzen, **B** Veränderung der Flussgeschwindigkeit nach Injektion der Substanzen gemessen in Leitungsarterie und in Kapillare. Die durch L-NIO (Inhibitor der NOS) verschlechterte Erythrozytenverformbarkeit und Flussgeschwindigkeit in der Kapillare veränderte sich nach Injektion des NO-Donors GSNO nicht.

Es wurde geprüft, ob der Effekt von L-NIO durch Hinzufügen von exogenem NO reversibel ist (Abbildung 19). Nach der Injektion von L-NIO und Messung der Parameter nach 10 min wurde mit einer zweiten Injektion GSNO in einer Konzentration von 600 nmol/l ins Mikrozirkulationssystem desselben Eies injiziert. Der vorher durch L-NIO verminderte Quotient aus Länge/Breite der Erythrozyten in der Engstelle blieb mit 2,5±0,14 nach GSNO unverändert. Auch die Flussgeschwindigkeit blieb in der Kapillare mit 0,2±0,04 mm/sec und in der Arterie mit 0,76±0,03 mm/sec unverändert.

4. Diskussion

Bekannt war, dass im vaskulären System neben Endothelzellen auch Erythrozyten eine NOS besitzen, welche in physiologisch relevanten Mengen NO synthetisiert[12]. Erythrozytär gebildetes NO verbessert wie endothelial gebildetes NO die Erythrozytenverformbarkeit[12;88]. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wurde eine endotheliale Dysfunktion mit einer verminderten Aktivität der eNOS und einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO nachgewiesen. Diese war mit einer reduzierten endothelabhängigen Vasodilatation assoziiert. Unbekannt war, ob die Aktivität der eryNOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren ebenfalls vermindert ist und dies Auswirkungen auf die Erythrozytenverformbarkeit hat.

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

(1.) Die erythrozytäre NO-Synthese ist bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren weniger stimulierbar.

(2.) Eine Ursache dafür könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Aktivität der erythrozytären Arginase bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren sein. Eine Veränderung in der Scherstress-vermittelten Stimulation der eryNOS-Aktivität durch Phosphorylierung an Serin 1177 konnte nicht nachgewiesen werden.

(3.) Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren konnte eine tendenzielle Verschlechterung der basalen Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen werden. Die Verformbarkeit in Abhängigkeit der eryNOS-Aktivität lässt sich bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren nur eingeschränkt verbessern.

(4.) Die Etablierung einer Methodik zur Untersuchung der Mikrozirkulation am Modell des Hühnerembryos ermöglichte erstmals den Nachweis des Einflusses von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit *in vivo*: Durch Abfangen von NO sowie durch Inhibition der NO-Synthese verschlechterte sich die Erythrozytenverformbarkeit und die Mikrozirkulation.

Im Folgenden soll zunächst auf die Bestimmung der NOS-Aktivität eingegangen werden. Anschließend wird der veränderte L-Arginin-NO-Stoffwechsel bei kardiovaskulären Krankheiten diskutiert: Einleitend werden in jedem Abschnitt die bekannten Veränderungen in der Endothelzelle beschrieben, um anschließend den erythrozytären NO-Stoffwechsel zu diskutieren. Danach werden die Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Krankheiten erörtert. Im letzten Abschnitt wird die Etablierung der Methode zur Untersuchung des Einflusses von NO *in vivo* auf die Mikrozirkulation diskutiert.

4.1 Erythrozytäre NO-Synthese bei kardiovaskulären Risikofaktoren

Zur Beurteilung der eryNOS-Aktivität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen wurden in dieser Arbeit die Metaboliten der NO-Synthese Nitrit und Nitrat im Plasma als sensitive Marker für die NOS-Aktivität verwendet. Im Gegensatz zu Nitrit und Nitrat lässt sich NO durch den schnellen Stoffwechsel und die kurze Halbwertszeit nahezu unmöglich unter basalen Bedingungen direkt und quantitativ detektieren[122]. NO wird in Anwesenheit von O_2 schnell mit einer Stöchiometrie von 1:1 zu Nitrit oxidiert oder direkt durch die Reaktion mit Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert[62]. Es wurde gezeigt, dass plasmatisches Nitrit *in vivo* als spezifischer und sensitiver Marker für akute Veränderungen der eNOS-Aktivität angesehen werden kann[56]. Die durchschnittliche Nitritkonzentration im Plasma von humanem Blut liegt zwischen 100-600 nmol/l[57]. 90 % des Nitrits entstammt der endothelialen NO-Synthese[57]. *In vitro* wurde im Vollblut nach Stimulation mit dem Substrat bzw. spezifischer Inhibition des Enzyms die Nitritfreisetzung einer NO-Synthese erythrozytärer Genese zugeordnet. Carvalho et al. (2004) und Kleinbongard et al. (2006) zeigten, dass in Analogie zur endothelialen NO-Synthese eine veränderte erythrozytäre NO-Synthese durch Änderungen der Nitritkonzentration im Plasma reflektiert wird[123;12]. Nitrat wurde in früheren Arbeiten als Marker für die Aktivität der eNOS kaum eingesetzt, da dessen Konzentration im Blut in hohem Maße von NO-Stoffwechsel-unabhängigen Faktoren beeinflusst wird. Die in der Literatur beschriebenen basalen Konzentrationen von Nitrat differieren stark und werden im Plasma mit 19-60 µmol/l angegeben[124;125]. Im Vollblut, welches *in vitro* unabhängig von potentiellen Einflussfaktoren bleibt, reflektieren auch Änderungen der plasmatischen Nitratkonzentration eine veränderte erythrozytäre NO-Synthese[12].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen der eryNOS im Vollblut durchgeführt. Der Versuchsaufbau war als geschlossenes System zu betrachten. Veränderungen der Nitrit- und Nitratkonzentration waren folglich eryNOS-spezifisch. Die in dieser Arbeit gemessene Nitritkonzentration nach *in vitro* Inkubation von Vollblut unter Kontrollbedingungen (PBS) war von der basalen eryNOS-Aktivität abhängig. Die eryNOS-Aktivität bei Probanden ohne kardiovaskuläre Risikofaktoren lässt sich mit der in den Arbeiten von Kleinbongard et al. (2006) mit einer gemessenen Nitritkonzentration von 38 nmol/l[12] und von Ludolph et al. (2007) mit einer gemessenen Nitritkonzentration von 56 nmol/l[126] vergleichen. Auch in der vorliegenden Arbeit stieg die Nitritkonzentration im Plasma unter erythrozytärer NOS-Stimulation mit L-Arginin an und verminderte sich durch Inhibition der eryNOS (siehe 3.1.2). Das mit dem Versuchsprotokoll bestimmte plasmatische Nitrit war folglich zur Bestimmung der eryNOS-Aktivität geeignet und wurde zum Vergleich der eryNOS-Aktivität in Abhängigkeit vom kardiovaskulären Risikoprofil eingesetzt. Kleinbongard et al. verwendeten

L-NMMA anstatt L-NIO als Inhibitor. Beide Substanzen sind kompetitive Inhibitoren der eNOS und hemmen auch die eryNOS. In eigenen Voruntersuchungen zeigte sich die Nitritkontamination von L-NIO mit durchschnittlich 15 nmol/l geringer als die von L-NMMA mit 25 nmol/l. Mit der Verwendung von L-NIO konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert werden. Im Gegensatz zu der veränderten Nitritkonzentration nach Stimulation oder Inhibition der eryNOS waren in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede des plasmatischen Nitrats in Abhängigkeit der eryNOS-Aktivität nachweisbar. Die Nitratbestimmung wurde jedoch nur bei 6 Probanden pro Risikogruppe durchgeführt. Anzunehmen ist, dass diese Fallzahl zu niedrig war um über die Bestimmung von Nitrat Veränderungen der eryNOS-Aktivität wiederzugeben.

An der Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten ist ein NO-Mangel beteiligt. Die Bedeutung einer eingeschränkten endothelialen NO-Bildung an der reduzierten NO-Bioverfügbarkeit wurde bereits bewiesen (siehe Kapitel 1). Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten Kleinbongard et al. (2006), dass die endotheliale NO-Bildung der eNOS mit steigender Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren im Vergleich zu Gesunden progressiv sank[127]. Auch für die erythrozytäre NO-Synthese wurden Veränderungen im Zusammenhang mit Krankheiten beschrieben. Eine der ersten Arbeiten, die eine eryNOS beschrieben hat, wies auf eine verminderte Aktivität der eryNOS im Zusammenhang mit Mammakarzinomen hin[128]. Es wurde eine verminderte basale und insulinstimulierte erythrozytäre NO-Bildung nachgewiesen. Dagegen wurde im Tierversuch im Zusammenhang mit Mittelohrentzündungen eine gesteigerte eryNOS-Aktivität mit erhöhter NO-Bildung gemessen[129].

Für kardiovaskuläre Risikofaktoren wurde in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen, dass die plasmatische Nitritkonzentration als Marker der erythrozytären NO-Synthese bei Patienten mit mehr als einem kardiovaskulären Risikofaktor vermindert ist. Diese Ergebnisse zeigen eine Tendenz zu einer eingeschränkten basalen Aktivität der eryNOS bei kardiovaskulären Risikofaktoren analog zur endothelialen Dysfunktion. Durch eine höhere und für alle Risikogruppen ausgeglichenere Fallzahl könnte eine statistische Signifikanz für die Unterschiede zwischen den einzelnen Risikofaktoren bewiesen werden. Nach Stimulation der eryNOS mit L-Arginin konnte ein signifikant niedriger Anstieg der Nitritbildung bei Patienten mit mehr als einem kardiovaskulären Risikofaktor nachgewiesen werden. Die Verminderung der Nitritkonzentration durch Inhibition der eryNOS war in Abhängigkeit der Risikofaktoren nicht verändert. Ergänzend zu der schon bekannten verminderten Aktivität der eNOS bei kardiovaskulären Krankheiten weisen die Ergebnisse dieser Arbeit eine *in vitro* eingeschränkte Funktion der eryNOS bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren nach. Die Nitritkonzentration bei der Kohorte mit einem Risikofaktor war nach Inkubation unter Kontrollbedingungen und nach Stimulation der eryNOS höher als bei den Probanden ohne

Risikofaktor. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Fallzahl in der Kohorte mit einem Risikofaktor mit sechs Patienten sehr klein war. Diese Kohorte unterschied sich von der Kontrollgruppe nur im höheren Alter und im BMI (siehe 3.1.1). Die reduzierte eryNOS-Aktivität bei den Patienten mit mehr als einem Risikofaktor wurde in Abhängigkeit von der *Anzahl* der kardiovaskulären Risikofaktoren festgestellt. Der Einfluss und die Bedeutung jedes einzelnen Risikofaktors für diese Verschlechterung sind noch offen und können Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein. Die statistische Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigte, dass neben der absoluten Anzahl an Risikofaktoren die Triglyzeride im Plasma, das Bestehen einer KHK und ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus (HbA_{1c}) den größten Einfluss auf die Ergebnisse hatten (siehe 3.1.7). Der Studiencharakter entsprach nicht einer repräsentativen Querschnittstudie. Mit einer Selektion der Patienten sollten auch geringe Veränderungen der eryNOS-Aktivität bei kardiovaskulären Risikofaktoren erfasst werden. Es wurden ausdrücklich Patienten mit einer starken, medikamentös schlecht eingestellten und langjährigen Ausprägung der kardiovaskulären Risikofaktoren für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt. Bei 38 von 55 Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wurden bereits manifeste mikro- und makroangiopathische Krankheiten diagnostiziert. Die einzelnen Risikofaktoren waren nicht gleichmäßig über die Kohorten verteilt. Auch ein Einfluss der Art der Therapie wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

4.2 Veränderungen des L-Arginin-NO-Metabolismus bei kardiovaskulären Risikofaktoren

Für die endotheliale Dysfunktion sind verschiedene Veränderungen des L-Arginin-NO-Metabolismus als Ursache einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit bekannt. In der Endothelzelle ist eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit mit einem verminderten Angebot an L-Arginin, einer gesteigerten Inhibition durch ADMA, einer entkoppelten NO-Synthese, einer veränderten Expression der NOS sowie einer vermehrten Inaktivierung von NO durch oxidativen Stress assoziiert. Für die in dieser Arbeit nachgewiesene eingeschränkte eryNOS-Aktivität sind ähnliche Mechanismen denkbar (Abbildung 20).

L-Arginin hat als Substrat der NOS eine entscheidende Rolle in der Regulation der NOS-Aktivität. Die eingeschränkte endotheliale Bioverfügbarkeit von NO bei kardiovaskulären Krankheiten kann durch ein *vermindertes L-Argininangebot* verursacht werden. In der Endothelzelle beträgt die physiologische Konzentration von L-Arginin 0,5-2 mM, während die Michaelis-Menten-Konstante der eNOS mit circa 3-10 µM angegeben wird[130;131]. Somit ist es sehr unwahrscheinlich, dass die zelluläre Substratkonzentration unter physiologischen Bedingungen die NO-Synthese limitiert. Im Plasma kommt L-Arginin in einer Konzentration von 0,1-0,25 mM vor[23;132]. Die L-Argininkonzentration im Erythrozyten ist mit einer Sättigung von 35 µM bis 133,3 µM viel niedriger als in der Endothelzelle[133].

