

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

**Der Einfluss basaler und diätetisch modifizierter Nitritspiegel auf
die kardiopulmonale Leistungsfähigkeit im Menschen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lisa-Marie Frommke

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf
Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Peer-review Originalarbeiten:

- Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Rammos C, **Frommke LM**, Knackstedt C, Predel HG, Kelm M, Rassaf T. Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes. *Nitric Oxide*. 2012;27(2):75-81.

Zitierfähige Abstracts:

- Totzeck M, Hendgen-Cotta U, Lüdike P, **Frommke L**, Heiss C, Knackstedt C, Predel H-G, Kelm M, Rassaf T. P1696 – a low cacao flavanol containing drink improves time trial performance and vascular function in highly trained athletes. *Clin Res Cardiol*. 2012;101.
- Totzeck M, Hendgen-Cotta U, **Frommke L**, Heiss C, Knackstedt C, Predel H-G, Kelm M, Rassaf T. V1532 – higher levels of endogenous nitrite are associated with superior vascular function and lactate anaerobic threshold in athletes. *Clin Res Cardiol*. 2012;101.

Zusammenfassung

Körperliche Arbeit führt zu kardiovaskulären und metabolischen Anpassungsvorgängen. Der Sauerstoffverbrauch in der Skelettmuskulatur nimmt zu. Eine erhöhte pulmonale Ventilation, eine Zunahme des Herzzeitvolumens und ein erhöhter Blutfluss in der Skelettmuskulatur verbessern das Sauerstoffangebot. Welche Faktoren die körperliche Leistungsfähigkeit limitieren und ob diese moduliert werden können, ist nicht vollständig bekannt. Der Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO[•]) nimmt in der Regulation dieser Anpassungsvorgänge eine wesentliche Rolle ein. Neuere Untersuchungen zeigen diesbezüglich, dass erhöhte NO-Spiegel mit einer verbesserten körperlichen Leistungsfähigkeit einhergehen. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die diätetische Zufuhr von anorganischem Nitrat über eine stufenweise ablaufende Bioaktivierung zu Nitrit und weiter zu NO[•] zu einer Steigerung der Leistungsfähigkeit führen kann. Ob allerdings basale endogene Nitritspiegel eine Rolle für die Leistungsfähigkeit spielen bzw. ob höhere basale endogene Nitritspiegel mit einer gesteigerten Leistungsfähigkeit assoziiert sind, ist nicht bekannt.

Flavonole erhöhen die NO-Bioverfügbarkeit über bisher unklare Mechanismen. Sie wurden darüber hinaus mit einer Verbesserung kardiovaskulärer Funktionen assoziiert. Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren es, 1.) die Bedeutung endogener basaler Nitritlevel für die Leistungsfähigkeit zu charakterisieren, 2.) die Wirkung einer erhöhten chronischen Einnahme von flavanolreichen bzw. flavanolarmen Getränken auf den plasmatischen Nitritgehalt und die Gefäßfunktion zu untersuchen und 3.) zu ermitteln, ob ein erhöhter plasmatischer Nitritspiegel und eine verbesserte Gefäßfunktion mit einer gesteigerten Leistungsfähigkeit verbunden sind.

Dabei lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen zusammenfassen:

1. Höhere endogene Nitritspiegel sind mit einer verbesserten Leistungsfähigkeit gemessen anhand der laktatanaeroben Schwelle assoziiert.
2. Die chronische Einnahme eines an Flavonolen niedrig dosierten Getränks erhöht den plasmatischen Nitritgehalt und verbessert die vaskuläre Funktion gemessen mittels flussvermittelte Dilatation (FMD) bei Ausdauertrainierten.
3. Erhöhte plasmatische Nitritspiegel sowie eine verbesserte FMD sind dabei mit einer gesteigerten Leistungsfähigkeit verbunden.

