

Brixius K, Bloch W

Neue Aspekte der Gefäßregulation: Erythrozyten und Durchblutungsregulation unter körperlicher Belastung

New Aspects of Vascular Regulation: Erythrocytes and Blood Flow Regulation in Exercise

Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin,
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin, Deutsche Sporthochschule Köln

ZUSAMMENFASSUNG

In der letzten Zeit wird zunehmend die Bedeutung der Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO)-Freisetzung aus den Erythrozyten für die Regulation der Gefäßdurchblutung diskutiert. Nach der sogenannten ‚S-Nitroso-Hämoglobin Hypothese‘ soll sich im oxygenierten Zustand von Hämoglobin dessen Affinität zu NO schlagartig erhöhen. Wird Hämoglobin im Verlauf der Passage der Arteriolen desoxygeniert, sinkt die NO-Affinität von Hämoglobin wieder und NO wird aus dem Erythrozyten freigesetzt. Hierdurch könnte eine Vasodilatation hervorgerufen werden. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Erythrozyten endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) enthalten, wie dies zuvor im Endothel beschrieben wurde. Es wird in diesem Zusammenhang diskutiert, ob die in den Erythrozyten vorhandene eNOS ähnlichen funktionellen Regulationsmechanismen unterliegt, wie das für die im Endothel lokalisierte eNOS der Fall ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Insulin eine verstärkte Phosphorylierung der eNOS an der Aminosäure Serin1177 bewirkt und dass diese Phosphorylierung der eNOS mit einer verstärkten Freisetzung von Nitrit einhergeht. Ähnliche Prozesse sind für das Endothel bereits bekannt. Ob, wie bereits am Endothel beschrieben, eine Erhöhung der Scherkräfte eine Zunahme der eNOS-Aktivität bewirken, muss weiter untersucht werden. In einer unlängst publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten auch aus Nitrit NO für die Vasodilatation freisetzen können. Eine Erhöhung der NO-Freisetzung aus den Erythrozyten wird in Zusammenhang mit einer Verbesserung der arteriolen Vasodilatation sowie der Erythrozytenflexibilität gebracht und könnte hierdurch dazu beitragen, die Mikrozirkulation auch unter körperlicher Aktivität zu verbessern. In dieser Übersicht soll zunächst auf die verschiedenen Hypothesen zur NO-Freisetzung aus den Erythrozyten eingegangen werden mit einem besonderen Focus auf die Bedeutung der endothelialen eNOS Aktivierung von Erythrozyten unter körperlicher Belastung.

Schlüsselwörter: Erythrozyten, Stickstoffmonoxid, eNOS, körperliche Aktivität

TRAININGSINDUZIERTE NO-FREISETZUNG UND VASKULÄRES REMODELLING

Körperliche Aktivität bewirkt über eine Aktivierung von neuronalen, metabolischen und mechanischen Signalwegen, die den Kontraktionszustand der Gefäßmuskulatur beeinflussen, eine verbesserte Regulation der Durchblutung (Übersicht bei (1,2)). Auch der Freisetzung von Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) durch eine Scherkraft- oder Rezeptor-abhängige Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) im Endothel kommt unter körperlicher Aktivität zentrale Bedeutung zu. Kurzfristig (innerhalb von