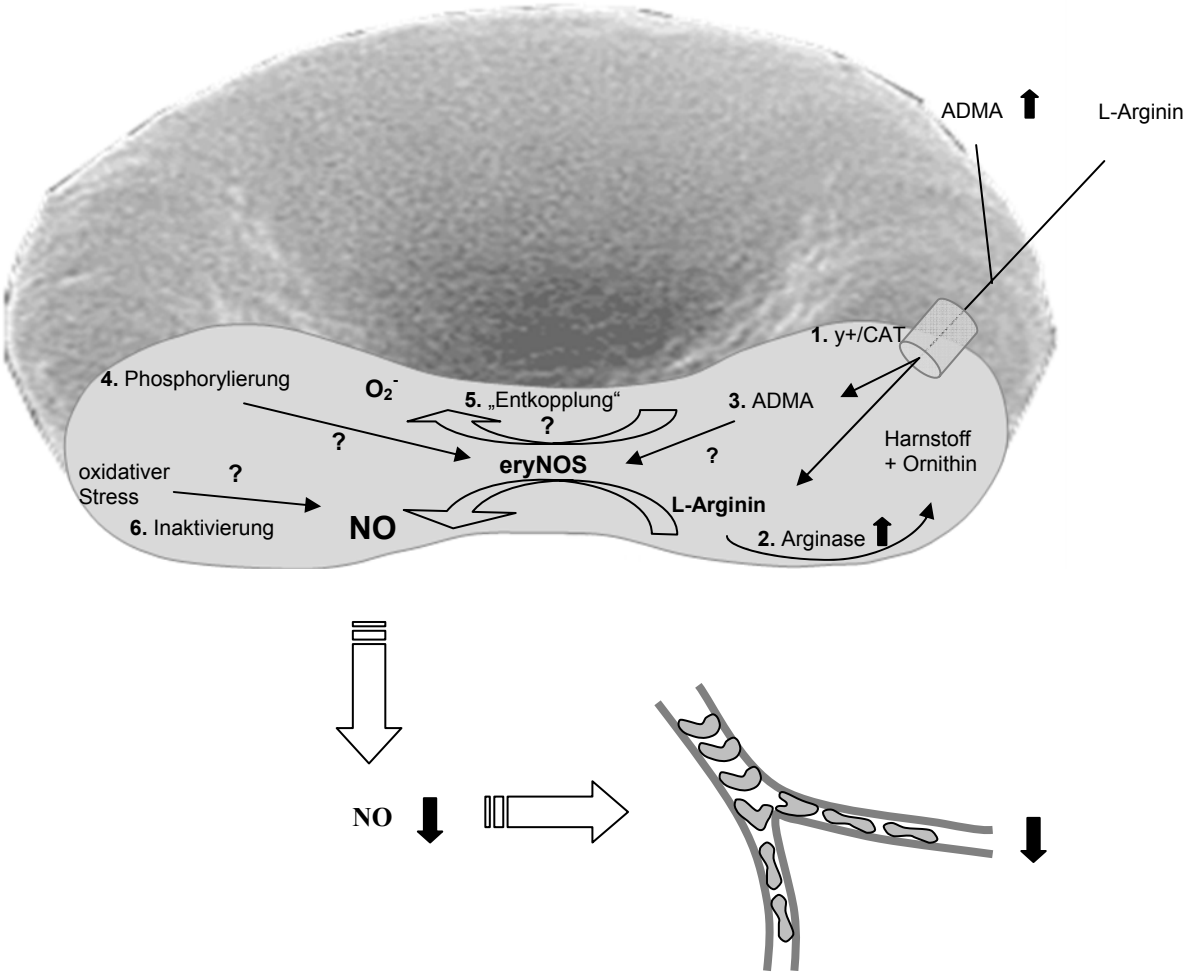

Abbildung 20
Möglicher Stoffwechsel von erythrozytär gebildetem NO bei kardiovaskulären Risikofaktoren. Eine reduzierte NO-Bioverfügbarkeit könnte analog zur Endothelzelle durch multiple Veränderungen verursacht werden. Bekannt waren erhöhte plasmatische ADMA-Konzentrationen, die eine gesteigerte Inhibition der eryNOS vermuten lassen **(3)**, sowie eine Erhöhung der ROS, die eine erhöhte Inaktivierung von NO vermuten lassen **(6)**.
In dieser Arbeit wurde eine erhöhte intraerythrozytäre Arginaseaktivität nachgewiesen **(2)**, die die L-Arginin-Verfügbarkeit verringern könnte. Eine veränderte Phosphorylierung der eryNOS durch Scherstress wurde nicht nachgewiesen **(4)**. Weitere Einflussgrößen könnten ein verringerter Transport von L-Arginin in die Zelle **(1)** sowie eine „Entkopplung“ der eryNOS **(5)** sein. In dieser Arbeit wurde zusammen mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit eine eingeschränkte Stimulation der Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen.

Bei arterieller Hypertonie[134], Diabetes mellitus[135], Dyslipidämie[136] und im Alter[137] verbessert die Substitution von L-Arginin die endotheliale Dysfunktion mit einer reduzierten NO-Bioverfügbarkeit und einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation. Es wird angenommen, dass durch die L-Argininsubstitution unter anderem eine gesteigerte Arginase-aktivität, ein verminderter L-Arginintransport in die Endothelzelle oder ein erhöhter ADMA-Spiegel kompensiert und dadurch die NO-Synthese gesteigert wird. Veränderungen der plasmatischen L-Argininkonzentration bei kardiovaskulären Risikofaktoren werden kontrovers diskutiert. Bei Patienten mit Diabetes mellitus wurden niedrigere L-Argininspiegel im Plasma gemessen[138]. Dagegen ist der plasmatische L-Argininspiegel bei der arteriellen

Hypertonie erhöht[139]. Es fehlen bislang Angaben bezüglich der intraerythrozytären L-Argininkonzentration bei kardiovaskulären Risikofaktoren.

Die *Arginase* trägt unter physiologischen Bedingungen mit einer Michaelis-Menten-Konstante von 1-3 mM erheblich zum Abbau des L-Arginins bei[140]. Für die endotheliale Arginase konnten bei Diabetes mellitus[32], bei der arteriellen Hypertonie[33] und im Alter[31] eine erhöhte Expression und Aktivität mit einer verminderten NO-Bildung nachgewiesen werden. Als Folge wurde eine eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation beschrieben, die durch Inhibition der Arginase verbessert werden konnte[141]. Im Erythrozyten wurde eine erhöhte Arginaseproteinmenge bei Diabetes mellitus nachgewiesen, über die Aktivität des Enzyms konnte jedoch keine Aussage gemacht werden[142]. Bei Ratten mit arterieller Hypertonie wurde eine erhöhte Arginaseaktivität im Erythrozyten nachgewiesen[33].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikant erhöhte Aktivität der Arginase im Erythrozyten bei kardiovaskulären Risikofaktoren gemessen (siehe 3.1.3). Eine *in vitro* Inkubation von Erythrozyten gesunder Probanden mit Arginase führte in früheren Arbeiten zu einer reduzierten erythrozytären NO-Bildung[12]. In dieser Arbeit wurde in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren eine verminderte Stimulation der eryNOS durch eine L-Argininsubstitution nachgewiesen. Folglich könnte die in dieser Arbeit bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren gemessene erhöhte intraerythrozytäre Arginaseaktivität die eryNOS-Aktivität über eine verminderte intraerythrozytäre L-Argininkonzentration beeinträchtigen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend kann in weiterführenden Untersuchungen durch eine Inkubation der Erythrozyten mit einem Arginaseinhibitor die Bedeutung der Arginase für die eryNOS-Aktivität bei kardiovaskulären Krankheiten weiter untersucht werden.

Die intrazelluläre L-Argininkonzentration wird auch durch den *Transport in die Zelle* beeinflusst. Das L-Arginin gelangt über den y+ Transporter in die Endothelzelle und in den Erythrozyten. Eine Sättigung des y+ Transporters der Endothelzelle besteht unter physiologischen Bedingungen bei einer L-Arginin-Plasmakonzentration von circa 0,1-0,2 mM[143]. Im Zusammenhang mit der arteriellen Hypertonie wurde ein verminderter L-Arginintransport in die Endothelzelle nachgewiesen[28]. Die Expression und Proteinmenge des y+ Transporters war jedoch nicht verändert. Bei Diabetes mellitus[144] und im Alter[145] konnte keine Veränderung des L-Arginintransportes in die Endothelzelle nachgewiesen werden. Für den Gestationsdiabetes wurde sogar eine erhöhte Aktivität des y+ Transporters der Endothelzelle nachgewiesen[146]. Veränderungen des L-Arginintransportes in die Erythrozyten wurden bislang nur in wenigen Arbeiten untersucht. Bekannt ist, dass für den L-Arginintransport eine spezielle Zusammensetzung der Erythrozytenmembran zur Aktivierung des y+ Transporters nötig ist[147]. Vermutlich führen Veränderungen der

Erythrozytenmembran und der Zusammensetzung der Lipiddoppelschicht, wie sie für kardiovaskuläre Risikofaktoren beschrieben wurden, auch zu einer Veränderung der Membrantransporteraktivität y+ oder y+L. Moss et al. (2004) zeigten, dass der L-Arginintransport in den Erythrozyten und Thrombozyten bei der arteriellen Hypertonie über den y+L Transporter signifikant reduziert war, aber in der Aktivität des y+ Transportsystems kein Unterschied bestand[139]. Da vor allem das y+ Transportsystem für den L-Arginintransport in den Erythrozyten verantwortlich ist, bleibt der Mechanismus des L-Arginintransportes in den Erythrozyten bei kardiovaskulären Krankheiten unklar. Es fehlen bislang noch Arbeiten, die eine mögliche Beeinträchtigung der erythrozytären L-Argininaufnahme bei kardiovaskulären Krankheiten und die Auswirkungen auf die Aktivität der eryNOS untersuchen.

Neben der Argininverfügbarkeit kommt auch der *ADMA-Konzentration* eine Bedeutung als Einflussfaktor der NO-Synthese zu. Für die endotheliale NOS wurde in Kapitel 1 die Bedeutung erhöhter plasmatischer ADMA-Spiegel für eine endotheliale Dysfunktion mit verminderter NO-Bildung beschrieben. In der Endothelzelle wird die ADMA-Konzentration durch das metabolisierende Enzym DDAH reguliert. Eine reduzierte Aktivität der DDAH bei kardiovaskulären Risikofaktoren wird durch ROS, advanced glycation end products (AGE) und oxidiertes LDL im Endothel verursacht[148;149]. Unter diesen kardiovaskulären Risikobedingungen führt eine verminderte Metabolisierung durch DDAH zu einer erhöhten ADMA-Konzentration[150]. Eine erhöhte Konzentration von 3-15 µmol/l ADMA im Plasma in Verbindung mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Dyslipidämie, arterieller Hypertonie, Hyperhomocysteinämie, Nikotinabusus und Diabetes mellitus führt zu einer Inhibition der eNOS mit eingeschränkter NO-abhängiger Vasodilatation[42;41;44]. Auch im Erythrozyten wurde eine DDAH-Aktivität nachgewiesen[39]. Wie in der Endothelzelle hydrolysiert dieses Enzym ADMA und L-NMMA zu L-Citrullin und vermindert dadurch den ADMA-Spiegel. Für den kardiovaskulären Risikofaktor Alter wurde eine reduzierte erythrozytäre DDAH-Aktivität mit erhöhten plasmatischen ADMA-Spiegeln nachgewiesen[39]. In Analogie zur Endothelzelle steigt vermutlich mit kardiovaskulärem Risiko der ADMA-Spiegel über eine reduzierte DDAH-Aktivität an. Dies könnte zu einer Inhibition der eryNOS mit Auswirkungen auf die Erythrozytenverformbarkeit führen. Bei der arteriellen Hypertonie sind erhöhte ADMA-Spiegel über eine verminderte endotheliale NO-Bioaktivität mit einer verschlechterten Membranfluidität der Erythrozyten assoziiert[151]. Bei Diabetes mellitus wurde ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten plasmatischen und erythrozytären ADMA-Konzentration, einer verminderten erythrozytären NO-Verfügbarkeit und einer reduzierten Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen[152]. Eine Inkubation von gesunden Erythrozyten *in vitro* mit ADMA führte zu einer Verschlechterung der Verformbarkeit[103]. Zusammenfassend

kann gesagt werden, dass erhöhte ADMA-Spiegel sowohl zu einer verminderten endothelialen als auch zu einer verminderten erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit beitragen und die Erythrozytenverformbarkeit beeinflussen können.

Als ein weiter Einflussfaktor der NO-Synthese wird die *Regulation der NOS-Aktivität* durch Proteinmodifikationen angesehen (siehe Kapitel 1). Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren werden für die Endothelzelle Veränderungen der Phosphorylierung der eNOS kontrovers diskutiert. Durch Hyperglykämie wurden Modifikationen des Signalmoleküls *O-N*-Acetylglucosamin der eNOS mit einer verminderten Phosphorylierung an Serin 1177 nachgewiesen[51]. Auch bei der arteriellen Hypertonie und im Alter wurde eine verminderte Phosphorylierung an Serin 1177 und eine gesteigerte Phosphorylierung an Threonin 495 nachgewiesen[52;53]. Dagegen veränderten erhöhte Glukosespiegel und die Hyperhomocysteinämie die Phosphorylierung an Serin 1177 nicht[153;154].

Für die eryNOS wurde in der vorliegenden Arbeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren keine Veränderung in der durch Scherstress stimulierten Phosphorylierung an Serin 1177 nachgewiesen. Eine veränderte Regulation der eryNOS-Aktivität durch Scherstress kann folglich nicht als Ursache einer verminderten erythrozytären NO-Bildung bei kardiovaskulären Krankheiten angesehen werden. Insulin wurde als Stimulans nicht verwendet, da im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren häufig eine periphere Insulinresistenz besteht. Unter diesen Bedingungen könnte eine verminderte Rezeptorantwort die Ergebnisse nach Insulinstimulierung beeinflussen.