Diese Ergebnisse erweitern das bestehende Wissen über die Bedeutung endogenen Nitrits für die Leistungsfähigkeit. Eine diätetische Steigerung der plasmatischen Nitritlevel kann durch flavanolhaltige Getränke erreicht werden. Dieses ist mit einer verbesserten vaskulären Funktion vergesellschaftet und steigert die Leistungsfähigkeit. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welchen Dosis-Wirkungs-Beziehungen Flavonole folgen und wie sich die Sättigungskinetik bei der chronischen Einnahme von flavanolhaltigen Getränken verhält.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μM	Mikromolar
μl	Mikroliter
A.	Arteria, <i>lat.</i>
AÄCO ₂	Atemäquivalente für Kohlendioxid
AÄO ₂	Atemäquivalente für Sauerstoff
Abb.	Abbildung
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ATP	Adenosintriphosphat
a-v-DO ₂	arterio-venöse Sauerstoffdifferenz
BAL	Bundesausschuss für Leistungssport
BMI	body mass index, <i>engl.</i>
bpm	beats per minute, <i>engl.</i>
BTPS	body temperature pressure saturated, <i>engl.</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-C-Oxidase
CRP	C-reaktives Protein
CPX	cardiopulmonary exercise testing, <i>engl.</i>
dl	Deziliter
dest.	destilliert
EDTA-4Na	Tetrasodium-Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FECO ₂	expiratorischer CO ₂ -Gehalt
FEO ₂	expiratorischer O ₂ -Gehalt
FMD	flussvermittelte Dilatation
g	Erdbeschleunigung (9,80665 m/s ²)
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCO ₃ ⁻	Bicarbonat
HF	Herzfrequenz
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HDL	high density lipoprotein, <i>engl.</i>
HPLC	high performance liquid chromatography, <i>engl.</i>
HZV	Herzzeitvolumen
kcal	kilocalories, <i>engl.</i>
kg	Kilogramm
km	Kilometer
l	Liter
LAT	laktatanaerobe Schwelle (lactate anaerobic threshold, <i>engl.</i>)
LDL	low density lipoprotein, <i>engl.</i>
M	Mol/l
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
nmol	nanomol
NO [·]	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NO _x	Summe aus Nitrit und Nitrat
NOS	NO-Synthase

O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{·-}	Superoxidanionradikal
OH [·]	Hydroxylradikal
PIP3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
r	Korrelationskoeffizient
RER	respiratory exchange ratio, <i>engl.</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute, <i>engl.</i>
RR	Blutdruck
RR _{dia}	diastolischer Blutdruck
RR _{sys}	systolischer Blutdruck
RQ	respiratorischer Quotient
s	Sekunde
SD	Standardabweichung (standard deviation, <i>engl.</i>)
SE	Standardfehler (standard error, <i>engl.</i>)
STPD	standard temperature pressure dry, <i>engl.</i>
SV	Schlagvolumen
UV	Ultraviolett
\dot{V}_E	Ventilation / Atemminutenvolumen
VE	Ventilation / Atemminutenvolumen
$\dot{V}CO_2$	Kohlendioxidabgabe
Vis	visible, <i>engl.</i>
$\dot{V}O_2$	Sauerstoffaufnahme
$\dot{V}O_{2max}$	maximale Sauerstoffaufnahme
$\dot{V}O_{2peak}$	maximale Sauerstoffaufnahme am Ende der Belastung
vs	versus, <i>lat.</i>
W	Watt
WADA	World Anti-Doping Agency, <i>engl.</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Kardiopulmonale Leistungsfähigkeit	2
1.1.1	Umstellungsreaktionen des Organismus bei körperlicher Arbeit	2
1.1.2	Rolle von Stickstoffmonoxid in der Regulation körperlicher Leistungsfähigkeit	6
1.2	Biochemische Eigenschaften von Flavanolen	8
1.2.1	Einfluss diätetischer Flavane auf kardiovaskuläre Funktionen	8
1.2.2	Experimentelle Daten zur Modulation des zirkulierenden und gewebsständigen Stickstoffmonoxidpools durch Flavane	9
1.3	Fragestellungen	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Biochemische Analytik	11
2.1.1	Blutentnahme	11
2.1.2	Probenaufarbeitung	12
2.1.3	Klinisch-chemische Laborparameter	13
2.1.4	Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentration mittels NOx-Analyzer	14
2.2	Teilstudie A: „Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits für die Leistungsfähigkeit“	16
2.2.1	Studiendesign	16
2.2.2	Studienkollektiv	17
2.2.2.1	Bestimmung anthropometrischer Größen	18
2.2.3	Charakterisierung der Studienpopulation	19
2.2.4	Leistungstests	19
2.2.5	Leistungstest mittels Fahrradergometrie	20
2.3	Teilstudie B: „Flavane und Leistungsfähigkeit“	21
2.3.1	Studienkollektiv	21
2.3.1.1	Bestimmung anthropometrischer Größen	22
2.3.2	Charakterisierung der Studienpopulation	22
2.3.3	Zusammensetzung der Testgetränke (niedrig dosiert vs hoch dosiert)	23
2.3.4	Ablaufprotokoll der Untersuchungstage	23
2.3.5	Duplexsonographische Untersuchung der vaskulären Funktionen durch Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	26
2.3.6	Leistungstests	26
2.3.6.1	Fahrradspiroergometrie	26
2.3.6.2	Zeitfahren	27
2.4	Mathematisch-statistische Verfahren	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Teilstudie A: „Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits für die Leistungsfähigkeit“	30

