

Diplomarbeit

Effekte von Spermidin auf die Endothelfunktion der Dahl-Rattenaorta und die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid in Mauskardiomyozyten

Eingereicht von:

Felix Christian Renneberg

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Kardiologie

Universitätsklinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Assoz.-Prof. PD Dr. Simon Sedej

Graz, am 06.04.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 06.04.2017

Felix Christian Renneberg eh

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen an all diejenigen, die mich bei der Anfertigung dieser Diplomarbeit unterstützt und motiviert haben. Ferner gilt mein Dank allen, die mir während meines Studiums zur Seite standen und mich über Jahre hinweg auf diesem Weg begleitet haben.

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Assoz.-Prof. PD Dr. Simon Sedej bedanken, der mir stets ein verlässlicher Ansprechpartner war und mich immer wieder mit Anregungen und konstruktiver Kritik unterstützte. Danke für die gute Zusammenarbeit und umfangreiche Betreuung im Rahmen dieser Arbeit. Weiter möchte ich mich bei der Abteilung für Pharmakologie und Toxikologie des Institutes für Pharmazeutische Wissenschaften der Karl-Franzens-Universität Graz bedanken, durch deren Kooperationsbereitschaft ein Teil der Experimente erst ermöglicht wurde. Insbesondere möchte ich Gerald Wölkart hervorheben, dessen wissenschaftliche Erfahrung, Unterstützung und Hilfsbereitschaft von großer Bedeutung für die experimentelle Durchführung war.

Nicht zuletzt möchte ich ein ganz herzliches Dankeschön aussprechen an meine Freunde und Studienkollegen, die mich direkt und indirekt auf diesem Weg begleitet haben, indem sie Studium und Freizeit mit mir verbrachten und unzählige schöne Momente mit mir teilten, die ich stets in Erinnerung behalten werde.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Felicitas Frauenschuh, die in den letzten Jahren immer für mich da war und mir in guten sowie weniger guten Momenten zur Seite stand.

Der allergrößte Dank jedoch gebührt meiner Familie, allen voran meinen Eltern Marion und Thomas Renneberg, die es mir ermöglicht haben, diesen Lebensweg einzuschlagen. Stets haben sie meine Entscheidungen vertrauensvoll respektiert, mich unterstützt, wo immer es möglich war und mich in vielerlei Hinsicht geprägt.

In Gedenken widme ich diese Arbeit und den damit verbundenen Studienabschluss meinen Großeltern, die ebenfalls einen großen Anteil an meiner persönlichen Entwicklung tragen und diesen wichtigen Schritt in meinem Leben sicherlich nur allzu gern miterlebt hätten.

Zusammenfassung

Das natürlich vorkommende Polyamin Spermidin ist Bestandteil diverser Nahrungsmittel. Eine erhöhte orale Spermidinzufuhr verzögert die Entwicklung einer hypertensiven Herzkrankheit bei salzsensitiven Dahl-Ratten durch Reduktion des arteriellen Blutdrucks. Dieser Effekt ist mit einer Erhöhung der Bioverfügbarkeit von L-Arginin assoziiert, dem einzigen Substrat für die Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO). Die vorliegende Arbeit untersucht, ob exogene Zufuhr von Spermidin (1) die NO-abhängige endotheliale Funktion der thorakalen Aorta von salzsensitiven Dahl-Ratten verbessert und (2) die Bioverfügbarkeit von NO in adulten C57BL6 Wildtyp-Mauskardiomyozyten erhöht.

Bei 7-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten (klinisch relevantes Tiermodell für die hypertensive Herzkrankheit) wurde eine salzreiche Diät eingeleitet. Die Hälfte der Tiere erhielt mit 3mM Spermidin angereichertes Trinkwasser für 7 bzw. 12 Wochen (Kontrollgruppe: normales Leitungswasser). Anschließend wurde *ex vivo* die NO-bedingte Endothelfunktion der thorakalen Aorta von 14- und 19-wöchigen Ratten bestimmt. Dazu wurde die Relaxation des Gefäßes nach Gabe von Acetylcholin und NO-Donor mittels Myographie gemessen. Darüber hinaus wurden ventrikuläre Kardiomyozyten von adulten C57BL6 Wildtyp-Mäusen mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM Diacetat beladen und nach akuter Inkubation mit Spermidin die DAF-FM Diacetat-vermittelte Fluoreszenz der Kardiomyozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen.

Neunzehnwöchige salzsensitive Dahl-Ratten wiesen eine reduzierte Endothel-abhängige sowie -unabhängige Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta im Vergleich zu 14-wöchigen Tieren auf. Spermidingabe hat die Endothelfunktion der 14-wöchigen Tiere nicht verändert. Bei den 19-wöchigen Ratten zeigte sich dagegen eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion von mit Spermidin behandelten Tieren gegenüber gleichaltrigen Kontrolltieren. Akute Inkubation mit Spermidin hatte keinen Einfluss auf die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Spermidin die Progression der NO-abhängigen endothelialen Dysfunktion der thorakalen Aorta von salzsensitiven Dahl-Ratten verlangsamt. Dieser Effekt ist jedoch nicht für die Spermidin-bedingte Reduktion des arteriellen Blutdruckes bei salzsensitiven Dahl-Ratten verantwortlich.

Abstract

The natural polyamine spermidine is present in high amounts in certain human diets. Dietary spermidine delays the development of hypertensive heart disease in Dahl salt-sensitive rats by reducing high arterial blood pressure. This effect is associated with increased global L-arginine bioavailability, the only source for the production of vasodilator nitric oxide (NO). The aim of the present study was to test whether spermidine supplementation (i) improves NO-dependent endothelial function of thoracic aorta in Dahl salt-sensitive rats, and (ii) increases NO bioavailability in adult C57BL6 wild-type mouse cardiomyocytes.

Seven-week-old Dahl salt-sensitive rats, a clinically relevant animal model of hypertension-induced heart disease, were fed high-salt diet and received drinking water supplemented with 3 mM spermidine for 7 and 12 weeks, whereas control rats received regular drinking water. NO-dependent endothelial function was determined *ex vivo* in thoracic aortic rings of rats aged 14 and 19 weeks by measuring increases in luminal diameter in response to acetylcholine and NO donor DEA/NO using myography. Ventricular cardiomyocytes were isolated from adult C57BL6 mice and cells were loaded with NO-sensitive dye DAF-FM diacetate. FACS analysis was carried out to quantify fluorescence intensity of DAF-FM diacetate after acute incubation of cardiomyocytes with spermidine.

Nineteen-week-old control rats had reduced endothelium-dependent and -independent dilation compared to 14-week-old animals. Spermidine feeding did not increase the endothelial function in 14-week-old rats. However, spermidine supplementation significantly improved NO-mediated endothelial function in 19-week-old animals compared to age-matched control. Acute incubation of mouse cardiomyocytes with spermidine did not affect the cellular NO production.

These results suggest that spermidine delays the deterioration of NO-mediated endothelial dysfunction of thoracic aorta in Dahl salt-sensitive rats. However, this effect does not contribute to reduced high blood pressure by spermidine in Dahl salt-sensitive rats.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagung	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungen	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Hinführung	1
1.2 Polyamine	2
1.2.1 Bioverfügbarkeit und endogene Synthese	2
1.2.2 Effekte und Wirkungsweise der Polyamine	6
1.2.3 Interaktion von Spermidin/Polyaminen mit den NO-Synthasen	10
1.3 Stickstoffmonoxid	11
1.3.1 NO und kardiovaskuläre Physiologie	11
1.3.2 NO und kardiovaskuläre Pathophysiologie	13
1.4 Hypothesen	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Tiere	17
2.2 Isolation der Aorta	19
2.3 Endotheliale Funktionsmessung an Rattenaorten	20
2.4 Isolation des Herzens von der Maus und Zellisolation	25
2.5 Inkubation und elektrische Feldstimulation	27
2.6 FACS (<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>)	31
2.7 Lösungen und Chemikalien	33
2.8 Datenauswertung und statistische Analyse	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Endotheliale Funktionsmessung	38
3.1.1 Kontrollversuche	38
3.1.2 Effekt von Spermidin auf die Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta	40

3.2 NO-Produktion in isolierten Mauskardiomyozyten.....	44
3.2.1 Indirekte NO-Kalibrierung	44
3.2.2 Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in nicht-stimulierten Muskardiomyozyten.....	46
3.2.3 Effekt der elektrischen Feldstimulation auf die NO-Produktion in Muskardiomyozyten.....	48
3.2.4 Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Muskardiomyozyten	50
3.2.5 Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Muskardiomyozyten unter Verwendung von Probenecid.....	52
4 Diskussion.....	54
4.1 Endotheliale Funktion.....	54
4.2 NO-Produktion in Kardiomyozyten	56
4.3 Zusammenfassung und klinische Perspektive	61
Literaturverzeichnis	63
Anhang.....	72

Abkürzungen

ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i> (ATP-bindender Kassetten-Transporter)
AGE.....	<i>advanced glycation end product</i> (Fortgeschrittenes Glykierungsendprodukt)
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
CAT-1.....	<i>cationic amino acid transporter-1</i> (kationischer Aminosäuretransporter Typ 1)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DAF-2/DA	4,5-Diaminofluorescein Diacetat
DAF-FM.....	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein
dcSAM.....	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
DEA/NO.....	Diethylamin NONOat
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDD.....	<i>endothelium-dependent dilation</i> (Endothel-abhängige Dilatation)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS.....	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FL1	Fluoreszenzkanal 1
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GABR.....	<i>global arginine bioavailability ratio</i> (L-Arginin-Bioverfügbarkeitsverhältnis)
geNOps	<i>genetically encoded NO probes</i> (genetisch kodierte NO-Sonden)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
iNOS.....	induzierbare NO-Synthase
KG	Körpergewicht
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
L-NAME.....	L-N ^G -Nitroarginin Methyl Ester
MRP	<i>multidrug resistance-related protein</i>

mTOR.....	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PKG.....	Proteinkinase G
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
SMP 30	<i>senescence marker protein-30</i>
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SSC.....	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
TPR.....	totaler peripherer Widerstand
U46.....	U46,619 (Thromboxan A2-Analogen)

Bemerkung: Für englischsprachige Begriffe wurde in allen als angemessen erachteten Fällen der deutsche Begriff verwendet. Die englischen Begriffe sind durch kursive Schrift kenntlich gemacht.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin.	2
Abbildung 2: Polyamin-Stoffwechsel in eukaryotischen Zellen.....	4
Abbildung 3: Mittlerer Polyamingehalt bestimmter Nahrungsmittelgruppen.	5
Abbildung 4: Spermidingehalt ausgewählter Lebensmittel.	6
Abbildung 5: Zentrale Bedeutung von L-Arginin für die NO- und Polyaminsynthese.....	8
Abbildung 6: Zelluläre Mechanismen der Polyamine im Überblick.	10
Abbildung 7: Polyamin-Metabolismus und NO-Produktion bei exogener Spermidinzufuhr: Vereinfachte Darstellung der Arbeitshypothese.	16
Abbildung 8: Versuchsplan mit Fütterungsschema und Gruppeneinteilung der salzsensitiven Dahl-Ratten	18
Abbildung 9: Thorakale Rattenaorta, freipräpariert.....	20
Abbildung 10: Messplatz.	21
Abbildung 11: Vorrichtung zur Aufnahme eines Aortenringes.	21
Abbildung 12: Organbad mit Signalumwandler (1), Verstärker (2) und Steuereinheit (3).....	22
Abbildung 13: Kontraktionskurve einer vollständigen Messung im Überblick.	23
Abbildung 14: U46-induzierte Kontraktion mit nachfolgender Relaxierung durch Acetylcholingabe.	24
Abbildung 15: U46-induzierte Kontraktion mit nachfolgender Relaxierung durch DEA/NO-Gabe.	25
Abbildung 16: Reaktionsschema von DAF-FM Diacetat.....	28
Abbildung 17: Emissionsspektrum von DAF-FM Diacetat.	29
Abbildung 18: Versuchsplan Kalibrierung.....	29
Abbildung 19: Versuchsplan Experiment 1 (ohne Feldstimulation).	30

Abbildung 20: Versuchsplan Experiment 2 (mit Feldstimulation).....	30
Abbildung 21: Versuchsplan Experiment 3 (mit Feldstimulation und Probenecid).....	30
Abbildung 22: Grafische Darstellung der FACS-Analyse: Typisches Beispiel für ein Streudiagramm der detektierten Ereignisse.	32
Abbildung 23: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14- und 19-wöchigen Kontrolltieren.....	38
Abbildung 24: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14- und 19-wöchigen Kontrolltieren.....	39
Abbildung 25: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14-wöchigen Tieren.....	40
Abbildung 26: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14- wöchigen Tieren.....	41
Abbildung 27: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 19-wöchigen Tieren.....	42
Abbildung 28: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 19- wöchigen Tieren.....	43
Abbildung 29: Lineare Korrelation zwischen DAF-FM Fluoreszenz und Konzentration des NO-Donors Spermin NONOat.	44
Abbildung 30: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für die indirekte NO-Kalibrierung.	45
Abbildung 31: Effekt von Spermidin und/oder L-Arginin auf die NO- Produktion in nicht-stimulierten Mauskardiomyozyten.	46
Abbildung 32: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für die NO-Produktion in nicht-stimulierten Mauskardiomyozyten.	47
Abbildung 33: Effekt der elektrischen Feldstimulation auf die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten.	48
Abbildung 34: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt der Feldstimulation auf die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten.	49

Abbildung 35: Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten.	50
Abbildung 36: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten.	51
Abbildung 37: Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten; Einfluss von Probenecid auf das DAF-FM Fluoreszenzsignal.	52
Abbildung 39: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten, die mit Probenecid vorbehandelt wurden.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit Puffer	33
Tabelle 2: Zusammensetzung der Kaliumlösung zum Vorreizen der Gefäße	34
Tabelle 3: Zusammensetzung der Normaltyrode-Lösung.....	34
Tabelle 4: Zusammensetzung des Perfusionspuffers.....	34
Tabelle 5: Zusammensetzung der Calcium-Aufbaureihe.....	35
Tabelle 6: Zusammensetzung von Myozyten-Verdauungs-, Kanülierungs- und Stopp-Lösung	35
Tabelle 7: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 14-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Acetylcholingabe.....	75
Tabelle 8: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 14-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Gabe von NO-Donor.....	75
Tabelle 9: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 19-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Acetylcholingabe.....	76
Tabelle 10: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 19-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Gabe von NO-Donor.....	76

1 Einleitung

1.1 Hinführung

Trotz intensiver Bemühungen bei der Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen, die weltweit die häufigste Todesursache darstellen (World Health Organization 2016), existieren derzeit nur limitiert effektive pharmakologische Therapien mit teils großem Nebenwirkungsspektrum. In den letzten Jahren intensivierter Forschung konnten viele neue Erkenntnisse über die kardioprotektiven Effekte von natürlich vorkommenden Substanzen (z.B. Resveratrol, Nicotinamid) gewonnen werden, die Standardtherapien bei kardiovaskulären Erkrankungen unterstützen bzw. ergänzen können (Sukhodub et al. 2010; Sukhodub et al. 2011; Bonnefont-Rousselot 2016; Hashemzaei et al. 2017). Darüber hinaus konnten Studien eine negative Korrelation zwischen der nahrungsbedingten Polyaminaufnahme und der kardiovaskulär-bedingten Mortalität nachweisen (Soda et al. 2012). So stellte sich unter anderem heraus, dass das Polyamin Spermidin bei Mäusen kardioprotektiv wirkt und die mediane Lebensspanne von Hefe, Fruchtfliegen, Würmern und C57BL/6 Wildtyp-Mäusen verlängert (Eisenberg et al. 2009; Eisenberg et al. 2016). Die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Effekte sind bislang nur teilweise verstanden und daher Gegenstand aktueller Forschung. Einer der wichtigsten Wirkungsmechanismen von Spermidin scheint die Aktivierung von Autophagie zu sein, dem zellulären Selbstreinigungsprozess, dessen Aktivität im Alter abnimmt. Weitere Studien deuten aber darauf hin, dass auch Autophagie-unabhängige Mechanismen eine zentrale Rolle spielen könnten. So zeigte sich, dass Spermidin die mit zunehmendem Alter sinkende Elastizität der Arterien positiv beeinflusst (LaRocca et al. 2013). Dieser Effekt ist sowohl mit einem reduzierten Kollagenanteil in Arterien als auch mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) im arteriellen Endothel assoziiert. Zudem existieren diverse Studien, die den positiven Zusammenhang von NO-Verfügbarkeit, Endothelfunktion und kardioprotektiven Effekten untermauern (Forstermann und Sessa 2012; Zhang et al. 2014; Zhang 2016). Zu diesen NO-vermittelten Effekten zählen unter anderem die Blutdrucksenkung durch Dilatation von Blutgefäßen sowie die Unterbindung von Thrombosen und Inflammation der Gefäßwand durch die Inhibierung der Thrombozytenaggregation und Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten an die

Gefäßwand. Auch die Steigerung der Relaxationsfähigkeit des Herzmuskels (positive Lusitropie) stellt einen solchen Effekt dar.

Die vorliegende Arbeit baut auf den neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe über die blutdrucksenkenden Effekte des Polyamins Spermidin auf und widmet sich der Fragestellung, ob eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO als möglicher grundlegender Mechanismus dieser anti-hypertensiven Wirkungsweise des Spermidins in Betracht zu ziehen ist. Dabei wird zum einen der Frage nachgegangen, ob eine langfristige orale Spermidingabe die NO-abhängige Endothelfunktion bei hypertensiven salzsensitiven Dahl-Ratten verbessert. Zum anderen werden die direkten Einflüsse des Polyamins Spermidin auf die NO-Produktion von isolierten Mauskardiomyozyten untersucht.

1.2 Polyamine

1.2.1 Bioverfügbarkeit und endogene Synthese

Zu den natürlich vorkommenden Polyaminen gehören Putrescin, Spermidin und Spermin (Abbildung 1), die aus einem Kohlenstoff-Grundgerüst und mehreren NH_3 -Aminogruppen (zwei, drei oder vier) bestehen.

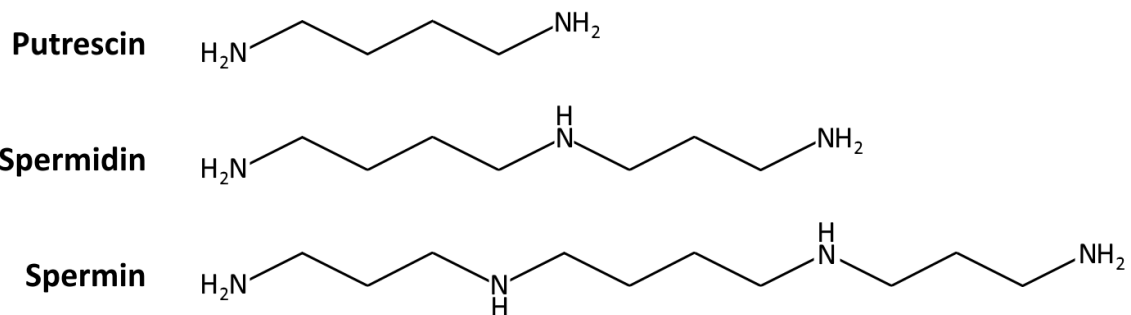


Abbildung 1: Chemische Struktur der Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin.

Polyamine werden sowohl vom Organismus selbst synthetisiert als auch mit der Nahrung zugeführt, zudem auch von Bakterien der Darmflora produziert. Die Nahrungsaufnahme spielt dabei quantitativ betrachtet eine größere Rolle als die endogene Biosynthese (Kalac 2014). Polyamine werden im Darm vollständig resorbiert und dabei teilweise noch während des Absorptionsprozesses

metabolisiert (Bardocz et al. 1995). So bleiben ca. 70 – 80% von Spermin und Spermidin in ihrer ursprünglichen Form erhalten, während Putrescin zu mehr als 80% in andere Polyamine und Metaboliten wie z.B. Aminosäuren umgebaut wird. Die Resorption erfolgt im Duodenum sowie in den proximalen Anteilen des Jejunums durch Polyamin-Transporter und parazelluläre Absorption (Larque et al. 2007). Die freien Konzentrationen von Spermidin und Spermin im menschlichen Vollblut liegen im niedrigen 1- bis 2-stelligen μM -Bereich (Spermidin: 7,9 – 16,7 bzw. Spermin: 3,4 – 13,7 $\mu\text{mol/l}$) (Soda et al. 2009b). Die berichtete Konzentration von Spermidin und Spermin in Erythrozyten beträgt 8,1 – 14,1 bzw. 5,4 – 8,4 $\mu\text{mol/l}$ (Ducros et al. 2009). Es bestehen große Unterschiede hinsichtlich des totalen und prozentualen Polyamingehaltes in humanem Vollblut zwischen verschiedenen Altersgruppen. Pucciarelli et al. (2012) konnten zeigen, dass die totale Polyaminkonzentration sowie die Spermidin- und Sperminkonzentration bei Menschen im Alter zwischen 60 und 80 Jahren gegenüber einer jüngeren Altersgruppe (31 – 56 Jahre) erniedrigt ist. Interessanterweise weisen Menschen noch höheren Alters (ab 90 Jahren) jedoch erhöhte Polyaminkonzentrationen gegenüber 60 – 80-jährigen auf. Maßgeblich verantwortlich hierfür ist die Spermidinkonzentration, die bei über 90-jährigen das gleiche Niveau erreicht wie in der Altersgruppe unter 56 (Pucciarelli et al. 2012).

Der Polyamin-Stoffwechsel von Säugetieren findet in jeder Körperzelle statt (Abbildung 2) (Pegg und McCann 1982; Lawrence 2004; Minois et al. 2011). Die Synthese von Putrescin erfolgt aus der semi-essentiellen Aminosäure L-Arginin über das Zwischenprodukt Ornithin. Die Reaktion von L-Arginin zu Ornithin erfolgt durch Abspaltung von Harnstoff sowie Einbau von H_2O und wird durch die Arginase (Typ II) katalysiert. Dieser Prozess findet in den Mitochondrien statt. Ornithin wird anschließend im Zytoplasma durch die Ornithin-Decarboxylase (ODC) in Putrescin umgewandelt. In weiterer Folge werden Spermidin und Spermin durch jeweils eine weitere Reaktion synthetisiert, dabei wird jeweils eine weitere Aminogruppe mit Kohlenstoffgerüst hinzugefügt. Die Reaktion von Putrescin zu Spermidin wird durch die Spermidin-Synthase, die anschließende Reaktion von Spermidin zu Spermin durch die Spermin-Synthase katalysiert. Dabei wird jeweils eine Aminopropylgruppe von decarboxyliertem S-

Adenosylmethionin (dcSAM) übertragen. Ausgangspunkt für die Synthese von dcSAM ist die essentielle Aminosäure Methionin.

Die Synthese von Putrescin aus Ornithin wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus gesteuert: Spermidin und Spermin steigern die Transkription eines Antizym, welches an die ODC bindet und diese hemmt.

Es existiert jeweils auch ein entgegengesetzter Reaktionsweg, bei dem Spermin und Spermidin über die Spermin/Spermidin N¹-Acetyltransferase acetyliert und anschließend im Peroxisom von der Polyamin-Oxidase oxidiert wird. Für die Umwandlung von Spermin zu Spermidin existiert zudem noch ein zweiter direkter Weg ohne Zwischenprodukt über die Spermin-Oxidase. (Pegg und McCann 1982; Lawrence 2004, S. 62-64; Minois et al. 2011)

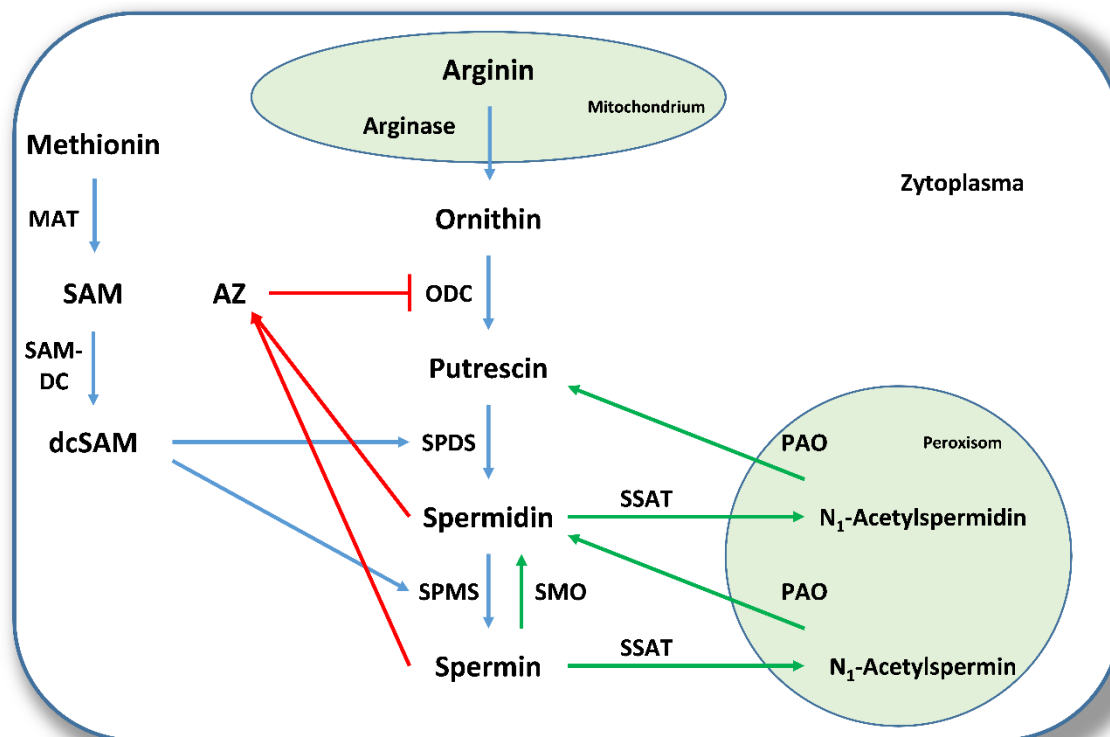


Abbildung 2: Polyamin-Stoffwechsel in eukaryotischen Zellen. Anabolismus (blau); Katabolismus (grün); Inhibition (rot). ODC: Ornithin-Decarboxylase; SPDS: Spermidin-Synthase; SPMS: Spermin-Synthase; MAT: Methionin-Adenosyl-Transferase; SAM: S-Adenosylmethionin; SAM-DC: S-Adenosylmethionin-Decarboxylase; dcSAM: decarboxyliertes S-Adenosylmethionin; SMO: Spermin-Oxidase; SSAT: Spermin/Spermidin N¹-Acetyltransferase; PAO: Polyamin-Oxidase; AZ: Antizym.

Polyamine sind in größeren Mengen in bestimmten Nahrungsmittelgruppen enthalten (Abbildung 3) und werden somit bei der Nahrungsaufnahme zugeführt. Bezüglich des jeweiligen Polyamingehaltes der einzelnen Nahrungsmittel gibt es jedoch starke Unterschiede, vor allem in Abhängigkeit von der Zubereitungsart. Auch unterliegen sie Schwankungen durch z.B. unterschiedliche regionale Anbau- und Erntebedingungen.