Für die eNOS wurde als weitere Ursache einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit eine *veränderte Aktivität der NOS* durch eine „Entkopplung“ des Elektronentransfers beschrieben. Das bei der arteriellen Hypertonie durch oxidativen Stress vermehrt gebildete Peroxynitrit oxidiert BH_4[155]. Der resultierende Mangel des Kofaktors der NOS[156], wie auch ein L-Argininmangel[157] oder die Anwesenheit von LDL-Cholesterin[158] führt zur Dissoziation der eNOS-Dimere in Monomere. Der normale Elektronentransfer ist gestört. Statt L-Arginin wird O_2 zum Elektronenakzeptor. An Stelle von NO wird die reaktive Sauerstoffspezies O_2^- gebildet[159]. Die damit assoziierte endotheliale Dysfunktion bei Diabetes mellitus und der Dyslipidämie verbesserte sich durch die Substitution von BH_4[160;161]. Im Erythrozyten führt eine reduzierte Aktivität der Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase bei Diabetes mellitus[162], bei der arteriellen Hypertonie[163] und der Dyslipidämie[164] zu einer verminderten intrazellulären ATP (Adenosintriphosphat)-Konzentration. Ein Mangel an intraerythrozytärem ATP führt zu einer reduzierten Aktivität der membranständigen ATP-abhängigen Ca^{2+}-Pumpe, die unter physiologischen Bedingungen die niedrigen Ca^{2+}-Spiegel im Erythrozyten aufrecht erhält[165]. Die Folge ist ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+}-Gehaltes. Deliconstantinos et al. (1995) konnten nachweisen, dass die Erhöhung des Ca^{2+} im

Erythrozyten über eine Stimulation der eryNOS zu einer gesteigerten Produktion von O_2^- und Peroxynitrit führt[74]. Diese Ergebnisse lassen eine entkoppelte erythrozytäre NO-Synthese mit erhöhter O_2^--Bildung und verminderter NO-Synthese analog zur Endothelzelle vermuten.
In der Endothelzelle führt oxidativer Stress nicht nur zu einer Entkopplung der NOS, sondern auch zu einer *vermehrten Inaktivierung von NO*[71]. Für die endotheliale NO-Synthese ist bekannt, dass bei kardiovaskulären Krankheiten der gesteigerte NO-Abbau durch oxidativen Stress an der endothelialen Dysfunktion mit reduzierter NO-abhängiger Vasodilatation beteiligt ist[9]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie der Diabetes mellitus, die arterielle Hypertonie, die Dyslipidämie und der Nikotinabusus führen zu einem erhöhten oxidativen Stress durch eine vermehrte Bildung von ROS[9]. An der erhöhten Bildung der ROS in der Endothelzelle sind nichtenzymatische Reaktionen wie die Autoxidation der Glukose, die Bildung von AGE und die Steigerung des Polyolstoffwechsels bei Diabetes mellitus beteiligt[166]. Auch gesteigerte enzymatische Reaktionen der Xanthin-Oxidase, der Cyclooxygenase der Atmungskette und der membranassoziierten NAD(P)H-Oxidase bei Diabetes mellitus und bei der arteriellen Hypertonie tragen zu oxidativen Stress bei[9;167]. Als weitere Quelle einer enzymatischen ROS-Produktion in der Endothelzelle wird die eNOS selbst angesehen. Die Anwesenheit von ROS bestimmt, ob die protektive oder die schädigende Wirkung der eNOS überwiegt. Die NO-Synthese wird durch Peroxynitrit wie oben beschrieben „entkoppelt“, anstatt NO wird vermehrt O_2^- gebildet. Das O_2^- reagiert leicht mit NO zum hochreaktiven Peroxynitrit. Diese Reaktion ist beinahe ausschließlich durch die Diffusion limitiert und läuft 3x-6x schneller als die Reaktion von O_2^- mit der antioxidativen Superoxiddismutase ab[168]. Dadurch trägt sie zum beschleunigten Abbau des NO bei. Nicht nur eine vermehrte Bildung von ROS, sondern auch deren verminderter Abbau kann zu oxidativen Stress in der Endothelzelle beitragen. Unter normalen Bedingungen wird O_2^- schnell durch antioxidative Verteidigungsmechanismen wie der mitochondrialen Mangan-Superoxiddismutase und der zytosolischen Kupfer-Superoxiddismutase eliminiert. Wasserstoffperoxid wird durch die Glutathionperoxidase oder durch die Katalase der Mitochondrien und Lysosomen zu Wasserstoffperoxid und O_2 konvertiert. Bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren wurde in der Endothelzelle im Zusammenhang mit oxidativen Stress eine verminderte Aktivität dieser enzymatischen Inaktivierung sowie eine reduzierte Konzentration der antioxidativ wirkenden Vitamine C und E nachgewiesen[169;170;171]. In anderen Arbeiten wurde eine Zunahme der ROS trotz Aktivitätszunahme der Abbaumechanismen nachgewiesen[172]. Die antioxidative Therapie mit Vitamin C oder Vitamin E verlängert die NO-Halbwertszeit durch einen Abfang von ROS, steigert die NOS-Expression[173] und stellt die endotheliale Vasodilatatorfunktion bei Diabetes mellitus[174], bei Rauchern[175], bei der Dyslipidämie[176] und der arteriellen Hypertonie[177] wieder

her. Ein langfristiger Effekt einer oralen Therapie von Antioxidantien auf die kardiovaskuläre Krankheit konnte jedoch nicht nachgewiesen werden[178]. Zusammengefasst kann neben einer verminderten NO-Bildung durch eine „Entkopplung“ der eNOS auch bereits gebildetes NO durch oxidativen Stress vermehrt inaktiviert werden.

Analog zur Endothelzelle könnte auch im Erythrozyten eine vermehrte Bildung von ROS die Bioverfügbarkeit von NO durch eine gesteigerte Inaktivierung reduzieren. Im Erythrozyten schützt zwar das leicht oxidierbare Glutathion intrazelluläre Proteine mit Schwefelwasserstoff-Gruppen wie die Hämoglobinmoleküle in der Erythrozytenmembran gegen eine Oxidation. Erythrozyten sind jedoch sehr empfänglich für oxidativen Stress. Grund hierfür ist der hohe Gehalt an ungesättigten Fettsäuren in der Membran und die hohe Konzentration von O_2 und Hämoglobin[179]. Selbst unter physiologischen Bedingungen sind die Erythrozyten kontinuierlich ROS exponiert. Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus[180], arterielle Hypertonie[181], Dyslipidämie und Adipositas[182] wurden Veränderungen in den Erythrozyten in Abhängigkeit von oxidativem Stress nachgewiesen. Damit einhergehend besteht ein geringeres Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion[183]. Es konnte eine inverse Korrelation der Häufigkeit diabetischer Mikro- und Makroangiopathien zu dem Gehalt an reduziertem Glutathion nachgewiesen werden[184]. Ursache für den verminderten Glutathiongehalt kann eine vermehrte Oxidation durch oxidativen Stress oder eine reduzierte Glutathionreduktase sein[184]. Zusätzlich zum Abbau von NO durch oxidativen Stress führt bei Diabetes mellitus auch eine vermehrte Bindung von exogen aufgenommenem NO in Form von S-Nitrosohämoglobin zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit[185].

4.3 Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die eingeschränkte eryNOS-Aktivität bei kardiovaskulären Risikofaktoren zu einer Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit führt. Diese könnte an Mikrozirkulationsstörungen bei kardiovaskulären Krankheiten beteiligt sein. Als Ursache einer verminderten basalen Verformbarkeit bei kardiovaskulären Krankheiten sind strukturelle und physiologische Veränderungen der Erythrozyten denkbar. Die Erythrozytenverformbarkeit ist sowohl von intrinsischen als auch von extrinsischen Faktoren abhängig. Zu den intrinsischen Faktoren zählen die Eigenschaften der Membran, die zytoplasmatische Viskosität und die Zellgeometrie[113]. Die viskoelastischen *Eigenschaften der Membran* werden maßgeblich durch die Lipidzusammensetzung und die Struktur des unterhalb der Erythrozytenmembran gelegenen Zytoskeletts beeinflusst. Auch die intraerythrozytäre Konzentration von ATP, Ca^{2+} und der Phosphorylierungsgrad des Spektrins

sind an der Regulierung beteiligt[186]. Die Membranfluidität ist die Fließeigenschaft der Membran in der Phospholipid-Doppelschicht-Ebene. Die Fließeigenschaft wird durch die Lipidperoxidation, die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration und die Mobilität der Membrankomponenten beeinflusst[187]. Die Hauptfunktion der Fluidität der Membran ist die Permeabilität für den Austausch physiologisch relevanter Substanzen. Vermutet wird, dass die Membranfluidität auf die Regulation der Verformbarkeit großen Einfluss nimmt[100]. In diversen Arbeiten konnten Veränderungen der Membraneigenschaften bei kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen werden. Es wurde eine reduzierte Membranfluidität bei Diabetes mellitus[188], bei der Dyslipidämie und der arteriellen Hypertonie[189] gemessen. Diese reduzierte Membranfluidität wurde mit einer veränderten Membranlipidzusammensetzung erklärt[190]. Auch konnte eine durch Glykosylierung erhöhte Membranrigidität nachgewiesen werden[191]. Erhöhte Ca^{2+}-Spiegel im Erythrozyten bei Diabetes mellitus[162], bei der arteriellen Hypertonie[163] und der Dyslipidämie[164] führen zu einer verstärkten Vernetzung des intraerythrozytären Tubulinsystems mit der Folge einer Rigidifizierung der Erythrozyten. Ebenso fehlt der direkte, depolimerisierende Effekt des ATP auf das Tubulinsystem und die Phosphorylierung von Spektrin. Die Phosphorylierung des wichtigsten Strukturproteins der Erythrozytenmembran ist jedoch für das korrekte Zusammenwirken mit den kontraktilen Elementen der Membran für die Flexibilität des Erythrozyten von entscheidender Bedeutung[192]. Die bei kardiovaskulären Krankheiten vermehrt gebildeten ROS wie Peroxynitrit und Wasserstoffperoxid können die Erythrozytenmembran durch Modulierung der Lipid- und Proteinkomponenten schädigen. Es kommt zu einer vermehrten Lipidperoxidation der Erythrozytenmembran, assoziiert mit Veränderungen der Membranfluidität, einer gesteigerten Permeabilität, einer verminderten Aktivität der membrangebundenen Ca^{2+}-ATPase und folglicher Störung der Ca^{2+}-Homöostase[193]. Die Lipidperoxidation bewirkt eine Polymerisation der Membrankomponenten und kann dadurch die Rigidität der Phospholipid-Doppelschicht erhöhen[194]. Es wurde bewiesen, dass oxidativer Stress zu einer Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit führt[195]. Die *zytoplasmatische Viskosität* wird hauptsächlich von der intrazellulären Hämoglobinkonzentration bestimmt. Eine erhöhte intrazelluläre Viskosität bei Diabetes mellitus kann durch glykosyliertes Hämoglobin oder einen veränderten Gehalt organischer Phosphate (Adenosindiphosphat, 2,3-Bisphosphoglycerat) bedingt sein[196]. Die *Zellgeometrie* beeinflusst die Erythrozytenverformbarkeit durch das Verhältnis von Zelloberfläche zu Zellvolumen. Aus der bikonkaven, diskoiden Form des Erythrozyten resultiert ein vorteilhaftes Oberflächen/Volumen-Verhältnis. Das ermöglicht dem Erythrozyten, relativ große Verformungen durch einwirkende Scherkräfte zu tolerieren, ohne dass die Zelle einen Schaden nimmt. Die intakte Oberfläche und ein relativer Überschuss an Oberfläche im Verhältnis zum Zellvolumen sind wichtige

Voraussetzungen für die optimale zelluläre Deformabilität. Eine Minderung des Oberflächen/Volumen-Verhältnisses zum Beispiel durch eine Zunahme des Volumens würde auch eine Verschlechterung der Möglichkeit zur Verformung des Erythrozyten bedeuten[192]. Veränderungen der Zellgeometrie können durch Stoffwechselveränderungen bei Diabetes mellitus verursacht werden. Über eine gesteigerte Aldosereduktase und einen gesteigerten Polyolstoffwechsel kommt es zu einer Sorbitol-Akkumulation im Erythrozyten[197]. Die oben beschriebene reduzierte Aktivität der erythrozytären Natrium/Kalium-ATPase bei Diabetes mellitus, bei der arteriellen Hypertonie und der Dyslipidämie führt auch über eine Zellschwellung zu einer verminderten Verformbarkeit. Hyperosmolarität durch Hyperglykämie kann vorübergehend das Zellvolumen und den MCV erhöhen[198]. Niedrige pH-Werte des Blutes und niedrige Natrium-Konzentrationen bei Diabetes mellitus kommen ebenfalls als Ursache für eine Erhöhung des MCV in Frage[199]. Als *extrinsische Faktoren* können eine erhöhte Plasmaviskosität und eine erhöhte Fibrinogenkonzentration bei Diabetes mellitus die Erythrozytenverformbarkeit verschlechtern[200].

Die Veränderungen der Stoffwechselprozesse in den Erythrozyten und deren Auswirkungen auf die Erythrozytenverformbarkeit werden kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite wiesen Arbeiten mit dem Filtrationsverfahren weder durch Verwendung von Filtern mit 5 µm Porengröße[201;202] noch durch Verwendung von Filtern mit 3 µm Porengröße[203;204] eine reduzierte Verformbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren nach. Dagegen wurde in anderen Arbeiten durch Verwendung von Filtern sowohl mit 5 µm als auch mit 3 µm Porengröße eine reduzierte Verformbarkeit der Erythrozyten von Patienten mit Diabetes mellitus gemessen[196;205]. Für diese Verschlechterung der Filterpassage bei Diabetes mellitus wurde nur eine Subpopulation von älteren Erythrozyten verantwortlich gemacht[206]. Auch bei der Dyslipidämie[207] und der arteriellen Hypertonie[208] wurde eine verminderte Filtrierbarkeit nachgewiesen. Arbeiten, die die Erythrozytenverformbarkeit mit dem Laserdiffraktometer quantifizierten, wiesen ebenfalls eine Verschlechterung der Verformbarkeit bei Diabetes mellitus[99], arterieller Hypertonie[100] und Dyslipidämie[101] nach. Das Laserdiffraktometer misst die scherkraftinduzierte Elongation der Erythrozyten über ein Reflexionssignal eines Laserstrahls[209]. Mit dieser Methode können Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit sehr spezifisch erfasst werden. Eine andere spezifische Methode stellt die direkte mikroskopische Messung der Verformbarkeit unter einem rotierenden, Scherstress-auslösenden Rheoskop dar. Auch mit dieser Methode wurde eine Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen[210].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung des Filtrationsverfahrens eine geringe Verschlechterung der basalen Erythrozytenverformbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren im Vergleich zu gesunden jungen Probanden nachgewiesen (siehe 3.1.5).