SUMMARY

Recently, the relevance of nitric oxide (NO) release from erythrocytes for the regulation of vascular blood flow has come under increasing discussion, especially since it was demonstrated in past years that erythrocytes contain nitric oxide synthase (eNOS). According to the so-called 'S-Nitroso-hemoglobin' hypothesis the NO-affinity of haemoglobin is increased in situations when haemoglobin is oxygenated and vice versa. If haemoglobin is desoxygenated during the passage of the arteriols, the NO-affinity of haemoglobin is decreased and NO will be released from the erythrocytes and may thus induce vasodilation. In the last years, it has been shown that erythrocytes also contain endothelial nitric oxide (eNOS), similar as has been described in the endothelial cells. There is an ongoing discussion whether the activation mechanisms regarding erythrocyte eNOS are similar to what has been described in the endothelial cells. It has been already described that application of insulin results in an increased phosphorylation of eNOS at amino acid serine 1177. In addition it was shown that insulin is able to induce a release of nitrite from the erythrocytes. Whether shear stress is going along with an increased eNOS activation has to be further investigated. In a recent study it was also shown that erythrocytes are also able to release NO from nitrite thus inducing vasodilation. An increase of NO from the erythrocytes has been attributed to an improvement of the arteriolar vasodilation and an increase in erythrocyte flexibility. An increase in NO-release from the erythrocytes appears to be associated with improvement in arteriolar vasodilation and erythrocyte flexibility, and could contribute in this way to improvement of microcirculation in physical exercise. This overview begins with the various hypotheses of NO-release from the erythrocytes, with special focus on the relevance of endothelial eNOS activation of erythrocytes in physical exercise.

Key words: erythrocytes, nitric oxide, eNOS, exercise

Minuten) kommt es unter körperlicher Aktivität zu einer Stimulierung der NO-Freisetzung aus dem Endothel und durch eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Zunahme der Durchblutung. Weiterhin bewirkt regelmäßige körperliche Aktivität eine Erhöhung der eNOS-Proteinexpression, sodass ein, bezogen auf die Anfangsbelastung, vergleichbarer körperlicher Belastungs-Stimulus in einer erhöhten endothelialen NO-Freisetzung resultiert. Langfristig (sechs bis acht Monate und länger) induziert körperliche Aktivität vaskuläre Umbauprozesse, die die Gefäßwand betreffen und sich in einer Vergrößerung des Gefäßlumens widerspiegeln. Hierdurch ist die Durchblutung bereits unter Basalbedingungen erhöht, wodurch

dann die eNOS-Proteinexpression wiederum vermindert werden kann (6).

MECHANISMEN DER ERYTHROZYTÄREN NO-FREISETZUNG

Es wird seit längerem kontrovers diskutiert, ob neben dem Endothel möglicherweise auch die Freisetzung von NO aus den Erythrozyten für die Regulation der Gefäßdurchblutung von Bedeutung ist. Nach der sogenannten ‚S-Nitroso-Hämoglobin Hypothese‘ soll sich im oxygenierten Zustand von Hämoglobin dessen Affinität zu NO schlagartig erhöhen (5,7). In diesem Zustand kann eine kooperative Bindung von NO an Hämoglobin erfolgen. Wird Hämoglobin im Verlauf der Passage der Arteriolen desoxygeniert, sinkt die NO-Affinität von Hämoglobin wieder und NO wird aus dem Erythrozyten freigesetzt und könnte somit durch Induktion einer Vasodilatation dazu beitragen, die Sauerstoffdiffusionsfläche dieser Gefäße zu vergrößern. In Bezug auf diesen Mechanismus gilt zu beachten, dass er sich insbesondere unter ischämischen Situationen auswirkt, da in dieser Situation auch die Arteriolen von einem Sauerstoffmangel betroffen sind. Unter normoxischen Bedingungen scheint der Mechanismus für die Relaxation von Arteriolen keine Bedeutung zu haben (vgl. Abb. 1A).