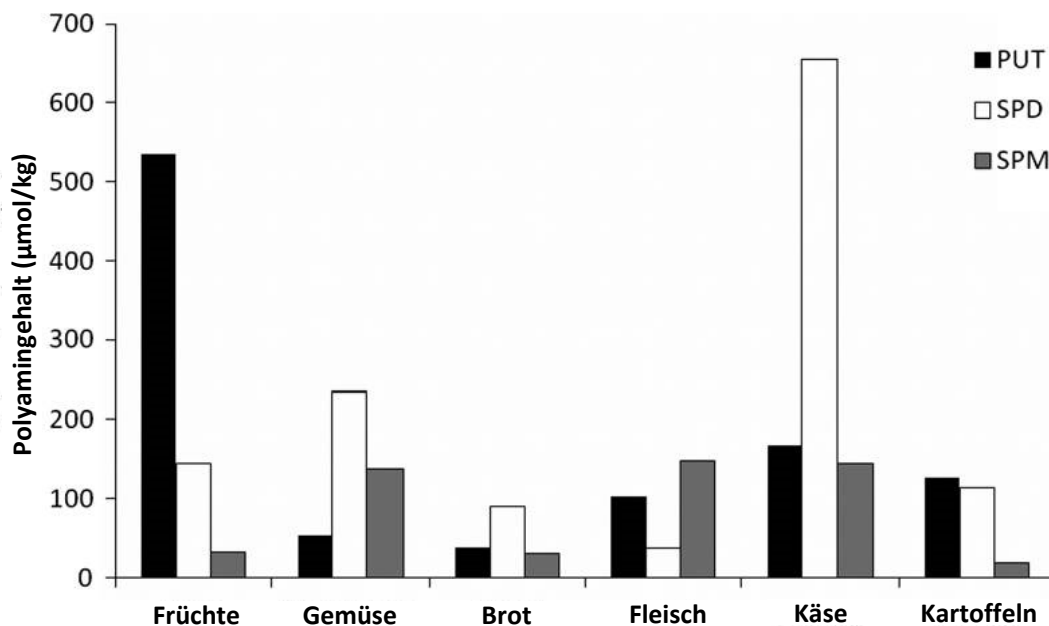


Abbildung 3: Mittlerer Polyamingehalt bestimmter Nahrungsmittelgruppen. Ein hoher Spermidingehalt findet sich vor allem in gereiftem Käse. Putrescin (PUT), Spermidin (SPD) und Spermin (SPM); Abbildung modifiziert nach Atiya Ali et al. (2011).

Neben Lebensmitteln wie Brokkoli, Erbsen und gereiftem Käse weisen insbesondere Sojabohnen und Weizenkeime besonders hohe Mengen an Spermidin auf (Abbildung 4) (Atiya Ali et al. 2011). Als Beispiel sei das vergleichsweise polyaminreiche Nahrungsmittel „Nattō“ genannt, eine traditionelle japanische Speise aus gekochten und fermentierten Sojabohnen.

Nahrungsmittel	Portionsgröße (g)	Spermidingehalt (mg/Portion)
Sojabohnen, gekocht	190	9,7
Erbsen	140	9,1
Birnen	125	6,6
Linsensuppe	250	5,5
Pilze	50	4,4
Rote Bohnen	190	3,7
Brokkoli	100	3,6
Blumenkohl	100	3,0
Hühnerfleisch	125	2,2
Popcorn	50	2,1
Käse	20	2,0
Kartoffeln, gekocht	150	1,8

Abbildung 4: Spermidingehalt ausgewählter Lebensmittel. Abbildung modifiziert nach Atiya Ali et al. (2011).

Eine Erkenntnis ist zudem, dass eine langfristige, erhöhte orale Aufnahme von Polyaminen auch einen erhöhten Plasmaspiegel derselben bewirkt. So führt eine kontrollierte, 2-monatige polyaminreiche Ernährung mit Nattō zu einem signifikanten Anstieg der Sperminkonzentration (Soda et al. 2009b). Einschränkungen der oralen Substitution ergeben sich in Hinblick auf die Toxizität, gemessen im Tierversuch an Wistar-Kyoto Ratten (Til et al. 1997): Akut toxisch wirkt die Zufuhr von 2000 mg/kg Körpergewicht (KG) Putrescin, und jeweils 600 mg/kg KG Spermidin und Spermin. Die jeweils höchste Dosierung, bei der langfristig nicht mit Nebenwirkungen zu rechnen ist, sind 180 mg/kg KG pro Tag Putrescin, 83 mg/kg KG pro Tag Spermidin und 19 mg/kg KG pro Tag Spermin.

1.2.2 Effekte und Wirkungsweise der Polyamine

Diverse Studien belegen die positiven Auswirkungen z.B. einer sojareichen Ernährung auf die Gesundheit. So zeigen epidemiologische Studien eine negative Korrelation zwischen nahrungsbedingter Sojazufuhr und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen (Hooper et al. 2008), Typ II Diabetes (Kwon et al. 2010), und einigen Typen maligner Erkrankungen wie Brust- (Chen et al. 2014), Prostatakrebs (van Die et al. 2014) oder Darmkrebs (Yang et al. 2009). Während bislang vor allem die antioxidative Wirkung der enthaltenen Isoflavone/Flavonoide dafür verantwortlich gemacht wurde, weisen neueste Studien unter anderem auf

den hohen Gehalt an Polyaminen als eine ursächliche Substanz für die genannten Effekte hin (Soda 2011; Soda et al. 2012; Vargas et al. 2015). Die Verabreichung von mit Polyaminen angereicherter Nahrung mit hoher Spermin- sowie Spermidinkonzentration (374 nmol/g bzw. 1540 nmol/g) an Mäuse zeigte, dass die Tiere gegenüber den Kontrollgruppen mit normaler sowie reduzierter Polyaminaufnahme eine signifikant geringere Mortalität aufwiesen. Dabei zeigte sich auch die Spermidinkonzentration im Vollblut nach 26-wöchiger Spermidingabe signifikant erhöht. Es zeigte sich zudem eine verminderte Inzidenz von Glomerulosklerose sowie eine vermehrte Expression des „Altersmarkers“ SMP 30 (*senescence marker protein-30*) in Niere und Leber (Soda et al. 2009a). Eine Studie an transgenen Mäusen mit gesteigertem Polyamin-Katabolismus legt die Vermutung nahe, dass diese Tiere unter anderem durch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) anfälliger gegenüber Stress sind (Cerrada-Gimenez et al. 2011). Die Rolle von Polyaminen in Hinblick auf bestimmte Krankheiten ist als komplex zu Betrachten. Generell lässt sich sagen, dass viele Krankheiten mit einer inflammatorischen Reaktion und gesteigerter Polyaminkonzentration einhergehen. Auf der anderen Seite weisen auch Krebszellen und andere hochproliferative Zellen eine erhöhte Polyaminkonzentration auf, sodass diese zugleich einen potenziellen Ansatzpunkt für Chemotherapeutika darstellen (Minois et al. 2011; Thomas und Thomas 2003). Auch existieren wegweisende Studien bezüglich Polyaminen und kardialer Hypertrophie (Giordano et al. 2010). So induzieren Faktoren wie Stress, körperliche Anstrengung, Verabreichung von Adrenozeptor-Agonisten oder eine Aortenstenose einen erhöhten intrazellulären Polyamingehalt des Herzgewebes. Gleichzeitig sind dies alles auch potentielle Auslöser einer Hypertrophie. Transgene Mäuse mit einer Überexpression der Ornithin-Decarboxylase (ODC) und somit gesteigerter Synthese von Putrescin aus Ornithin entwickelten eine moderate Hypertrophie. Eine chronische β -adrenerge Stimulation mit Isoproterenol steigerte diese linksventrikuläre Hypertrophie, zeitgleich zeigte sich, dass Isoproterenol auch die Aktivität der Arginase steigerte. Dies ist insofern interessant, als dass L-Arginin als Substrat der Arginase gleichzeitig auch Substrat für die NO-Synthasen und (darüber hinaus) NO ist. Eine reduzierte NO-Konzentration steht zudem in positiver Korrelation mit der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie. Auch konnte ein negativ inotroper Effekt von exogen

zugeführten Polyaminen (Spermin und eingeschränkt auch Spermidin) in isolierten Kardiomyozyten von Wistar-Kyoto Ratten nachgewiesen werden. Dieser war mit einer vorübergehenden Senkung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol assoziiert (Ventura et al. 1994).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vor allem bei kardiovaskulären Krankheitsbildern eine Assoziation mit einer erhöhten intrazellulären Polyaminkonzentration zum einen, zum anderen aber auch mit einer erniedrigten NO-Konzentration bzw. -Produktion besteht. Ein wichtiger Erklärungsansatz für diese scheinbar negativen Effekte der Polyamine stellt die Hypothese dar, dass die gesteigerte Polyaminproduktion bei gleichzeitiger Konkurrenz um das Substrat L-Arginin die NO-Produktion unterdrückt bzw. hemmt (Ghisalberti et al. 2016). Die zentrale Bedeutung, die das Substrat L-Arginin hierbei einnimmt ist in Abbildung 5 dargestellt.

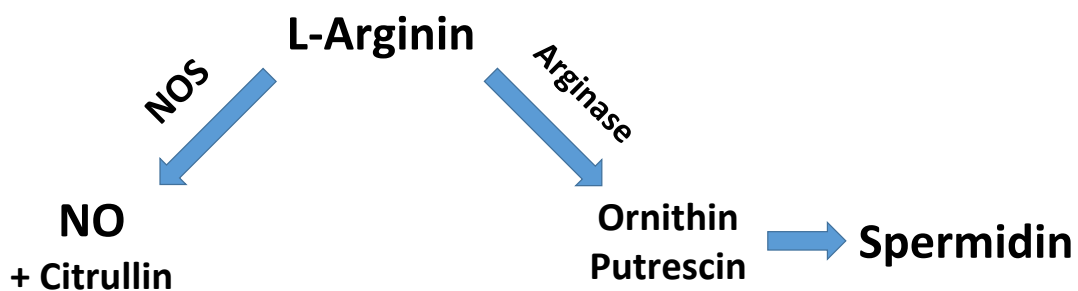


Abbildung 5: Zentrale Bedeutung von L-Arginin für die NO- und Polyaminsynthese. L-Arginin stellt das einzige Substrat sowohl für die NO-Synthasen (NOS) als auch für die Arginase dar. Diese katalysiert die Umwandlung zu Ornithin. In weiterer Folge entstehen Putrescin und Spermidin.

Eisenberg et al. (2016) konnten zeigen, dass eine orale Spermidinzufuhr die mediane Lebensspanne von Wildtyp-Mäusen signifikant verlängert. Mechanistisch ursächlich zeigten sich diverse kardioprotektive Effekte wie eine gesteigerte Autophagie, Mitophagie und mitochondriale Atmung in den Kardiomyozyten, die wiederum verbesserte mechanisch-elastische Eigenschaften des Myokards, eine reduzierte kardiale Hypertrophie und erhaltene diastolische Funktion im Alter bewirkten. Weiter konnte auch anhand von hypertensiven, salzsensitiven Dahl-Ratten verdeutlicht werden, dass die orale Spermidingabe den systemischen Blutdruck reduziert und der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sowie verringerter diastolischer Herzfunktion vorbeugt. Nicht zuletzt konnte auch bei

Menschen anhand einer Bewertung der Nahrungsaufnahme (Anhand eines Fragebogens) eine negative Korrelation zwischen Spermidinzufuhr und arteriellem Blutdruck sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen festgestellt werden. In einer weiteren Studie konnten die Wirkungen von Spermidin auf den Alterungsprozess arterieller Gefäße an Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (LaRocca et al. 2013). So konnte der physiologische Prozess der Gefäßalterung, geprägt von zunehmender Versteifung der großen Arterien durch eine vermehrte Kollagenbildung und Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion, assoziiert mit zunehmendem oxidativen Stress (gemessen anhand Nitrotyrosin-, Superoxid- und AGE-Produktion), durch Spermidingabe bereits nach 4 Wochen wesentlich aufgehoben werden. Auch diese Effekte sind zum einen mit einem Anstieg der arteriellen Expression von Autophagiemarkern assoziiert, zum anderen aber auch mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO im arteriellen Endothel. Weiter konnte in einer Reihe von neurobiologischen Experimenten an Ratten eine Gedächtnisbildungs- und lernfördernde Wirkung von Spermidin (bei intra-hippocampaler Injektion) nachgewiesen werden (Guerra et al. 2016). Ursache hierfür scheint unter anderem eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit zu sein, die auf Spermidin zurückzuführen ist (Guerra et al. 2006).

Polyamine wirken über verschiedene zelluläre Mechanismen (Abbildung 6) (Minois et al. 2011; Minois 2014). So sind Polyamine essentiell für das Zellwachstum und wirken als Stimulus für die Apoptose, den programmierten Zelltod. Dies geschieht durch erhöhte Ca^{2+} -Akkumulation in Mitochondrien, direkte Förderung der Cytochrom c-Freisetzung und eine inhibitorische Wirkung auf die Nekrose. Weiter verändern Polyamine die Chromatin-Struktur sowie die Genregulation, da sie aufgrund ihrer positiven Ladung als Kationen an die DNS binden und die Deacetylierung der Histone stimulieren. Die Induktion der Autophagie geschieht zum einen über AMP-abhängige, Kinase/mTOR-unabhängige Signalwege und zum anderen über Deacetylierungsreaktionen von Autophagie-assoziierten Proteinen im Zytoplasma. Im Speziellen induziert Spermidin die Autophagie indem es die Acetyltransferase EP300 hemmt (Pietrocola et al. 2015).

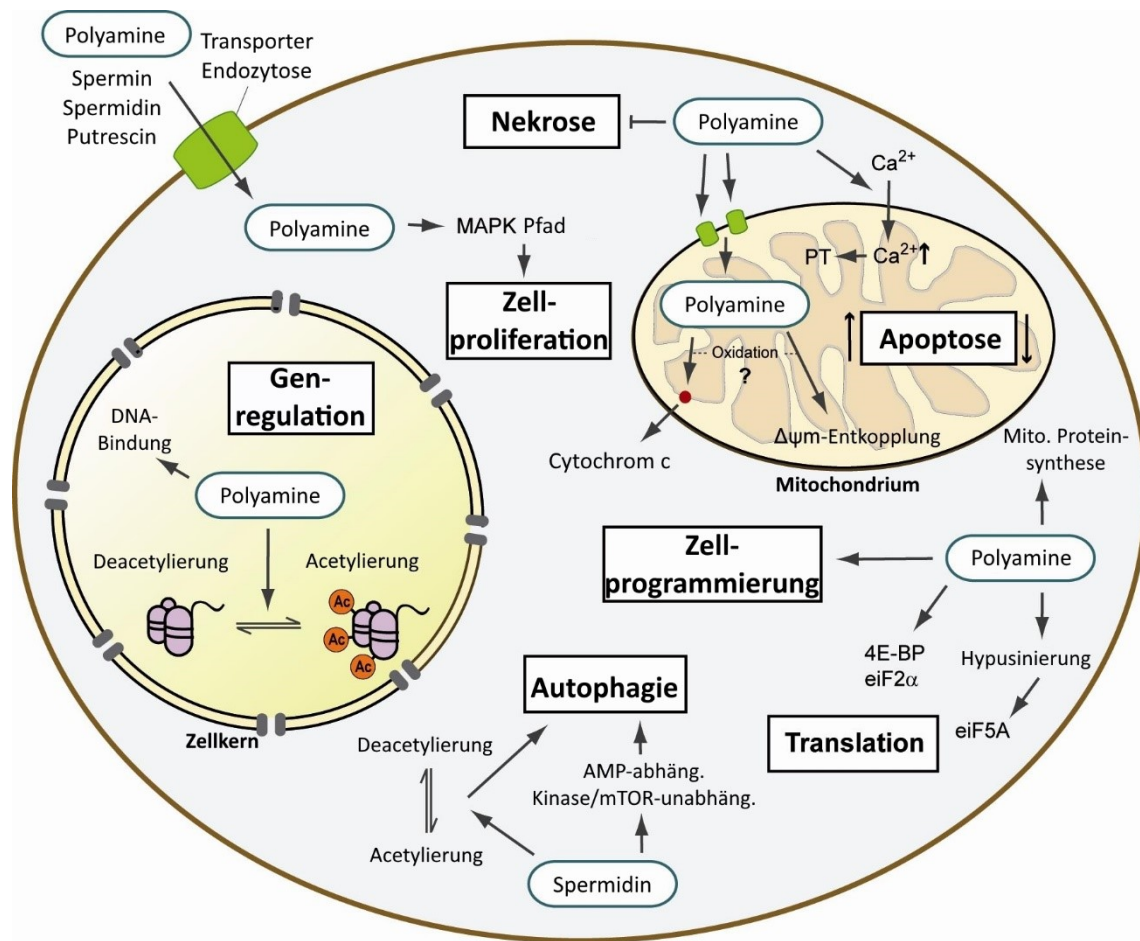


Abbildung 6: Zelluläre Mechanismen der Polyamine im Überblick. Polyamine wirken auf verschiedene Prozesse in Zytoplasma, Zellkern und Mitochondrien. Dazu zählen Zellproliferation und Zelltod (Stimulation der Apoptose, Hemmung der Nekrose), Genregulation und Proteinsynthese (Transkription sowie Translation), Zellprogrammierung und Autophagie. MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, PT: *permeability transition*; $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential. Abbildung modifiziert nach Minois et al. (2011).

1.2.3 Interaktion von Spermidin/Polyaminen mit den NO-Synthasen

In der Literatur sind unterschiedliche, teils kontroverse Effekte der Interaktion von Polyaminen mit den NO-Synthasen (NOS) beschrieben. So wurde in einer der ersten Studien festgehalten, dass Spermin, Spermidin und Putrescin in absteigender Reihenfolge eine hemmende Wirkung auf die NOS in Zytosolpräparaten des Cerebellum von Ratten besitzen (Hu et al. 1994). In weiteren Experimenten mit aus menschlichen Thrombozyten und cerebellärem Gewebe von Ratten extrahierter NOS zeigte sich eine Hemmung durch Spermin und Spermidin, jedoch eine Aktivierung durch Putrescin (Das und Khan 1995). Die Stärke des Effektes zeigte sich dabei jeweils dosisabhängig im Konzentrationsbereich von 10nM bis 1000nM. Auch eine weiterführende Studie

derselben Autoren mit extrahierter NOS aus cerebellärem und kortikalem neuronalen Gewebe bestätigte diesen Trend (Das und Khan 1996): Es zeigte sich bei den cerebellären Präparaten eine dosisabhängige Hemmung durch Spermin, zudem eine dosisunabhängige Aktivierung durch Putrescin. Spermidin zeigte keine signifikanten Auswirkungen. Die Zielkonzentrationen lagen hierbei im Bereich zwischen 1 μ M und 100 μ M. Interessanterweise waren an den kortikalen Präparaten keinerlei Effekte der drei Polyamine nachweisbar.

Im Widerspruch zu den genannten Ergebnissen zeigten Guerra et al. (2006), dass injiziertes Spermidin in das Hippocampus-Areal von Ratten die lokale NO-Produktion stimuliert. Gleichzeitig ist der Effekt unter Zugabe eines nicht-selektiven NOS-Inhibitors (L-NAME) hemmbar. Daraus lässt sich schließen, dass Spermidin die NO-Synthese aktiviert. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass eine 4-wöchige orale Spermidingabe bei alternden Ratten eine gesteigerte Endothelfunktion im Sinne einer gesteigerten Endothel-abhängigen Dilatation (EDD) der Arterien zur Folge hat (LaRocca et al. 2013). Für diesen Effekt zeigte sich der durch NO medierte Anteil an der Gesamtdilatation maßgeblich, sodass eine erhöhte NO-Verfügbarkeit durch erhöhte Spermidinkonzentration im Endothel verantwortlich gemacht wurde.

1.3 Stickstoffmonoxid

1.3.1 NO und kardiovaskuläre Physiologie

NO stellt ein ubiquitär vorkommendes und bioaktives Molekül für eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen im menschlichen Körper dar (Forstermann und Sessa 2012). So spielt es z.B. eine zentrale Rolle bei der Gefäßdilatation, bei Immunreaktionen und als Neurotransmitter. Bei NO handelt es sich um ein freies Radikal mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von lediglich 2 - 3 Sekunden. Die Produktion von NO erfolgt durch drei verschiedene NO-Synthasen (NOS): die neuronale NOS (nNOS oder NOS1), die induzierbare NOS (iNOS oder NOS2) und die endotheliale NOS (eNOS oder NOS3). Alle NOS-Isoformen katalysieren die NO-Produktion aus L-Arginin, dem einzigen Substrat für die NO-Synthese. Dazu werden Sauerstoff (O_2) und reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat als Cosubstrate benötigt. Flavin-Adenin-Dinukleotid,

Flavinmononukleotid und 5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin stellen weitere Cofaktoren dar. (Forstermann und Sessa 2012)

Für die NO-Produktion in Gefäßen ist vor allem die eNOS, die im Endothel exprimiert wird, verantwortlich (Forstermann und Sessa 2012). Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Blutdruckregulation, zudem bedingt sie weitere vasoprotektive und anti-atherosklerotische Effekte. Die nNOS befindet sich hingegen überwiegend in der glatten Muskulatur der Gefäßwand und ist ebenfalls für eine basale Dilatation verantwortlich. Die iNOS wird dagegen nicht konstitutiv exprimiert, eine Hochregulation erfolgt nur pathologisch bei z.B. inflammatorischen Prozessen der Gefäßwand zur Abwehr von Bakterien (unspezifische Immunreaktion). (Forstermann und Sessa 2012)

Wichtigster Signalweg für die eNOS-vermittelte Vasodilatation ist der L-Arginin – eNOS – cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) – Phosphodiesterase 5 Signalweg (Bauer und Sotnikova 2010): NO diffundiert durch die Plasmamembran der glatten Gefäßmuskelzellen und bindet an die Häm-Gruppe der löslichen Guanylylcyclase. Das so aktivierte Enzym produziert cGMP aus Guanosin triphosphat, welches wiederum die Proteinkinase G (PKG) aktiviert. Letztere phosphoryliert eine Reihe weiterer Proteine die an der Regulation des Ca^{2+} -Haushaltes beteiligt sind. Es resultiert eine verminderte Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol und damit einhergehend eine verminderte Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur.

Auch im Herzen sind eNOS und nNOS konstitutiv exprimiert, während die Expression der iNOS nur durch Entzündungsmediatoren induziert wird (Villanueva und Giulivi 2010). Beide Isoformen - eNOS und nNOS - erfüllen dabei unterschiedliche Aufgaben bzw. haben spezifische Effekte. Ursächlich hierfür ist vor allem die subzelluläre Lokalisation: während die eNOS vorwiegend in den Caveolae der Kardiomyozyten aufzufinden ist, befindet sich die nNOS in der Nähe des sarkoplasmatischen Retikulums (SR). So bestehen z.B. gegensätzliche Effekte auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und damit einhergehend auf die Kontraktilität des Myokards. Während eNOS den Kalziumeinstrom inhibiert, fördert die nNOS die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Verantwortlich hierfür scheint die lokalisationsspezifische, unterschiedliche Interaktion von eNOS mit Caveolin-3

und nNOS mit kardialen Ryanodin-Rezeptoren (Typ 2). Die nNOS scheint hierbei insgesamt betrachtet die wichtigste Isoform darzustellen, so ist sie für die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase, Kontraktion und Relaxation der Myozyten von zentraler Bedeutung (Zhang et al. 2014; Zhang 2016).

1.3.2 NO und kardiovaskuläre Pathophysiologie

Unbestritten ist, dass NO eine zentrale Rolle bei pathophysiologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems spielt. Insbesondere die Hypertonie ist mit Veränderungen der physiologischen NO-Produktion und -Funktion assoziiert. Bislang nicht eindeutig geklärt werden konnte dabei allerdings die Frage, ob diese Veränderungen von physiologischen Abläufen grundlegend die Hypertonie verursachen, oder ob sie selbst durch Hypertonie assoziierte, multiple zelluläre Anomalien hervorgerufen werden (Bohlen 2015).

Patienten mit einer manifesten Gefäßerkrankung und/oder kardiovaskulären Risikofaktoren (Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes Mellitus Typ 2, Rauchen etc.) weisen eine endotheliale Dysfunktion auf (Forstermann und Sessa 2012). Dies bedeutet, dass das Endothel nicht in der Lage ist, eine adäquate Menge an NO zu produzieren, was wiederum eine verminderte NO-vermittelte Vasodilatation zur Folge hat. Ursache hierfür ist die vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Endothel, welche zum einen eine Degradierung bzw. Inaktivierung der eNOS bewirken. Zum anderen erfolgt teilweise wiederum eine Umwandlung der eNOS in ein ROS-produzierendes Enzym (sog. eNOS-Entkopplung). Auch findet sich in atherosklerotischem Plaque eine erhöhte iNOS Expression. Gleichzeitig ist die iNOS-Expression ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese des Blutdruckabfalls bei Patienten mit septischem Schock. (Forstermann und Sessa 2012)

Im Herzen führt die reduzierte Anzahl an bioaktiver eNOS zu verminderter NO-Produktion und assoziierter Verschlechterung von Hypertonie-assoziierten pathologischen Veränderungen wie Hypertrophie, Fibrose, Arrhythmien, Myokardinfarkt und Herzversagen (Zhang et al. 2014; Zhang 2016). Interessanterweise zeigt sich gleichzeitig bei Hypertonie-Patienten eine verstärkte Expression und Aktivierung der nNOS im Myokard. Diese stellt unter anderem über Inhibierung der ROS-Produktion und positive Lusitropie (Steigerung der

Relaxationsfähigkeit) eine Art kompensatorischen Schutzmechanismus dar, das sog. myokardiale *Remodeling* (Umbauprozess des Myokards) wird unterdrückt. Zudem scheint hierfür auch die subzelluläre Translokation der nNOS vom SR zum Plasmalemma und damit einhergehender veränderter Funktion eine Rolle zu spielen. (Zhang et al. 2014; Zhang 2016)

1.4 Hypothesen

Eisenberg et al. (2016) konnten zeigen, dass die orale Verabreichung von mit 3mM Spermidin angereichertem Trinkwasser einen signifikanten Anstieg sowohl der Argininkonzentration im Plasma als auch des L-Arginin-Bioverfügbarkeitsverhältnis (*global arginine bioavailability ratio*; GABR) von salzsensitiven Dahl-Ratten bewirkt. Das GABR berechnet sich aus dem Verhältnis von L-Arginin zu L-Ornithin plus Citrullin und stellt einen wichtigen Marker für den Anteil frei verfügbaren L-Arginins als Kapazität für die NO-Synthese dar, so ist ein gesteigertes GABR mit einem verminderten kardiovaskulären Risiko assoziiert (Tang et al. 2009). Gleichzeitig war dieser Effekt mit einer um 4 Wochen verzögerten Progression des mittleren systemischen arteriellen Blutdruckes und einem reduzierten elastischen Widerstand der Arterien assoziiert.

Auch zeigte sich eine verbesserte linksventrikuläre diastolische Funktion, einhergehend mit einer gesteigerten Phosphorylierung des „elastischen“ Proteins Titin. Dieses ist als Teil des kardialen Sarkomers wesentlich für die Elastizität des Myokards verantwortlich (LeWinter und Granzier 2010; Linke und Hamdani 2014). Konsequenz der Phosphorylierung ist wiederum eine Verminderung der durch das kardiale Titin bedingten passiven Steifigkeit der Kardiomyozyten (Borbely et al. 2009). Als eine der wichtigsten Kinasen für diesen Schritt konnte die PKG identifiziert werden (Kruger et al. 2009), was eine zentrale Bedeutung des durch NO medierten Stoffwechselweges über cGMP impliziert.