Wegen der hohen interindividuellen Varianz ist für den Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds eine höhere Fallzahl notwendig. Im Vergleich zur Messung der Erythrozytenverformbarkeit mit dem Laserdiffraktometer und mit dem Scherstress-auslösenden Rheoskop hat die Verformbarkeitsbestimmung mittels Filtration den entscheidenden Vorteil, dass diese Methode die *in vivo* Situation am ehesten widerspiegelt, indem eine Erythrozytensuspension anstelle von einzelnen Erythrozyten untersucht wird[211]. Die Filtrationsmethode nach Reid et al. (1976) wurde in dieser Arbeit modifiziert: Um die Filtrationsgeschwindigkeit von Erythrozyten gesunder Probanden und von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren besser vergleichen zu können, wurden Membranfilter mit der Porengröße 3 µm anstatt 5 µm verwendet (siehe 2.1.9). Filter mit 3 µm Porengröße sind im Vergleich zu 5 µm Filter sensitiver und können daher minimale Veränderungen der erythrozytären Rheologie detektieren[212]. Zusätzlich wurde durch die Verwendung des niedrigen Hämatokrits von 7 % der Einfluss der Erythrozytenaggregation auf die Verformbarkeit vermindert. Je verdünnter die verwendete Erythrozytensuspension ist, desto geringer ist der Einfluss der Erythrozytenaggregation auf die Filtration[196]. In eigenen Voruntersuchungen mit einer Filterporengröße von 5 µm und einem Hämatokrit von 35 % konnte die Erythrozytensuspension von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren den Filter nicht passieren, während die Erythrozytensuspension gleichen Hämatokrits von Gesunden gut filtriert werden konnte. Bei Verwendung eines Filters mit 3 µm Porengröße und einem Hämatokrit von 7 % wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der Verformbarkeit zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen (siehe 2.1.9). Dies lässt vermuten, dass bei einem Hämatokrit von 35 % die Erythrozytenaggregation einen sehr großen Einfluss auf die Filtration hat. Das könnte die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei der Verwendung eines Hämatokrits von 35 % erklären. Die in der Literatur angegebene Verminderung der Filtrationsrate bei kardiovaskulären Risikofaktoren mit Verwendung von 5 µm Filtern und höheren Hämatokritwerten ist deshalb hinsichtlich der Validität als kritisch zu betrachten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Arbeiten eine Verschlechterung der Filtrationsrate vor allem durch eine erhöhte Aggregationsneigung der Erythrozyten verursacht wurde. Diese ist im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren erhöht[99]. Die pathophysiologische Relevanz dieser in der Literatur angegebenen Verschlechterung *in vitro* für die Erythrozytenverformbarkeit und die Mikrozirkulation *in vivo* ist noch nicht hinreichend untersucht. Driessen et al. (1980) zeigten im Tierversuch eine Verschlechterung der Mikrozirkulation *in vivo* nach Reinfusion von rigiden Erythrozyten[213]. Eine verminderte Dichte perfundierter Kapillare in der Mikrozirkulation *in vivo* bei Patienten mit Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und bei Rauchern wurde mit einer verschlechterten Erythrozytenverformbarkeit in Zusammenhang

gesetzt[214]. Der Einfluss der verminderten Erythrozytenverformbarkeit auf die Mikrozirkulation und die Funktion einzelner Organe ist jedoch unklar.

An der Regulation der Verformbarkeit ist NO beteiligt. Gezeigt wurde, dass exogen hinzugefügtes NO unter physiologischen Bedingungen die Membranfluidität[215] und die Verformbarkeit[88;98;216] von Erythrozyten verbessern kann. Durch welche Prozesse NO an der Verformbarkeit der Erythrozyten beteiligt ist, steht noch nicht fest. Diverse theoretische Modelle diskutieren die Wirkung von NO auf die Regulation der Erythrozytenmembran: In Erythrozyten lässt sich eine Guanylatzyklase nachweisen. Dieses Enzym liegt entweder membrangebunden oder gelöst im Zytoplasma vor. Durch NO kann die lösliche Guanylatzyklase ihre katalytische Aktivität auf das 200fache steigern[217]. Tsuda et al. (2000) haben postuliert, dass NO und cGMP die intrazelluläre Ca^{2+}-Kinetik beeinflussen[100]. Eine andere Theorie beschreibt, dass ein 240 kDa Protein, welches mit einem cGMP-mediierten Kationenkanal assoziiert ist, mit dem Spektrin der Erythrozyten interagieren kann[218]. Die Lokalisation des Proteins in Erythrozyten ist unklar. Das cGMP spielt auch für den Natrium/Wasserstoff-Ionenaustausch eine Rolle[219]. Es ist jedoch nicht bekannt, ob diese Mechanismen für die Erythrozytenverformbarkeit eine Bedeutung haben. Im Gegensatz zu der „cGMP-Theorie“ haben einige Arbeiten gezeigt, dass die Membranregulation unabhängig von dem cGMP-Stoffwechselweg ist. Korbut et al. (2002) erklärten, dass der Effekt von NO auf die Verformbarkeit unabhängig vom cGMP und direkt über einen Ca^{2+}-abhängigen Kaliumkanal stattfindet[220]. Postuliert wird, dass NO Konformationsänderungen der an der Verformbarkeit beteiligten Proteine wie dem Spektrin, Ankyrin und dem Bande-3-Protein bewirkt. NO kann mit oxygeniertem Hämoglobin zu Methämoglobin reagieren. Methämoglobin verändert durch Bindung an das Spektrin die Membranstruktur und reguliert möglicherweise dadurch die Erythrozytenverformbarkeit[221].

Der Einfluss der erythrozytären NO-Synthese auf die Erythrozytenverformbarkeit bei gesunden Probanden wurde in früheren Arbeiten untersucht. Kleinbongard et al. (2006) wiesen mit dem Filtrationsverfahren durch Stimulation der eryNOS mit L-Arginin eine Verbesserung, durch Inhibition eine Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit nach[12]. Bor-Kucukatay et al. (2003) zeigten eine Verschlechterung der Verformbarkeit mit Hilfe des Laserdiffraktometers nach Inhibition der eryNOS. Eine Stimulation durch L-Arginin allein hatte keinen Effekt, hob jedoch eine Verschlechterung der Verformbarkeit durch die Inhibition der eryNOS wieder auf[98].

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss der eryNOS auf die Verformbarkeit bei jungen gesunden Probanden durch Stimulation mit L-Arginin bzw. Inhibition mit L-NIO nachgewiesen werden (siehe 3.1.5). Die zusätzliche Addition eines NO-Fängers (HbO_2) zum L-NIO verhinderte nahezu vollständig den Durchtritt der Erythrozyten durch den Filter und

zeigte die Bedeutung von NO für die Aufrechterhaltung der basalen Verformbarkeit. Das in dieser Arbeit verwendete Versuchsprotokoll war folglich zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit in Abhängigkeit der eryNOS-Aktivität geeignet. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der durch Stimulation oder Inhibition der eryNOS veränderten plasmatischen Nitritkonzentration und der veränderten Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen werden (siehe 3.1.7). Diese positive Korrelation wird in der Literatur bestätigt[126].
Mit Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren wurde in dieser Arbeit eine nicht signifikante, tendenzielle Einschränkung der basalen eryNOS-Aktivität festgestellt. Diese könnte neben den NO-unabhängigen Erythrozytenveränderungen eine Ursache der Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit sein. Eine Steigerung der NO-Synthese könnte vor allem unter diesen pathologischen Bedingungen eine entscheidende Bedeutung zur Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation haben. Zudem verringerte sich in dieser Arbeit tendenziell der stimulative Effekt von L-Arginin auf die Verformbarkeit in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren. Im Zusammenhang mit der biochemisch gemessenen, signifikant verminderten Stimulierbarkeit der eryNOS bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil und der nachgewiesenen engen positiven Korrelation zwischen plasmatischem Nitrit und der Erythrozytenverformbarkeit lässt sich aus diesen Ergebnisse schließen, dass eine verminderte Stimulierbarkeit der eryNOS-Aktivität auch zu einer verminderten Verbesserung der Erythrozytenverformbarkeit führt. Nach Inhibition der eryNOS wurden in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren keine Unterschiede in der reduzierenden Wirkung auf die Erythrozytenverformbarkeit gemessen. Diese Ergebnisse lassen sich mit der gleichermaßen inhibierenden Wirkung von L-NIO auf die eryNOS-Aktivität bei Patienten mit kardiovaskulärem Risikoprofil und bei Gesunden erklären. Dagegen zeigte sich durch Inhibition der endogenen NO-Synthese und gleichzeitiges Abfangen von NO bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren eine geringere Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit im Vergleich zu den gesunden Probanden. Signifikant war der Unterschied nur für die relative Verschlechterung bezogen auf die basale Erythrozytenverformbarkeit. Wie oben beschrieben wurde eine tendenziell verminderte basale eryNOS-Aktivität und Erythrozytenverformbarkeit im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren nachgewiesen. Eine Erklärung für diese Ergebnisse könnte ein generell verminderter regulatorischer Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren sein.
Zusammengefasst folgt aus diesen Ergebnissen, dass bei kardiovaskulären Risikofaktoren eine eingeschränkte Verbesserung der Verformbarkeit nach Simulation der eryNOS vorliegt. Entweder kommt es zu einer reduzierten Freisetzung von bioaktivem NO, oder freigesetztes NO kann seine Wirkung nicht entfalten. Bei Untersuchungen der Wirkung von exogenem NO

auf Erythrozyten konnte *in vitro* durch Verwendung des Filtrationsverfahrens[88;222] und des Laserdiffraktometers[98;220] die Erythrozytenverformbarkeit bei gesunden Probanden verbessert werden. Der Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren wurde ebenfalls untersucht. Tsuda et al. (2000) haben bewiesen, dass exogenes NO die bei der arteriellen Hypertonie herabgesetzte Membranfluidität verbessert. Dabei zeigte sich der Effekt von exogenem NO auf die Membranfluidität bei der arteriellen Hypertonie stärker ausgeprägt als bei Probanden ohne kardiovaskuläres Risikoprofil[100]. Analog dazu zeigten Bor-Kucukatay et al. (2000) mit der Verwendung der Filtrationsmethode, dass die bei der arteriellen Hypertonie herabgesetzte Verformbarkeit durch exogenes NO wieder verbessert werden kann. Dagegen hatte exogenes NO keinen Effekt auf die Verformbarkeit bei Gesunden[102]. Für die verschlechterte Verformbarkeit bei der Dyslipidämie wurde eine Verbesserung durch Hinzufügen von exogenem NO wie auch durch Stimulation der eryNOS durch L-Arginin nachgewiesen. Auch hier hatte zusätzliches NO bei Gesunden keinen Effekt auf die Erythrozytenverformbarkeit[103].

In der vorliegenden Arbeit verbesserte die Inkubation mit einem NO-Donor die Verformbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren in gleichem Ausmaß wie bei gesunden Probanden. Durch Zugabe von NO-abfangendem HbO_2 sank die Flussrate in gleichem Ausmaß wie bei Gesunden (siehe 3.1.6). Diese Ergebnisse zeigen, dass bei kardiovaskulären Risikofaktoren zwar die erythrozytäre NO-Bildung beeinträchtigt, aber die Wirkung von exogenem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit unverändert ist. Dass im Gegensatz zu diesen Ergebnissen in den oben zitierten Arbeiten keine Wirkung von NO bei gesunden Probanden nachgewiesen wurde, könnte mit der angegebenen Verwendung von Sodium-Nitroprussid als NO-Donor in der sehr hohen Konzentration von 10 µmol/l erklärt werden. Der bei kardiovaskulären Krankheiten erhöhte oxidative Stress könnte die vaskuläre und intraerythrozytäre NO-Bioverfügbarkeit verringern und somit die Wirkung von exogenem NO in den in diesen Arbeiten verwendeten hohen Konzentrationen bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren erklären. Bei den gesunden Probanden mit physiologischer NO-Bioverfügbarkeit könnte die verwendete Konzentration von exogenem NO zu hoch gewesen sein, um eine Verbesserung der Verformbarkeit zu bewirken. Zu hohe Konzentrationen von NO im mikromolaren Bereich im Rahmen einer Sepsis sind sogar mit einer Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit verbunden[223]. Dies könnte auf einen biphasischen Einfluss der NO-Menge auf die Funktion und Struktur der Membran hindeuten[224].

Durch die verminderte endotheliale NO-Synthese resultieren bei kardiovaskulären Krankheiten *in vivo* niedrigere vaskuläre NO-Spiegel[225]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Verminderung der Erythrozytenverformbarkeit nach NO-Deletion durch HbO_2 weist auf die

Bedeutung einer verminderten vaskulären NO-Bioverfügbarkeit für die Erythrozyten-verformbarkeit und Mikrozirkulation hin. Die Erythrozytenverformbarkeit könnte folglich durch die Kombination einer verminderten endothelialen und erythrozytären NO-Synthese beeinträchtigt werden. Die pathophysiologische Relevanz der in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesenen eingeschränkten erythrozytären NO-Synthese für die Erythrozyten-verformbarkeit und Mikrozirkulation *in vivo* ist jedoch nicht bekannt. Es ist naheliegend, dass diese Veränderungen an den Störungen der Mikrozirkulation bei kardiovaskulären Krankheiten beteiligt sind.

4.4 Etablierung eines extraembryonalen Mikrozirkulationsmodells

Zur Bestimmung der Erythrozytenverformbarkeit *in vitro* und *in situ* werden zahlreiche experimentelle Methoden verwendet. Mit dem Laserdiffraktometer, der Mikropipettenaspiration und dem in dieser Arbeit verwendeten Filtrationsverfahren kann nur die Erythrozytenverformbarkeit *in vitro* quantifiziert werden. Die Messung der Erythrozytenverformbarkeit ist aber nicht ausreichend, um Aussagen über den Blutfluss in der Mikrozirkulation machen zu können. Die Auswirkungen einer beeinträchtigten Erythrozyten-verformbarkeit auf die Perfusion in der Mikrozirkulation und die klinische Relevanz dieser Messmethoden bleibt ungeklärt[226]. Mit einem artifiziellen, parallel angeordneten Mikrokanal-system konnte in früheren Arbeiten die Verformbarkeit und Geschwindigkeit der Erythrozyten während der Passage durch die Mikrozirkulation direkt mit einer Software gemessen werden[227]. Veränderungen der Verformbarkeit und die Auswirkungen auf den Blutfluss in der Mikrozirkulation wurden mit einer größeren Sensitivität erfasst, jedoch erfasst diese Methode rheologische Parameter nur *in vitro*. Ellis et al. (2005) entwickelten eine Methode, mit der *in situ* im Kapillarsystem eines zuvor separierten Muskels einer Ratte die Rheologie der Erythrozyten in der Mikrozirkulation untersucht werden konnte[228].