3.1.1	Quantifizierung zirkulierender Nitrit- und Nitratspiegel.....	30
3.1.2	Quantifizierung der Leistung mittels Fahrradergometrie und laktatanaerober Schwelle	31
3.1.3	Abhängigkeit der laktatanaeroben Schwelle von basalen endogenen Nitritspiegeln im Plasma	32
3.2	Teilstudie B: „Flavanole und Leistungsfähigkeit“	34
3.2.1	Quantifizierung klinischer Laborparameter	34
3.2.2	Quantifizierung zirkulierender Nitrit- und Nitratspiegel.....	34
3.2.3	Abhängigkeit der laktatanaeroben Schwelle von Nitritspiegeln im Plasma unter Flavanoleinnahme	36
3.2.4	Vaskuläre Effekte unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke	36
3.2.5	Kardiopulmonale Leistungsfähigkeit unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke.....	37
3.2.6	Leistungssteigerung unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke	43
4	Diskussion	48
4.1	Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits	49
4.1.1	Der Einfluss endogenen Nitrits auf die Leistungsfähigkeit.....	50
4.2	Flavanole und ihre Rolle in der Beeinflussung von Herz-Kreislauf- Funktionen.....	54
4.2.1	Mögliche Wirkmechanismen.....	55
4.3	Ausblick und klinische Bedeutung	58
5	Literaturverzeichnis	60

1 Einleitung

Körperliche Arbeit erfordert zahlreiche kardiovaskuläre und metabolische Anpassungsvorgänge. Metabolisch aktives Gewebe wie z. B. die Skelettmuskulatur verbraucht unter Belastung signifikant mehr Sauerstoff (O₂). Dies kann bis zu einem gewissen Ausmaß durch einen erhöhten Blutfluss zur Arbeitsmuskulatur kompensiert werden. Eine intakte Gefäßfunktion ist hierbei essentiell, um eine optimale kardiopulmonale Leistungsfähigkeit zu gewährleisten.¹ Das Gefäßendothel bildet über die endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (eNOS) NO.^{2, 3} Als Botenstoff trägt NO wesentlich zur Regulation des Gefäßtonus in Ruhe und unter körperlicher Arbeit bei.⁴ Bei körperlicher Anstrengung steigt der Bedarf an Blut in der Arbeitsmuskulatur. Eine kontinuierliche Produktion und Freisetzung von NO ist dann essentiell, um die vaskuläre Homöostase aufrechtzuerhalten und eine Dilatation der Gefäße zu bewirken.^{5, 6} Neben der körpereigenen enzymatischen NO-Generierung mittels eNOS stellt auch die Reduktion endogenen Nitrits zu NO eine signifikante Ressource dar.^{7, 8} Dieser Mechanismus ist vor allem unter solchen hypoxischen Zuständen aktiv, wie sie im aktiven Muskel vorkommen können. Zudem belegen aktuelle Studien, dass die NO-Bioverfügbarkeit sowohl über die enzymatische Produktion als auch über die Ernährung beeinflusst werden kann.⁹ Nahrungsmittel, welche die Nitrat- bzw. Nitritlevel erhöhen, stellen exogene NO-Quellen dar.¹⁰⁻¹² Welche Bedeutung endogene Nitritlevel und exogene NO-Quellen auf die Leistungsfähigkeit haben, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Allgemein wird unter einer gesunden Ernährung vor allem ein hoher Anteil an Gemüse und Früchten verstanden.¹³ Im Rahmen epidemiologischer Erhebungen konnte ein Zusammenhang zwischen einer pflanzenreichen Ernährung und der Senkung kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität aufgezeigt werden.¹⁴⁻¹⁸ Anorganischem Nitrat, welches vor allem in grünem Blattgemüse vorkommt, wird dabei eine wichtige Rolle zugeschrieben.¹⁹ Neben diesem zählen die Polyphenole zu den besonders in der kardiovaskulären Forschung intensiv untersuchten pflanzlichen Substanzen.^{20, 21} Eine wichtige Rolle spielen hierbei die Flavonoide, von denen sich die sogenannten Flavanole in hohen Konzentrationen in Wein, grünem Tee und insbesondere Kakao nachweisen lassen.²² Dabei schreibt man Inhaltsstoffen der Flavanole, beispielsweise (-)-Epicatechin, eine protektive Wirkung zu. Interventionsstudien und experimentelle Daten implizieren, dass der