Aus diesen Erkenntnissen leitet sich die grundlegende Hypothese dieser Arbeit ab: Die kardioprotektiven Effekte des Polyamins Spermidin beruhen neben den Autophagie-abhängigen Mechanismen auch auf einem weiteren Mechanismus, der Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO in Endothel und Kardiomyozyten.

Im dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

- I. Orale Spermidingabe verbessert die NO-abhängige Endothelfunktion und damit die Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta von salzsensitiven Dahl-Ratten
- II. Unmittelbare Spermidingabe erhöht die NO-Produktion in isolierten ventrikulären Kardiomyozyten von C57BL6 Wildtyp-Mäusen

Eine erhöhte NO-Produktion in Kardiomyozyten könnte zum einen durch direkte Effekte des Spermidins auf die NOS vermittelt sein. Zum anderen könnten die Effekte aber auch durch eine erhöhte Bioverfügbarkeit von L-Arginin zustande kommen. L-Arginin ist hierbei insofern von Bedeutung, da es sowohl als (einziges) Substrat für die NOS dient (Palmer et al. 1988), gleichzeitig aber auch im Polyamin-Stoffwechsel als Vorstufe von Spermidin eine zentrale Rolle spielt (siehe Abbildung 5). Chen und Sanders (1991) konnten zeigen, dass eine exogene Zufuhr von L-Arginin bei salzsensitiven Dahl-Ratten eine Steigerung der NO Synthese bewirkt, was einen antihypertensiven Effekt zur Folge hat. Gleichzeitig ist bei chronischem Herz- und Nierenversagen auch der L-Arginin-Transport in die Zellen erhöht (Mendes Ribeiro et al. 2001).

Hypothetisch hemmt exogen zugeführtes Spermidin durch einen negativen Feedback-Mechanismus die endogene Polyaminsynthese und erhöht somit die Bioverfügbarkeit von L-Arginin, welches wiederum als Substrat für die NO-Produktion zur Verfügung steht (Abbildung 7).

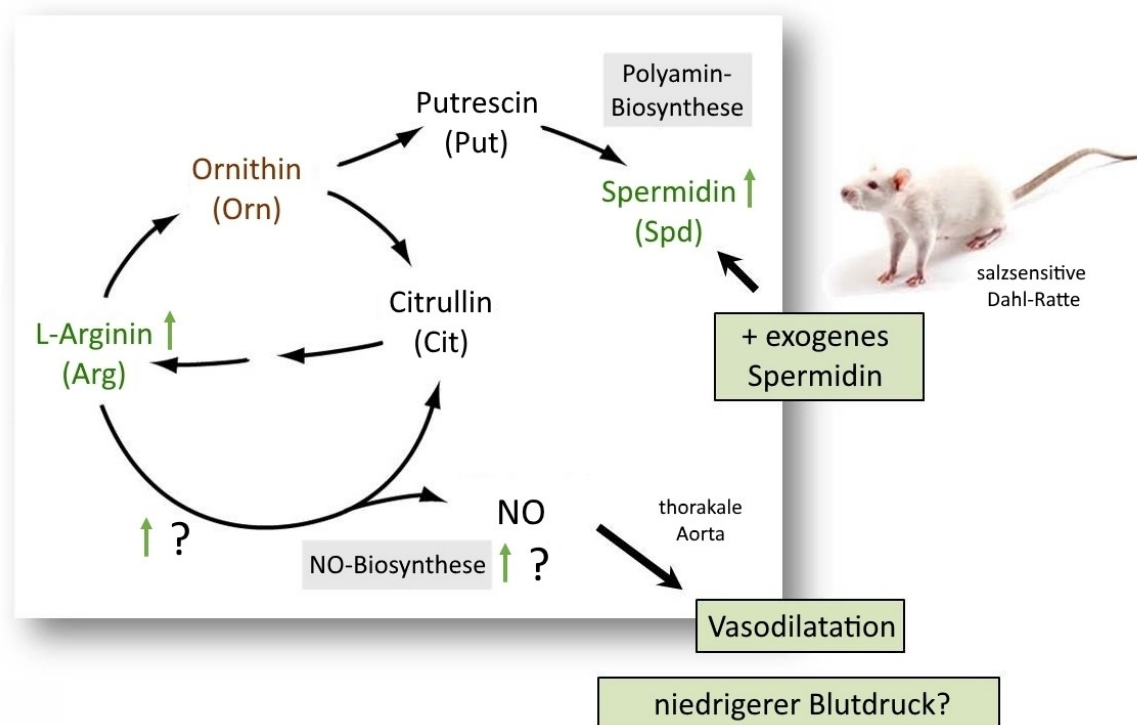


Abbildung 7: Polyamin-Metabolismus und NO-Produktion bei exogener Spermidinzufuhr: Vereinfachte Darstellung der Arbeitshypothese. Grün: Effekte der exogenen Spermidinzufuhr. Exogene Zufuhr von Spermidin führt durch einen negativen Feedback-Mechanismus zu intrazellulärer Erhöhung der L-Argininkonzentration. Hypothetisch führt diese erhöhte Bioverfügbarkeit des Substrates L-Arginin zu gesteigerter NO-Produktion und Vasodilatation.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Die endothelialen Funktionsmessungen wurden an thorakalen Aorten von salzsensitiven Dahl-Ratten (Charles River Laboratories®, USA) durchgeführt. Die Tiere wurden im Alter von 4 Wochen erworben. Es wurden nur männliche Ratten verwendet, um Östrogen-abhängige phänotypische Variationen zu vermeiden.

Salzsensitive Dahl-Ratten weisen eine genetisch bedingte Salzsensitivität auf und entwickeln unter Verabreichung einer natriumreichen Diät eine Hypertonie (Rapp 1982; Ni et al. 1999). Ursache ist eine angeborene renale Dysfunktion: Der Blutdruckanstieg bei salzsensitiven Dahl-Ratten unter salzreicher Diät wird durch ein vermindertes renales Ansprechen auf das atriale natriuretische Peptid (ANP) ausgelöst (Simchon et al. 1989; Simchon et al. 1991). Als Konsequenz ergibt sich eine verminderte Natrium- und - osmotisch folgend - Wasserausscheidung durch die Niere. Dies führt zu einem erhöhten Blutvolumen (sog. *volume overload*) und in Folge zu einer erhöhten Pumpbelastung des Herzens mit einem erhöhten kardialen Auswurf. Gleichzeitig besteht bzw. entwickelt sich zusätzlich auch ein erhöhter Gefäßwiderstand, sowohl in peripheren als auch in renalen Gefäßen. In Kombination führen diese Faktoren zur Ausbildung einer manifesten Hypertonie. (Simchon et al. 1989; Simchon et al. 1991)

Auch beim Menschen ist das Phänomen der salzsensitiven Hypertonie bekannt. Bei dieser entsprechenden Gruppe der Hypertonie-Patienten reagiert der arterielle Blutdruck sehr sensitiv auf eine veränderte bzw. erhöhte Natriumaufnahme. Daher stellen die Tiere allgemein ein klinisch relevantes Modell zur Erforschung der Pathomechanismen der Hypertonie und ihrer Folgeerscheinungen dar. Im Speziellen handelt es sich unter anderem um ein Tiermodell für die hypertensiv-bedingte linksventrikuläre Hypertrophie und systolisches sowie diastolisches Herzversagen (Doi et al. 2000; Qu et al. 2000; Klotz et al. 2006).

Ni et al. (1999) konnten zeigen, dass die genannten pathologischen Veränderungen mit signifikanten Veränderungen der NOS-Expression und -Aktivität in verschiedenen Geweben einhergehen. So zeigte sich in der Aorta von salzsensitiven Dahl-Ratten unter salzreicher Diät eine verminderte eNOS-

Expression. Gleichzeitig war die gesamte NOS-Aktivität gegenüber den salzresistenten Dahl-Ratten der Kontrollgruppe bereits unter regulärer Diät vermindert, die salzreiche Diät führte zu einem starken Abfall der Aktivität in beiden Gruppen, der jedoch wiederum bei den salzsensitiven Dahl-Ratten stärker ausfiel. Im Herzen zeigte sich dagegen eine leicht erhöhte eNOS-Expression bei salzsensitiven Dahl-Ratten unter salzreicher Diät. In beiden Organen zeigte sich zudem eine im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte iNOS-Expression. Die Expression der nNOS im Gehirn der salzsensitiven Dahl-Ratten war signifikant gegenüber derer bei den salzresistenten Dahl-Ratten erhöht. (Ni et al. 1999)

Das Ausmaß und die Genese der Hypertrophie bei salzsensitiven Dahl-Ratten hängt von der Menge des Kochsalzes (NaCl) im Futter und vom Zeitpunkt der Umstellung auf eine salzreiche Diät ab. Während der kontinuierlichen Gabe von 8% NaCl im Futter entwickelt sich innerhalb von 4 – 5 Wochen eine konzentrische und kompensierte linksventrikuläre Hypertrophie mit erhaltener Auswurfraction (Abbildung 8). Nach weiteren 6 – 8 Wochen kommt es zur exzentrischen Hypertrophie, die zur linksventrikulären Dilatation und Herzinsuffizienz führt (Doi et al. 2000; Qu et al. 2000; Klotz et al. 2006).

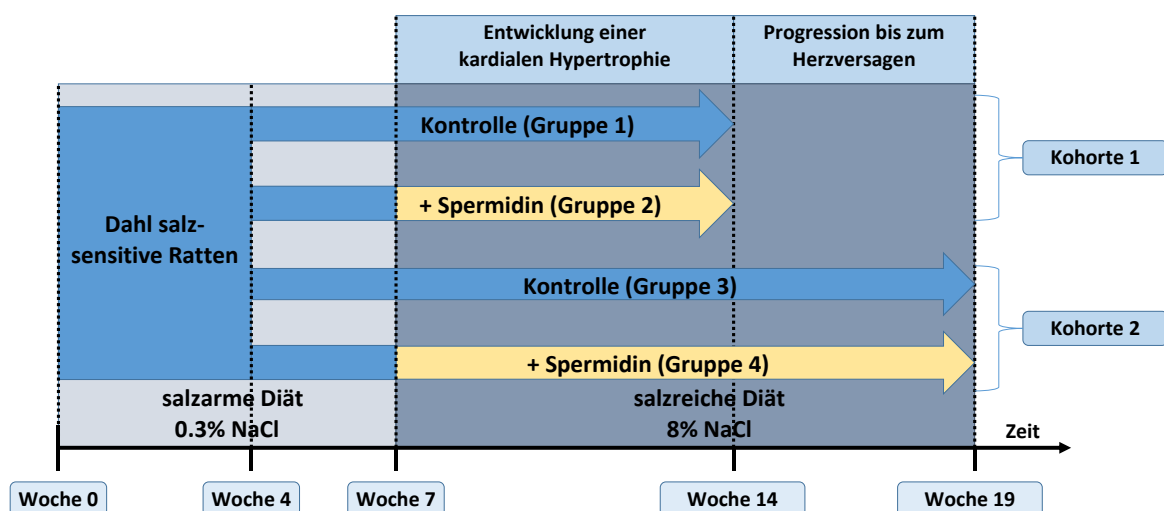


Abbildung 8: Versuchsplan mit Fütterungsschema und Gruppeneinteilung der salzsensitiven Dahl-Ratten

Das Fütterungsschema und der Ratten-Versuchsplan sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Tiere wurden randomisiert in zwei Kohorten unterteilt, von denen jeweils eine Gruppe mit 3mM Spermidin angereichertes Trinkwasser erhielt (Gruppe 2 und 4), während die jeweilige Kontrollgruppe lediglich normales Trinkwasser zur Verfügung gestellt bekam (Gruppe 1 und 3). Für alle Tiere bestand uneingeschränkter Zugang (*ad libitum*) zu Trinkwasser und Nahrung. Während der ersten zwei Wochen (Eingewöhnungszeit) wurde den Tieren 0,3% NaCl salzarmes Futter (AIN-76A, Research Diet Inc., USA) verabreicht. Ab der 7. Lebenswoche wurde die Ernährung dann auf 8% NaCl salzreiches Futter (AIN-76A, Research Diet Inc., USA) umgestellt um eine Hypertonie zu induzieren. Insgesamt wurden 48 Tiere auf zwei Kohorten aufgeteilt, die jeweils aus 12 Tieren der Gruppe 1 bzw. 3 und 12 Tieren der Gruppe 2 bzw. 4 bestanden. Die Versuche wurden zu zwei verschiedenen Endpunkten durchgeführt: 14 Wochen (Kohorte 1) und 19 Wochen (Kohorte 2).

Für die Messung der NO-Produktion in isolierten Kardiomyozyten wurden sowohl männliche als auch weibliche Wildtyp-Mäuse der Linie C57BL/6 im Alter von 14 – 26 Wochen verwendet.

Alle Tiere waren unter Quarantäne im Tierlabor des Instituts für Biomedizinische Forschung der Medizinischen Universität Graz untergebracht. Zur Simulation des Tag-/Nacht-Wechsels wurde im 12-Stunden Rhythmus das Licht an- bzw. ausgeschaltet. Die Tierversuche wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWF-66.010/0161/II/3b/2012).

2.2 Isolation der Aorta

Die Isolation der thorakalen Aorta erfolgte direkt nach dem terminalen hämodynamischen Versuch - das Tier war zu diesem Zeitpunkt bereits tot, der Thorax eröffnet und das Herz sowie die Lunge entnommen. Die Entnahme erfolgte in folgenden Schritten:

1. Reinigen der Thoraxhöhle von Blutkoagulum mithilfe von Tupfern zur besseren Darstellung der Aorta
2. Auffinden und Greifen des eröffneten Gefäßstumpfes der *Aorta ascendens*

3. Freipräparieren des Gefäßstranges von der hinteren Thoraxwand auf gesamter Länge bis zum *Hiatus aortae*
4. Durchtrennung des Gefäßes cranial des Durchtrittes durch den *Hiatus*.

Es war darauf zu achten, das Gefäß nicht zu verletzen und die thorakale Aorta in voller Länge zu gewinnen. Die Entnahme musste in möglichst kurzer Zeit erfolgen um das Gefäß in Hinblick auf die andauernde Hypoxie zu schonen. Auch Luftembolien im Gefäßlumen waren tunlichst zu vermeiden um das Endothel nicht zu schädigen. Abschließend wurde die Aorta in ein zuvor auf Eis bereitgestelltes Gefäß mit Krebs-Henseleit Puffer übertragen. Da es sich bei diesem Puffer um ein Bicarbonat-System handelt, wurde dieser jeweils frisch mit Oxymix (95% O₂, 5% CO₂) versetzt um den gewünschten pH-Wert von 7,46 zu gewährleisten.

Um diverse äußere Einflüsse auf die Messungen zu vermeiden war das Gefäß von perivaskulärem Fett- und Bindegewebe zu befreien. Hierzu wurde die Aorta in einer Petrischale im Pufferbad freipräpariert (Abbildung 9). Anschließend wurden ca. 4-5 mm große Aortenringe aus dem deszendierenden Teil der thorakalen Aorta geschnitten. Der *Arcus aorticus* sowie der distale Teil der Aorta wurden entfernt, da diese während der Präparation Manipulationen durch die Pinzette ausgesetzt waren.

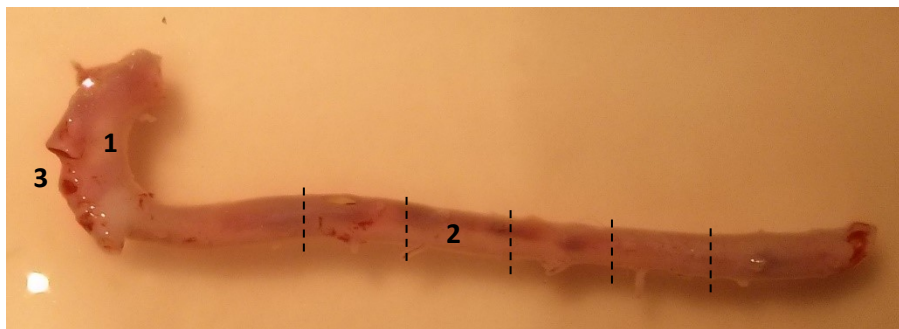


Abbildung 9: Thorakale Rattenaorta, freipräpariert. Ansicht von dorsal: Aortenbogen (1), deszendierender Teil der thorakalen Aorta (2), Gefäßabgänge am Aortenbogen (3). Gestrichelte Linien markieren beispielhaft die Schnittführung.

2.3 Endotheliale Funktionsmessung an Rattenaorten

Um die endotheliale Funktionsmessung an der Aorta durchzuführen wurde das Tissue Bath System Graz (Harvard Apparatus, USA) verwendet, eine Myograph,

welcher die Kontraktionskraft von Gefäßringen oder anderen Muskelpräparaten misst. In Abbildung 10 ist der Messplatz im Überblick dargestellt.

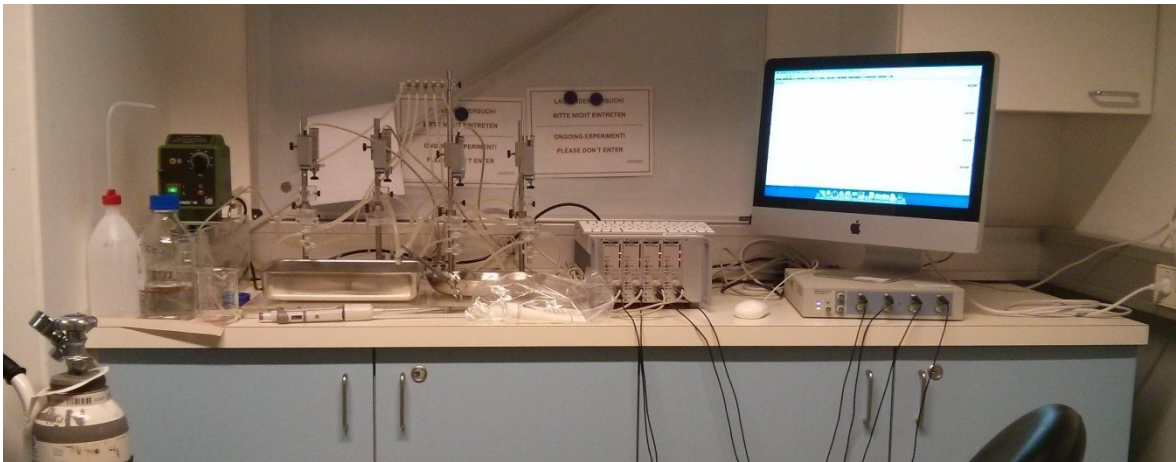


Abbildung 10: Messplatz.

Die Apparatur besteht aus insgesamt 4 Glasgefäßen mit einem jeweiligen Volumen von 5 ml, welche zur Aufnahme eines Puffers und des zu messenden Gewebe-/Gefäßstückes dienen (siehe Abbildung 11).

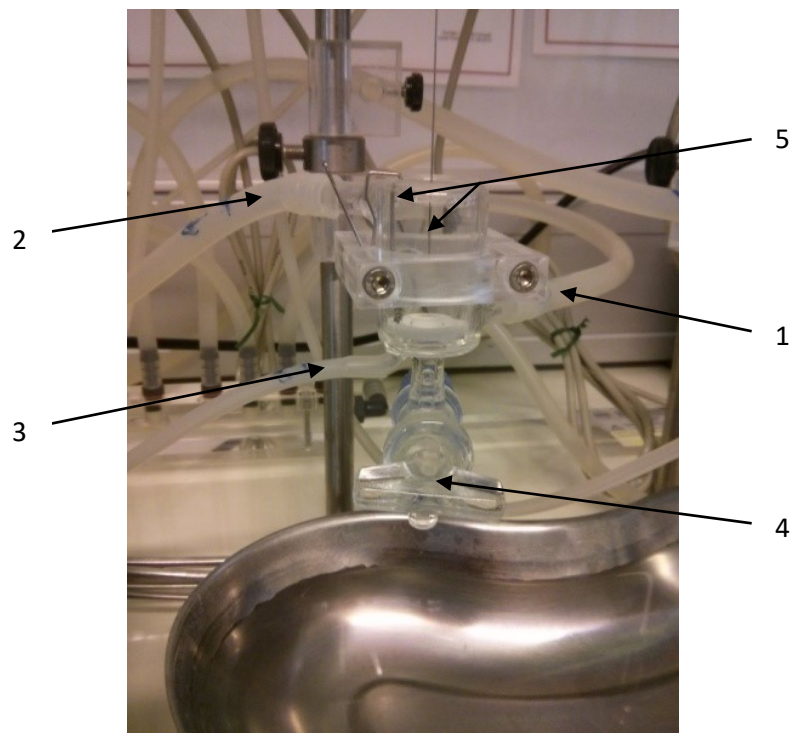


Abbildung 11: Vorrichtung zur Aufnahme eines Aortenringes. Schläuche für Wasserzulauf (1), Wasserablauf (2) und Gaszufuhr (3) sowie Ablassventil (4) und Metallhäkchen, die das Gefäß tragen (5).

Die Gefäßringe sind auf 2 kleine Metallhaken aufgefädelt, wovon jeweils einer am Glasgefäß sowie einer am Kraftaufnehmer befestigt ist. Dieser misst mechanisch die auf ihn wirkenden Zugkräfte und wandelt sie in ein elektronisches Signal um, welches noch verstärkt und schließlich am PC über eine zugehörige Software in Form eines grafischen Signals ausgegeben wird (Abbildung 12).

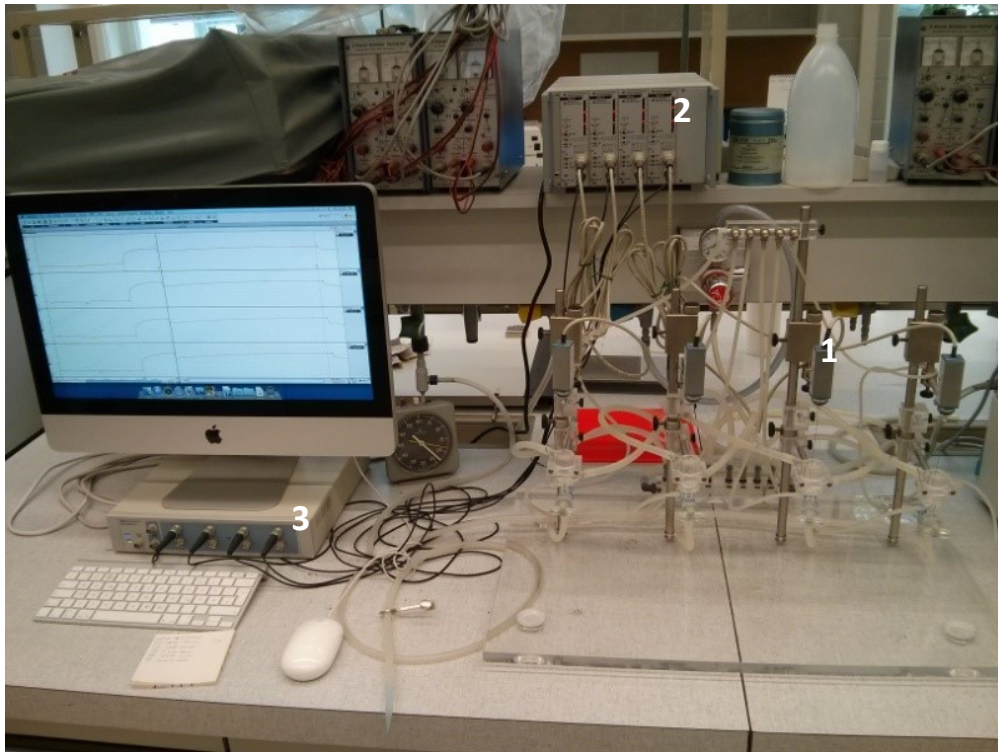


Abbildung 12: Organbad mit Signalumwandler (1), Verstärker (2) und Steuereinheit (3).

Zur Vorbereitung wurden die 4 Glasgefäße des Myographen mit Krebs-Henseleit Puffer (siehe 2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 1) befüllt und anschließend die 4 Aortenringe jeweils auf zwei Häkchen aufgefädelt und eingehängt. Eines der Häkchen wurde an das Glasgefäß geklemmt, das zweite wurde wiederum an dem Kraftaufnehmer befestigt. Die Gefäßpräparate wurden kontinuierlich bei 37°C perfundiert.

Der erste Teil des Versuches diente der Relaxation des Gefäßes, um für die anschließende Messung einen konstanten Gefäßtonus als Ausgangsbasis heranziehen zu können. Über eine Stellschraube am jeweiligen Kraftaufnehmer

wurde die Vorspannung der aufgefädelten Aortenringe auf 2g (entsprechend 19,61mN) eingestellt. Weiter wurde die Vorspannung von Zeit zu Zeit angepasst, da die Gefäße stetig relaxierten. Dieser Effekt war anfangs stärker ausgeprägt, nahm aber nach und nach ab bis der Gefäßtonus nach ca. einer Stunde zunehmend konstant blieb.

Abbildung 13 verdeutlicht die folgenden Schritte anhand der zugehörigen, aufgezeichneten Kontraktionskurve einer Messung. Zuerst wurde eine Pufferlösung mit 100mM Kaliumkonzentration (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 2) hinzugegeben, was einen Kontraktionsanstieg im Gefäß bewirkte. Eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration bewirkt die Depolarisation von glatten Muskelzellen und führt zur Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle (Cauvin et al. 1983; Loutzenhiser et al. 1989), zudem erhöht es die Ca^{2+} -Sensitivität der glatten Muskulatur (Ratz et al. 2005). Ziel war es, das Gefäß zu sensibilisieren und ein Kontraktionsniveau zu erzeugen, das zur Normierung der späteren Messung diente. Am maximalen Ausschlag wurde die erhöhte Kaliumkonzentration wiederum mit dem Krebs-Henseleit Puffer (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 1) ausgewaschen. Diese Prozedur wurde dreimal hintereinander durchgeführt, wobei der Ausschlag von Mal zu Mal anstieg beziehungsweise im optimalen Fall beim dritten Mal das gleiche Niveau erreichte wie beim zweiten. Eben dieses steigende Kontraktionsmaximum bei gleicher Kaliumkonzentration war der Grund für die wiederholte Durchführung und lässt sich damit erklären, dass das Gefäß zu Beginn noch nicht die volle Kontraktionskraft entfalten kann sondern erst sensibilisiert werden muss. Der dritte bzw. höchste Ausschlag wurde schließlich als Normwert herangezogen.

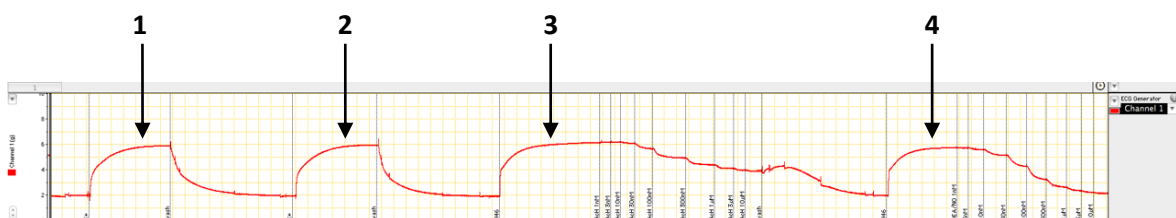


Abbildung 13: Kontraktionskurve einer vollständigen Messung im Überblick. Kalium-induzierte Kontraktion (1+2), U46-induzierte Kontraktion mit nachfolgender Gabe von Acetylcholin (3) und DEA/NO (4).