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der am Chorion-Allantois-Membransystem des bebrüteten Hühnereies erstmals die Bedeutung von NO auf die Erythrozyten-verformbarkeit und die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation *in vivo* untersucht werden konnte. Das Chorion-Allantois-Membransystem ist ein seit langem und sehr oft eingesetztes Tiermodell in der kardiovaskulären Forschung. Während der frühen Entwicklung eignet es sich besonders gut zum Studium der Hämodynamik des kardiovaskulären Systems[229] und der Entwicklung des zentralen Nervensystems[230]. In späteren Stadien ist es ein attraktives Modell zur Untersuchung der Physiologie des Gasaustausches[231] und der Mechanismen, die an der Entstehung von embryonalen Fehlentwicklungen beteiligt sind[232]. Auch wird es häufig für *in vivo* Studien der Angiogenese benutzt[233].

In dieser Arbeit konnte mit dem Chorion-Allantois-Membransystem als Mikrozirkulationsmodell nicht nur die Erythrozytenverformbarkeit *per se* quantifiziert werden, sondern es ermöglichte auch die direkte Messung des Einflusses einer verminderten Erythrozytenverformbarkeit auf die Perfusion des Kapillarsystems. Es ermöglichte sowohl die quantitative Erfassung von Parametern der Rheologie wie Erythrozytenverformbarkeit und Flussgeschwindigkeit als auch die deskriptive Erfassung der axialen Zellströmung und des Aggregationsverhaltens der Erythrozyten. Ein weiterer Vorteil war darin zu sehen, dass durch die gute Auflösung und lichtmikroskopische Darstellbarkeit des Kapillarsystems und der Erythrozyten eine Färbung der Zellen nicht erforderlich war. Diese Methodik könnte in Zukunft die Reevaluation des Einflusses von bekannten Veränderungen der Zellen und Plasmaeigenschaften ermöglichen, die für Krankheiten der Mikrozirkulation *in vitro* nachgewiesen wurden. Die in dieser Arbeit etablierte Untersuchung mit der verwendeten Software kann auf Untersuchungen an Mikrozirkulationssystemen von Säugetieren übertragen werden. Als Nachteil ist anzusehen, dass Ergebnisse aus Untersuchungen an Hühnern nur eingeschränkt auf Säugetiere übertragbar sind. Hühnererythrozyten besitzen im Gegensatz zu humanen Erythrozyten einen Zellkern. Dieser Zellkern könnte den Vorgang der Verformbarkeit beeinflussen. Jedoch zeigt die Erythrozytenmembran von Hühnern hinsichtlich der Zusammensetzung und Struktur kaum Unterschiede zu der Membran humaner Erythrozyten. Auch sie besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht mit einem Netzwerk aus den Strukturproteinen Spektrin, Aktin, Ankyrin, Adducin, Protein 4.1 und Glykophorin C in im Vergleich zu Menschen äquimolaren Verhältnissen[234;235]. Während sich der Verformbarkeitsprozess von humanen Erythrozyten und Hühnererythrozyten ähnelt, ist die Verformbarkeit der kernhaltigen Hühnererythrozyten geringer[236]. In dieser Arbeit wurden die Versuche an Hühnerembryonen des 7. Entwicklungstages durchgeführt. Dieses Entwicklungsstadium zeigte sich bezüglich des extraembryonalen Gefäßbettes als optimal. Ein Nachteil dieses Entwicklungsstadiums ist, dass neben ausgereiften Erythrozyten noch ein Teil (11,7 %) der embryonalen Erythrozytenstammlinie in der Mikrozirkulation aufzufinden ist (siehe 2.2.1). Embryonale Erythrozytenformen unterscheiden sich in der Membranstruktur von den ausgereiften Formen[237]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese beiden Formen auch in Hinblick auf deren Regulation der Verformbarkeit und deren Verhalten in der Mikrozirkulation unterscheiden.

Im Rahmen der Etablierung eines artifiziellen, parallel angeordneten Mikrokanalsystems verwendeten Shevkoplyas et al. (2005) Glutardialdehyd zur Evaluierung der Sensitivität der Methode[227]. Glutardialdehyd führt zu einer vermehrten Verknüpfung der Membranproteine und verschlechtert dadurch die Erythrozytenverformbarkeit[96;121]. Glutardialdehyd wirkt in gleicherweise auch auf Hühnererythrozyten[238]. Ab einer Inkubation humaner Erythrozyten

mit 0,01 % Glutardialdehyd zeigte sich mit abnehmender Verdünnung des Glutardialdehyds eine lineare Verschlechterung der Verformbarkeit[227]. Im Gegensatz dazu ist bekannt, das Pentoxifyllin die Verformbarkeit humaner Erythrozyten verbessert[239].
In der vorliegenden Arbeit konnten die Erythrozyten nach Injektion von Glutardialdehyd ihre Breite in der Engstelle nur noch eingeschränkt verändern. Diese signifikant eingeschränkte Verformbarkeit führte zu einer Verminderung der Flussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation. Der Kapillardurchmesser veränderte sich nicht, und die unveränderte Flussgeschwindigkeit in den größeren Gefäßen schloss eine generelle kadiodepressive Wirkung des Glutardialdehyds aus. Die Methode des Chorion-Allantois-Membranmodells erfasst eine Verschlechterung der Verformbarkeit von Hühnererythrozyten durch Glutardialdehyd mit einer der Filtrationsmethode und dem Mikrokanalsystem vergleichbaren Sensitivität[227]. Das Modell ist zur Beurteilung der Mikrozirkulation geeignet. Es wurde nachgewiesen, dass eine Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit die Perfusion in der Mikrozirkulation *in vivo* beeinträchtigt. Der fehlende Einfluss von Pentoxifyllin auf die Erythrozytenverformbarkeit in dieser Arbeit könnte durch eine unterschiedliche Wirkung dieser Substanz auf humane Erythrozyten und auf Hühnererythrozyten erklärt werden.

4.5 Einfluss von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit *in vivo*

In der Chorion-Allantois-Membran des Hühnerembryos wurde neben der induzierbaren NOS auch die eNOS-Expression und -Aktivität in der Gefäßwand nachgewiesen[240;241]. In Untersuchungen der pulmonalen Arterien wurde die NO-Bildung durch L-Arginin stimuliert[242]. Eine Inhibition der eNOS erhöhte den Gefäßwiderstand[243]. Somit scheint analog zu den Säugetieren dem endothelial gebildeten NO eine bedeutsame Rolle für die vaskuläre Hämostase zuzukommen. Untersuchungen des L-Arginin-NO-Stoffwechsels am Modell des Hühnereies ermöglichen keine Differenzierung zwischen endothelialer und erythrozytärer NO-Synthese.
Bislang wurde der Einfluss von exogenem und erythrozytär gebildetem NO auf die Erythrozytenverformbarkeit nur durch *in vitro* Untersuchungen nachgewiesen (siehe Kapitel 4.3). In der vorliegenden Arbeit führte die Gabe von exogenem NO *in vivo* zu keiner Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit. Unter physiologischen Bedingungen scheint zusätzliches NO keine Wirkung auf die Mikrozirkulation zu haben. Bei der Verwendung von GSNO als NO-Donor ist zu beachten, dass GSNO unter Lichteinfluss sehr schnell zerfällt. Es kann keine Aussage über die endgültige zirkulierende Konzentration von GSNO in der Mikrozirkulation gemacht werden. Die verwendete Konzentration von 600 nmol/l GSNO könnte für einen messbaren Effekt auf die Erythrozytenverformbarkeit zu gering gewesen sein. Dagegen führte die Injektion von NO-abfangendem HbO_2 in dieser Arbeit zu einer

signifikanten Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit und zu einer signifikant verminderten Flussgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation. Die unveränderte Flussgeschwindigkeit in den größeren Gefäßen schloss eine generelle kardiodepressive Wirkung des HbO_2 aus. Die Bedeutung von NO für die Aufrechterhaltung der basalen Erythrozytenverformbarkeit und die Mikrozirkulation wurde erstmals *in vivo* nachgewiesen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer endogenen NO-Synthese auf die Erythrozytenverformbarkeit untersucht. Die Stimulation der NOS mit L-Arginin bewirkte keine Unterschiede in der Verformbarkeit und Mikrozirkulation. Zur Erklärung dieser Ergebnisse können zwei Vermutungen aufgestellt werden: Entweder hat die Substitution von L-Arginin unter physiologischen Bedingungen keine Wirkung auf die Aktivität der NOS und NO wird nicht vermehrt gebildet. Oder die NOS wird durch L-Arginin zu einer vermehrten NO-Bildung stimuliert, dieses zusätzliche NO hat aber unter physiologischen Bedingungen keine weitere Wirkung auf die Erythrozytenverformbarkeit. Letzteres würde auch die fehlende Wirkung einer Substitution von GSNO erklären. Die Inhibition der NOS durch L-NIO verschlechterte die Erythrozytenverformbarkeit. Es wurde eine verminderte Flussgeschwindigkeit in der Kapillare gemessen. Dies zeigt eine Abhängigkeit der Erythrozytenverformbarkeit von dem endogen gebildeten NO. Es kann jedoch nicht zwischen endothelialer und erythrozytärer NO-Synthese differenziert werden. Um zu untersuchen, ob die eingeschränkte Verformbarkeit nach Inhibition der NOS durch exogen hinzugefügtes NO reversibel ist, wurde nach Injektion von L-NIO zusätzlich GSNO in das Mikrozirkulationssystem desselben Eies appliziert. Die eingeschränkte Verformbarkeit und verminderte Flussgeschwindigkeit konnte durch exogenes NO jedoch nicht wieder verbessert werden. Auch hier könnte die verwendete Konzentration von GSNO für einen messbaren Effekt auf die Erythrozytenverformbarkeit zu gering gewesen sein. Es ist auch vorstellbar, dass der Mangel an NO durch die Inhibition der NOS zu Strukturveränderungen der Membran führte, die durch zusätzlich hinzugefügtes exogenes NO nicht mehr, oder zumindest nur in einer langsameren Kinetik reversibel waren. Eine andere Erklärung wäre, dass endogen gebildetes und exogenes NO die Verformbarkeit über zwei unterschiedliche Mechanismen regulieren.

Die verminderte kapilläre Flussgeschwindigkeit nach NO-Deletion oder Inhibition der NOS wurde vermutlich nicht nur durch eine Verschlechterung der Erythrozytenverformbarkeit verursacht. Es ist denkbar, dass analog zum Menschen auch die Aggregation von Erythrozyten und Thrombozyten beeinflusst wurde. Eine mögliche Fehlerquelle der Messungen konnte eine NO-abhängige Gefäßdilatation sein. Die Beeinflussung des L-Arginin-NO-Metabolismus in dieser Arbeit hätte auch den Gefäßdurchmesser verändern und die Messergebnisse beeinflussen können. Das Chorion-Allantois-Membransystem wurde als Mikrozirkulationsmodell gewählt, da die Wand der Gefäße der Mikrozirkulation in diesem

Entwicklungsstadium des Hühnerembryos aus mesenchymalen Zellen besteht und Muskelzellen nicht nachgewiesen wurden[117]. Dunn et al. (2005) konnten durch extravasales Hinzufügen eines NO-Donors in die Chorion-Allantois-Membran von Hühnerembryonen keine Wirkung von NO auf den Gefäßdurchmesser nachweisen. Die Mikrozirkulation blieb unverändert[244]. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen vor und nach Injektion jeder Substanz wiesen keine Veränderung des Gefäßdurchmessers nach. Ein Einfluss von NO auf den Gefäßdurchmesser kann deshalb ausgeschlossen werden. Veränderungen der Mikrozirkulation wurden demnach durch eine Beeinflussung der Blutzelleigenschaften verursacht.

Ungeachtet dessen könnten die Messergebnisse durch Veränderungen der Glykokalix beeinflusst worden sein. Die Glykokalix ist eine Schicht negativ geladener, glykosylierter Makromoleküle und kleidet die innere Oberfläche der Kapillare aus. Sie bildet eine poröse 0,4-0,5 µm dicke Schicht, die Penetrationen durch Erythrozyten widersteht[245]. Die Glykokalix verzögert die Plasmabewegung in der Zone an der Kapillarwand, und beeinflusst infolgedessen über ihre Dicke und Resistenz den Hämatokrit (Fahraeus Effekt) und Flusswiderstand in den Kapillaren[246]. Dies führt zu einem im Vergleich zum systemischen Hämatokrit niedrigeren Hämatokrit im Kapillarsystem[247]. Der Flusswiderstand erhöht sich, da die Glykokalix den effektiven Gefäßdurchmesser für den Fluss der Erythrozyten vermindert[248]. Eine experimentelle Verbreiterung der Glykokalix führte aber zu keiner messbaren Veränderung des anatomischen Kapillardurchmessers, da Veränderungen der Glykokalix lichtmikroskopisch nicht darstellbar sind[249]. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der effektive Durchmesser durch eine Verbeiterung oder Verschmälerung der Glykokalix veränderte. Dies könnte die Messergebnisse der Erythrozytenverformbarkeit und Flussgeschwindigkeit beeinflusst haben. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine Verbreiterung der Glykokalix über eine Verlängerung der Diffusionsstrecke zu einer Abnahme des endothelial gebildeten NO im Gefäßlumen führt[250]. Dies könnte ebenfalls die Erythrozytenverformbarkeit beeinflussen.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Erythrotytenverformbarkeit auf die Mikrozirkulation *in vivo* gezeigt. Es konnte erstmals *in vivo* die Bedeutung von NO für die Aufrechterhaltung der Erythrozytenverformbarkeit und den Fluss in der Mikrozirkulation nachgewiesen werden. Darüber hinaus führte zusätzliches NO aber zu keiner weiteren Verbesserung der Verformbarkeit *in vivo*. Überträgt man diese Ergebnisse auf den humanen Organismus, werden die Auswirkung einer verminderten vaskulären NO-Bioverfügbarkeit bei kardiovaskulären Krankheiten für die Erythrozytenverformbarkeit und Mikrozirkulation deutlich. Dass hierbei auch eine eingeschränkte erythrozytäre NO-Synthese beteiligt ist, wurde im ersten Teil dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen.