In einer unlängst publizierten Studie konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten auch aus Nitrit NO für die Vasodilatation freisetzen können (14). Voraussetzung hierfür ist jedoch, dass Nitrit nicht direkt durch die hohen Konzentrationen an Hämoglobin abgebaut wird. Es wird angenommen, dass die Erythrozyten mit Eintritt in die Arteriolen beginnen Sauerstoff abzugeben, Hämoglobin aber in dieser Situation noch seine für Sauerstoff hochaffine R-Form beibehält (vgl. Abb. 1B). Die Folge ist, dass das Hämoglobin-Molekül Untereinheiten ohne Sauerstoff-Liganden hat, die mit Nitrit in Form eines stabilen Intermediärproduktes reagieren können. Wenn im Verlauf der weiteren Passage der Erythrozyten durch die Mikrozirkulation immer mehr Sauerstoff vom Hämoglobin abdissoziiert verformt sich die Quartärstruktur von Hämoglobin in den T-Status (niedrig NO-affin), woraufhin NO aus dem Intermediärprodukt freigesetzt wird. Weil Hämoglobin im T-Status eine höhere Affinität zur Erythrozytenmembran hat, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass ein Teil des freigesetzten NO nicht mit Hämoglobin reagiert, sondern aus dem Erythrozyten in die Umgebung diffundiert. Dieser Mechanismus weist Ähnlichkeiten zur S-Nitroso-Hämoglobin-Hypothese auf und ist, ähnlich wie dieser, in hypoxischen Situationen bzw. in Situationen mit einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes von Bedeutung (4, 13, 19).

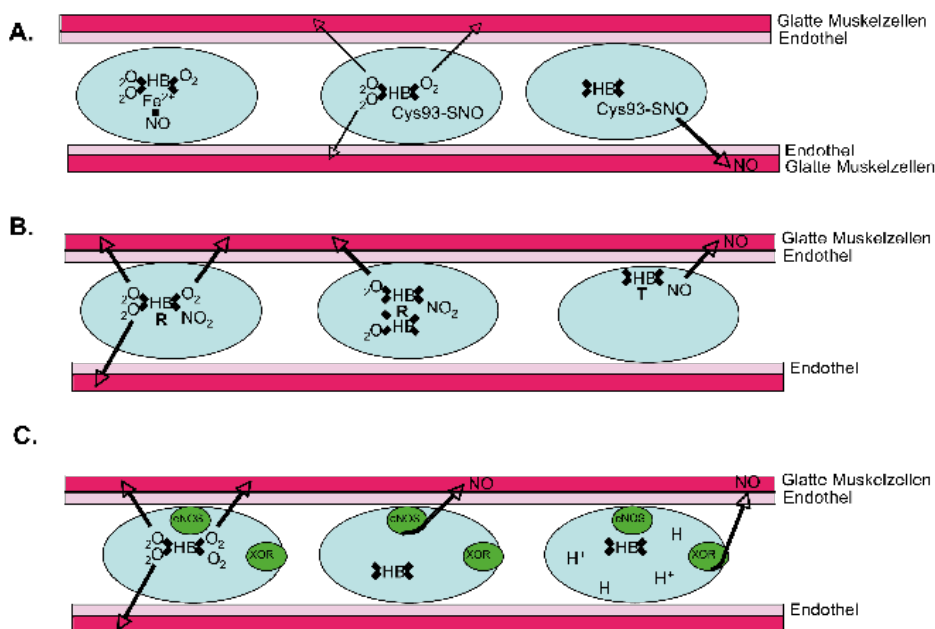


Abbildung 1: Hypothetische Schemen zur NO-Freisetzung aus den Erythrozyten im Rahmen der Passage durch die Arteriolen unter hypoxischen Bedingungen.

A) S-Nitroso-Hämoglobin-Hypothese (modifiziert nach (5)). Im oxygenierten Zustand erhöht sich die Affinität von Hämoglobin zu NO. Über ein Eisen-Nitrosylion kommt es zur Bildung von S-Nitroso-Hämoglobin. Der S-Nitroso-Hämoglobin Mechanismus wirkt sich insbesondere unter ischämischen Situationen aus, da in dieser Situation auch die Arteriolen von einem Sauerstoffmangel betroffen sind. Unter normoxischen Bedingungen scheint der Mechanismus für die Relaxation von Arteriolen keine Bedeutung zu haben. Diese Hypothese berücksichtigt nicht die Diffusionswege von NO in der Zelle bzw. zu den benachbarten Zellen.