Nun folgte die eigentliche Messung (Abbildung 14): eine Kontraktion des Gefäßes wurde mit 50nM U46,619 (kurz: U46, Prostaglandinderivat, Thromboxan A2 Analogon) herbeigeführt. U46 bindet an membranständige Thromboxan-Rezeptoren von glatten Muskelzellen der Gefäßwand und bewirkt über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehaltes eine Kontraktion (Bolla et al. 2002; Huang 2004; Nakahata 2008). Anschließend wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe Acetylcholin hinzu pipettiert (1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM). Dieses bewirkte die Endothel-vermittelte Relaxation des Gefäßes, deren Gesamtausmaß den wichtigsten Messwert darstellte. Acetylcholin bindet an muskarinische Acetylcholinrezeptoren in der Endothelzellmembran und bewirkt über einen gesteigerten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle eine Aktivierung der NOS (Behrends et al. 2017). Anhand der hierdurch ausgelösten NO-vermittelten Relaxation des Gefäßes lassen sich direkte Rückschlüsse auf das Ausmaß der endothelialen NO-Produktion ziehen. Der Effekt von Acetylcholin lässt sich durch NOS-Inhibitoren nahezu vollständig hemmen, was eine hohe NO-Spezifität impliziert (Moore et al. 1990; Rees et al. 1990). Pipettiert wurde jeweils, wenn im Kurvenverlauf ein „steady state“ Effekt einer hinzugegebenen AcetylcholinKonzentration erreicht war.

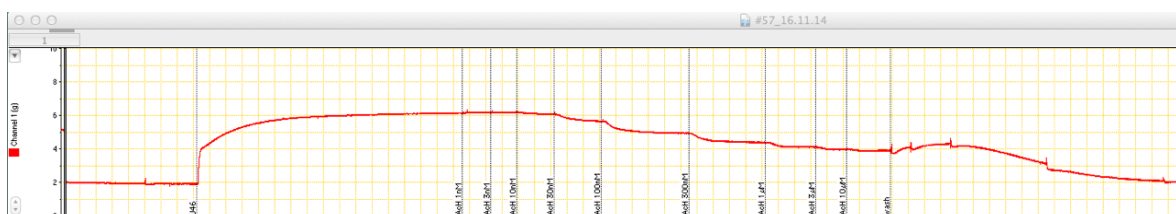


Abbildung 14: U46-induzierte Kontraktion mit nachfolgender Relaxierung durch Acetylcholingabe. Vertikale Linien markieren den Zeitpunkt der Zugabe von Reagenzien (von links nach rechts: 50nM U46; 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μM , 3 μM , 10 μM Acetylcholin).

Abschließend wurden sämtliche Chemikalien abermals mit Krebs-Henseleit Puffer ausgewaschen bevor der letzte Schritt begann. Dieser stellte eine Positivkontrolle dar, geprüft wurde die Reaktion der Gefäßmuskelzellen auf exogenes NO. Hierzu wurde das Gefäß abermals mit 50nM U46,619 vorkontrahiert, es folgte die Hinzugabe einer aufsteigenden Konzentrationsreihe (1nM, 3nM, 10nM, 30nM,

100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M) von Diethylamin NONOat (DEA/NO), einem spontan-dissoziierenden NO-Donor (Abbildung 15).

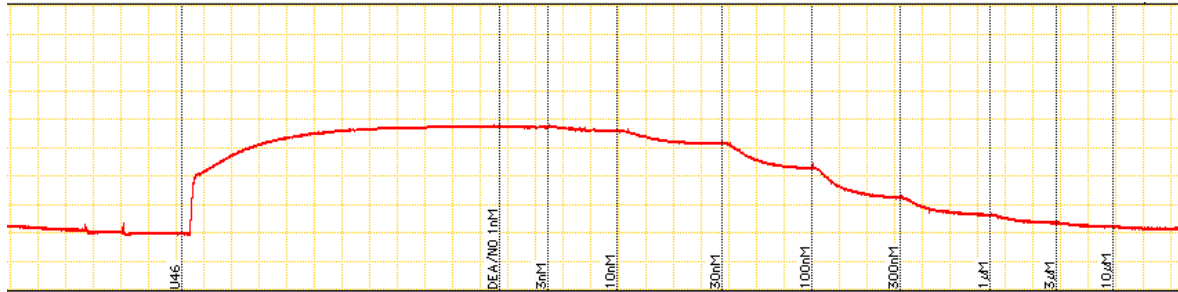


Abbildung 15: U46-induzierte Kontraktion mit nachfolgender Relaxierung durch DEA/NO-Gabe. Vertikale Linien markieren den Zeitpunkt der Zugabe von Reagenzien (von links nach rechts: 50nM U46; 1nM, 3nM, 10nM, 30nM, 100nM, 300nM, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M DEA/NO).

2.4 Isolation des Herzens von der Maus und Zellisolation

Die Mäuse wurden mit Isofluran (Baxter, Deutschland) anästhesiert und anschließend heparinisiert (50 Internationale Einheiten (IE), intraperitoneal injiziert). Danach wurde aufgrund des verzögerten Wirkungseintrittes 10 Minuten gewartet. Dann wurde das Tier erneut mit Isofluran narkotisiert und per Genickbruch getötet. Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend an allen vier Extremitäten fixiert, die Haut mit einer chirurgischen Pinzette oberhalb des Nabels angehoben und entfernt. Nun wurde das Abdomen unterhalb des Sternums mit einem Schnitt eröffnet. Ausgehend von diesem wurde unter ständiger Fixierung und Anhebung des Sternums das Diaphragma durchtrennt und so der Thorax eröffnet. Die weiteren Schnitte wurden jeweils in Richtung lateral und dann auf der vorderen bis mittleren Axillarlinie bis an die vorderen Extremitäten gesetzt. Die vordere Thoraxwand konnte nun nach kranial geklappt werden und wurde dort unter Zug fixiert. Die freiliegenden Gefäßstämme des Herzens wurden mit einer anatomischen Pinzette gefasst und unmittelbar unter der Pinzette mit einer Schere durchtrennt. Das Herz wurde in ein bereitstehendes Becherglas mit Kanülierungslösung (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 6) gegeben.

Die Isolation von Kardiomyozyten erfolgte mittels Langendorff-Technik (Bell et al. 2011). Erster Schritt war die Kanülierung des Herzens. Dazu wurde das zuvor

extrahierte Herz in eine Petrischale mit eisgekühlter Kanülierungslösung (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 6) gegeben. Die bereits vorbereitete Langendorff-Apparatur bestand zudem aus einer mit Kanülierungslösung gefüllten Spritze mit Kanüle. Ein doppelt geknoteter Faden (Prolene®, Ethicon Inc., USA) der Stärke 5-0 war am Schaft der Kanüle vorgelegt. Die Aorta wurde nun unter dem Stereomikroskop gefasst und auf die stumpfe Kanüle gefädelt. Aufgrund der anatomischen Lage der Abgänge der Koronargefäße konnte so eine Perfusion gewährleistet werden. Nach dem Fixieren der Aorta mit dem vorgelegten Faden an der Einkerbung der Kanüle wurde das Herz mit Kanülierungslösung gespült. Dabei konnte man beobachten, wie die zuvor blutgefüllten Koronarien ohne Verzögerung aufklarten.

Als nächstes wurde das Herz mitsamt der Kanüle an das Langendorff-Setup angeschlossen und die Perfusion mit einer Geschwindigkeit von 3ml/min bei 37°C eingeschaltet. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen in der Kanüle oder dem zuführenden Röhrchen des Setups befanden um eine Luftembolie zu verhindern. Perfundiert wurde zuerst 3 Minuten mit Perfusionspuffer (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 4), anschließend 7 Minuten mit der Verdauungslösung (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 6). Um die Temperatur konstant bei 37°C zu halten wurde das das Herz umgebende Gefäß der Apparatur mit Alufolie abgedeckt. Nach 10 Minuten wurde das Herz von der Kanüle entfernt indem es unterhalb der beiden Vorhöfe durchtrennt wurde. Die beiden Ventrikel wurden mit einem Stopp-Lösung (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 6) enthaltenden Becherglas aufgefangen, mit weiteren Schnitten zertrennt und anschließend mithilfe von Pasteurpipetten mit unterschiedlich großer Einlassöffnung durch langsames auf- und abpipettieren mechanisch dissoziiert. Dann wurde die Zellsuspension durch Nylongaze filtriert um die unverdauten Gewebsreste zu entfernen. Nach 10 bis 15 Minuten, die dem Absetzen der ventrikulären Kardiomyozyten und der Ausbildung eines Pellets dienten, begann der Ca²⁺-Aufbau. Alle 10 Minuten wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, möglichst ohne dabei das Pellet aufzuwirbeln oder abzusaugen, und dann neuer Puffer der Calcium-Aufbaureihe (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 5) mit der jeweils nächsthöheren Ca²⁺-Konzentration hinzugefügt.

2.5 Inkubation und elektrische Feldstimulation

Es wurden eine Kalibrierung zur Implementierung der Messmethode sowie 3 verschiedene experimentelle Ansätze mit Spermidingabe durchgeführt.

Zur Kalibrierung wurden die Kardiomyozyten mit einer ansteigenden Konzentrationsreihe des spontan dissoziierenden NO-Donors Spermin NONOat (10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M) inkubiert, um die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der NO-Konzentration darzustellen. Die Negativkontrolle stellten unbeladene Kardiomyozyten dar, die Positivkontrolle wiederum bestand aus Kardiomyozyten, die ausschließlich mit Farbstoff beladen wurden.

In Experiment 1 wurden die Effekte von verschiedenen Spermidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) und 100 μ M L-Arginin auf nicht-stimulierte ventrikuläre Mauskardiomyozyten untersucht.

Bei den Versuchen 2 und 3 wurde zusätzlich eine elektrische Feldstimulation durchgeführt (siehe Seite 31). Im Speziellen wurde durch Zugabe von 100 μ M L-NAME (L-N^G-Nitroarginin Methyl Ester) überprüft, inwiefern die gemessene Fluoreszenz mit der tatsächlichen NO-Bioverfügbarkeit korreliert bzw. ob die NO-Synthese unterdrückbar ist (Experiment 2). L-N^G-Nitroarginin Methyl Ester ist ein Arginin-Derivat und Inhibitor aller drei NOS-Isoformen (Ogden und Moore 1995).

Im dritten Versuchsansatz wurden die Effekte von Spermidin auf elektrisch stimulierte Kardiomyozyten unter Zugabe von L-Arginin (100 μ M) und Probenecid (1mM) untersucht. Ziel war es, eine eventuelle, durch Farbstoffverlust verursachte Verminderung von Effekten zu demaskieren bzw. zu verhindern. Bei Probenecid handelt es sich um einen nicht-selektiven Inhibitor von organischen Anionentransportern, im Speziellen der *multidrug resistance-related* Proteine (MRP, Klasse C der *ATP-binding cassette* Transporter (ABC-Transporter)), welche unter anderem imstande sind, Farbstoffe aus der Zelle zu transportieren (Di Virgilio et al. 1990; Bakos et al. 2000).

Eine vollständige Auflistung der verschiedenen Probeansätze aller durchgeführten Experimente kann dem Dokument „Spermidin und die Bioverfügbarkeit von NO in Kardiomyozyten – Experimenteller Plan“ (siehe Seite 73 ff.) entnommen werden.

Der Ablauf dieser Experimente ist in den Abbildung 18-21 dargestellt. Als erster Schritt erfolgte die Beladung mit Farbstoff, DAF-FM Diacetat (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetat, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Dieser diffundiert passiv durch die Zellmembran und ist im Ausgangszustand nicht fluoreszent. In der Zelle angekommen wird er durch intrazelluläre Esterasen zu DAF-FM deacetyliert. Schließlich bildet sich durch die Reaktion mit NO^+ -Äquivalenten wie Distickstofftrioxid (N_2O_3) ein stark fluoreszierendes Benzotriazol-Derivat. Diese Reaktion ist irreversibel (Abbildung 16).

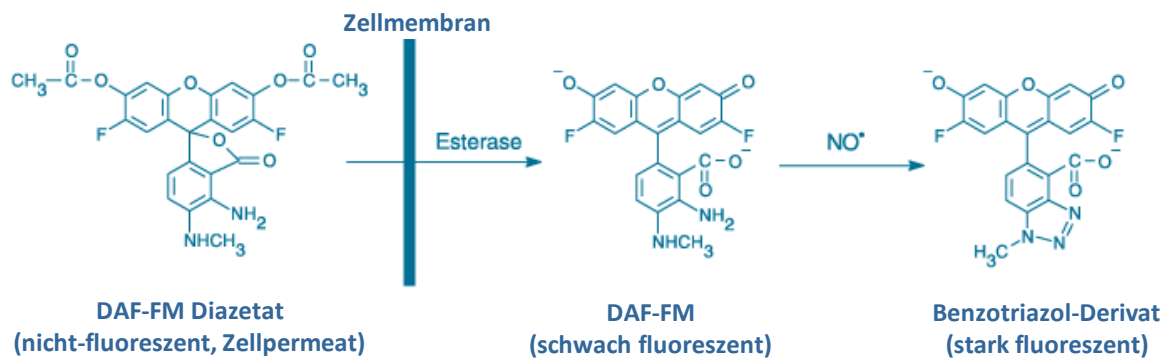


Abbildung 16: Reaktionsschema von DAF-FM Diacetat. DAF-FM Diacetat diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird im Zytosol von Esterasen zu DAF-FM deacetyliert. Durch Reaktion mit NO^+ -Äquivalenten entsteht das hoch-fluoreszente Benzotriazol-Derivat. Abbildung modifiziert nach Thermo Fisher Scientific Inc. (2010).

Das Ausmaß der Fluoreszenz einer Zelle hängt demnach nur von der kumulierten Anzahl an fluoreszierenden Molekülen ab. Es gilt: je mehr freies NO vorhanden bzw. im Laufe der Zeit freigesetzt, umso höher die Anzahl der Benzotriazol-Derivat-Moleküle. Das Anregungs- bzw. Emissionsmaximum liegt bei 495 bzw. 515 nm (Abbildung 17). (Kojima et al. 1999; Molecular Probes Inc. 2001; Thermo Fisher Scientific Inc. 2010)

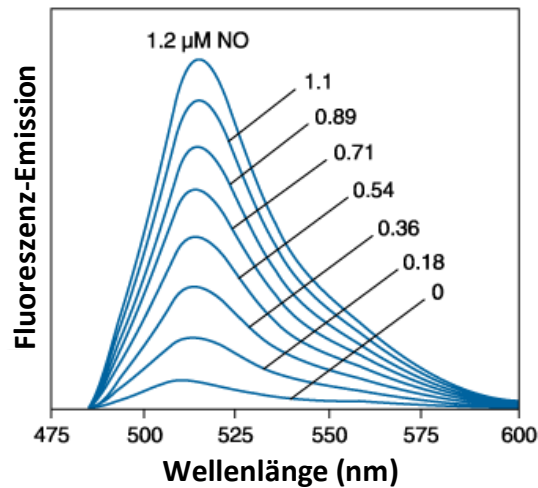


Abbildung 17: Emissionsspektrum von DAF-FM Diacetat. Abbildung modifiziert nach Thermo Fisher Scientific Inc. (2010).

Die gewonnenen Kardiomyozyten wurden mit Normaltyrode-Lösung (2.7 Lösungen und Chemikalien; Tabelle 3) versetzt, aufgeteilt (je nach Protokoll) und anschließend die entsprechende Menge DAF-FM hinzu pipettiert um eine DAF-FM-Konzentration von $10\mu\text{M}$ in Lösung zu erreichen. Auch $100\mu\text{M}$ L-Arginin wurden zu diesem Zeitpunkt als Substrat für die NOS den entsprechenden Proben hinzugefügt. Während der 45-minütigen ersten Inkubationsphase wurden die Zellen alle 10 Minuten aufgewirbelt und die Zellsuspension durchmischt, um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Zellen sicherzustellen. Dann wurden die vorinkubierten Zellsuspensionen weiter aufgeteilt, also jeweils $400\mu\text{l}$ in einzelne FACS-Röhrchen gefüllt und Spermin NONOat sowie Spermidin in unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend der jeweiligen Proben hinzugegeben. Es folgte eine weitere Stunde der Inkubation.

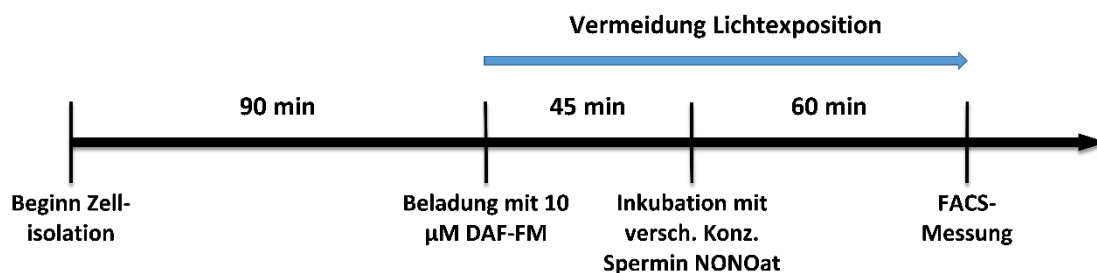


Abbildung 18: Versuchsplan Kalibrierung.

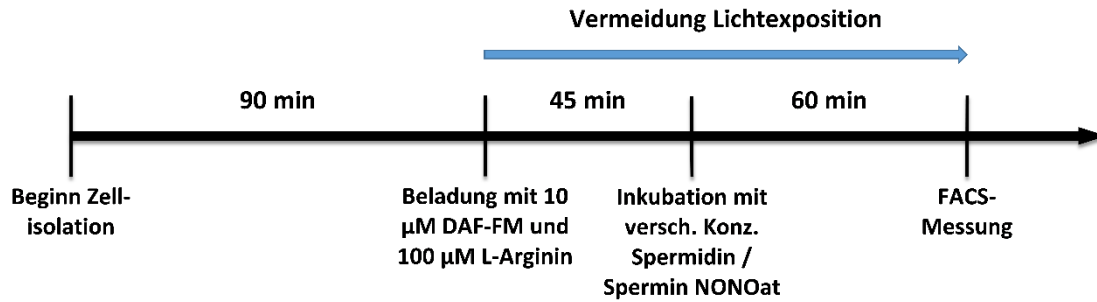


Abbildung 19: Versuchsplan Experiment 1 (ohne Feldstimulation).

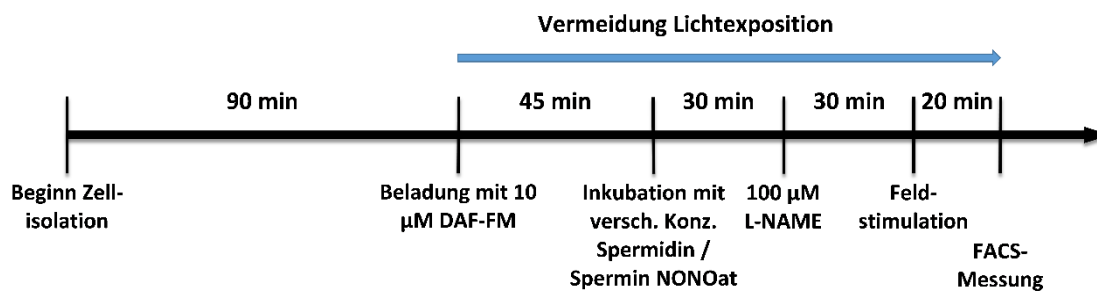


Abbildung 20: Versuchsplan Experiment 2 (mit Feldstimulation).

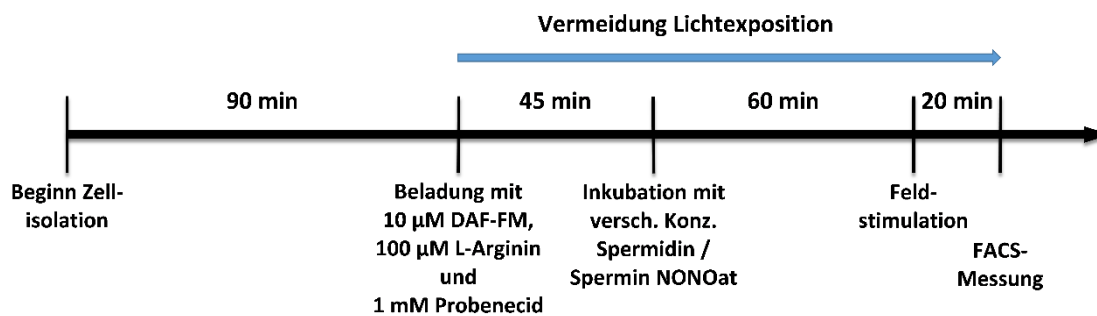


Abbildung 21: Versuchsplan Experiment 3 (mit Feldstimulation und Probenecid).

Schließlich folgte die elektrische Stimulation (10V, 5ms, 3Hz) mit dem C-Dish[®] und C-Pace EP[®] (elektrischer Feldstimulator, IonOptix Limited, Irland) im Brutschrank bei 37°C über 20 Minuten um die NO-Produktion zu stimulieren. So weisen diverse Studien darauf hin, dass eine Aktivierung sowohl der eNOS als auch der nNOS durch kontraktile Aktivität der Kardiomyozyten ausgelöst wird (Kaye et al. 1996; Dedkova et al. 2007). Dies geschieht über einen Ca²⁺-abhängigen sowie einen Ca²⁺-unabhängigen Signalweg. Das angewendete Schema orientiert sich dabei an vergleichbaren Experimenten mit Ratten (Pavlovic et al. 2013) und wurde für die Versuche mit Mäusen entsprechend adaptiert.

2.6 FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

Die Messung der Fluoreszenz der Kardiomyozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Strijdom et al. 2004). Hierzu wurde das FACSCalibur[™] (BD Biosciences[®], USA) verwendet. Das System verwendet einen 15 mW Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Es stehen insgesamt drei verschiedene Photomultiplier-Detektoren für die Fluoreszenzmessung zur Auswahl. Für die durchgeführten Messungen wurde der Fluoreszenzkanal 1 (FL1), der im grünen Fluoreszenzbereich (530/30 nm) detektiert, ausgewählt. Aufgezeichnet wurden die anfallenden Datensätze mit BD CellQuest[™] Pro Software (ebenfalls BD Biosciences[®], USA).

Besonders wichtig war die Einstellung des *Forward Scatters* (Vorwärtsstreulicht, FSC) sowie des *Side Scatters* (Seitwärtsstreulicht, SSC), um die gewünschte Zellpopulation detektieren zu können. Während der FSC über Beugung des Lichts im flachen Winkel die Größe bzw. das Volumen der Zellen erfasst, erkennt der SSC über Brechung des Lichts im rechten Winkel die Granularität. Nach diesen beiden Kriterien, grafisch auf x- und y-Achse aufgetragen, lassen sich zusammenhängende Zellpopulationen erkennen. Die gesuchten, vitalen Kardiomyozyten wiesen eine höhere Granularität auf, zudem waren sie größer als die letalen Zellen, Zelltrümmer und andere in der Suspension befindliche Artefakte. Ein entsprechendes Streudiagramm ist in Abbildung 22 dargestellt.

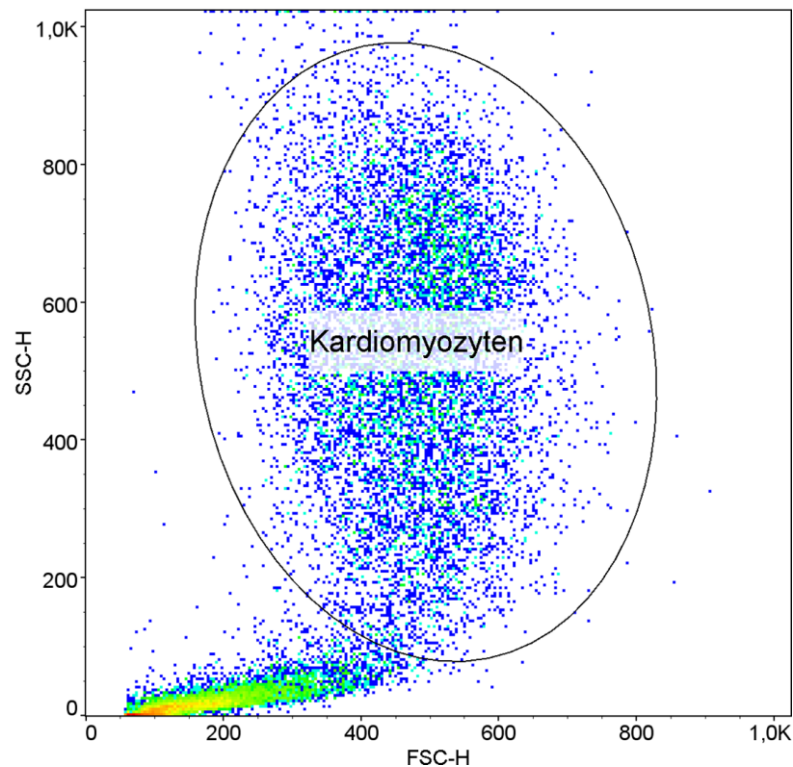


Abbildung 22: Grafische Darstellung der FACS-Analyse: Typisches Beispiel für ein Streudiagramm der detektierten Ereignisse. Jeder Punkt markiert ein registriertes Teilchen (Zellen, Zelltrümmer, Fremdpartikel, etc.) in der Zellsuspension, aufgetragen nach Größe (*Forward Scatter-Height* (FSC-H), x-Achse) und Granularität (*Side Scatter-Height* (SSC-H), y-Achse). Zur Auswertung der DAF-FM Fluoreszenz wurde nur die umgrenzte Zellpopulation der Kardiomyozyten herangezogen.

Die Messungen liefen wie folgt ab: Zunächst wurden die Proben für wenige Sekunden bei ca. 700 Umdrehungen pro Minute mit dem Vortexmischer durchmischt. Dies diente dem Lösen der am Boden der FACS-Röhrchen befindlichen Zellpellets um eine möglichst gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten, welche für einen durchgängigen Zellfluss durch den Ansaugstutzen des FACS-Gerätes wichtig war. Dann wurde das FACS-Röhrchen angesteckt und das Gerät mit der Einstellung *run high* gestartet um einen hohen Durchfluss (60 ± 7 $\mu\text{l}/\text{min}$) zu erreichen. Am PC wurde nun die Messung, also die Aufzeichnung der registrierten Events gestartet. Endpunkt der Messung war eine detektierte Anzahl von 10.000 Events bzw. Zellen innerhalb des definierten, abgegrenzten Populationsbereiches. Sank währenddessen die Zahl der registrierten Events pro Sekunde deutlich ab, bedeutete dies ein erneutes Absetzen der Zellen, es wurde unterbrochen und wiederholt gevortext. Insgesamt wurde versucht alle Proben in

möglichst kurzer Zeit abzuarbeiten um keine relevanten Unterschiede bezüglich der Inkubationszeit zu erhalten. Auch wurde von Versuch zu Versuch die Reihenfolge der Messung der einzelnen Proben geändert um eventuelle unspezifische Effekte auszuschließen.