Wirkmechanismus auf einer Beeinflussung des zirkulierenden NO-Pools beruht.^{23,}
²⁴ ^{25,} ²⁶ Eine flavanolreiche Diät verbessert sowohl bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z. B. Rauchen, als auch bei gesunden Probanden die Gefäßfunktion.^{23,} ²⁷⁻²⁹ Über einen signifikanten Anstieg plasmatischen Nitrits nach Flavanoleinnahme können erhöhte Nitritspiegel als exogene NO-Quelle dienen und den NO-Pool beeinflussen.^{23, 25}
Inwiefern die diätetische Einnahme eines flavanolreichen oder flavanolarmen Getränks über eine verbesserte Gefäßfunktion zu einer gesteigerten körperlichen Leistungsfähigkeit führt, ist nicht bekannt.

1.1 Kardiopulmonale Leistungsfähigkeit

Unter steigender Belastung bewirkt eine erhöhte Durchblutung aktiver Muskelgruppen eine Anpassung des menschlichen Organismus an einen erhöhten O₂- und Energiebedarf.^{30, 31} Insgesamt ist das koordinierte Zusammenspiel vom kardiovaskulären, respiratorischen, nervalen und muskulären System eine wichtige Determinante für die körperliche Leistungsfähigkeit.³² Die mit spirometrischen Methoden (cardiopulmonary exercise testing, CPX) kombinierte Ergometrie ist die wichtigste klinische Methode, um die Anpassungsvorgänge von Herz, Kreislauf, Lunge und Stoffwechsel auf zunehmende Belastung zu ermitteln und die kardiopulmonale Belastbarkeit an Gesunden und Patienten quantitativ zu beurteilen.³³

1.1.1 Umstellungsreaktionen des Organismus bei körperlicher Arbeit

Steigende Belastungen erfordern verschiedene Anpassungsvorgänge des Organismus. Das Herz-Kreislauf-System stellt sich auf einen erhöhten O₂-Bedarf ein und steigert den Blutfluss. Gesteigerter Sauerstoffverbrauch ($\dot{V}O_2$) und erhöhte Kohlendioxidproduktion ($\dot{V}CO_2$) fördern zudem eine stärkere Lungenarbeit. Im vegetativen Nervensystem überwiegt die sympathikotone Innervation, was sich beispielsweise in einer erhöhten Schweißsekretion äußern kann. Hormonelle Reaktionen steigern unter Belastung katabole Prozesse im Körper, durch welche Nährstoffe zu Energielieferanten verstoffwechselt werden.³⁴ Dabei limitiert das Herz-Kreislauf-System, genauer gesagt das Herzzeitvolumen (HZV), die körperliche Belastung.³⁵⁻³⁷ Durch zahlreiche Anpassungsmechanismen im

pulmonalen und kardiovaskulären System sowie im Skelettmuskel bewirkt körperliches Training eine Steigerung der körperlichen Belastbarkeit.³⁸ Im Folgenden soll daher auf die notwendigen Umstellungsreaktionen im Herz-, Kreislauf- und Lungensystem eingegangen werden.