B) Hämoglobin als Nitritreduktase (14). Bei der Passage durch die Arteriolen diffundiert Sauerstoff aus den Erythrozyten in die Peripherie. Die frei werdenden Ligandenstellen des Hämoglobins können mit Nitrit eine Bindung eingehen. Mit zunehmender Deoxygenierung bildet Hämoglobin ein Intermediärprodukt in dem Nitrit in stabiler Form beibehalten werden kann ohne eine Interaktion mit Hämoglobin einzugehen. In der vollständig desoxygenierten Form verändert Hämoglobin seine Konformation in die T-Variante. Hierdurch verändert sich die Lokalisation von Hämoglobin, es verändert seine Lage an die Erythrozytenmembran. In der desoxygenierten Form verliert Hämoglobin die Affinität zu NO und NO kann direkt vom äußeren Rand der Erythrozyten in das Endothel zw. die darunterliegende glatte Muskulatur diffundieren und hier eine Vasorelaxation auslösen. Auch hier können hypoxische Bedingungen wie sie auch im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität beschrieben werden besonders effektiv zur Dilatation der Arteriolen beitragen.

C) eNOS- und Xanthin-Oxidase-Reduktase-induzierte NO-Freisetzung (20). Unter hypoxischen Bedingungen kann es unter zunächst normalen intrazellulären pH-Werten in Ergänzung zu dem unter A) und B) beschriebenen Mechanismen zu einer zusätzlichen Freisetzung von NO aus Nitrit durch die eNOS kommen. Fällt im Verlauf der Hypoxie der intrazelluläre pH-Wert ab, so kommt es durch die Xanthin-Oxidase-Reduktase zur NO-Bildung.

Andere Untersuchungen zeigen, dass eine erhöhte ATP-Freisetzung aus den Erythrozyten parallel zur Sauerstoffabgabe in Situationen von einem erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck eine NO-Freisetzung aus dem Endothel stimuliert (17). Dadurch wäre eine direkte Kopplung der NO-Freisetzung an die metabolischen Bedürfnisse des Muskels möglich. Auch hierbei handelt es sich um einen kurzfristigen, d.h. innerhalb von wenigen Minuten aktivierbaren Prozess. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Scherkräfte zu einer Erhöhung der ATP-Freisetzung aus den Erythrozyten im Lungenkreislauf führt, wodurch der Widerstand in den Pulmonalgefäßen herabgesetzt werden kann (16). Es kann davon ausgegangen werden, dass auch bei körperlicher Aktivität die Erhöhung der ATP-Freisetzung aus den Erythrozyten für die Vasorelaxation eine Rolle spielt, zumal gezeigt worden ist, dass es unter körperlicher Aktivität zu einem Anstieg der ATP-Konzentration im Plasma kommt (3). Einschränkend muss jedoch festgehalten werden, dass eine Erhöhung der Plasmalaktat-Konzentration, wie sie im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität zu erwarten wäre, der erythrozytären ATP-Freisetzung entgegenwirkt (15).

ERYTHROZYTÄRE eNOS: AKTIVIERUNGSMECHANIEN UND FUNKTIONELLE BEDEUTUNG

Veröffentlichungen in den letzten Jahren haben gezeigt, dass auch in Erythrozyten das eNOS-Protein exprimiert ist (9,11). Es stellt sich daher die Frage, ob die in den Erythrozyten vorhandene eNOS ähnlichen funktionellen Regulationsmechanismen unterliegt, wie das für die im Endothel lokalisierte eNOS der Fall ist (s.o.). Kleinbongard und Mitarbeiter (11) konnten zeigen, dass es unter Zugabe von Insulin zu einer verstärkten Phosphorylierung der eNOS an der Aminosäure Serin1177 kommt und dass diese Phosphorylierung der eNOS mit einer verstärkten Freisetzung von Nitrit einhergeht (11). Dies bedeutet, dass Insulin in der Lage ist, an Erythrozyten, ähnlich wie bereits am Endothel beschrieben (Übersicht bei (10)) die eNOS zu aktivieren und eine Freisetzung von NO in den Erythrozyten zu induzieren.