2.7 Lösungen und Chemikalien

Für die endotheliale Funktionsmessung wurde Krebs-Henseleit Puffer (Tabelle 1) und Kaliumlösung zum Vorreizen der Gefäße (Tabelle 2) verwendet. Für die Versuche zur Bioverfügbarkeit von NO in Kardiomyozyten wurde Normaltyrode-Lösung (Tabelle 3), Perfusionspuffer (Tabelle 4), die Lösungen der Calcium-Aufbaureihe (Tabelle 5) sowie einer Reihe weitere spezieller Lösungen (Tabelle 6) verwendet. Sämtliche Chemikalien mit Ausnahme von DAF-FM (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), stammen von der Firma Sigma-Aldrich®, USA. Dazu zählen auch die oben aufgeführten U46,619, Acetylcholin, DEA/NO, Spermidin, Spermin NONOat, L-Arginin, L-NAME und Probenecid.

Krebs-Henseleit Puffer	
Reagenz	Konzentration [mM]
NaCl	118,40
KCl	5,01
KH ₂ PO ₄	1,20
CaCl ₂	2,50
MgCl ₂	1,20
Glukose	10,00
NaHCO ₃	25,00

Tabelle 1: Zusammensetzung von Krebs-Henseleit Puffer

Kaliumlösung zum Vorreizen der Gefäße	
Reagenz	Konzentration [mM]
NaCl	23,4
KCl	100,0
KH ₂ PO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
MgCl ₂	1,2
Glukose	10,0
NaHCO ₃	25,0

Tabelle 2: Zusammensetzung der Kaliumlösung zum Vorreizen der Gefäße

Normaltyrode-Lösung	
Reagenz	Konzentration [mM]
NaCl	136,0
KCl	5,0
CaCl ₂ *2H ₂ O	1,0
MgCl ₂ *6H ₂ O	1,0
HEPES	10,0
Glukose	10,0

Tabelle 3: Zusammensetzung der Normaltyrode-Lösung

Perfusionspuffer	
Reagenz	Konzentration [mM]
NaCl	135,0
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	0,6
Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O	0,6
Mg ₂ SO ₄ *7H ₂ O	1,2
HEPES	10,0
Taurin	30,0
BDM	10,0
Glukose	10,0

Tabelle 4: Zusammensetzung des Perfusionspuffers

Calcium-Aufbaureihe		
Reagenz	Volumen	Konzentration in Lösung
Calcium 125 μM		
Stopp-Lösung 2	8 ml	1x
CaCl ₂ 0,1M	10 μ l	0,125 mM
Calcium 250 μM		
Stopp-Lösung 2	4 ml	1x
CaCl ₂ 0,1M	10 μ l	0,25 mM
Calcium 500 μM		
Stopp-Lösung 2	8 ml	1x
CaCl ₂ 0,1M	40 μ l	0,5 mM

Tabelle 5: Zusammensetzung der Calcium-Aufbaureihe

Andere Lösungen		
Reagenz	Volumen	Konzentration in Lösung
Myozyten-Verdauungslösung		
Perfusionspuffer	25 ml	1x
Liberase TM	300 μ l	0,075 mg/ml
Trypsin	111 μ l	0,056 mg/ml
CaCl ₂ 10mM	30 μ l	12,5 μ M
Kanülierungslösung		
Perfusionspuffer	150 ml	1x
CaCl ₂ 1M	150 μ l	1mM
Stopp-Lösung 1		
Perfusionspuffer	2,25 ml	1x
Rinderserum (BCS)	0,25 ml	0,25 mg/ml (10%)
CaCl ₂ 1M	3,125 μ l	12,5 μ M
Stopp-Lösung 2		
Perfusionspuffer	19 ml	1x
Rinderserum (BCS)	1 ml	0,125 mg/ml (5%)
CaCl ₂ 1M	25 μ l	12,5 μ M

Tabelle 6: Zusammensetzung von Myozyten-Verdauungs-, Kanülierungs- und Stopp-Lösung

2.8 Datenauswertung und statistische Analyse

Die Datenauswertung der endothelialen Funktionsmessung erfolgte auf Basis der aufgezeichneten Kontraktionskurve (Abbildung 13 - 15). Die bestehende Vorkontraktion zu Beginn der Messung (ca. 2g bzw. 19,61mN), also vor der ersten Kontraktion durch U46, wurde als *Baseline* gesetzt. Die Werte des maximalen Ausschlages nach U46 Gabe und der jeweiligen maximalen Relaxation nach jeder spezifischen Konzentration an Acetylcholin sowie DEA/NO wurden manuell abgelesen. Zur Vergleichbarkeit der verschiedenen Präparate wurde nicht die absolute Kontraktion (in g bzw. mN), sondern die relative Kontraktion (in %) betrachtet (die *Baseline* vor U46-Gabe wurde auf 0% gesetzt, die maximale Kontraktion nach U46-Gabe auf 100%). Insgesamt ergaben sich pro Tier 4 Messkurven, jeweils eine pro gemessenem Aortenring. Diese wurden gemittelt, um am Ende jeweils einen Datensatz pro Tier zu erhalten.

Mittels aufgezeichneter Kurve nach Kaliumgabe war zum einen die Aussage zu treffen ob das Gefäß intakt ist und eine angemessene Kontraktionsfähigkeit bei Erhöhung der Kaliumkonzentration besitzt, zum anderen war im direkten Vergleich mit der U46-Kontraktionskurve zu beurteilen, ob auch hier eine angemessene Reaktion vorlag. So sollte das Kontraktionsmaximum nach U46-Gabe circa 80% der Kontraktion nach Kaliumgabe erreichen um von einer intakten Gefäßfunktion ausgehen zu können. Präparate, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden aus der Studie/Analyse ausgeschlossen.

Bei den Versuchen zur NO-Bioverfügbarkeit in Kardiomyozyten erfolgte jeweils eine FACS-Messung (à 10.000 detektierte Zellen im definierten Populationsbereich der Kardiomyozyten) je Probe. Die Auswertung der aufgezeichneten Durchflusszytometrie-Messdaten erfolgte primär mit FlowJo™ (FlowJo LLC, USA). Mittels dieser Software wurden die einzelnen Datensätze der jeweiligen Proben ausgelesen, zusammengefügt und Übersichtsdiagramme erstellt. Dazu wurde zunächst die gewünschte Zellpopulation manuell markiert, deren jeweilige Fluoreszenz ausgelesen und die Werte der einzelnen Gruppen in einem Kurvendiagramm vergleichend dargestellt. Zudem wurde der Anteil der vitalen, innerhalb der markierten Zellpopulation befindlichen Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der erfassten Ereignisse berechnet. Sämtliche Messwerte wurden

relativ (in %) in Bezug auf die jeweilige Positivkontrolle (entspricht 100% Fluoreszenz) des entsprechenden Versuches dargestellt.

Zur statistischen Analyse wurde MS-Excel® 2016 (Microsoft Corporation, USA) benutzt. Die Prüfung der Messdaten auf Normalverteilung erfolgte mittels Anderson-Darling-Test. Die Signifikanzprüfung erfolgte bei normalverteilten Datensätzen und homogener Varianz mittels Zweistichproben *Student's t-Test* für unabhängige Stichproben, Korrelationsanalysen mit dem Korrelationskoeffizienten nach *Pearson*. Die einzelnen Datensätze sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Für die grafische Darstellung wurde SigmaPlot™ (Systat Software Inc., USA) genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Endotheliale Funktionsmessung

3.1.1 Kontrollversuche

Im Vergleich zu 14 Wochen alten salzsensitiven Dahl-Ratten zeigte sich eine signifikant reduzierte Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta von 19 Wochen alten Tieren ab einer Acetylcholin-Konzentration von 300 nM (Abbildung 23).

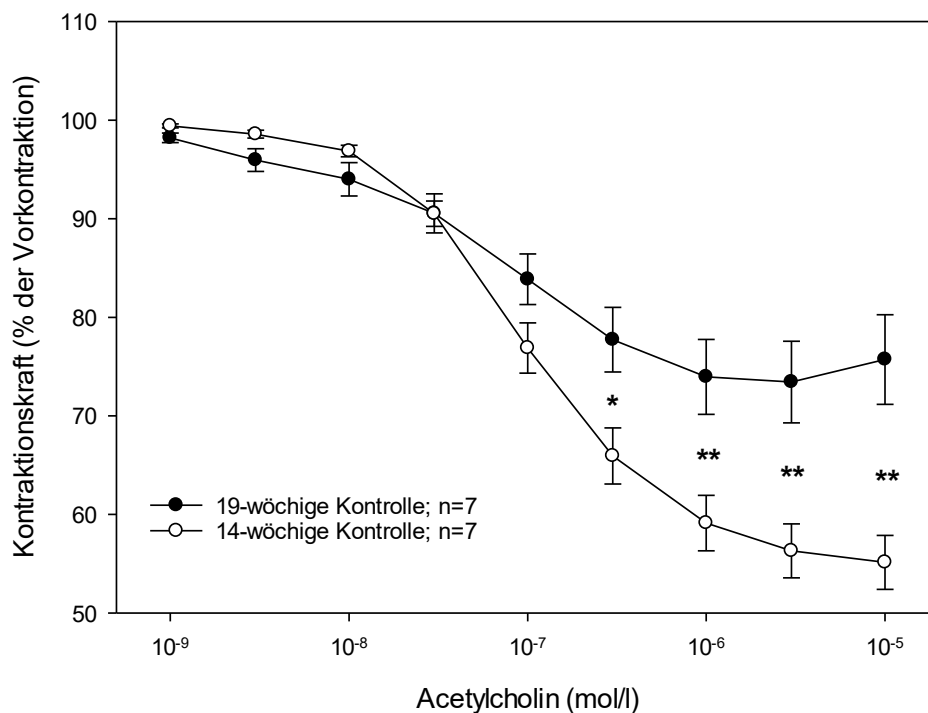


Abbildung 23: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14- und 19-wöchigen Kontrolltieren. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die maximale Relaxation betrug $55,1 \pm 2,7\%$ bei den 14-wöchigen und $73,4 \pm 4,2\%$ bei den 19-wöchigen Tieren ($p=0,003$). Dieser Endpunkt wurde bei den 19-wöchigen Tieren bereits bei einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ Acetylcholin erreicht. Die mittlere Effektive Konzentration (EC_{50}) zeigte sich nicht signifikant verändert ($p=0,12$); sie betrug $123 \pm 23,6 \text{ nmol/l}$ (14 Wochen) bzw. $83,1 \pm 10,9 \text{ nmol/l}$ (19 Wochen).

Die 19-wöchigen Tiere wiesen auch eine niedrigere Relaxationsfähigkeit auf den NO-Donor im Vergleich zur 14-wöchigen Kontrollgruppe auf (Abbildung 24).

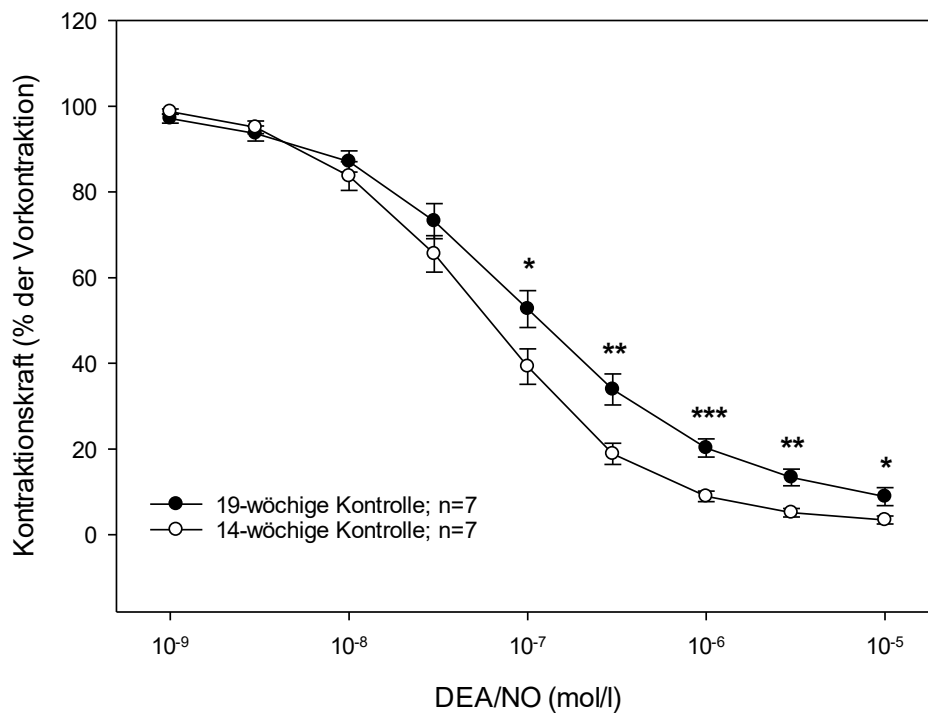


Abbildung 24: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14- und 19-wöchigen Kontrolltieren. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Diese reduzierte Relaxation der Gefäßmuskulatur als Antwort zeigte sich signifikant ab einer DEA/NO-Konzentration größer gleich 100nM. Die maximale Relaxation betrug $3,4 \pm 0,9\%$ (14-wöchige Ratten) bzw. $8,9 \pm 2,1\%$ (19-wöchige Ratten) der Vorkontraktion ($p=0,04$), bei den älteren Tieren kam es nicht zu einer vollständigen Relaxation. Hinsichtlich der EC_{50} bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen (14 Wochen: $62,7 \pm 16$ nmol/l; 19 Wochen: $109 \pm 22,3$ nmol/l; $p=0,12$).

3.1.2 Effekt von Spermidin auf die Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta

Bei den 14-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich des Relaxationsverhaltens der thorakalen Aorta auf verschiedene Acetylcholin-Konzentrationen (10^{-9} - 10^{-5} mol/l) zwischen den mit Spermidin behandelten Tieren und den unbehandelten Kontrolltieren nachgewiesen (Abbildung 25).

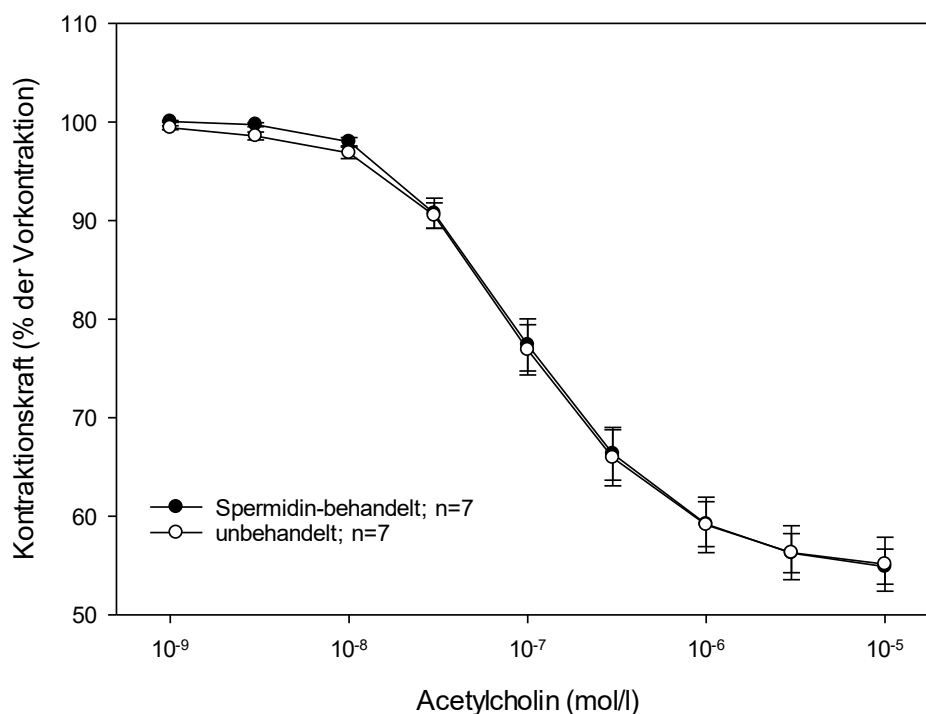


Abbildung 25: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14-wöchigen Tieren.

Weiter war auch die maximale Relaxation (Endpunkt) gleich. Diese lag bei $54,9 \pm 1,8\%$ (Spermidin-behandelte Tiere) bzw. $55,1 \pm 2,7\%$ (Kontrolltiere) der Vorkontraktion. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das Gefäß zu $45,1\%$ bzw. $44,9\%$ relaxierte, was bereits einer stark eingeschränkten Endothelfunktion entspricht. Auch die EC_{50} der beiden Gruppen wies keinen signifikanten Unterschied auf (Spermidin: $121 \pm 22,5$ nmol/l versus Kontrolle: $127 \pm 23,6$ nmol/l).

Das Relaxationsverhalten der thorakalen Aorta nach exogener Gabe von NO-Donor zeigte sich bei den Spermidin-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe nahezu ident (Abbildung 26).

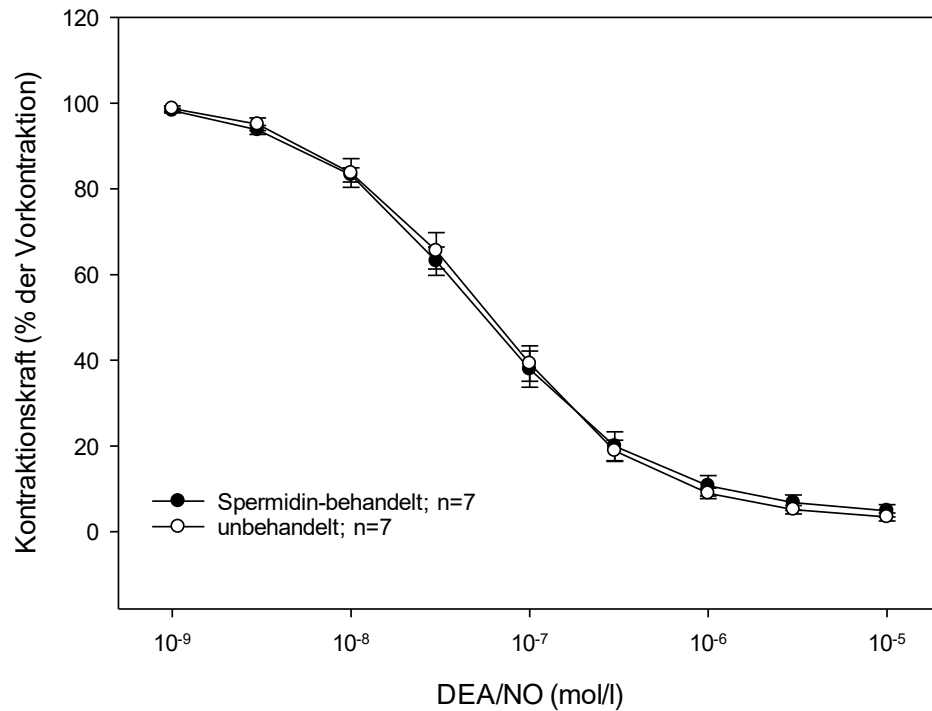


Abbildung 26: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 14-wöchigen Tieren.

Die maximale Relaxation betrug $4,9 \pm 1,4\%$ (Spermidin-Gruppe) sowie $3,4 \pm 0,9\%$ (Kontrollgruppe) der Vorkontraktion. Es lag also eine nahezu vollständige Relaxation vor, die auf eine erhaltene Gefäßfunktion hinsichtlich eines adäquaten Ansprechens der glatten Muskulatur auf exogen-zugeführtes Stickstoffmonoxid hindeutet.

Bei den 19-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten zeigte sich eine stärker ausgeprägte Relaxationsfähigkeit der Aorta von mit Spermidin behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Abbildung 27).

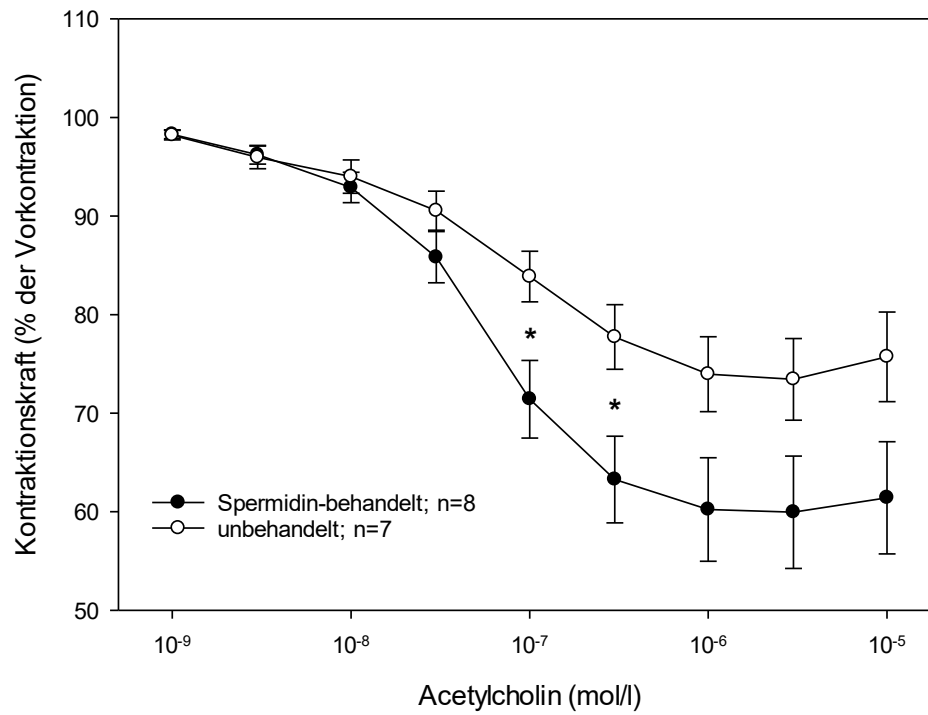


Abbildung 27: Acetylcholin-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 19-wöchigen Tieren. *p < 0,05.

Statistisch signifikant zeigte sich dieser Trend bei einer Acetylcholinkonzentration von 100 nM (Spermidin: 71,4±3,9% versus Kontrolle: 83,9±2,6%, p=0,02) und 300 nM (Spermidin: 63,3±4,4% versus Kontrolle: 77,7±3,3%, p=0,02). Bei einer Acetylcholinkonzentration von 1µM (p=0,06), 3µM (p=0,09) und 10µM (p=0,08) bestand dagegen grenzwertig keine Signifikanz. Die maximale Relaxation betrug 59,9±5,7% (nach Spermidingabe) bzw. 73,4±4,2% (Kontrolle). Auch die EC₅₀ der Spermidin-behandelten Tiere war mit 56,4±5,96 nmol/l signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (83,1±10,9 nmol/l; p=0,04), was auf eine stärkere Reaktion des Gefäßes auf niedrigere Acetylcholinkonzentrationen hindeutet.

Nach exogener Gabe von NO-Donor zeigte sich eine verbesserte Gefäßrelaxation bei der 19-wöchigen Spermidingruppe gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 28).

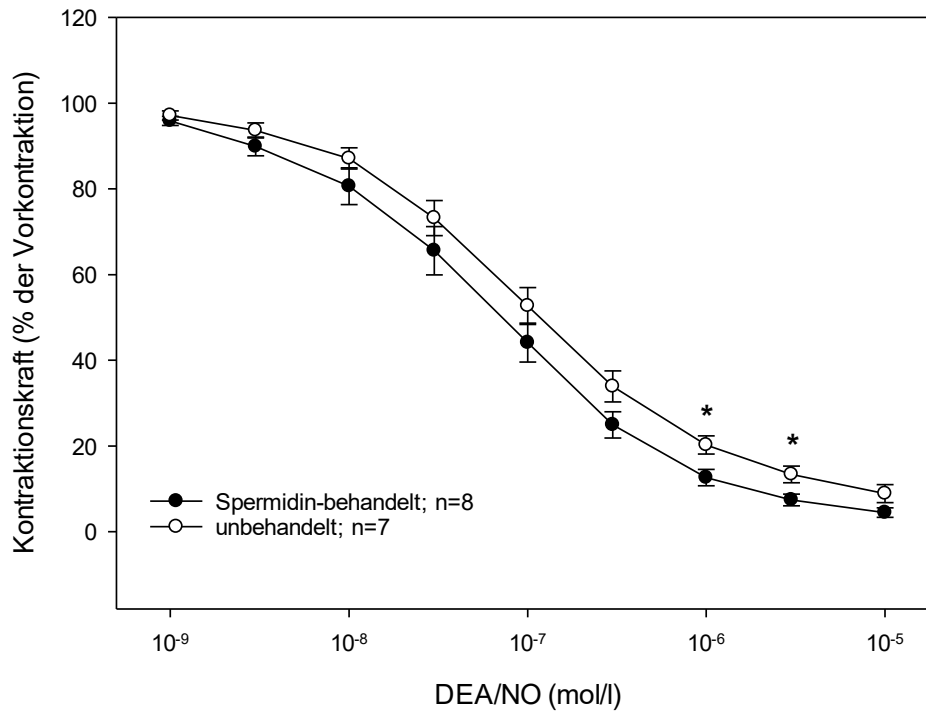


Abbildung 28: DEA/NO-abhängige Relaxation der thorakalen Aorta von 19-wöchigen Tieren. *p < 0,05.

Eine statistische Signifikanz ergab sich bei einer DEA/NO-Konzentration von 1 μ M (Spermidin: $12,6 \pm 1,9\%$; Kontrolle: $20,2 \pm 2,1\%$; $p=0,02$) sowie 3 μ M (Spermidin: $7,4 \pm 1,4\%$; Kontrolle: $13,4 \pm 1,9\%$; $p=0,02$). Die maximale Relaxation betrug $4,5 \pm 1,1\%$ (Spermidingruppe) bzw. $8,9 \pm 2,1\%$ (Kontrollgruppe) der Vorkontraktion ($p=0,08$). Es lag also vor allem bei der Kontrollgruppe keine vollständige Relaxation nach Gabe der höchsten DEA/NO-Konzentration vor. Die EC_{50} war bei der Spermidingruppe ($78,6 \pm 12,3$ nmol/l) nicht signifikant kleiner als bei der Kontrollgruppe ($109 \pm 22,3$ nmol/l; $p=0,24$).

Die erhobenen Messwerte sind in Tabellenform im Appendix als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardfehlern übersichtsmäßig dargestellt (siehe Seite 75 ff. „Endothelfunktion der Dahl-Ratten – Datentabellen“).

3.2 NO-Produktion in isolierten Mauskardiomyozyten

3.2.1 Indirekte NO-Kalibrierung

Bei der indirekten NO-Kalibrierung zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration des NO-Donors Spermin NONOat und dem Anstieg des gemessenen Fluoreszenzsignals des DAF-FM Farbstoffes als Surrogatmarker für die NO-Produktion (Abbildung 29 und 30). Das zugehörige Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsgeraden betrug $r^2=0,9542$, der Korrelationskoeffizient nach *Pearson* $r=0,9769$. 1 μM Spermin NONOat entspricht bei vollständiger Dissoziation einer Konzentration von 2 μM NO.