4.6 Ausblick

Bisher wurden pathologische Mikrozirkulationsstörungen bei kardiovaskulären Krankheiten zum Teil auf die verminderte Verfügbarkeit endothelial gebildeten NO und die dadurch entstehende Reduzierung der Erythrozytenverformbarkeit zurückgeführt[251]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch eine verminderte erythrozytäre NO-Bildung beteiligt ist. Somit kann auch die erythrozytäre NO-Bildung keine bedeutende Funktion in der Aufrechterhaltung der Homöostase bei kardiovaskulären Krankheiten übernehmen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend kann der Einfluss von plasmatischem ADMA, des L-Arginintransportes in die Erythrozyten und des oxidativen Stresses auf die erythrozytäre NO-Synthese bei kardiovaskulären Krankheiten weiter untersucht werden. Sollten sich in weiteren Untersuchungen die oben genannten Ergebnisse zur Bedeutung der erythrozytären NO-Synthese *in vivo* bestätigen, könnte dies einen neuen Therapieansatz für kardiovaskuläre Krankheiten bedeuten. Da die Synthese und der Abbau von NO innerhalb der Erythrozyten die basale Erythrozytenverformbarkeit beeinflussen, könnten Mikrozirkulationsstörungen durch eine Steigerung der NO-Synthese im Erythrozyten ausgeglichen werden. Dies könnte entscheidend die Behandlung vaskulärer Krankheiten verbessern. Ein Ansatz zur Verbesserung der erythrozytären Funktion wäre die therapeutische Substitution des NO. Bei Gefäßerkrankungen konnte schon in der Vergangenheit die Relevanz von NO-Donatoren wie Nitrate oder Nitroglycerin in der Therapie der endothelialen Dysfunktion gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Wirkung von NO auf die Erythrozytenverformbarkeit bei kardiovaskulären Risikofaktoren nicht eingeschränkt ist. Somit könnte eine Substitution von NO auch die erythrozytäre Funktion verbessern. Die kausale Therapie der Arteriosklerose besteht hauptsächlich aus einer Reduktion der kardiovaskulären Risikofaktoren. Dies verbessert sicherlich auch die erythrozytäre Funktion. Insbesondere eine Beeinflussung des ADMA-Spiegels, der erythrozytären Arginaseaktivität und des oxidativen Stresses könnte zu einer Verbesserung der erythrozytären Dysfunktion beitragen und in das Therapiekonzept kardiovaskulärer Krankheiten integriert werden.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen von Herzkreislauferkrankungen führen Veränderungen des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges zu einer endothelialen Dysfunktion mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO. Neben Endothelzellen besitzen im vaskulären System auch Erythrozyten eine NOS. Die NO-Synthese der eryNOS wird über ähnliche Mechanismen wie die eNOS reguliert und beeinflusst die Erythrozytenverformbarkeit.
Unbekannt war, ob bei kardiovaskulären Krankheiten die Aktivität der eryNOS verändert ist und diese Veränderung an einer verschlechterten Erythrozytenverformbarkeit beteiligt ist. Da ein Einfluss von NO auf die Mikrozirkulation bislang nur *in vitro* nachgewiesen wurde, sollte zudem in dieser Arbeit eine *in vivo*-Methode für den Nachweis diesen Einflusses etabliert werden.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
(1.) Die erythrozytäre NO-Synthese ist bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren weniger stimulierbar.
(2.) Eine Ursache könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Aktivität der erythrozytären Arginase bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren sein. In der Regulation der eryNOS-Aktivität über die Phosphorylierung an Serin 1177 wurde kein Unterschied nachgewiesen.
(3.) Im Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren konnte eine tendenzielle Verschlechterung der basalen Erythrozytenverformbarkeit nachgewiesen werden. Die Verformbarkeit ließ sich in Abhängigkeit der eryNOS-Aktivität bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren nur eingeschränkt verbessern.
(4.) Es wurde das Mikrozirkulationsmodell des Chorion-Allantois-Membransystems von Hühnerembryonen etabliert, mit dem *in vivo* in Abhängigkeit von NO die Erythrozyten-verformbarkeit und die Perfusion des Kapillarsystems untersucht werden konnte. Durch Abfangen von NO sowie durch Inhibition der NO-Synthese war die Erythrozyten-verformbarkeit vermindert und die Perfusion in der Mikrozirkulation gestört.

Bei kardiovaskulären Krankheiten scheint analog zum endothelialen auch der erythrozytäre L-Arginin-NO-Stoffwechselweg beeinträchtigt zu sein. Die veränderte erythrozytäre NO-Synthese könnte für Mikrozirkulationsstörungen relevant sein. Die Auswirkung einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit auf die Mikrozirkulation wurde anhand eines etablierten *in vivo*-Mikrozirkulationsmodells nachgewiesen. Diese Untersuchungen können Grundlage für eine Verbesserung der erythrozytären NO-Bildung als therapeutischen Ansatz in der Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten sein.

Literaturverzeichnis

[1] Braunwald E: Shattuck lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337:1360-1369

[2] McCartey MF: Haemostatic concomitants of syndrome X. *Med Hypotheses* 1994; 44:179-193

[3] Li H, Förstermann U: Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190:244-254

[4] Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA: Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:567-574

[5] Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd: Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation* 1995; 91:1732-1738

[6] Stroes ES, Koomans HA, deBruin TW, Rabelink TJ: Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995; 346:467-471

[7] Kugiyama K, Yasue H, Ohgushi M, Motoyama T, Kawano H, Inobe Y, Hirashima O, Sugiyama S: Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1161-1167

[8] Chauhan A, More RS, Mullins PA, Taylor G, Petch MC, Schofield PM: Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1796-1804

[9] Cai H, Harrison DG: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87:840-844

[10] Gimbrone MA Jr: Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1995; 75:67-70

[11] Ross R: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126

[12] Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Oezueyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Bloch W, Rosen P, Kelm M: Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 2006; 2005-2010

[13] Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012

[14] Gardner PR, Gardner AM, Martin LA, Salzman AL: Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:10378-10383

[15] Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncasa S: Constitutive and inducible nitric oxide synthases in corporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991; 26:23790-23795

[16] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-615

[17] Busse R, Fleming I: Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 1995; 27:331-340

[18] Nathan C, Xie Q: Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915-918

[19] Ghafourifar P, Richter C: Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 418:291-296

[20] Palmer RM, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666

[21] White MF, Christensen HN: The two way flux of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is largely explained by a single transport system. *J Biol Chem* 1982; 257:4450-4457

[22] Devés R, Boyd CAR: Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998; 78:487-545

[23] Mann GE, Yudilevich DL, Sobrevia L: Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2003; 83:183-252

[24] McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS: A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997; 272:31213-31216

[25] Brunini TMC, Francischetti EA, Ellory JC, Mann GE, Yaqoob MM, Mmendes Ribeiro AC: Elevated nitric oxide in uraemic platelets is dependent on L-arginine transport. *J Physiol* 2001; 531-533

[26] Hardy TA, May JM: Coordinate regulation of L-arginine uptake and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:121-132

[27] Ogonowski AA, Kaesemeyer WH, Jin L, Ganapathy V, Leibach FH, Caldwell RW: Effects of NO donors and synthase agonists on endothelial cell uptake of L-arginine and superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:136-143

[28] Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM: Impaired L-Arginine transport and enthothelial function in hypertensive and genetically predisposed normootensive subjects. *Circulation* 2004; 110:3680-3686

[29] Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ: Arginase activity in endothelial cells: Inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. *Am J Physiol* 1996; 271:1988-1998

[30] Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato P, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R: Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:515-523

[31] Berkowitz DE, White R, Li, D, Minhas KM: Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation* 2003; 108:2000-2006

[32] Bivalacqua TJ, Hellstrom JG, Kadowitz PJ, Hunter C: Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283:923-927

[33] Sahach VF, Baziliuk OV, Kotsiuruba AV, Buzhanevich OM: Disorders of endothelium-dependent vascular reactions and of the arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in arterial hypertension. *Fiziol Zh* 2000; 46:3-13

[34] Zhang C, Hein TW, WangW, Chang CI, Kuo L: Constitutive expression of arginase in microvascular endothelial cells counteracts nitric oxide mediated vasodilatory function. *FASEB J* 2001; 15:1264-1266

[35] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Endogenous as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 [Suppl12]:60-62

[36] McDermott JR: Studies on the catabolism of Ng-methylarginine, Ng, N gdimethylargininen and Ng, Ng-dimethylarginine in the rabbit. *Biochem J* 1976; 154:179-184

[37] Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2032–2037

[38] Leiper J, Vallance P: Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999; 43:542-548

[39] Kang ES, Cates TB, Harper DN: An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells. *Free Radic Res* 2001; 35:693-707

[40] Tojo A, Welch WJ, Bremer V, Kimoto M, Kimura K, Omata M, Ogawa T, Vallance P, Wilcox CS: Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int* 1997; 52:1593-1601

[41] Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boger R, Bode-Boeger S, Froelich J: Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 33,652-658

[42] Xiong Y, Fu YF, Zhou HH: Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42:19196

[43] Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T: Endogenous nitric oxide synthase inhibitor. A novel marker of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:1141-1146

[44] Boger R, Bode-Boger S, Szuba A, Tsao P, Chan J, Tangphao O, Blaschke T, Cooke J: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98:1842-1847

[45] Kurose I, Wolf R, Grisham MB: Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol* 1995; 268:2224-2231

[46] Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G: Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 1999; 397:259-263

[47] Abu-Soud HM, Stuehr DJ: Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10769-10772

[48] Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE: AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 1999; 443: 285-289

[49] Dimmeler S, Flemming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399:601-605

[50] Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S., Kemp BE, Busse R: Phosphorylation of Thr^{495} regulates Ca^{2+}/Calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001; 88:68-75

[51] Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M: Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 2001; 108:1341-1348

[52] Sasser JM, Sullivan JC, Elmarakby AA, Kemp BE, Pollock DM, Pollock JS: Reduced NOS 3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 43:1080-1085

[53] Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL: Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis. *J Sex Med* 2005; 2(3):347-357

[54] Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG: Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: Implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2001;103:1282-1288

[55] Heslop RB, Jones K: Inorganic chemistry. *Elsevier* 1976, Amsterdam

[56] Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M: Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(22):12814-12819

[57] Grau M, Hendgen-Cotta UB, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P: Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;851(1-2):106-23.

[58] Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M: Evidence for in vivo transport of bioaktive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest* 2002; 109:1241-1248

[59] Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J: Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitrose adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7674-767

[60] Gladwin MT, Lancaster JR, Freeman BA, Schechter AN: Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 2003; 9:496-500

[61] Lancaster M jr: A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997; 1:18-30

[62] Kelm M: Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1411:273-289

[63] Kelm M, Yoshida K, Feelisch M, Stamler J: Metabolic fate of nitric oxide and related N-oxides. Methods in nitric oxide research. *John Wiley & Sons Ltd* 1996; Chichester

[64] Gross SS, Lane P: Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999*;* 96:9967-9969

[65] Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS: S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380:221-226

[66] Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS: Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 2001; 409:622-626

[67] Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL: Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry (Mosc)* 2003; 42:1150-1159

[68] Gow AJ, Stamler JS: Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 2001; 391:169-173

[69] Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL: Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 357:1-7

[70] Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO, Gladwin MT: Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003; 9:1498-1505

[71] Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91:31-38

[72] Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney jr JF: Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337:408-416

[73] Chen LY, Mehta JL: Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32:57-61

[74] Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N, Gogas J: Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Res* 1995; 15:1435-1446

[75] Bhattacharya S, Patra SC, Roy SB, Kahn NN, Sinha AK: Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes. *Arch Physiol Biochem* 2001; 109:441-449

[76] Snyder SH, Bredt DS: Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 1992; 266(5):68-77

[77] Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-2018

[78] Griendling K, Alexander RW: Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 1996; 10:283-292

[79] Toborek M, Kaiser S: Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999; 94:295-314

[80] De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96:60-68

[81] He P, Zeng M, Curry FE: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on basal microvessel permeability and endothelial cell [Ca2+]. *Am J Physiol* 1997; 273:747-755

[82] Janssens S, Flaherty D, Nong Z, Varenne O, van Pelt N, Haustermans C, Zoldhelyi P, Gerard R, Collen D: Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998; 97:1274-1281

[83] Chien S: Filterability and other methods of approaching red cell deformability. Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 156:7-12

[84] Radomski MW, Palmer RMJ: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 1987; 2:1057-1058

[85] Radomski WM, Rees DD, Dutra A, Moncada S: S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1992; 107:745-749

[86] Cha YJ, Chang EA, Kim CH: Effects of endothelial cell and mononuclear leukocytes on platelet aggregation. *Haematologia* 2000; 30:97-106

[87] Alt E, Amann-Vesti BR, Madl C, Funk G, Koppensteiner R: Platelet aggregation and blood rheology in severe sepsis/septic shock: relation to the sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30:107-115

[88] Starzyk D, Korbut R, Gryglewski RJ: Effects of NO and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells on rats ex vivo and in vitro. *J Phys Pharm* 1999; 50:629-637

[89] Schmid-Schonbein H, Rieger H, Gallasch G, Schachtner H: Pathological red cell aggregation (clump aggregation). Molecular and electrochemical factors. *Bibl Anat* 1977; 484-489

[90] MacRury SM, Lennie SE, McColl P, Balendra R, MacCuish AC, Lowe GD: Increased red cell aggregation in diabetes mellitus: association with cardiovascular risk factors. *Diabet Med* 1993; 10:21-26

[91] Elishkevitz K, Fusman R, Koffler M, Shapira I: Rheologial determinants of red blood cell aggregation in diabetic patients in relation to their metabolic control. *Diabet Med* 2001; 19:152-156