Ob, wie bereits am Endothel beschrieben, eine Erhöhung der Scherkräfte eine Zunahme der eNOS-Aktivität bewirken, muss weiter untersucht werden. Erste eigene Untersuchungen deuten an, dass körperliche Aktivität zu Veränderungen der erythrozytären eNOS-Aktivität führen (18).

Kürzlich wurde beschrieben, dass die erythrozytäre eNOS auch aus Nitrit NO freisetzen kann (20). Es wird davon ausgegangen, dass die NO-Freisetzung aus Nitrit als Konkurrenzreaktion neben der NO-Freisetzung aus Arginin abläuft und dass diese Reaktion unter hypoxischen Bedingungen bei physiologischen pH-Werten abläuft. Kommt es jedoch unter Hypoxie zu einem Abfall des intrazellulären pH-Wertes, dann kommt es zu einer verstärkten Nitritreduktion durch die Xanthinoxidase-Reduktase (20). Es wird davon ausgegangen, dass die eNOS- bzw. Xanthinoxidase Reduktase abhängige NO-Bildung in den Erythrozyten die Desoxy-abhängige Nitrit-Reduktion ergänzt (Abb. 1C).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung der erythrozytären NO-Freisetzung. Kleinbongard und Mitarbeiter (11) konnten zeigen, dass eine Aktivierung der eNOS zu einer Erhöhung der Erythrozytenflexibilität beiträgt. Dies bedeutet, dass die Passage der Erythrozyten insbesondere durch die Gefäße der Mikrozirkulation verbessert wäre. Hier müssen weitere Untersuchungen abgewartet werden. Dennoch kann angenommen werden, dass die Freisetzung von NO in den Erythrozyten die Flexibilität der Erythrozyten erhöht und dadurch dazu beiträgt, den Blutfluss in der Mikrozirkulation zu verbessern. Dieser Aspekt ist insbesondere im Hinblick auf den Einfluss von körperlichem Training auf die NO-Freisetzung in den Erythrozyten interessant. Ein NO-vermittelter Anstieg der Erythrozytenflexibilität vermindert die Blutviskosität und könnte dadurch dazu beitragen, die Muskelperfusion zu verbessern.

FAZIT

Erythrozyten kommt nicht nur eine Bedeutung als reine Sauerstoff-Transportzellen zu, sondern sie sind auch in der Lage, insbesondere in hypoxischen Situationen durch Desoxy-Hämoglobin, ATP-Synthese, eNOS- oder Xanthin-Oxidase-Reduktase-Aktivierung NO zu produzieren. Neben einer Vasodilatation bewirkt die erythrozytäre NO-Bildung möglicherweise eine Erhöhung der Erythrozyten-Flexibilität. Diese beiden Mechanismen könnten dazu beitragen, den Blutfluss durch die Mikrozirkulation zu verbessern. Ob dies auch

eine Bedeutung unter körperlicher Belastung spielt muss in weiterführenden Experimenten gezeigt werden.

Angaben zu finanziellen Interessen und Beziehungen, wie Patente, Honorare oder Unterstützung durch Firmen: Keine.