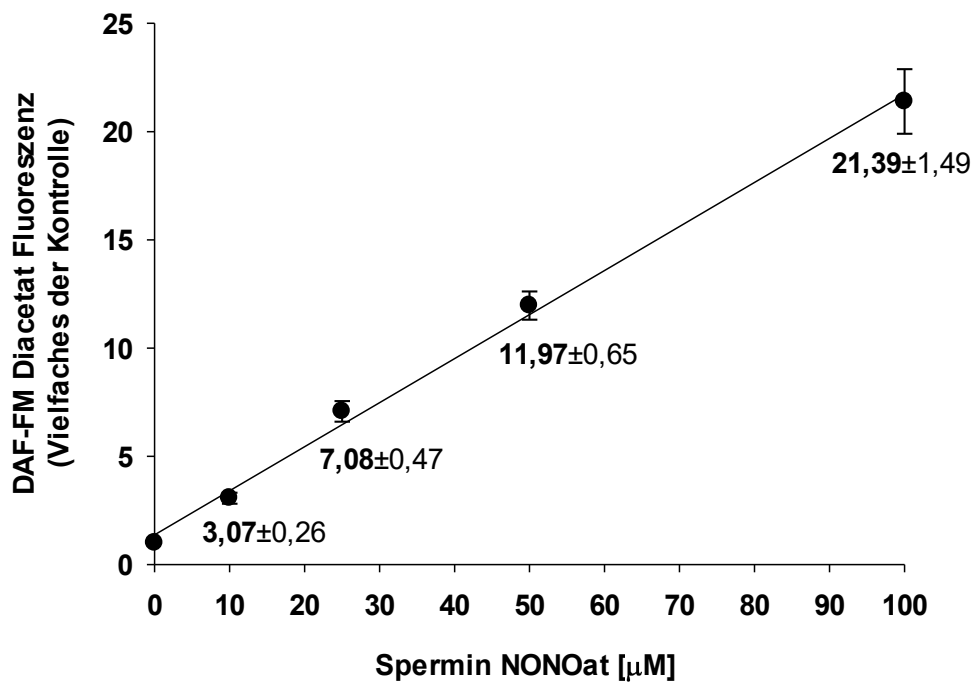


Abbildung 29: Lineare Korrelation zwischen DAF-FM Fluoreszenz und Konzentration des NO-Donors Spermin NONOat. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardfehler. N = 5 Mäuse.

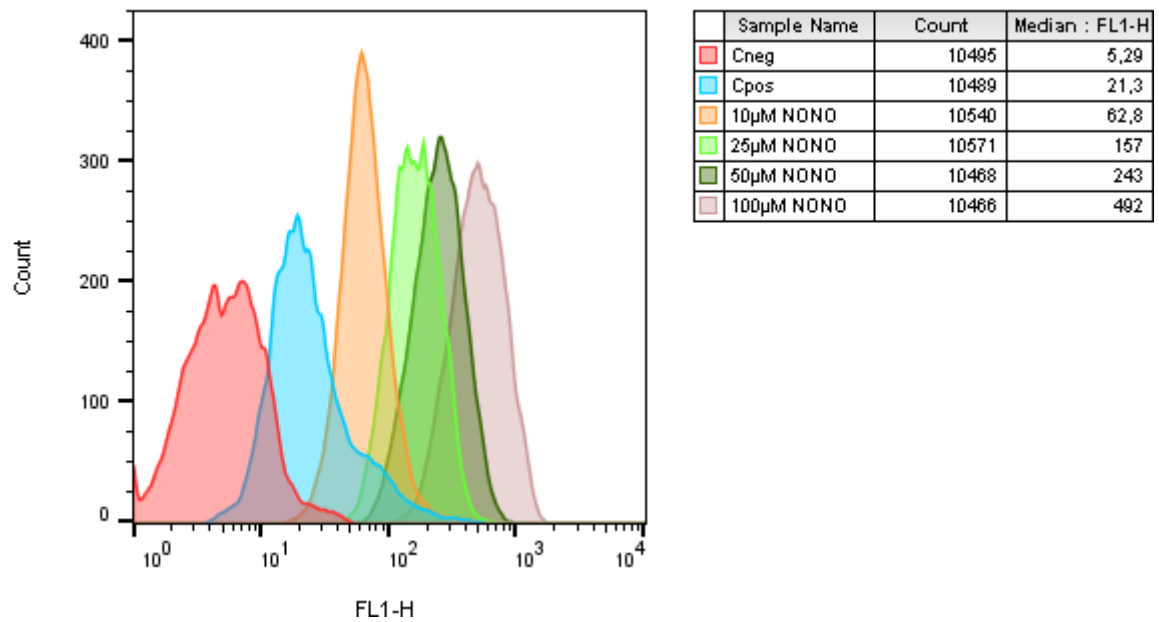


Abbildung 30: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für die indirekte NO-Kalibrierung. Die verschiedenen Proben sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet; auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenz aufgetragen; man erkennt deutlich die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der jeweiligen Kurvenmaxima. Cneg: Negativkontrolle; Cpos: Positivkontrolle; NONO: Spermin NONOat; FL1-H: *fluorescence channel 1-height*.

3.2.2 Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in nicht-stimulierten Mauscardiomyozyten

Bei den Versuchen ohne elektrische Feldstimulation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der verschiedenen Spermidin-Konzentrationen (Abbildung 31 und 32).

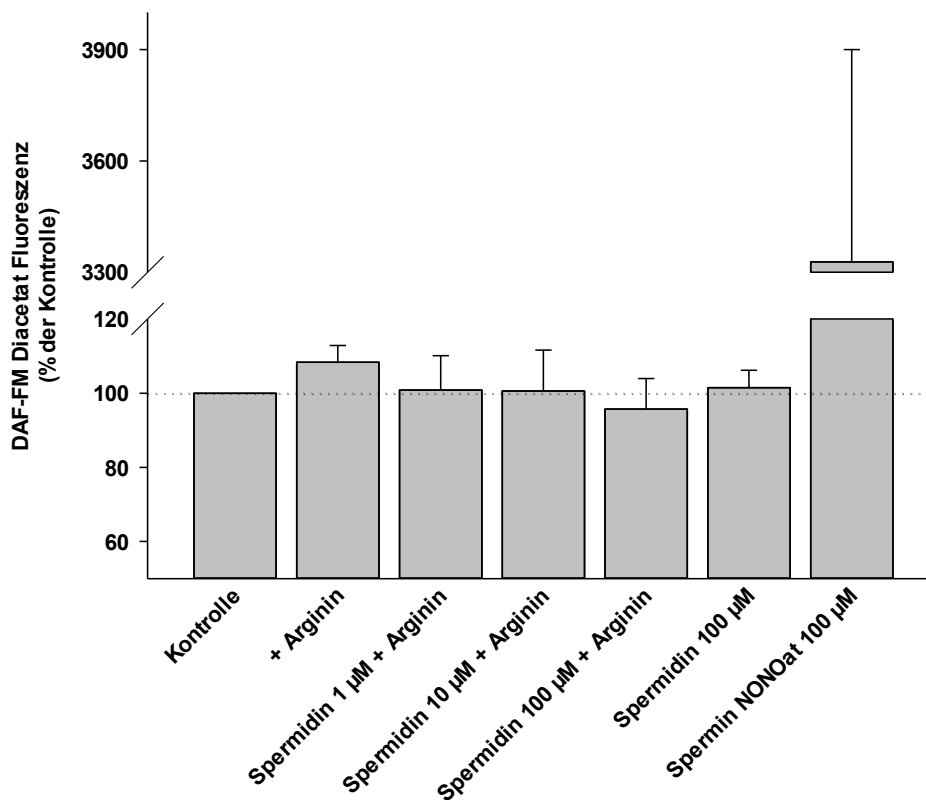


Abbildung 31: Effekt von Spermidin und/oder L-Arginin auf die NO-Produktion in nicht-stimulierten Mauscardiomyozyten. N = 5 Mäuse.

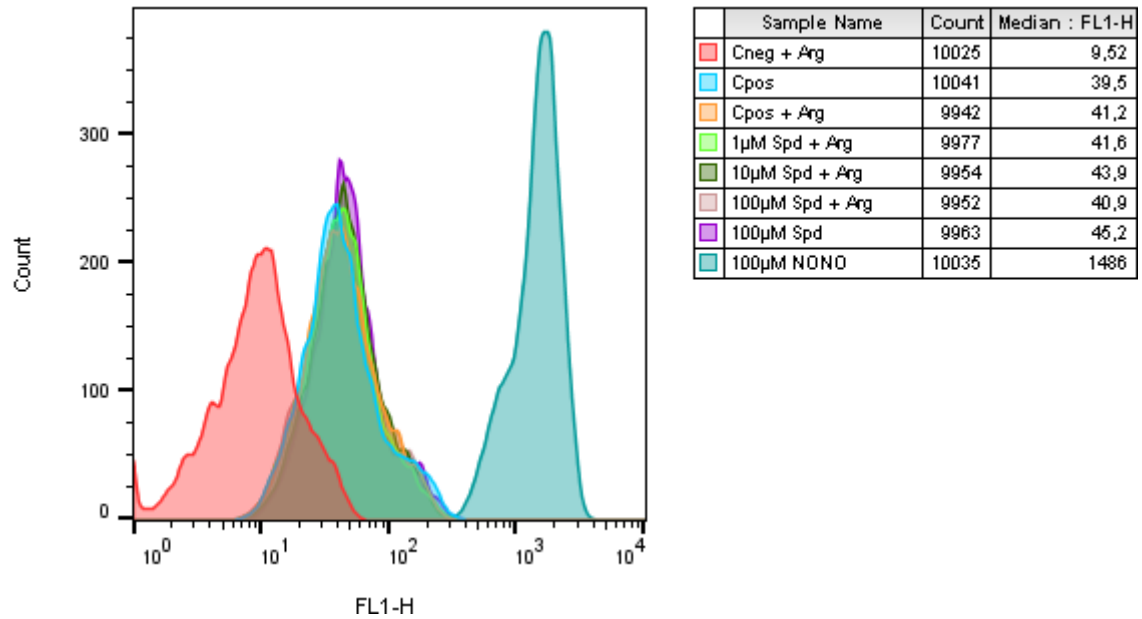


Abbildung 32: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für die NO-Produktion in nicht-stimulierten Mauskardiomyozyten. Die verschiedenen Proben sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet; auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenz aufgetragen. Cneg: Negativkontrolle; Cpos: Positivkontrolle; Arg: L-Arginin; Spd: Spermidin; NONO: Spermin NONOat (NO-Donor); FL1-H: *fluorescence channel 1-height*.

3.2.3 Effekt der elektrischen Feldstimulation auf die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten

Unter Anwendung der elektrischen Feldstimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der DAF-FM Diacetat-Fluoreszenz im Vergleich zu der Fluoreszenz in den nicht-stimulierten Kardiomyozyten (Abbildung 33 und 34). Dieser mittlere Anstieg entsprach 30,7% gegenüber der Kontrolle ($p < 0,001$), während der mittlere Fluoreszenzanstieg nach der Inkubation mit Spermin NONOat (Positivkontrolle) $127,2 \pm 15,4\%$ gegenüber den Kontrollzellen betrug.

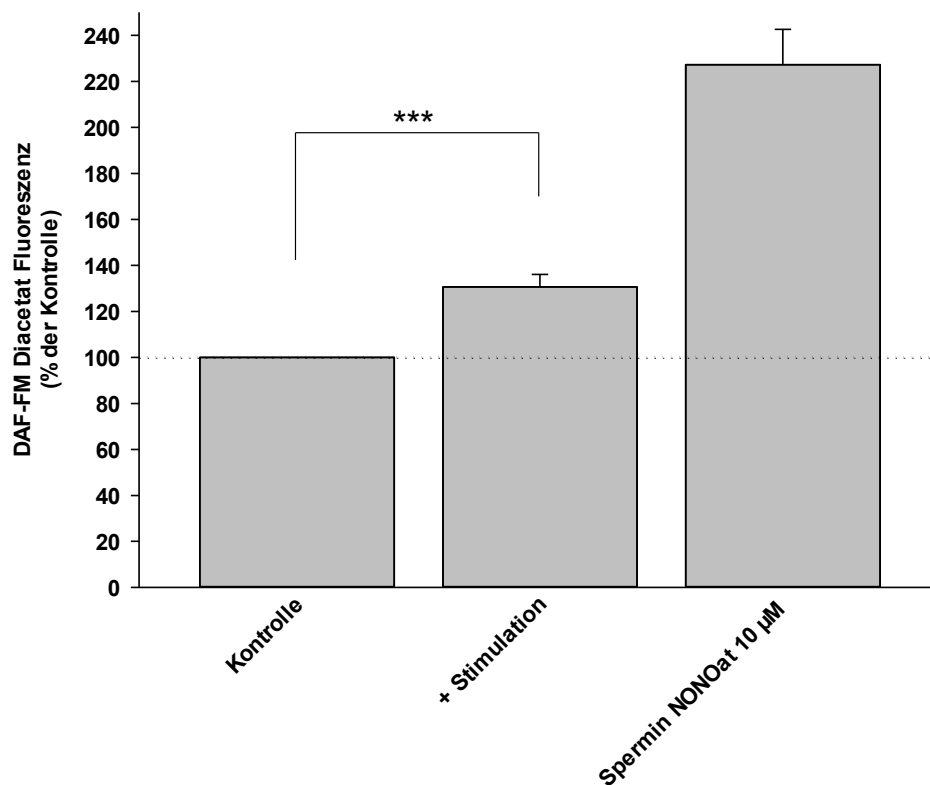


Abbildung 33: Effekt der elektrischen Feldstimulation auf die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten. *** $p < 0,001$. N = 8 Mäuse.

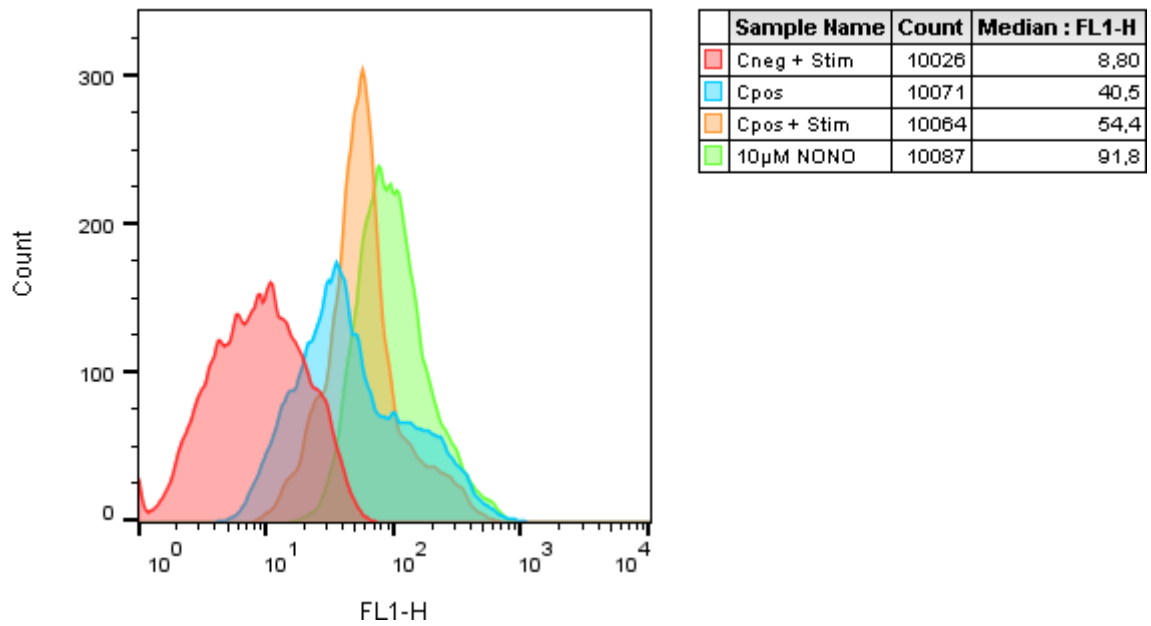


Abbildung 34: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt der Feldstimulation auf die NO-Produktion in Muskardiomyozyten. Die verschiedenen Proben sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet; auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenz aufgetragen. Cneg: Negativkontrolle; Cpos: Positivkontrolle; Stim: Stimulation; NONO: Spermin NONOat (NO-Donor).

3.2.4 Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten

Unter Zugabe von L-NAME (NOS-Inhibitor) zeigte sich eine verringerte DAF-FM Fluoreszenz (Abbildung 35 und 36). Dieser Effekt trat sowohl bei der stimulierten Kontrollgruppe und bei den stimulierten Kardiomyozyten nach der Inkubation mit 100 nM Spermidin als auch bei den nicht-stimulierten Kontrollzellen auf. Allerdings ließ sich eine statistische Signifikanz nur bei den nicht-stimulierten Kardiomyozyten nach der Inkubation mit L-NAME nachweisen ($p=0,024$). Zwischen den beiden verschiedenen Spermidinkonzentrationen (100nM und 10 μ M) sowie in Relation zu der stimulierten Kontrolle bestanden keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der DAF-FM Fluoreszenz. Die Inkubation der Kardiomyozyten mit L-NAME konnte das DAF-FM Fluoreszenzsignal entgegen den Erwartungen nur teilweise unterdrücken.

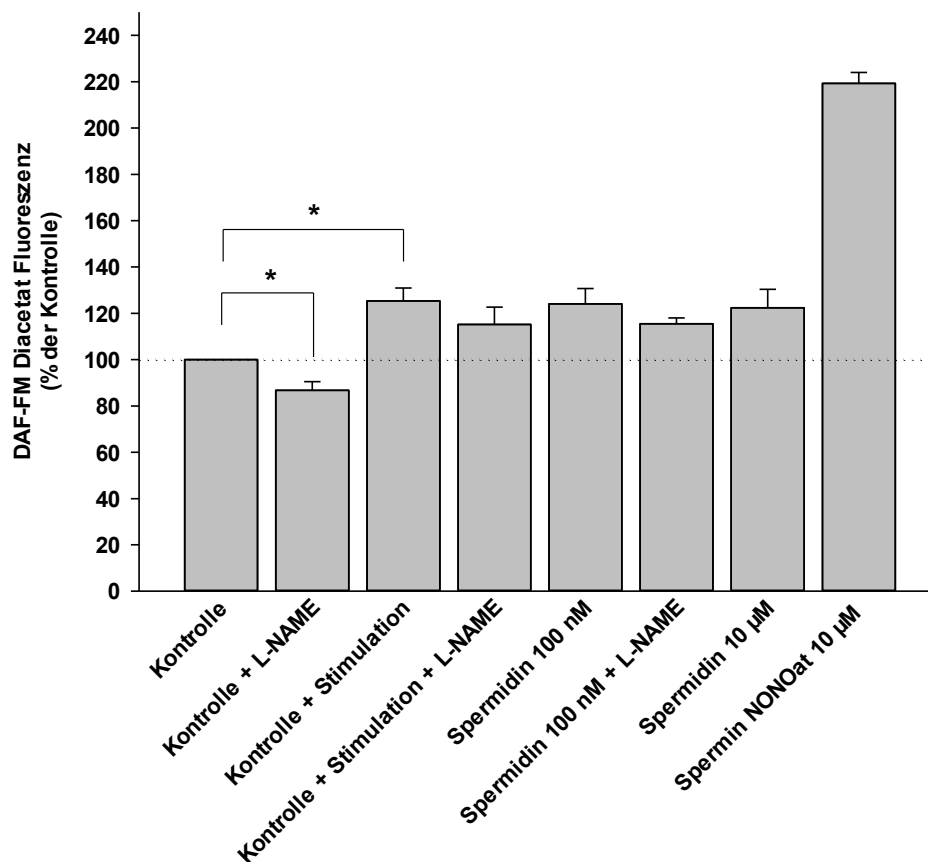


Abbildung 35: Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Mauskardiomyozyten. * $p < 0,05$. N = 3 Mäuse.

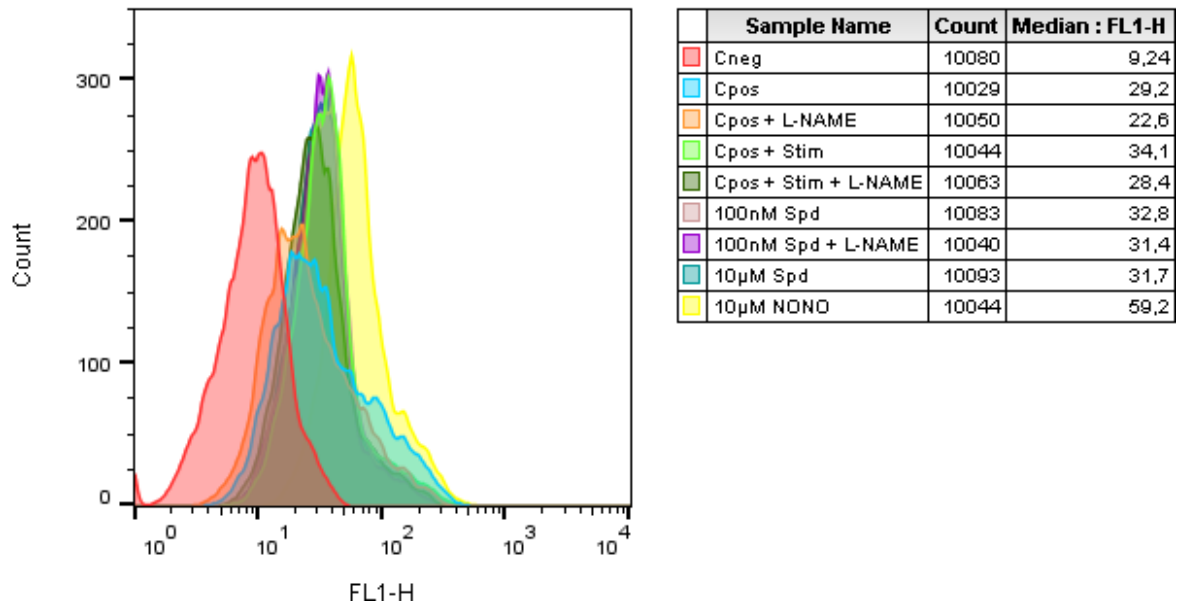


Abbildung 36: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt von Spermidin und L-NAME auf die NO-Produktion in stimulierten Mauscardiomyozyten. Die verschiedenen Proben sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet; auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenz aufgetragen. Cneg: Negativkontrolle; Cpos: Positivkontrolle; L-NAME: NOS-Inhibitor; Stim: Stimulation; Spd: Spermidin; NONO: Spermin NONOat (NO-Donor); FL1-H: *fluorescence channel 1-height*.

3.2.5 Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Mauscardiomyozyten unter Verwendung von Probenecid

Die Zugabe von Probenecid führte zu einem signifikanten Anstieg der DAF-FM Fluoreszenz bei den nicht-stimulierten Zellen (Abbildung 37 und 38; $p=0,032$).

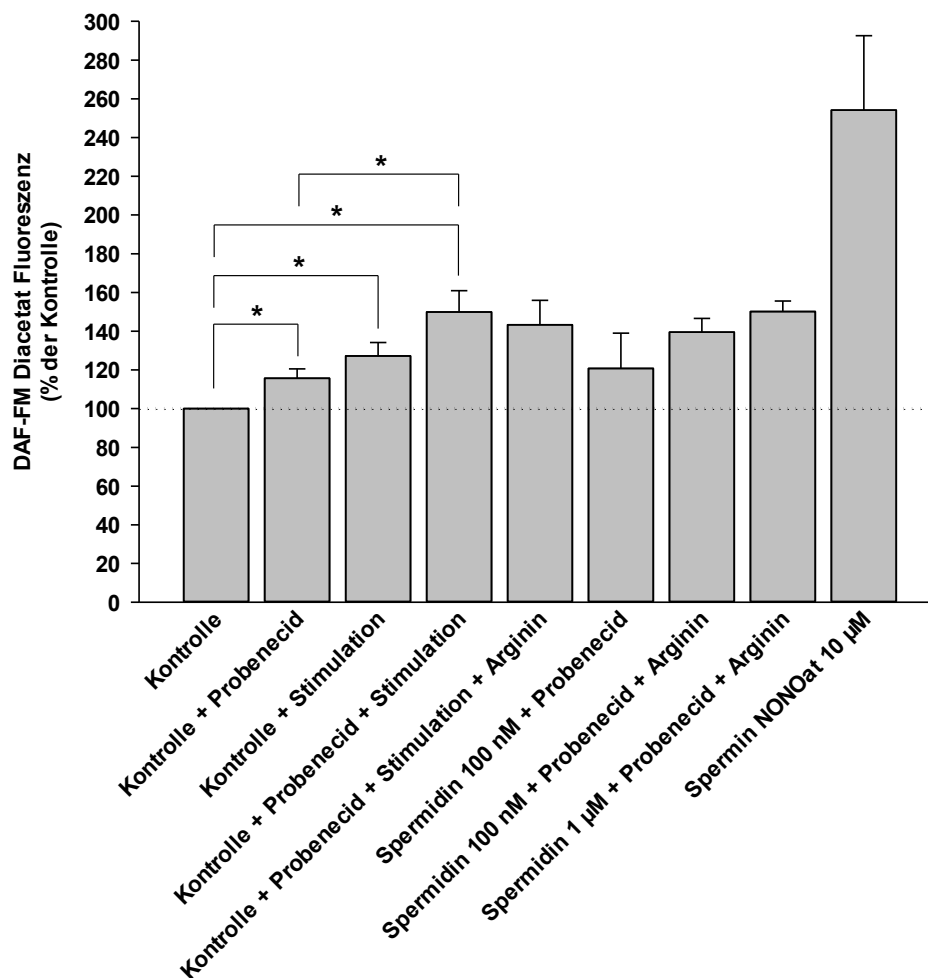


Abbildung 37: Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Mauscardiomyozyten; Einfluss von Probenecid auf das DAF-FM Fluoreszenzsignal. * $p < 0,05$. $N = 3$ Mäuse.

Hinsichtlich des Effektes bei der stimulierten Kontrolle ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,16$). Der jeweilige Fluoreszenzanstieg durch Zugabe von Probenecid und Anwendung der elektrischen Feldstimulation ist als kumulativ anzusehen. So bewirkte Probenecid alleine eine DAF-FM Fluoreszenzsteigerung auf $115,7 \pm 4,9\%$ und Feldstimulation einen Anstieg auf $127,2 \pm 7\%$ der Kontrolle ($p=0,018$). Zusammen (stimulierte Zellen mit Probenecid) addierte sich dieser

Effekt auf $149,9 \pm 11\%$ ($p=0,011$). Dies entsprach einer relativen Steigerung von 16,3% gegenüber dem kumulierten Wert von 142,9% (nicht-stimulierte Kontrolle mit Probenecid + stimulierte Kontrolle ohne Probenecid). Auch der spezifische, durch Anwendung der elektrischen Feldstimulation ausgelöste Fluoreszenzanstieg wurde somit durch Probenecid um 16,3% gesteigert.

Weiter zeigte sich ein Trend zur Verringerung des Fluoreszenzsignals bei den mit Spermidin (100nM) und Probenecid behandelten Zellen ($120,8 \pm 18,2\%$) gegenüber den stimulierten Kardiomyozyten nach der Inkubation mit Probenecid ($p=0,24$). Die Zugabe von L-Arginin zeigte keinen zusätzlichen Anstieg der DAF-FM Fluoreszenz. Auch die beiden weiteren mit Spermidin behandelten Proben (100nM sowie $1\mu\text{M}$, jeweils mit L-Arginin) unterschieden sich nicht wesentlich von den stimulierten Kontrollzellen, die mit Probenecid und L-Arginin vorbehandelt wurden.