[92] Rogers ME, Williams DT, Niththyananthan R, Rampling MW, Heslop KE, Johnston DG: Decrease in erythrocyte glycophorin sialic acid content is associated with increased erythrocyte aggregation in human diabetes. *Clin Sci Colch* 1992; 82:309-313

[93] Gregory TR: Nucleotypic effects without nuclei: genome size and erythrocyte size in mammals. *Genome* 2000; 43:895-901

[94] Chien S: Red cell deformability and its relevance to blood flow. *Annu Rev Physiol* 1987; 49:177-192

[95] Lee JCM, Wong DT, Discher DE: Direct measurement of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton. *Biophys J* 1999; 77:853-864

[96] Van Dort HM, Knowles DW, Chasis JA, Lee G, Mohandas N, Low PS: Analysis of integral membrane protein contributions to the deformability and stability of the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 2001; 276:46968-46974

[97] Dorrance AM, Graham D, Dominiczak A, Fraser R: Inhibition of nitric oxide synthesis increases erythrocyte membrane fluidity and unsaturated fatty acid content. *Am J Hypertens* 2000; 13:1194-1202

[98] Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK: Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284:1577-1584

[99] Babu N, Singh M: Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes. *Clin Hemorheol micocirc* 2004; 31(4):273-280

[100] Tsuda K, Kimura K, Nishio I, Masuyama Y: Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275:946-954

[101] Riquelme B, Foresto P, D'Arrigo M, Filippini F, Valverde J: Laser diffractometry technique: clinical applications to vascular pathologies. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35(1-2):277-281

[102] Bor-Kucukatay M, Yalcin Ö, Kipmen-Korgun D, Yesilkaya A, Baykal A, Ispir M, Senturk UK, Kaputlu I, Baskurt OK: Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 22:267-275

[103] Kuwai T, Hayashi J: Nitric oxide pathway activation and impaired red blood cell deformability with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Throm* 2006; 13:286-294

[104] Feelisch M, Kubitzek D, Werringloer J: The oxyhemoglobin assay. In: Methods in nitric oxide research. Feelisch M, Stamler JS. *John Wiley & Sons Ltd* 1996, Chichester

[105] Joint National Committee on Detection EaToHBP. The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, and treatment of high blood pressure (JNC VI). *Arch Intern Med* 1997;157:2413-2446

[106] Chalmers J. WHO-ISH Hypertension Guidelines Committee. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. *J Hypertens* 1999; 17:151-185

[107] Definition, diagnosis and classification of Diabetes mellitus and its complications - Report of a WHO Consultation-Part 1: Diagnosis and classification of Diabetes melltus. *WHO Offset Publication* 1999

[108] Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20:118

[109] Reid HL, Barnes AJ, Lock PJ, Dormandy JA, Dormandy TL: A simple methode for measuring erythrocyte deformability. *J Clin Pathol* 1976; 29:855-858

[110] Chien S, Schmalzer EA, Lee MML, Impeluso T, Skalak R: Role of the white blood cells in filtration of blood cell suspension. *Biorheology* 1983; 20:11-27

[111] Drummond MM, Lowe GD, Belch JJ, Barbenel JC, Forbes CD: An assessment of red cell deformability using a simple filtration method. *J Clin Pathol* 1980; 33:373-376

[112] Kikuchi Y: Transient increase in deformability of stressed red blood cells and role of plasma proteins. *Jpn J Physiol* 1992; 42:441-443

[113] Chien S: Determinants of blood viscosity and red cell deformability. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41:7-12

[114] Stuart J, Stone PCW, Bareford D, Caldwell NM, Davies JE, Baar S: Evaluation of leucocyte removal methods for studies of erythrocyte deformability. *Clin Hemorheol* 1985; 5:137-147

[115] Stuart J, Stone PCW, Bareford D, Bilto YY: Effect of pore diameter and cell volume on erythrocyte filterability. *Clin Hemorheol* 1985; 5:449-461

[116] Rosenbruch M: Zur Sensitivität des Embryos im bebrüteten Hühnerei. *Altek* 1994; 11(4):189-244

[117] Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Burri PH, Djonov V: Chorioallantoic membrane capilllary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat rec* 2001; 264:317-324

[118] Van Golde J, Mulder T, van Straaten H, Blanco CE: The chorioallantoic artery blood flow of the chick embryo from stage 34 to 43. *Pediatr Res* 1996; 40:867-871

[119] Romanoff AL: The Avian Embryo. *The Macmillan Company* 1960, New York

[120] Freeman BM, Vinde MA: Development of the avian embryo. A behavioural and physiological study. *Chapman and Hall* 1974, London

[121] Arevalo F, Bellelli A, Brancaccio A, Ippoliti R, Lendaro E, Brunori M: Biochemical and rheodynamic properties of red blood cells crosslinked with glutaraldehyde. *Biotechnol Appl Biochem* 1992; 16:195-200

[122] Vallance P: Direct measurement of nitric oxide in human beings. *Lancet* 1995; 345:153-154

[123] Carvalho FA, Martins-Silva J, Saldanha C: Amperometric measurements of nitric oxide in erythrocytes. *Biosens Bioelectron* 2004; 20(3):505-8

[124] Cicinelli E, Ignarro LJ, Schonauer LM, Matteo MG, Galantino P, Falco N: Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood. *Clin Physiol* 1999; 19:440-442

[125] Tprakci M, Ozmen D, Mutaf I, Turgan N, Parildar Z, Habif S, Guner I, Bayindir O: Age associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. *Int J Clin Lab Res* 2001; 30:83-85

[126] Ludolph B, Bloch W, Kelm M, Schulz R, Kleinbongard P: Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3(6) 1–5

[127] Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P, Balzer J, Zotz RB, Scharf R, Willers R, Schechter A, Feelisch M, Kelm M: Plasma nitrite concentration reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:295-302

[128] Sinha A, Bhattacharya AS, Guha SC, Ray U, Khan SB, Chakraborty K: Neutralization by ''antineoplastin'' of insulin-activated nitric oxide synthase antibody and its effects in cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; 128:659-668

[129] Yilmaz A, Uslu C and Akyuz M: Nitric oxide synthase activity and nitric oxide level in erythrocytes of guinea pigs with experimental otitis media with effusion. *Cell Biochem Funct* 2006; 24:471-473

[130] Arnal JF, Munzel T, Venema RC: Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest* 1995; 95:2565-2572

[131] Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC: Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000; 478:1-3

[132] Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD: L-arginine. *Biomed Pharmacother* 2002; 56:439-445

[133] Divino Filho JC, Hazel SJ, Fürst P, Bergström J, Hall K: Glutamate concentration in plasma, erythrocyte and muskle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis. *J Endocrinol* 1998; 156:519-527

[134] Schlaich MP, Ahlers BA, Parnell MM, Kaye DM: Beta-Adrenoceptor-mediated, nitric-oxide-dependent vasodilatation is abnormal in early hypertension: Restoration by l-arginine. *J Hypertens* 2004; 22:1917-1925

[135] Pieper GM, Peltier B: Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/ nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 25:397-403

[136] Cooke JP, Andon NA, Girerd XJ, Hirsch AT, Creager MA: Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation* 1991; 83:1057-1062

[137] Chauhan A, More RS, Mullins PA, TaylorG, Petch MC, Schofield PM: Aging-associated endothelial dysfunction in humans is reversed by L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:1796-1804

[138] Grill V, Bjorkman O, Gutniak M, Lindquist M: Brain uptake and release of amni acids in nondiabetic and insulin-dependent diabetic subjects: important role of glutamine release for nitrogen balance. *Metabolism* 1992; 41:28-32

[139] Moss MB, Brunini T, Soares de Moura R: Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci* 2004; 107:391-397

[140] Huynh NN, Chin-Dusting J: Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:1-8

[141] Johnson FK, Johnson RA, Peyton KJ, Durante W: Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:1057-62

[142] Jiang M, Jia L, Jiang W, Hu X: Protein disregulation in red blood cell membranes of type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309:196-200

[143] Devés R, Boyd CAR: Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 1998; 78:487-545

[144] Wu G, Meininger CJ: Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat. *Am J Physiol* 1995; 269:1312-1318

[145] Ahlers BA, Parnell MM, Chin-Dusting JP, Kaye DM: An age-related decline in endothelial function is not associated with alterations in L-arginine transport in humans. *J Hypertens* 2004; 22(2):321-327

[146] Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL and Mann GE: Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol* 1996; 490:775-781

[147] Hendry BM: Membrane transport in uraemia. *Adv Renal Med* 1992; 23:16-23

[148] Yin QF, Fu SH, He P, Xiong Y: Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: Effects of aminoguanidine. *Atherosclerosis* 2007; 190(1):53-61

[149] Ito A, Tsao PS, Adimoolam, KimotoM, Ogawa T, Cooke JP: Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99:3092-3095

[150] Lin KJ, Ito A, Asagami T, Tsao PS: Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106:987-992

[151] Tsuda K, Nishio I: An association between plasma asymmetric dimethylarginine and membrane fluidity of erythrocytes in hypertensive and normotensive men: an electron paramagnetic resonance investigation. *A J H* 2005;18:1243-1248

[152] Yang ZC, Xia K, Wang L, Jia SJ, Li D, Zhang Z, Deng S, Zhang XH, Deng HW, Li YJ: Asymmetric dimethylarginine reduced erythrocyte deformability in streptozotocin-induced diabetic rats. *Microvasc Res* 2007; 73:131-136

[153]Xu B, JI Y, Yao K, Cao JX, Ferro A: Inhibition of human endothelial cell nitric oxide synthesis by advanced glycation end-products but not glucose: relevance to diabetes. *Clin Science* 2005; 109:439-446

[154] Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM Jr, Randhawa JK, Rumbaut RE, Durante W, Schafer AI, Yang X, Wang H: Hyperhomocystinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:2515-25211

[155] Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Hollad SM, Mitch WE, Harrison DG: Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111:1201-1209

[156] Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA Jr: Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9220–9225

[157] Klatt P, Schmidt K, Uray G, Mayer B: Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 268:14781-14787

[158] Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P, Wolin MS, Stemerman MB: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995; 77:510-518

[159] Honing ML, Morrison PJ, Banga JD, Stroes ES, Rabelink TJ: Nitric oxide availability in diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14(3):241-249

[160] Pieper GM: Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29:8-15

[161] Stroes E, Kastelein J, Cosentino F: Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997; 99:41-46

[162] González Flecha, FL, Bermúdez MC, Cédola NV, Gagliardino JJ and Rossi JPFC: Decreased Ca^{2+}-ATPase activity after glycosylation of erythrocyte membranes in vivo and in vitro. *Diabetes* 1990; 39:707-711

[163] Caimi G, Contorno A, Serra A, Catania A, Presti RL, Sarno A, Gerasola G: Red cell metabolic parameters and rheological determinants in essential hypertension. *Clin Hemorheol* 1993; 13:35-44

[164] Konukoglu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi H: Relation of erythrocyte Na^{+}-K^{+} ATPase activity and cholesterol and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 2003; 26(6):279-284

[165] Carafoli E: Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res Cardiol* 1997; 92:59-61

[166] Giugliano D, Pasolisso G, Ceriello A: Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19:257-267

[167] Heitzer T, Wenzel U, Hink U: Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 1999; 55:252-260

[168] Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R: Kinetics of cytochrome c^{2+} oxidation by peroxynitrite: Implications of superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319:491-497

[169] Simic D, Perunicic J, Lasica R, Ivanovic B: Plasma and red blood cell superoxide dismutase activity in patients with different stages of essential hypertension. *Med Arch* 2005; 59(3):156-159

[170] Bhatia S, Shukla R, Venkata Madhu S, Kaur Gambhir J, Madhava Prabhu K: Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 2003; 36(7):557-62

[171] Ashour M, Salem S, Hassaneen H: Antioxidant status and IDMM. *J Clin Biochem Nutr* 1999; 26:99-107

[172] Atli T, Keven K, Avci A: Oxidative stress and antioxidant status in elderly diabetes mellitus and glucose intolerance patients. *Arch Gerontol Geriatr* 2004; 39(3):269-75

[173] Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG: Modulation of expression of endothelial nitric oxide synthase by nordihydroguaiaretic acid, a phenolic antioxidant in cultured endothelial cells. *Mol Pharmacol* 1999; 56:116-123

[174] Ting HH, Timimi FK, Boles KS: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilatation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97:22-28

[175] Heitzer T, Just H, Münzel T: Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996; 94:6-9

[176] Ting HH, Timimi FK, Haley EA, RoddyM-A, Ganz P, Creager MA: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95:2617-2622

[177] Hornig B, Arakawa N, Kohler C, Drexler H: Vitamin C improves endothelial function of conduit arteries inpatients with chronic heart failure. *Circulation* 1998; 97: 363-368

[178] Marchioli R: Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data. *Pharmacol Res* 1999; 149:168-176

[179] Giulini C, Hochstein P, Davies KJA: Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Rad Biol Med* 1994; 16:123-129

[180] Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V: Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996; 13:715–719

[181] Turi S, Friedman A, Bereczki C, Papp F, Kovacs J, Karg E, Nemeth I: Oxidative stress in juvenile essential hypertension. *Hypertension* 2003; 21:145–152

[182] Olusi SO: Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotectic enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:1159-64

[183] De Mattia G, Bravi MC, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, Armiento A, Ferri C, Balsano F: Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998; 47:993-997

[184] Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sonksen PH: Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1996; 91(5):575-582

[185] James PE, Lang D, Tufnell-Barret T, Milson A, Frenneaux M: Vasorelaxation by red blood cells and impairment in diabetes: reduced nitric oxide and oxygen delivery by glycated hemoglobin. *Circ Res* 2004; 94:976-983

[186] Legge DG, Shortman K: Effect on pH on the volume, density and shape of erythrocytes and thymic lymphocytes. *Br J Haematol* 1968; 14:323-335

[187] Hollan S: Membrane fluidity of blood cells. *Haematologia (Budap)* 1996; 27:109-127

[188] Kamada T, McMillan DE, Yamashita T, Otsuji S: Lowered membrane fluidity of younger erythrocytes in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1992; 16(1):1-6