LITERATUR

1. BODE-BÖGER SM, BÖGER RH, SCRODER EP, FRÖLICH JC: Exercise increases systemic nitric oxide production in men. *J Cardiovasc Risk* 1 (1994) 173-178.
2. DICKHUTH HH, RÖCKER K, MAYER F, KÖNIG D, KORSTEN-RECK U: Endurance training and cardiac adaptation (athlete's heart). *Herz* 29 (2004) 373-380.
3. FARIAS M 3RD, GORMAN MW, SAVAGE MV, FEIGL EO: Plasma ATP during exercise: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 288 (2005) H1586-1590.
4. GAUTIER C, VAN FAASSEN E, MIKULA I, MARTASEK P, SLAMA-SCHWOK A: Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 341 (2006) 816-821.
5. GLADWIN MT, LANCASTER JR JR, FREEMAN BA, SCHECHTER AN: Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 9 (2003) 496-500.
6. GREEN DJ, MAIORANA A, O'DRISCOLL G, TAYLOR R: Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *J Physiol* 561 (2004) 1-25.
7. JIA L, BONAVENTURA C, BONAVENTURA J, STAMLER JS: S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380 (1996) 221-226.
8. KADI A, DE ISLA N, LACOLLEY P, STOLTZ JF, MENU P: Potential relation between cytoskeleton reorganization and e-NOS activity in sheared endothelial cells (Effect of rate and time of exposure). *Clin Hemorheol Microcirc* 37 (2007) 131-140.
9. KANG ES, FORD K, GROKULSKY G, WANG YB, CHIANG TM, ACCIARDO SR: Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med* 135 (2000) 444-451.
10. KIM JA, MONTAGNANI M, KOH KK, QUON MJ: Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 113 (2006) 1888-1904.
11. KLEINBONGARD P, SCHULZ R, RASSAF T, LAUER T, DEJAM A, JAX T, KUMARA I, GHARINI P, KABANOVA S, OZÜYAMAN B, SCHNÜRCH HG, GÖDECKE A, WEBER AA, ROBENEK M, ROBENEK H, BLOCH W, RÖSEN P, KELM M: Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107 (2006) 2943-2951.
12. ROBENEK H, BLOCH W, RÖSEN P, KELM M: Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107 (2006) 2943-2951.
13. MODIN A, BJÖRNE H, HERULF M, ALVING K, WEITZBERG E, LUNDBERG JO: Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand* 171 (2001) 9-16.
14. RIFKIND JM, NAGABABU E, CAO Z, BARBIRO-MICHAELY E, MAYEVSKY A: Nitrite-induced improved blood circulation associated with an increase in a pool of RBC-NO with no bioactivity. *Adv Exp Med Biol* 645 (2009) 27-34.
15. ROZIER MD, ZATA VJ, ELLSWORTH ML: Lactate interferes with ATP release from red blood cells. *Am J Physiol* 292 (2007) 3038-3042.
16. SPRAGUE RS, OLEARCZYK JJ, SPENCE DM, STEPHENSON AH, SPRUNG RW, LONIGRO AJ: Extracellular ATP signaling in the rabbit lung: erythrocytes as determinants of vascular resistance. *Am J Physiol* 285 (2003) 693-700.
17. SPRAGUE RS, HANSON MS, ACHILLEUS D, BOWLES EA, STEPHENSON AH, SRIDHARAN M, ADDERLEY S, PROCKNOW J, ELLSWORTH ML: Rabbit erythrocytes release ATP and dilate skeletal muscle arterioles in the presence of reduced oxygen tension. *Pharmacol Rep* 61 (2009) 183-190.

18. SUHR F, PORTEN S, HERTRICH T, BRIXIUS K, SCHMIDT A, PLATEN P, BLOCH W: Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric Oxide* 20 (2009) 95-103.
19. VANIN AF, MOKH VP, SEREZHENKOV VA, CHAZOV EI: Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands. *Nitric Oxide* 16 (2007) 322-330.
20. WEBB AJ, MILSOM AB, RATHOD KS, CHU WL, QURESHI S, LOVELL MJ, LECOMTE FM, PERRETT D, RAIMONDO C, KHOSHBIN E, AHMED Z, UPPAL R, BENJAMIN N, HOBBS AJ, AHLUWALIA A: Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* 103 (2008) 957-964.

Korrespondenzadresse:

**Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Deutsche Sporthochschule Köln
Carl-Diem-Weg 6
50933 Köln
E-Mail: Brixius@dshs-koeln.de**