Herz-Kreislauf-System

Steigende Belastung erfordert ein erhöhtes HZV. Einerseits wird vermehrt O₂ zum arbeitenden Muskel transportiert; andererseits werden verschiedene Metabolite sowie vom Muskel produzierte Wärme in die Peripherie geleitet.^{35, 36} Dies wird durch eine Steigerung der Herzfrequenz (HF) und des Schlagvolumens (SV) des Herzens bewirkt.³⁹ Normwerte des HZV liegen in Ruhe bei ca. 5 l/min.³⁵ Unter körperlicher Belastung lässt sich eine Steigerung auf bis zu 20 l/min, bei Ausdauersportlern sogar kurzweilig auf bis zu 30 l/min erzielen.^{37, 39} Ausdauersportlern gelingt dies durch eine trainingsbedingte Hypertrophie des Herzmuskels, vor allem des linken Ventrikels, mit einem erhöhten SV.³⁵ Bis zu ca. 70% der maximalen Leistungsfähigkeit steigt unter Belastung zunächst das SV zur Steigerung des HZVs. Im Bereich über 70% ist keine Steigerung des SVs mehr möglich, sodass das HZV nur noch über eine HF-Steigerung gelingt.⁴⁰ Normwerte für die HF liegen ungefähr bei 60-85 Schlägen pro Minute.³⁵ Ausdauersportler können aufgrund eines höheren Parasympathikotonus und gesteigerten SVs einen niedrigeren Ruhepuls von bis zu 40 Schlägen pro Minute aufweisen.³⁵ Bei leichter bis mittelschwerer Arbeit entsteht ein Fließgleichgewicht (steady state) der HF.³⁹ Vom Ruhewert ausgehend kommt es dabei zu einer Steigerung der HF. Während der Belastung bleibt diese konstant erhöht, bevor sie in der Erholungsphase wieder abfällt. Bei schwerer Arbeit zeigt sich dagegen ein Ermüdungsanstieg ohne Erreichen eines Steady States, was schließlich eine maximale Erschöpfung bedingt.³⁶ Außerdem ändert sich auch der Blutdruck (RR) durch eine gesteigerte körperliche Aktivität.³⁶ Dabei steigt vor allem der systolische Blutdruck (RR_{sys}) proportional zur Leistung. Der diastolische Blutdruck (RR_{dia}) hingegen bleibt gleich oder verringert sich minimal.^{37, 39}

Der Skelettmuskel benötigt unter Arbeit mehr O₂, sodass eine höhere Durchblutung erforderlich ist.³⁷ Dies wird u. a. von einer verringerten Kontaktzeit des Blutes in den Kapillaren begünstigt.³⁹ Auch lokal-metabolische Mechanismen tragen jedoch zur Vasodilatation der Muskelarteriolen bei. Während einer Ausdauerleistung fällt der O₂-Partialdruck (pO₂) im Gewebe. Die Kohlendioxid-

Bildung steigt, während der pH-Wert des Gewebes sinkt und eine Gewebsazidose bewirkt. Zusammen mit der anfallenden Laktatazidose im Rahmen der Energiegewinnung und der lokalen Freisetzung von Adenosin, ATP, NO⁻ und Kalium führt dies zu einer Weitstellung der Gefäße.³⁵