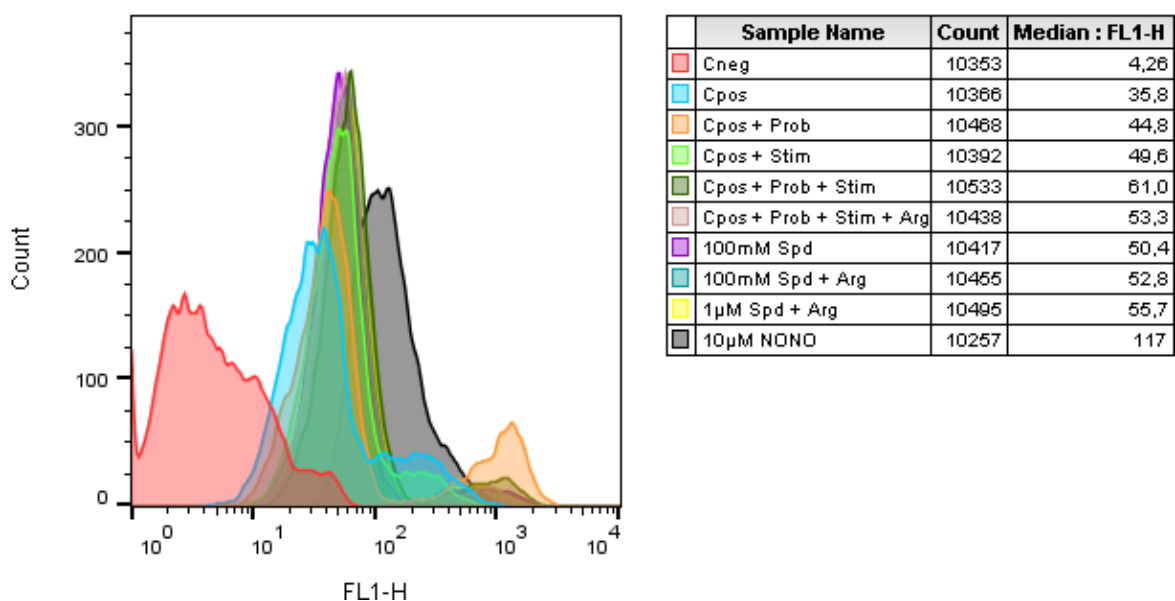


Abbildung 38: Repräsentatives FACS Histogramm (DAF-FM Fluoreszenz) für den Effekt von Spermidin auf die NO-Produktion in stimulierten Mauscardiomyozyten, die mit Probenecid vorbehandelt wurden. Die verschiedenen Proben sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet; auf der y-Achse ist die Anzahl der detektierten Zellen, auf der x-Achse die Fluoreszenz aufgetragen. Cneg: Negativkontrolle; Cpos: Positivkontrolle; Prob: Probenecid; Stim: Stimulation; Arg: L-Arginin; Spd: Spermidin; NONO: Spermin NONOat; FL1-H: *fluorescence channel 1-height*.

4 Diskussion

4.1 Endotheliale Funktion

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte orale Spermidinzufuhr bei salzsensitiven Dahl-Ratten eine Verbesserung der Endothel-abhängigen Dilatation (*endothelium-dependent vasodilation*, EDD) der thorakalen Aorta bewirkt. Im Unterschied zur Studie von LaRocca et al. (2013), die analoge Effekte auf die Gefäßalterung bei C57BL/6 Mäusen ohne Hypertonie nachweisen konnte, wurde in diesem Fall auf ein klinisch relevantes Tiermodell zurückgegriffen, um die schützende Wirkung von Spermidin auf Entstehung und Fortschreiten der Hypertonie-induzierten Herzinsuffizienz aufzuklären. Grundlegend konnte dabei bestätigt werden, dass sich bei den Dahl-Ratten die Endothelfunktion mit fortschreitender Hypertonie drastisch verschlechtert.

Der positive Effekt von Spermidin auf die EDD der thorakalen Aorta war bei den 19-wöchigen Tieren zu beobachten, die sich bereits im fortgeschrittenen Stadium der Hypertonie-induzierten kardialen Hypertrophie befinden. Keine Verbesserung zeigte sich dagegen bei den 14-wöchigen Tieren, obwohl auch diese bereits eine endotheliale Dysfunktion aufwiesen. Die Wirkung der langfristigen Spermidingabe setzt also genau in diesem 5-wöchigen Zeitraum (zwischen der 14. und 19. Lebenswoche) ein und induziert einen zumindest teilweisen Erhalt der Endothelfunktion. So verschlechtert sich die maximale Relaxation bei den Spermidin-Tieren innerhalb dieses Zeitraumes um lediglich ca. 5%, in der Kontrollgruppe dagegen um ca. 18%. Spermidingabe unterdrückt also die (weitere) Verschlechterung der Endothelfunktion.

Die Spermidinzufuhr erfolgte von Beginn der 8. Lebenswoche an, zeitgleich mit Einleitung der salzreichen Diät. Bis zur 14. Lebenswoche entwickelte sich bei den Tieren eine Hypertonie mit kompensatorischer kardialer Hypertrophie (Doi et al. 2000; Klotz et al. 2006; Qu et al. 2000). Auch die Endothelfunktion der thorakalen Aorta verschlechterte sich in diesem Zeitraum, so liegt die maximale Relaxation der 14-wöchigen Tiere nur noch bei ca. 55% der maximalen Kontraktion. In dieser Phase scheint Spermidin jedoch keinen signifikanten Effekt zu haben, obwohl bereits nach 2-wöchiger Spermidingabe der arterielle Blutdruck reduziert ist (Eisenberg et al. 2016). Es ist also von einer Art Latenzzeit der Spermidin-

bezogenen Effekte auf die Endothelfunktion der thorakalen Aorta auszugehen. Dieses Ergebnis widerspricht der Hypothese, dass eine durch Spermidin ausgelöste kurzfristige Erhöhung der Bioverfügbarkeit von NO in der Aorta einen grundlegenden Mechanismus gegen die Hypertonie darstellt. Stattdessen kommen wiederum längerfristige Autophagie-assoziierte Prozesse in Betracht (siehe unten).

In Hinblick auf diese beobachtete Latenz des Wirkungseintrittes der Spermidin-vermittelten Effekte auf die Aorta wäre eine weitere Differenzierung von Interesse. So könnte ein Versuchsansatz mit früher einsetzender Spermidingabe (z.B. bereits nach dem Absetzen von der Mutter) die Frage klären, ob tatsächlich eine reine zeitliche Wirklatenz vorliegt oder ob die Effekte mit anderen, erst im späteren Zeitraum (ab 14 Wochen) auftretenden Pathophysiologien assoziiert sind. Im Speziellen könnte der Einfluss von Spermidin also auch auf bestimmte pathophysiologische Veränderungen beschränkt sein, die erst ab einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium auftreten.

Der von Eisenberg et al. (2016) beschriebene Effekt des signifikant erniedrigten arteriellen Blutdruckes ist zwischen der 9. und 15. Lebenswoche am stärksten ausgeprägt, während er sich ab der 17. Woche wieder angleicht. Die beobachtete erhaltene Endothelfunktion im Alter scheint sich also nicht signifikant auf den Blutdruck auszuwirken. Andererseits scheint die Blutdruckdifferenz der jüngeren Tiere nicht durch eine verbesserte Endothelfunktion bedingt. Limitierend lässt sich allerdings festhalten, dass die Endothelfunktion nur an Gefäßpräparaten der thorakalen Aorta untersucht wurde. Die Blutdruckregulation erfolgt dagegen zum Großteil durch den Widerstand der kleineren Gefäße und Arteriolen der peripheren Stromgebiete. So entfallen auf die kleinen Arterien und Arteriolen circa 50% und auf die Kapillaren ca. 25% des totalen peripheren Widerstandes (TPR), während Aorta und große Arterien lediglich für 19 % des TPR maßgeblich sind (Silbernagl et al. 2012; Schmidt et al. 2011). Für eine genauere Untersuchung der Zusammenhänge wäre also eine Messung kleinerer arterieller Gefäße zu bevorzugen. Auch die Endothelfunktion der Nierenarterien wäre in diesem Zusammenhang von großem Interesse, da eine verminderte Durchblutung der Niere im juxtaglomerulären Apparat eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bewirkt. Ohnehin ist die durch ANP vermittelte Hemmung der

Renin-Ausschüttung bei den Dahl-Ratten vermindert, die fehlende renale Vasodilatation zugleich eine der Ursachen für die Ausbildung der Hypertonie (Simchon et al. 1989; Simchon et al. 1991). Bei den von Eisenberg et al. (2016) untersuchten mit Spermidin behandelten Tieren zeigte sich eine reduzierte Nierenschädigung (weniger Kollageneinlagerungen/Fibrose und Glomerulosklerose) gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.

Zur Beurteilung der oben erwähnten fehlenden Auswirkung der erhaltenen Endothelfunktion auf den Blutdruck muss beachtet werden, dass neben der Endothelfunktion auch die Versteifung der großen elastischen Arterien einen wesentlichen Anteil an der Entstehung der Hypertonie hat (LaRocca et al. 2013). Diese Versteifung von Aorta und den *Arteriae carotides communes* (Halsschlagader) entsteht durch Kollagenablagerung, Reduktion des Elastinanteils sowie die Vernetzung (sog. *cross-linking*) von Elastin und anderer Strukturproteine durch AGEs in der Wand der Arterien. Die grundlegenden Mechanismen für diese Veränderungen sind noch nicht vollends verstanden, aber ein wichtiger Auslöser scheinen vor allem vermehrter oxidativer Stress und dadurch verursachte molekulare Zellschädigungen sein. Hier scheinen wiederum die durch Spermidin gesteigerte Induktion der Autophagie und die antioxidative Wirkung die zentralen Mechanismen zum Abbau schädigender Substanzen darzustellen (Eisenberg et al. 2009; LaRocca et al. 2013). Weiter sind aber auch andere Spermidin-bedingte Effekte auf die jeweiligen beschriebenen Pathomechanismen der Versteifung von elastischen Arterien denkbar und sollten in weiterführenden Studien untersucht werden.

4.2 NO-Produktion in Kardiomyozyten

Anhand der Experimente zur Kalibrierung konnte gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich bis 100µM Spermin NONOat eine lineare Abhängigkeit der DAF-FM-vermittelten Fluoreszenz vorliegt. In Experimenten gemessene NO-Konzentrationen lassen sich so mit dem jeweiligen Spermin NONOat-Äquivalent vergleichen, was auch eine quantitative Bestimmung von NO ermöglicht. Mittels Extrapolation der Regressionsgeraden lassen sich so auch Rückschlüsse auf niedrigere oder höhere Konzentrationen ziehen (<10µM und >100µM). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die beobachtete Linearität nicht unbedingt für

alle Konzentrationsbereiche gegeben ist. Gerade für niedrigere Konzentrationsbereiche (Nano- bis Mikromolar), wie sie auch in den durchgeführten Experimenten vorlagen, wäre eine weitere Evaluation sinnvoll, auch in Hinblick auf die Detektionsgrenze und Messgenauigkeit. Im Vergleich zur Studie von Strijdom et al. (2004), die erstmals die Methode der Durchflusszytometrie zur NO-Detektion in isolierten Kardiomyozyten etabliert haben, erwies sich der gewählte Ansatz mit DAF-FM (anstelle DAF-2/DA) und Spermin NONOat (anstelle DEA/NO) als weitaus sensitiver. So bewirkte bereits die Konzentration von $10\mu\text{M}$ Spermin NONOat eine circa dreifache, hoch signifikante Steigerung der Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle, während Strijdom et al. bei einer Konzentration von $100\mu\text{M}$ DEA/NO noch keine Signifikanz nachweisen konnten. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass vor allem die beobachtete hohe Grundfluoreszenz von DAF-FM gerade bei Messungen im niedrigen Konzentrationsbereich ein Problem darstellt.

Auch die prognostizierte Steigerung der NO-Synthese durch elektrische Feldstimulation war eindeutig darstellbar, so führte die 20-minütige Stimulation zu einer durchschnittlichen Erhöhung der Fluoreszenz um 31% gegenüber der Kontrolle, was ca. 24% der durch $10\mu\text{M}$ Spermin NONOat verursachten Fluoreszenz entspricht. Man kann also sagen, dass die Menge an synthetisiertem NO in etwa derer von $2,4\mu\text{M}$ Spermin NONOat freigesetzten entspricht (äquivalent $4,8\mu\text{M}$ NO).

Ziel der Versuchsreihe mit Probenecid war die Demaskierung von eventueller Fluoreszenzreduktion durch Transport des Farbstoffes durch organische Anionentransporter aus der Zelle. Di Virgilio et al. (1990) konnten zeigen, dass eine Hemmung der MRP die Sekretion von Farbstoffen aus der Zelle unterbindet. Insgesamt existieren 9 verschiedene MRP-Subtypen beim Menschen (Slot et al. 2011). In humanen Kardiomyozyten sowie in Kardiomyozyten von Mäusen konnten verschiedene MRP-Subtypen nachgewiesen werden, so auch MRP1 und in geringerem Ausmaß MRP2 (Couture et al. 2006; Wang et al. 2013), die beide durch Probenecid inhibiert werden (Bakos et al. 2000). Sowohl der Fluoreszenzanstieg der nicht-stimulierten Proben als auch der spezifische Anstieg der Fluoreszenz bei Anwendung der elektrischen Feldstimulation wurden durch Probenecid jeweils um circa 16% gesteigert. Probenecid erwies sich damit als

sinnvoller Ansatz zur Verstärkung der (durch NO mediierten) DAF-FM Fluoreszenz und somit zur besseren Analyse der NO-Produktion. Dies konnte erstmals gezeigt werden.

Verschiedene Spermidinkonzentrationen hatten keinerlei Effekt auf die NO-Produktion in ventrikulären Mauskardiomyozyten, weder bei den Experimenten ohne, noch bei den Experimenten mit elektrischer Feldstimulation. Aufgrund der verminderten Sensitivität von DAF-FM im niedrigen Konzentrationsbereich $< 10\mu\text{M}$ könnten eventuelle Effekte bezogen auf die hohe Grundfluoreszenz sehr gering ausfallen, was eine Detektion erschwert.

Auch die Inkubation mit L-Arginin schien keinen Einfluss auf die Steigerung der NO-Produktion zu haben. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bereits genügend L-Arginin als Substrat in den Zellen vorhanden ist und die NO-Synthese durch eine weitere Konzentrationserhöhung nicht beeinflussbar ist. Dem gegenüber steht allerdings das sog. Arginin-Paradoxon (Kurz und Harrison 1997). Es besagt, dass die NO-Produktion durch exogene L-Argininingabe steigt, obwohl die physiologische, intrazelluläre L-Argininkonzentration (einige hundert μM pro Liter) die Michaelis-Menten-Konstante der eNOS ($K_m = 5\mu\text{M}$) bereits um ein Vielfaches übersteigt. Dieses Paradoxon ist dabei vor allem bei *In-vivo*-Experimenten zu beobachten, nicht jedoch bei *In-vitro*-Studien. Eine Erklärung hierfür lautet, dass L-Arginin nicht als Substrat für die NOS, sondern durch Stimulation der Insulinausschüttung eine periphere Vasodilatation bewirkt (Kurz und Harrison 1997). Weiter ist eine exogene L-Argininingabe mit einer Steigerung der Expression und Aktivität der Arginase assoziiert, was eventuell eine Verschiebung von der NO-Produktion hin zur Polyaminsynthese zur Folge hat (Dioguardi 2011). Exogenes L-Arginin fungiert also eher als Substrat für die Polyaminsynthese als für die NO-Produktion (dies möge jedoch nur bei verringerter oder unveränderter Polyaminaufnahme mit der Nahrung gelten).

Weiter könnte jedoch auch die Aufnahme von L-Arginin in die Zellen behindert sein. Zani und Bohlen (2005) beobachteten bei *In-vivo*-Versuchen an Ratten, dass eine kontinuierliche Aufnahme von L-Arginin mittels kationischem Aminosäuretransporter Typ 1 (CAT-1) aus dem extrazellulären Raum für die NO-Produktion von Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielt. Die beiden im

Endothel vorhandenen Transportsysteme für kationische Aminosäuren, genannt γ^+ - (vor allem CAT-1) und γ^+L -System, sind unter anderem durch kationische und neutrale Aminosäuren beeinflussbar, so bewirkt z.B. deren erhöhte Konzentration im extrazellulären Raum den Transport von L-Arginin aus der Zelle (Kakoki et al. 2006). Ob diese Beobachtungen allerdings auch von Relevanz in Hinblick auf die NO-Synthese in Kardiomyozyten sind, ist unklar. So sind je nach Gewebe- bzw. Zell- und NOS-Typ die verschiedenen L-Arginin-Quellen (endogene Synthese, Transport in die Zelle, Proteinumsatz bzw. -abbau) von unterschiedlicher Bedeutung (Morris, JR 2016). Der Transport bzw. die exogene Zufuhr von L-Arginin muss also bei Kardiomyozyten - im Gegensatz zum Endothel - nicht unbedingt wesentlich sein. Stattdessen könnte hier z.B. auch die endogene Synthese den Bedarf ausreichend decken.

Wie zuvor erwähnt zeigte sich generell bei den Farbstoff-positiven Kontrollen jeweils eine relativ hohe Fluoreszenz, die sich lediglich zu einem geringen Anteil mit dem nicht-selektiven NOS-Inhibitor L-NAME (100 μ M) senken ließ. Rees et al. (1990) beobachteten bei dieser L-NAME-Konzentration eine nahezu vollständige Hemmung der cGMP-Formation in Endothelzellen der thorakalen Aorta von Schweinen (mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 3,1 μ M). Auch der vasodilatorische Effekt von Acetylcholin auf die Aorta von Ratten konnte mit einer Konzentration von 10 μ M L-NAME fast komplett gehemmt werden (EC_{50} von 0,54 μ M). Pfeiffer et al. (1996) beobachteten dagegen eine IC_{50} von 70 μ M L-NAME bei Inhibierung der nNOS aus Rattenhirn, eine annähernd vollständige Hemmung zeigte sich erst bei Konzentrationen ab 1mM L-NAME. Dies legt den Schluss nahe, dass die gewählte L-NAME-Konzentration von 100 μ M zwar für eine vollständige Hemmung der eNOS, nicht jedoch der nNOS ausreichend ist, was zumindest teilweise die geringe Unterdrückung der Fluoreszenz erklärt. Insgesamt betrachtet liegt jedoch dennoch die Vermutung nahe, dass ein Großteil der Fluoreszenz nicht durch NO vermittelt ist, sondern der Farbstoff auch nicht-selektiv aktiviert wurde. So berichten auch Strijdom et al. (2004) von einer 5-fach gesteigerten Fluoreszenz bei unbehandelten Proben mit Farbstoff im Vergleich zu unbehandelten Proben ohne Farbstoff. Verwendet wurde dabei der in seiner chemischen Struktur sehr ähnliche DAF-2/DA-Farbstoff. Eine mögliche Erklärung für diese hohe Grundfluoreszenz und deren fehlende Hemmbarkeit könnte die

intrazelluläre Deacetylierung von DAF-FM Diacetat zu DAF-FM, welches bereits ohne weitere Reaktion mit NO^+ -Äquivalenten eine gewisse Eigenfluoreszenz aufweist (siehe Seite 28 ff.), liefern.

Weiter zeigte sich auch der durch elektrische Feldstimulation ausgelöste Anstieg der NO-abhängigen Fluoreszenz von DAF-FM nicht durch L-NAME hemmbar. Die Hemmung betrug bei den stimulierten Zellen im Durchschnitt lediglich 10%, was in etwa auch dem Niveau bei den nicht-stimulierten Zellen entspricht. Zu erwarten wäre wiederum eine nahezu komplette Hemmbarkeit des 25%igen Fluoreszenzanstieges gegenüber der nicht-stimulierten Kontrolle, legt man die Hypothese zu Grunde, dass dieser nur oder zumindest größtenteils durch NO-Synthese zustande kommt. Pavlovic et al. (2013) beobachteten bei 20-minütiger Stimulation mit fast identem Protokoll einen ca. 50%igen Fluoreszenzanstieg, der mit 1mM L-NAME annähernd vollständig hemmbar war. Verwendet wurden allerdings Kardiomyozyten von Ratten, die Messungen erfolgten mittels Fluoreszenzmikroskopie ohne längere vorherige Inkubation.

In Hinblick auf die beschriebenen Kontroversen ist der gewählte Versuchsansatz zur Detektion von intrazellulärem NO mittels DAF-FM und Durchflusszytometrie (Strijdom et al. 2004) betreffend den niedrigen Konzentrationsbereich von Nano- bis wenige Mikromolar NO-Donor-Äquivalent zu hinterfragen.

Eine neuartige Alternative hierfür stellt z.B. die Detektion von NO mittels genetisch kodierter NO-Sonden (sog. geNOps) dar. Eroglu et al. (2016) konnten erstmals eine Reihe unterschiedlicher geNOps generieren, die sowohl im Zytoplasma als auch auf subzellulärer Ebene (z.B. in Mitochondrien) NO im nanomolaren Konzentrationsbereich binden. Diese Methode konnte bereits in verschiedenen Zellkulturen, darunter auch Endothelzellen und embryonale Kardiomyozyten, etabliert werden. Die geNOps wurden dabei mittels Klonierung in die Zellen gebracht. Ob sich diese allerdings auch in frisch isolierte, intakte Herzmuskelzellen transfizieren lassen ist derzeit ungeklärt. Aufgrund der konzentrationsabhängigen, selektiven, voll reversiblen und wiederholbaren Bindung von NO sind geNOps besonders für die Echtzeitdarstellung von NO-Signalen in Einzelzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie bestens geeignet.

Ein großer Vorteil der verwendeten Methode der Durchflusszytometrie gegenüber der Fluoreszenzmikroskopie mit separater Messung von einzelnen Zellen ist dagegen vor allem die höhere Repräsentativität, da sich hiermit eine größere Anzahl von Zellen innerhalb weniger Minuten betrachten lassen.

4.3 Zusammenfassung und klinische Perspektive

Es konnte gezeigt werden, dass eine orale Spermidingabe bei salzsensitiven Dahl-Ratten eine Verbesserung der Endothel-vermittelten, NO-abhängigen Relaxationsfähigkeit der thorakalen Aorta bewirkt. Dieser Effekt zeigte sich nach 12-wöchiger Spermidingabe (19 Wochen alte Tiere) signifikant. Nach 7-wöchiger Spermidingabe (14 Wochen alte Tiere) konnte dagegen kein positiver Effekt auf die thorakale Aorta festgestellt werden. Als ursächliche Mechanismen kommen demnach keine akuten Effekte in Betracht, die zu einer Erhöhung des NOS-Substrates L-Arginin und damit gesteigerter NO-Synthese in der thorakalen Aorta führen. Eine Evaluation der NO-Bioverfügbarkeit und endothelialen Funktion in kleineren arteriellen Gefäßen (z.B. im Mesenterium) wäre diesbezüglich durchaus sinnvoll.

Die zweite Hypothese, dass eine akute Inkubation mit Spermidin die NO-Produktion in Mauskardiomyozyten erhöht, konnte dagegen nicht belegt werden. Einschränkungen dieser Schlussfolgerung ergeben sich in Hinblick auf den verwendeten DAF-FM Farbstoff: Dieser erscheint aufgrund seiner hohen, offensichtlich nicht selektiv NO-abhängigen Grundfluoreszenz nur bedingt für die Detektion von NO in niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereichen geeignet, stellt aber aufgrund mangelnder ausgereifter Alternativen aktuell dennoch die Methode der Wahl dar.

Trotz dieser nicht restlos geklärten Rolle der Steigerung der NO-Produktion als ursächlichem Mechanismus stellt das Polyamin Spermidin in Hinblick auf die von Eisenberg et al. (2016) beschriebenen pleiotropen kardioprotektiven Effekte einen vielversprechenden Ansatz für die Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Erste epidemiologische Studien deuten darauf hin, dass eine spermidinreiche Ernährung auch beim Menschen kardioprotektiv wirkt. So konnte mit Daten aus der sog. Bruneck-Studie (Stegemann et al. 2014), einer seit 1990 bestehenden, fortlaufenden Evaluierung der Ernährungsgewohnheiten einer

Bevölkerungsgruppe in Südtirol (Italien), die Menge an Spermidin, die mit der Nahrung aufgenommen wurde, für jede Person berechnet werden. Weiter zeigte ein Vergleich dieser Daten mit der jeweiligen Krankheitsgeschichte, dass die zugeführte Spermidinmenge negativ mit dem arteriellen Blutdruck, dem Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen sowie der Herzinsuffizienzbedingten Mortalität korreliert. Eine spermidinreiche Ernährungsweise scheint daher als grundlegender Ansatz zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen geeignet. Ob Spermidin darüber hinaus auch einen therapeutischen Effekt auf vorbestehende Erkrankungen wie z.B. Hypertonie hat und ob sich die im Tierversuch beobachteten Effekte vollständig auf den Menschen übertragen lassen, muss in weiterer Folge genauer untersucht werden. So könnte Spermidin präventiv im Sinne einer bewusst spermidinreichen Ernährung oder als Nahrungsergänzung zugeführt werden. Auch ist längerfristig eine Verwendung als natürliches Antihypertensivum, alleine oder in Kombination mit etablierten Standardtherapien (z.B. ACE-Hemmer, Diuretika, Kalziumantagonisten) zur Behandlung manifester Erkrankungen denkbar. Mögliche additive und synergistische Wirkungen könnten z.B. die Dosis bestimmter Antihypertensiva und die damit verbundenen Nebenwirkungen reduzieren. Dieses Potential könnte, nicht zuletzt auch in Hinblick auf den finanziellen Aspekt und die damit verbundene Zugänglichkeit zu effektiven Therapiemöglichkeiten von kardiovaskulären Erkrankungen, einen Meilenstein der medizinischen Grundlagenforschung darstellen.

Literaturverzeichnis

- Atiya Ali, Mohamed; Poortvliet, Eric; Stromberg, Roger; Yngve, Agneta (2011): Polyamines in foods: development of a food database. In: *Food & nutrition research* 55. DOI: 10.3402/fnr.v55i0.5572.
- Bakos, E.; Evers, R.; Sinko, E.; Varadi, A.; Borst, P.; Sarkadi, B. (2000): Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. In: *Molecular pharmacology* 57 (4), S. 760–768.
- Bardocz, S.; Duguid, T. J.; Brown, D. S.; Grant, G.; Pusztai, A.; White, A.; Ralph, A. (1995): The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth. In: *The British journal of nutrition* 73 (6), S. 819–828.
- Bauer, V.; Sotnikova, R. (2010): Nitric oxide – the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions. In: *gpb* 29 (4), S. 319–340. DOI: 10.4149/gpb_2010_04_319.
- Behrends, Jan C.; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer (2017): Physiologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-004-132217>.
- Bell, Robert M.; Mocanu, Mihaela M.; Yellon, Derek M. (2011): Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 50 (6), S. 940–950. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
- Bohlen, Harold Glenn (2015): Nitric oxide and the cardiovascular system. In: *Comprehensive Physiology* 5 (2), S. 808–823. DOI: 10.1002/cphy.c140052.
- Bolla, Manlio; Matrougui, Khalid; Loufrani, Laurent; Maclouf, Jacques; Levy, Bernard; Levy-Toledano, Sylviane et al. (2002): p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for thromboxane- induced contraction in perfused and pressurized rat mesenteric resistance arteries. In: *Journal of vascular research* 39 (4), S. 353–360.
- Bonnefont-Rousselot, Dominique (2016): Resveratrol and Cardiovascular Diseases. In: *Nutrients* 8 (5). DOI: 10.3390/nu8050250.
- Borbely, Attila; Falcao-Pires, Ines; van Heerebeek, Loek; Hamdani, Nazha; Edes, Istvan; Gavina, Cristina et al. (2009): Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium. In: *Circulation research* 104 (6), S. 780–786. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.193326.
- Cauvin, C.; Loutzenhiser, R.; van Breemen, C. (1983): Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 23, S. 373–396. DOI: 10.1146/annurev.pa.23.040183.002105.