[189] Tsuda K, Tsuda S, Minatogawa Y, Iwahashi H, Kido R, Masuyama Y: Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultured vascular smooth cells in spontaneously hypertensive rats: an electronic spin resonjance study. *Clin Sci* 1988; 75:477-480

[190] Cignarelli M, Damato A, Cospite MR, Guastamacchia E, Nardelli GM, Giorgino R: Erythrocyte cholesterol and red blood cells deformability in diabetes mellitus. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1982; 58(17):1115-1118

[191] Maeda N, Kon K, Imaizumi K, Sekiya M, Shiga T: Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1983; 735(1):104-112

[192] Mohandas N, Chasis JA: Red blood cell deformability, membrane material properties and shape: regulation by transmembrane, skeletal and cytosolic proteins and lipids. *Semin Hematol* 1993; 30:171-192

[193] Veda N, Shah SV: Role of intracellular calcium in hydrogen proxide-induced renal tubular cell injury. *Am J Physiol* 1992; 263:214-221

[194] Chiu D, Kuypers F, Lubin B: Lipid peroxidation in human red cell. *Semin. Hematol* 1989; 26:257-276

[195] Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ: Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free rad Biol Med* 1998; 24:102-110

[196] Isogai Y, Mochzuki K, Maeda T: Red cell filterability in diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 1981; 41 Suppl. 156:171-173

[197] Ito T, Nishimura C, Takahashi Y, Saito T, Omori Y: The level of erythrocyte aldose reductase: a risk factor for diabetic neuropathy? *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 36(3):161-167

[198] Evan-Wong LA, Davidson RJ: Raised coulter mean corpuscular volume in diabetic ketoacidosis, and its underlying association with marked plasma hyperosmolarity. *J Clin Pathol* 1983; 36:334-336

[199] Bock HA, Flückiger R, Berger W: Real and artefactual erythrocyte swelling in hyperglycaemia. *Diabetologia* 1985; 28:335-338

[200] Oughton J, Barnes AJ, Kohner EM: Diabetes mellitus: effect on the flow properties of blood. *Horm Metab Res* 1981; 11:112-120

[201] Caimi G, Lo Presti R: Techniques to evaluate erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2004; 41:99-103

[202] Mataseje A, Beder I, Kittova M, Okkelova J, Vazan R: The assessment of erythrocyte deformability by filtration rate. *Bratisl Lek Listy* 2003; 104(4-5):158-160

[203] Bareford D, Jennings PE, Stone PCW, Baar S, Barnett AH, Stuart J: Effects of hyperglycaemia and sorbitol accumulation on erythrocyte deformability in diabetes mellitus. *J Clin Pathol* 1986; 39:722-727

[204] Kelly LW, Barden CA, Tiedeman JS, Hatchell DL: Alterations in viscosity and filterability of whole blood and blood cell subpopulations in diabetic cats. *Exp Eye Res* 1993; 56(3):341-347

[205] Sabo A, Jakovljevic V, Stanulovic M, Lepsanovic L, Pejin D: Red blood cell deformability in diabetes mellitus: effect of phytomenadione. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993; 31(1):1-55

[206] Khodabandehlou T, Le Devehat C: Evaluation of erythrocyte deformability using a cell transit analyzer "CTA". Comparison with the technique of initial filtration flow rate. Application to the blood of diabetic patients. *J Mal Vasc* 1996; 21(3):175-180

[207] Hayashi J, Ishida N, Sato H, Hata Y, Saito T: Effect of beraprost, a stable prostacyclin analogue, on red blood cell deformability impairment in the presence of hypercholesterolemia in rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27(4):527-531

[208] Gomi T, Ikeda T, Ikegami F: Beneficial effect of alpha-blocker on hemorheology in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10(8):886-892

[209] Hardeman MR, Goedhart P, Breederveld D: Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear stress using a rotational viscometer. *Clin Chim Acta* 1987; 165:227-234

[210] Lee SS, Kim NJ, Sun K, Dobbe JG, Hardeman MR, Antaki JF, Ahn KH, Lee SJ: Association between arterial stiffness and the deformability of red blood cells (RBCs). *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 34(4):475-481

[211] Chien S: Final summary of the international symposium on filterability and red blood cell deformability. Conclusions. *Scand J Clin Invest* 1981; 41:321-324

[212] Rainhart WH, Usami S, Schmalzer EA: Evaluation of red blood cell filterability test: influences of pore size on hematocrit level, and flow rate. *J Lab Clin Med* 1984; 104:501-516

[213] Driessen GK, Fischer TM, Haest CW, Inhoffen W, Schmid-Schönbein H: Flow behaviour of rigid red blood cells in the microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 1984; 3(2):197-210

[214] Cicco G, Cicco S: Hemorheological aspects in the microvasculature of several pathologies. *Adv Exp Med Biol* 2007; 599:7-15

[215] Dorrance AM, Graham D, Dominiczak A, Fraser R: Inhibition of nitric oxide synthesis increases erythrocyte membrane fluidity and unsaturated fatty acid content. *Am J Hypertens* 2000; 13:1194-1202

[216] Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ: Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage. *Biorheology* 2004; 41:79-89

[217] Friebe A, Koesling D: Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 2003; 93:96-105

[218] Molday LL, Cook NJ, Kaupp UB, Molday RS: The cGMP-gated cation channel of bovine rod photoreceptor cells is associated with a 240-kDa protein exhibiting immunochemical cross-reactivity with spectrin. *J Biol Chem* 1990; 265:18690-18695

[219] Petrov V, Lijnen P: Regulation of human erythrocyte Na^+/H^+ exchange by soluble and particulate guanylate cyclase. *Am J Physiol* 1994; 271:1556-1564

[220] Korbut RA, Guzik TA, Madej J, Korbut R: Endothelial secretogogues and deformability of erythrocytes. *J Phys Pharm* 2002; 53:655-665

[221] Kiefer CR, Trainor JF, McKenney JB, Valeri CR, Snyder LM: Hemoglobin-spectrin complexes: interference with spectrin tetramer assembly as a mechanism for compartmentalization of band 1 and band 2 complexes. *Blood* 1995; 86:366-371

[222] Korbut R, Gryglewski RJ: Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro. *Eur J Pharmacol* 1993; 234:17-22

[223] Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis GC: Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:2848-2856

[224] Mesquita R, Picarra B, Saldanha C, Martins S: Nitric oxide effects on human erythrocytes structural and functional properties in vitro. *Clin Hemorheol Microcirc* 2002; 27:137-147

[225] Kelm M, Rath J: Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO-pathway. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:107-127

[226] Hardeman MR, Ince C: Clinical potential of in vitro measured red cell deformability, a myth? *Clin Hermorheol Microcirc* 1999; 21:277-284

[227] Shevkoplyas SS, Yoshida T, Gifford SC, Bitensky MW: Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device. *Lab Chip* 2006; 6:914-920

[228] Japee SA, Pittman RN and Ellis CG: A new video image analysis system to study red blood cell dynamics and oxygenation in capillary networks. *Microcirculation* 2005;12:498-506

[229] Nakazawa M, Aida T, Everson WV, Gonda MA, Hughes SH, Kao WW: Structure of the gene encoding the beta-subunit of chicken prolyl 4-hydroxylase. *Gene* 1988; 71(2):451-460

[230] Hu N, Clark EB: Hemodynamics of the stage 12 to stage 29 chick embryo. *Circ Res* 1989; 65(6):1665-1670

[231] Metcalfe J, Stock MK: Current topic: oxygen exchange in the chorioallantoic membrane, avian homologue of the mammalian placenta. *Placenta* 1993; 14(6):605-613

[232] Tibboel D, Molenaar JC, Van Nie CJ: New perspectives in fetal surgery: the chicken embryo. *J Pediatr Surg* 1979; 14(4):438-440

[233] Rizzo V, DeFouw DO: Macromolecular selectivity of chick chorioallantoic membrane microvessels during normal angiogenesis and endothelial differentiation. *Tissue Cell* 1993; 25(6):847-856

[234] Blanchet JP: Chicken erythrocyte membranes: comparison of nuclear and plasma membranes from adults and embryos. *Exp Cell Res* 1974; 84:159-166

[235] Weise, MJ, Chan LL: Membrane protein synthesis in embryonic chick erythroid cells. *J Biol Chem* 1978; 253:1892-1897

[236] Gaethgens P, Schmidt F,, Will G: Comparative Rheology of Nucleated and Non-Nucleated Red Blood Cells: Microrheology of Avian Erythrocytes During Capillary Flow. *Pfltigers Arch* 1981; 390:278-282

[237] Chan LN, Wacholtz M, Sha'afi RI: Changes in membrane structure and function during chick embryonic erythropoiesis. *Membr Biochem* 1978; 1(1-2):159-176

[238] Horisberger M: Adhesion of human and chicken red blood cells to polystyrene: influence of electrolyte and polyethylene glycol concentration. *Physiol Chem Phys*. 1980; 12(3):195-204

[239] Oonishi T, Sakashita K, Uyesaka N: Regulation of red blood cell filterability by Ca^{2+} influx and cAMP-mediated signaling pathways. *Am J Physiol* 1997; 273:1828-1834

[240] Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, Flordellis C, Maragoudakis ME: Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 2000; 129:207-21*3*

[241] Groenendijk BC, Hierck BP, Vrolijk J, Baiker M, Pourquie MJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE: Changes in shear stress-related gene expression after experimentally altered venous return in the chicken embryo. *Circ Res* 2005; 96(12):1291-1298

[242] Tan X, Sun WD, Li JC, Pan JQ, Liu YJ, Wang JY, Wang XL: L-arginine prevents reduced expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS) in pulmonary arterioles of broilers exposed to cool temperatures. *Vet J* 2007; 173(1):151-157

[243] Wideman RF, Chapman ME, Wang W, Erf GF: Immune modulation of the pulmonary hypertensive response to bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in broilers. *Poult Sci* 2004; 83(4):624-637

[244] Dunn LK, Gruenloh SK, Dunn BE, Reddy DS Falck JR, Jacobs ER, Medhora M: Chick chorioallantoic membrane as an in vivo model to study vasoreactivity: Characterization of development-dependent hyperemia induced by epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Anat Rec* 2005; 285A:771–780

[245] Secomb TW, HSU R, Pries AR: A model for red blood cell motion in glycocalix-lined capillaries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274;43:1016-1022

[246] Desjardins C, Duling BR: Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol* 1990; 258:647-654

[247] Klitzman B, Duling BR: Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am. J. Physiol* 1979; 237:481-490

[248] Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF: Gaehtgens P: Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res* 1994; 75:904-915

[249] Vink H, Duling BR: Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996; 71:581-589

[250] Chen X, Jaron D, Barbee KA, Buerk DG: The influence of radial RBC distribution, blood velocity profiles, and glycocalyx on coupled NO/O2 transport. *J Appl Physiol* 2006; 100:482-492

[251] Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschning T, de Wit C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rülicke T, Shaw S, Lindberg RL, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Lüscher TF, Gassmann M: Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:11609-11613

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard möchte ich für die hervorragende Betreuung danken. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik bei der Planung und Durchführung der Experimente sowie Korrektur der vorliegenden Arbeit haben meine Arbeit sowie Denkweise sehr geprägt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Intan Fatah Kumara für seine ständige Bereitschaft auf Fragen einzugehen, sowie Hilfestellungen jeder Art zu leisten. Seine Fähigkeit, Probleme jeglicher Art durch sein innovatives Denken zu lösen, beeindruckte mich immer wieder.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des kardiologischen Labors, insbesondere Herrn Paris Brouzos, Frau Dr. rer. nat. Svetlana Kabanova, Frau Dr. med. Puthrika Gharini, Frau Katharina Lysaja und Frau Anita Kossak.

Herrn Dr. med. Thomas Jax danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.
Herrn Dr. med. Georg Mannsmann danke ich für die Unterstützung bei der Rekrutierung der Probanden.

Die Möglichkeit erythrozytäre Arginaseaktivität zu messen verdanke ich Herrn Dr. rer. nat. Oliver Schnorr und seiner Arbeitsgruppe des Instituts der Biochemie.
Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schrader und seiner Arbeitsgruppe des Instituts der Herzkreislaufphysiologie möchte ich für die Kooperation mit der Intravitalmikroskopie danken.

Meiner Familie gebührt besonderer Dank für die Unterstützung auf meinem Weg und ihr Glaube an mich. Sarah danke ich sehr für die sprachliche Korrektur dieser Arbeit und die unermüdliche Fehlersuche. In inniger Verbundenheit widme ich ihnen diese Arbeit.

8. Lebenslauf

Persönliches

Name:	Patrick Horn
Geboren:	18. Februar 1980 in Düsseldorf
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

- 1986-1999 Anne-Frank-Grundschule und Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Neuss
- 05/1999 Abitur

Berufsausbildung

- 1999-2001 Zivildienst und Berufsausbildung zum Rettungsassistenten in Neuss und Rheine beim Deutschen-Roten-Kreuz, Kreisverband Neuss
- 09/2001 Examen zum Rettungsassistenten

Hochschulausbildung

- 10/2001-11/2007 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

09/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2004	International Summer School, Surgery and Emergency Medicine, Charité, Berlin
08/2006	Beginn des Praktischen Jahres
	Dep. de Cirugía, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires
	Klinik für Neurologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
	Dept. of Internal Medicine, University of Louisville Hospital (USA)
11/2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktische Tätigkeiten

- Dept. of Emergency Medicine 4 wöchige Famulatur, Mount Sinai Hospital, Chicago
- Dept. of Cardiology 8 wöchige Famulatur, Queen Elizabeth Hospital, London
- Kardiologische Ambulanz 4 wöchige Famulatur, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Allgemeine Innere Medizin 4 wöchige Famulatur, Johanna-Etienne-Krankenhaus, Neuss
- Anästhesiologie 3 wöchiges freiwilliges Praktikum, Dominikuskrankenhaus, Düsseldorf
- Praxis der Allgemeinmedizin 3 wöchiges freiwilliges Praktikum, Kleve
- Anästhesiologie 7 wöchiges Praktikum, Kreiskrankenhaus Dormagen

Berufliche Tätigkeit

- 2001-2007 Rettungsassistent im Rettungsdienst der Stadt Neuss
- Seit 02/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Aachen (Direktor: Prof. Dr. M. Kelm)