- Cerrada-Gimenez, Marc; Pietila, Marko; Loimas, Suvikki; Pirinen, Eija; Hyvonen, Mervi T.; Keinanen, Tuomo A. et al. (2011): Continuous oxidative stress due to activation of polyamine catabolism accelerates aging and protects against hepatotoxic insults. In: *Transgenic research* 20 (2), S. 387–396. DOI: 10.1007/s11248-010-9422-5.
- Chen, Meinan; Rao, Yanhua; Zheng, Yi; Wei, Shiqing; Li, Ye; Guo, Tong; Yin, Ping (2014): Association between soy isoflavone intake and breast cancer risk for pre- and post-menopausal women: a meta-analysis of epidemiological studies. In: *PloS one* 9 (2), e89288. DOI: 10.1371/journal.pone.0089288.
- Chen, P. Y.; Sanders, P. W. (1991): L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. In: *The Journal of clinical investigation* 88 (5), S. 1559–1567. DOI: 10.1172/JCI115467.
- Couture, Lucie; Nash, John A.; Turgeon, Jacques (2006): The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. In: *Pharmacological reviews* 58 (2), S. 244–258. DOI: 10.1124/pr.58.2.7.
- Das, I.; Khan, N. S. (1995): Inhibition of nitric oxide synthase by L-arginine metabolites. In: *Biochemical Society transactions* 23 (2), 324S.
- Das, I.; Khan, N. S. (1996): Differing effects of polyamines on nitric oxide synthase. In: *Biochemical Society transactions* 24 (3), 484S.
- Dedkova, E. N.; Wang, Y. G.; Ji, X.; Blatter, L. A.; Samarel, A. M.; Lipsius, S. L. (2007): Signalling mechanisms in contraction-mediated stimulation of intracellular NO production in cat ventricular myocytes. In: *The Journal of physiology* 580 (Pt 1), S. 327–345. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.126805.
- Di Virgilio, F.; Steinberg, T. H.; Silverstein, S. C. (1990): Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. In: *Cell calcium* 11 (2-3), S. 57–62.
- Dioguardi, Francesco Saverio (2011): To give or not to give? Lessons from the arginine paradox. In: *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* 4 (2), S. 90–98. DOI: 10.1159/000327777.
- Doi, R.; Masuyama, T.; Yamamoto, K.; Doi, Y.; Mano, T.; Sakata, Y. et al. (2000): Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. In: *Journal of hypertension* 18 (1), S. 111–120.
- Ducros, Veronique; Ruffieux, Daniel; Belva-Besnet, Helene; Fraipont, Florence de; Berger, Francois; Favier, Alain (2009): Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *Analytical biochemistry* 390 (1), S. 46–51. DOI: 10.1016/j.ab.2009.04.007.

Eisenberg, Tobias; Abdellatif, Mahmoud; Schroeder, Sabrina; Primessnig, Uwe; Stekovic, Slaven; Pendl, Tobias et al. (2016): Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. In: *Nature medicine*. DOI: 10.1038/nm.4222.

Eisenberg, Tobias; Knauer, Heide; Schauer, Alexandra; Buttner, Sabrina; Ruckenstuhl, Christoph; Carmona-Gutierrez, Didac et al. (2009): Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. In: *Nature cell biology* 11 (11), S. 1305–1314. DOI: 10.1038/ncb1975.

Eroglu, Emrah; Gottschalk, Benjamin; Charoensin, Suphachai; Blass, Sandra; Bischof, Helmut; Rost, Rene et al. (2016): Development of novel FP-based probes for live-cell imaging of nitric oxide dynamics. In: *Nature communications* 7, S. 10623. DOI: 10.1038/ncomms10623.

Forstermann, Ulrich; Sessa, William C. (2012): Nitric oxide synthases: regulation and function. In: *European heart journal* 33 (7), 829-37, 837a-837d. DOI: 10.1093/eurheartj/ehr304.

Ghisalberti, Carlo A.; Borzi, Rosa M.; Cetrullo, Silvia; Flamigni, Flavio; Cairo, Gaetano (2016): Soft TCPTP Agonism—Novel Target to Rescue Airway Epithelial Integrity by Exogenous Spermidine. In: *Frontiers in pharmacology* 7, S. 147. DOI: 10.3389/fphar.2016.00147.

Giordano, Emanuele; Flamigni, Flavio; Guarnieri, Carlo; Muscari, Claudio; Pignatti, Carla; Stefanelli, Claudio et al. (2010): Polyamines in Cardiac Physiology and Disease. In: *TOHFJ* 3 (2), S. 25–30. DOI: 10.2174/1876535101003020025.

Guerra, Gustavo Petri; Mello, Carlos Fernando; Sauzem, Patricia Dutra; Berlese, Daiane Bolzan; Furian, Ana Flavia; Tabarelli, Zuleica; Rubin, Maribel Antonello (2006): Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. In: *Psychopharmacology* 186 (2), S. 150–158. DOI: 10.1007/s00213-006-0376-5.

Guerra, Gustavo Petri; Rubin, Maribel Antonello; Mello, Carlos Fernando (2016): Modulation of learning and memory by natural polyamines. In: *Pharmacological research*. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.03.023.

Hashemzaei, Mahmoud; Entezari Heravi, Reza; Rezaee, Ramin; Roohbakhsh, Ali; Karimi, Gholamreza (2017): Regulation of autophagy by some natural products as a potential therapeutic strategy for cardiovascular disorders. In: *European journal of pharmacology*. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.02.038.

Hooper, Lee; Kroon, Paul A.; Rimm, Eric B.; Cohn, Jeffrey S.; Harvey, Ian; Le Cornu, Kathryn A. et al. (2008): Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. In: *The American journal of clinical nutrition* 88 (1), S. 38–50.

- Hu, J.; Mahmoud, M. I.; el-Fakahany, E. E. (1994): Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. In: *Neuroscience letters* 175 (1-2), S. 41–45.
- Huang, J. (2004): Cell signalling through thromboxane A2 receptors. In: *Cellular Signalling* 16 (5), S. 521–533. DOI: 10.1016/j.cellsig.2003.10.008.
- Kakoki, Masao; Kim, Hyung-Suk; Edgell, Cora-Jean S.; Maeda, Nobuyo; Smithies, Oliver; Mattson, David L. (2006): Amino acids as modulators of endothelium-derived nitric oxide. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 291 (2), F297-304. DOI: 10.1152/ajprenal.00417.2005.
- Kalac, Pavel (2014): Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005-mid 2013. In: *Food chemistry* 161, S. 27–39. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.03.102.
- Kaye, D. M.; Wiviott, S. D.; Balligand, J. L.; Simmons, W. W.; Smith, T. W.; Kelly, R. A. (1996): Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. In: *Circulation research* 78 (2), S. 217–224.
- Klotz, Stefan; Hay, Ilan; Zhang, Geping; Maurer, Mathew; Wang, Jie; Burkhoff, Daniel (2006): Development of heart failure in chronic hypertensive Dahl rats: focus on heart failure with preserved ejection fraction. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 47 (5), S. 901–911. DOI: 10.1161/01.HYP.0000215579.81408.8e.
- Kojima; Urano; Kikuchi; Higuchi; Hirata; Nagano (1999): Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 38 (21), S. 3209–3212.
- Kruger, Martina; Kotter, Sebastian; Grutzner, Anika; Lang, Patrick; Andresen, Christian; Redfield, Margaret M. et al. (2009): Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. In: *Circulation research* 104 (1), S. 87–94. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184408.
- Kurz, S.; Harrison, D. G. (1997): Insulin and the arginine paradox. In: *The Journal of clinical investigation* 99 (3), S. 369–370. DOI: 10.1172/JCI119166.
- Kwon, Dae Young; Daily, James W. 3rd; Kim, Hyun Jin; Park, Sunmin (2010): Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. In: *Nutrition research (New York, N.Y.)* 30 (1), S. 1–13. DOI: 10.1016/j.nutres.2009.11.004.
- LaRocca, Thomas J.; Gioscia-Ryan, Rachel A.; Hearon, Christopher M., JR; Seals, Douglas R. (2013): The autophagy enhancer spermidine reverses arterial aging. In: *Mechanisms of ageing and development* 134 (7-8), S. 314–320. DOI: 10.1016/j.mad.2013.04.004.
- Larque, Elvira; Sabater-Molina, Maria; Zamora, Salvador (2007): Biological significance of dietary polyamines. In: *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 23 (1), S. 87–95. DOI: 10.1016/j.nut.2006.09.006.

- Lawrence, Stephen A. (2004): Amines. Synthesis, properties, and applications. Cambridge: Cambridge University Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/description/cam041/2003065415.html>.
- LeWinter, Martin M.; Granzier, Henk (2010): Cardiac titin: a multifunctional giant. In: *Circulation* 121 (19), S. 2137–2145. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.860171.
- Linke, Wolfgang A.; Hamdani, Nazha (2014): Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. In: *Circulation research* 114 (6), S. 1052–1068. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301286.
- Loutzenhiser, R.; Hayashi, K.; Epstein, M. (1989): Divergent effects of KCl-induced depolarization on afferent and efferent arterioles. In: *The American journal of physiology* 257 (4 Pt 2), F561-4.
- Mendes Ribeiro, A. C.; Brunini, T. M.; Ellory, J. C.; Mann, G. E. (2001): Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. In: *Cardiovascular research* 49 (4), S. 697–712.
- Minois, Nadege (2014): Molecular basis of the 'anti-aging' effect of spermidine and other natural polyamines - a mini-review. In: *Gerontology* 60 (4), S. 319–326. DOI: 10.1159/000356748.
- Minois, Nadege; Carmona-Gutierrez, Didac; Madeo, Frank (2011): Polyamines in aging and disease. In: *Aging* 3 (8), S. 716–732. DOI: 10.18632/aging.100361.
- Molecular Probes Inc. (2001): Nitric Oxide Indicators: DAF-FM and DAF-FM Diacetate. Online verfügbar unter <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp23841.pdf>, zuletzt geprüft am 18.11.2016.
- Moore, P. K.; al-Swayeh, O. A.; Chong, N. W.; Evans, R. A.; Gibson, A. (1990): L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. In: *British journal of pharmacology* 99 (2), S. 408–412.
- Morris, Sidney M., JR (2016): Arginine Metabolism Revisited. In: *The Journal of nutrition* 146 (12), 2579S-2586S. DOI: 10.3945/jn.115.226621.
- Nakahata, Norimichi (2008): Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. In: *Pharmacology & therapeutics* 118 (1), S. 18–35. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2008.01.001.
- Ni, Z.; Oveisi, F.; Vaziri, N. D. (1999): Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 34 (4 Pt 1), S. 552–557.
- Ogden, J. E.; Moore, P. K. (1995): Inhibition of nitric oxide synthase--potential for a novel class of therapeutic agent? In: *Trends in biotechnology* 13 (2), S. 70–78. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)88908-8.

- Palmer, R. M.; Ashton, D. S.; Moncada, S. (1988): Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. In: *Nature* 333 (6174), S. 664–666. DOI: 10.1038/333664a0.
- Pavlovic, Davor; Hall, Andrew R.; Kennington, Erika J.; Aughton, Karen; Boguslavskyi, Andrii; Fuller, William et al. (2013): Nitric oxide regulates cardiac intracellular Na(+) and Ca(2)(+) by modulating Na/K ATPase via PKCepsilon and phospholemman-dependent mechanism. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 61, S. 164–171. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.013.
- Pegg, A. E.; McCann, P. P. (1982): Polyamine metabolism and function. In: *The American journal of physiology* 243 (5), C212-21.
- Pfeiffer, S.; Leopold, E.; Schmidt, K.; Brunner, F.; Mayer, B. (1996): Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. In: *British journal of pharmacology* 118 (6), S. 1433–1440.
- Pietrocola, F.; Lachkar, S.; Enot, D. P.; Niso-Santano, M.; Bravo-San Pedro, J. M.; Sica, V. et al. (2015): Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. In: *Cell death and differentiation* 22 (3), S. 509–516. DOI: 10.1038/cdd.2014.215;
- Pucciarelli, Stefania; Moreschini, Benedetta; Micozzi, Daniela; Fronzo, Giusi S. de; Carpi, Francesco M.; Polzonetti, Valeria et al. (2012): Spermidine and spermine are enriched in whole blood of nona/centenarians. In: *Rejuvenation research* 15 (6), S. 590–595. DOI: 10.1089/rej.2012.1349.
- Qu, P.; Hamada, M.; Ikeda, S.; Hiasa, G.; Shigematsu, Y.; Hiwada, K. (2000): Time-course changes in left ventricular geometry and function during the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. In: *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 23 (6), S. 613–623.
- Rapp, J. P. (1982): Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats. A review. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 4 (6), S. 753–763.
- Ratz, Paul H.; Berg, Krystina M.; Urban, Nicole H.; Miner, Amy S. (2005): Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 288 (4), C769-83. DOI: 10.1152/ajpcell.00529.2004.
- Rees, D. D.; Palmer, R. M.; Schulz, R.; Hodson, H. F.; Moncada, S. (1990): Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. In: *British journal of pharmacology* 101 (3), S. 746–752.
- Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (2011): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=3066576>.
- Silbernagl, Stefan; Despopoulos, Agamemnon; Gay, Rüdiger (2012): Taschenatlas Physiologie. 8., überarbeitete und erweiterte Auflage.

- Simchon, S.; Manger, W. M.; Brown, T. W. (1991): Dual hemodynamic mechanisms for salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 17 (6 Pt 2), S. 1063–1071.
- Simchon, S.; Manger, W. M.; Carlin, R. D.; Peeters, L. L.; Rodriguez, J.; Batista, D. et al. (1989): Salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. Hemodynamics and renal responses. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 13 (6 Pt 1), S. 612–621.
- Slot, Andrew J.; Molinski, Steven V.; Cole, Susan P. C. (2011): Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). In: *Essays in biochemistry* 50 (1), S. 179–207. DOI: 10.1042/BSE0500179.
- Soda, Kuniyasu (2011): Polyamines - The Principal Candidate Substance of Soybean-Induced Health. In: Hany El-Shemy (Hg.): *Soybean and Health: InTech*.
- Soda, Kuniyasu; Dobashi, Yoh; Kano, Yoshihiko; Tsujinaka, Shingo; Konishi, Fumio (2009a): Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. In: *Experimental gerontology* 44 (11), S. 727–732. DOI: 10.1016/j.exger.2009.08.013.
- Soda, Kuniyasu; Kano, Yoshihiko; Chiba, Fumihiro (2012): Food polyamine and cardiovascular disease--an epidemiological study. In: *Global journal of health science* 4 (6), S. 170–178. DOI: 10.5539/gjhs.v4n6p170.
- Soda, Kuniyasu; Kano, Yoshihiko; Sakuragi, Masako; Takao, Koichi; Lefor, Alan; Konishi, Fumio (2009b): Long-term oral polyamine intake increases blood polyamine concentrations. In: *Journal of nutritional science and vitaminology* 55 (4), S. 361–366.
- Stegemann, Christin; Pechlaner, Raimund; Willeit, Peter; Langley, Sarah R.; Mangino, Massimo; Mayr, Ursula et al. (2014): Lipidomics profiling and risk of cardiovascular disease in the prospective population-based Bruneck study. In: *Circulation* 129 (18), S. 1821–1831. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002500.
- Strijdom, Hans; Muller, Christo; Lochner, Amanda (2004): Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 37 (4), S. 897–902. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2004.05.018.
- Sukhodub, Andriy; Du, Qingyou; Jovanovic, Sofija; Jovanovic, Aleksandar (2010): Nicotinamide-rich diet protects the heart against ischaemia-reperfusion in mice: a crucial role for cardiac SUR2A. In: *Pharmacological research* 61 (6), S. 564–570. DOI: 10.1016/j.phrs.2010.01.008.
- Sukhodub, Andriy; Sudhir, Rajni; Du, Qingyou; Jovanovic, Sofija; Reyes, Santiago; Jovanovic, Aleksandar (2011): Nicotinamide-rich diet improves physical endurance by up-regulating SUR2A in the heart. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 15 (8), S. 1703–1712. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01156.x.

Tang, W. H. Wilson; Wang, Zeneng; Cho, Leslie; Brennan, Danielle M.; Hazen, Stanley L. (2009): Diminished global arginine bioavailability and increased arginine catabolism as metabolic profile of increased cardiovascular risk. In: *Journal of the American College of Cardiology* 53 (22), S. 2061–2067. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.02.036.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2010): The Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Probes for Nitric Oxide Research - Section 18.3. 11th Edition. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/at/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/probes-for-nitric-oxide-research.html>, zuletzt geprüft am 19.11.2016.

Thomas, Thresia; Thomas, T. J. (2003): Polyamine metabolism and cancer. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 7 (2), S. 113–126.

Til, H. P.; Falke, H. E.; Prinsen, M. K.; Willems, M. I. (1997): Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 35 (3-4), S. 337–348.

van Die, M. Diana; Bone, Kerry M.; Williams, Scott G.; Pirotta, Marie V. (2014): Soy and soy isoflavones in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. In: *BJU international* 113 (5b), E119-30. DOI: 10.1111/bju.12435.

Vargas, Ashley J.; Ashbeck, Erin L.; Wertheim, Betsy C.; Wallace, Robert B.; Neuhouser, Marian L.; Thomson, Cynthia A.; Thompson, Patricia A. (2015): Dietary polyamine intake and colorectal cancer risk in postmenopausal women. In: *The American journal of clinical nutrition* 102 (2), S. 411–419. DOI: 10.3945/ajcn.114.103895.

Ventura, C.; Ferroni, C.; Flamigni, F.; Stefanelli, C.; Capogrossi, M. C. (1994): Polyamine effects on Ca²⁺ homeostasis and contractility in isolated rat ventricular cardiomyocytes. In: *The American journal of physiology* 267 (2 Pt 2), H587-92.

Villanueva, Clea; Giulivi, Cecilia (2010): Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. In: *Free radical biology & medicine* 49 (3), S. 307–316. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.004.

Wang, Jie; Nachtigal, Mark W.; Kardami, Elissavet; Cattini, Peter A. (2013): FGF-2 protects cardiomyocytes from doxorubicin damage via protein kinase C-dependent effects on efflux transporters. In: *Cardiovascular research* 98 (1), S. 56–63. DOI: 10.1093/cvr/cvt011.

World Health Organization (2016): Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Hg. v. World Health Organization. Geneva. Online verfügbar unter http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/, zuletzt geprüft am 21.02.2017.

Yang, Gong; Shu, Xiao-Ou; Li, Honglan; Chow, Wong-Ho; Cai, Hui; Zhang, Xianglan et al. (2009): Prospective cohort study of soy food intake and colorectal cancer risk in women. In: *The American journal of clinical nutrition* 89 (2), S. 577–583. DOI: 10.3945/ajcn.2008.26742.

Zani, Brett G.; Bohlen, H. Glenn (2005): Transport of extracellular l-arginine via cationic amino acid transporter is required during in vivo endothelial nitric oxide production. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 289 (4), H1381-90. DOI: 10.1152/ajpheart.01231.2004.

Zhang, Yin Hua (2016): Neuronal nitric oxide synthase in hypertension - an update. In: *Clinical hypertension* 22, S. 20. DOI: 10.1186/s40885-016-0055-8.

Zhang, Yin Hua; Jin, Chun Zi; Jang, Ji Hyun; Wang, Yue (2014): Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. In: *The Journal of physiology* 592 (15), S. 3189–3200. DOI: 10.1113/jphysiol.2013.270306.

Anhang

Spermidin und die Bioverfügbarkeit von NO in Kardiomyozyten – Experimenteller Plan

Kalibrierung:

Gruppen:

1. Zellen ohne DAF-FM (Negativkontrolle; Cneg)
2. Zellen mit DAF-FM (Positivkontrolle; Cpos)
3. Zellen mit DAF-FM + 10 μ M Spermin NONOat (10 μ M NONO)
4. Zellen mit DAF-FM + 25 μ M Spermin NONOat (25 μ M NONO)
5. Zellen mit DAF-FM + 50 μ M Spermin NONOat (50 μ M NONO)
6. Zellen mit DAF-FM + 100 μ M Spermin NONOat (100 μ M NONO)

N=5 Mäuse

Experiment 1 (ohne Feldstimulation):

Gruppen:

1. Zellen ohne DAF-FM + 100 μ M L-Arginin (Negativkontrolle; Cneg+Arg)
2. Zellen mit DAF-FM (Positivkontrolle; Cpos)
3. Zellen mit DAF-FM + 100 μ M L-Arginin (Positivkontrolle; Cpos+Arg)
4. Zellen mit DAF-FM + 1 μ M Spermidin + 100 μ M L-Arginin (1 μ M Spd+Arg)
5. Zellen mit DAF-FM + 10 μ M Spermidin + 100 μ M L-Arginin (10 μ M Spd+Arg)
6. Zellen mit DAF-FM + 100 μ M Spermidin + 100 μ M L-Arginin (100 μ M Spd+Arg)
7. Zellen mit DAF-FM + 100 μ M Spermidin (100 μ M Spd)
7. Zellen mit DAF-FM + 100 μ M Spermin NONOat + 100 μ M L-Arginin (100 μ M NONO)

N=5 Mäuse

Experiment 2 (Feldstimulation, L-NAME):

Gruppen:

1. Zellen ohne DAF + Stimulation (Negativkontrolle; Cneg)
2. Zellen mit DAF (Positivkontrolle; Cpos)
3. Zellen mit DAF + 100 μ M L-NAME (Cpos+L-NAME)
4. Zellen mit DAF + Stimulation (Cpos+Stim)
5. Zellen mit DAF + Stimulation + 100 μ M L-NAME (Cpos+Stim+L-NAME)
6. Zellen mit DAF + Stimulation + 100 nM Spermidin (100nM Spd)
7. Zellen mit DAF + Stimulation + 100 nM Spermidin + 100 μ M L-NAME (100nM Spd+L-NAME)
8. Zellen mit DAF + Stimulation + 10 μ M Spermidin (10 μ M Spd)
9. Zellen mit DAF + 10 μ M Spermin NONOat (10 μ M NONO)

N=3 Mäuse

Experiment 3 (Feldstimulation, Probenecid):

Gruppen:

1. Zellen ohne DAF-FM + Stimulation (Negativkontrolle; Cneg)
2. Zellen mit DAF-FM (Positivkontrolle; Cpos)
3. Zellen mit DAF-FM + 1mM Probenecid (Cpos+Prob)
4. Zellen mit DAF-FM + Stimulation (Cpos+Stim)
5. Zellen mit DAF-FM + Stimulation + 1 mM Probenecid (Cpos+Stim+Prob)
6. Zellen mit DAF-FM + Stimulation + 1 mM Pobenecid + 100 μ M L-Arginin (Cpos+Stim+Prob+Arg)
7. Zellen mit DAF-FM + Stimulation + 100 nM Spermidin + 1 mM Probenecid (100nM Spd+Prob)
8. Zellen mit DAF-FM + Stimulation + 100 nM Spermidin + 1 mM Probenecid + 100 μ M L-Arginin (100nM Spd+Prob+Arg)
9. Zellen mit DAF-FM + Stimulation + 1 μ M Spermidin + 1 mM Probenecid + 100 μ M L-Arginin (1 μ M Spd+Prob+Arg)
10. Zellen mit DAF-FM + 10 μ M Spermin NONOat (10 μ M NONO)

N=3 Mäuse

Endothelfunktion der Dahl-Ratten – Datentabellen

Ach Konz.	Acetylcholin Spermidin 14w, n=7		Acetylcholin Kontrolle 14w, n=7	
	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)
1 nM	100,1	0,1	99,4	0,2
3 nM	99,7	0,2	98,6	0,4
10 nM	98,0	0,4	96,9	0,6
30 nM	90,7	1,5	90,5	1,3
100 nM	77,4	2,7	76,9	2,6
300 nM	66,3	2,7	65,9	2,8
1 µM	59,2	2,3	59,1	2,8
3 µM	56,3	2,0	56,3	2,7
10 µM	54,9	1,8	55,1	2,7
EC50 (mol/l)	1,21E-07	2,25E-08	1,27E-07	2,36E-08

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 14-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Acetylcholingabe.

DEA/NO Konz.	DEA/NO Spermidin 14w, n=7		DEA/NO Kontrolle 14w, n=7	
	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)
1 nM	98,3	0,5	98,8	0,6
3 nM	93,8	1,0	95,1	1,5
10 nM	83,3	1,7	83,7	3,3
30 nM	63,2	3,3	65,6	4,2
100 nM	37,9	4,2	39,2	4,1
300 nM	19,9	3,4	18,9	2,5
1 µM	10,7	2,4	9,0	1,2
3 µM	6,8	1,8	5,1	1,0
10 µM	4,9	1,4	3,4	0,9
EC50 (mol/l)	5,72E-08	1,06E-08	6,27E-08	1,60E-08

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 14-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Gabe von NO-Donor.

	Acetylcholin Spermidin 19w, n=8		Acetylcholin Kontrolle 19w, n=7	
Ach Konz.	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)
1 nM	98,3	0,4	98,2	0,5
3 nM	96,2	0,9	95,9	1,1
10 nM	92,9	1,5	94,0	1,7
30 nM	85,8	2,6	90,5	2,0
100 nM	71,4	3,9	83,9	2,6
300 nM	63,3	4,4	77,7	3,3
1 µM	60,2	5,3	73,9	3,8
3 µM	59,9	5,7	73,4	4,2
10 µM	61,4	5,7	75,7	4,5
EC50 (mol/l)	5,64E-08	5,96E-09	8,31E-08	1,09E-08

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 19-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Acetylcholingabe.

	DEA/NO Spermidin 19w, n=8		DEA/NO Control 19w, n=7	
DEA/NO Konz.	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)	Mittelwert (% der max. Kontraktion)	Standardfehler (% der max. Kontraktion)
1 nM	95,9	1,0	97,1	1,1
3 nM	89,9	2,2	93,7	1,8
10 nM	80,7	4,3	87,1	2,5
30 nM	65,6	5,6	73,2	4,1
100 nM	44,2	4,6	52,7	4,3
300 nM	24,9	3,1	33,9	3,6
1 µM	12,6	1,9	20,2	2,1
3 µM	7,4	1,4	13,4	1,9
10 µM	4,5	1,1	8,9	2,1
EC50 (mol/l)	7,86E-08	1,23E-08	1,09E-07	2,23E-08

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardfehler der Kontraktionskraft der thorakalen Aorta von 19-wöchigen salzsensitiven Dahl-Ratten nach Gabe von NO-Donor.