Lungensystem

Der initiale Atemantrieb unter Belastung erfolgt durch eine Mitinnervation des Motorkortex im Gehirn auf das Inspirationszentrum.³⁵ Proprio(re)zeptoren (Bewegungssensoren) aus der beanspruchten Muskulatur und den Gelenken spielen dabei als Signalgeber eine wesentliche Rolle.³⁵ Zudem können auch chemische Reize eine Ventilationssteigerung bedingen. Ebenso fördern eine erhöhte Körpertemperatur sowie eine Mehrbildung von Kohlendioxid (CO₂) und die damit verbundene Abatmung die Ventilation.³⁵ Eine zunehmend aerobe Energiegewinnung bei länger andauernder Belastung zieht einen gesteigerten O₂-Verbrauch (Ruhe 250-300 ml O₂/min) mit sich.³⁵ Die $\dot{V}O_2$ hat bezüglich der Beurteilung der maximalen Leistungsfähigkeit eine zentrale Bedeutung für die Spiroergometrie.⁴¹ Physiologisch wird mithilfe von zwei Mechanismen eine $\dot{V}O_2$ -Steigerung unter Belastung erreicht: zum einen durch den Anstieg des HZV (siehe oben), zum anderen durch eine erhöhte Differenz des O₂-Gehalts zwischen arteriellem und zentralvenösem Blut (a-v-DO₂) durch vermehrte Extraktion von O₂.³¹ Folgt dieser Anstieg zu Beginn noch einer linearen Beziehung zwischen Leistung und $\dot{V}O_2$ von ca. 10 ml/min je Watt, so ist ab einer gewissen Belastungsintensität ein Plateau erreicht, an dem die Sauerstoffaufnahme nicht weiter ansteigt. An dieser Stelle ist somit die maximale Sauerstoffaufnahme ($\dot{V}O_{2max}$ in l/min bzw. ml/min/kg Körpergewicht) definiert. Sportler erreichen dabei Werte von bis zu 6 l/min. Die Werte Untrainierter liegen dagegen bei 3-3,5 l/min. Wird bei der Belastung kein Plateau erreicht, wird der Ausdruck $\dot{V}O_{2peak}$ verwendet: Er bezeichnet dann die maximal erreichte O₂-Aufnahme.^{35, 39}

Während zunehmender Belastung entsteht vermehrt CO₂, das Endprodukt der zellulären Atmung. Die $\dot{V}CO_2$ bezeichnet die Menge CO₂ in Litern, die pro Zeiteinheit abgeatmet wird.^{31, 41} Unter Belastung entsteht CO₂ metabolisch über den oxidativen Metabolismus, bei dem ca. 75% des aufgenommenen Sauerstoffs energieliefernd zu CO₂ abgebaut werden, und nichtmetabolisch über die Pufferung von Laktat.⁴¹ Bei höherer Belastung dient die anaerobe Glykolyse (Kohlenhydrat-

Stoffwechsel) der Energiegewinnung, wobei zusätzliches Laktat entsteht. Dieses wird durch physiologisches Bicarbonat (HCO_3^-) abgepuffert, sodass eine Azidose des Organismus verhindert wird. Es kommt zur Steigerung der Ventilation (\dot{V}_E) und der $\dot{V}\text{CO}_2$.⁴¹ Anfangs verhält sich die $\dot{V}\text{CO}_2$ noch linear und proportional zum Sauerstoffverbrauch, bis es schließlich ab der sogenannten anaeroben Schwelle zu einer Überproduktion von CO_2 kommt und die $\dot{V}\text{CO}_2$ zunimmt.³⁶ Die anaerobe Schwelle wiederum ist ein bedeutender Marker für die Beurteilung der Ausdauerleistungsfähigkeit: Sie bietet Sportlern unter anderem eine Möglichkeit zur Steuerung ihres Trainingsprogramms.³⁵ Mit Erreichen der anaeroben Schwelle und der anaeroben Energiegewinnung fällt vermehrt Laktat als Stoffwechselendprodukt an. Dieses muss mittels HCO_3^- eliminiert werden. Sobald dieser physiologische Puffer aufgebraucht ist, kann das Gleichgewicht zwischen Laktatproduktion und -elimination nicht länger aufrecht erhalten werden – die Ausdauerleistungsgrenze wird erreicht.^{35, 36} Ihre genaue Bestimmung lässt sich sowohl spirometrisch aus ventilatorischen Parametern („ventilatorische Schwelle“) als auch aus der Blutlaktatkonzentration ermitteln.^{35, 42}

Ein spirometrisch ermittelter Parameter ist die Respiratory Exchange Ratio (RER). Sie bezeichnet das Verhältnis von $\dot{V}\text{CO}_2$ zu $\dot{V}\text{O}_2$ während eines gesamten respiratorischen Zyklus.³⁵ Daneben existiert der Begriff des respiratorischen Quotienten (RQ): Er spiegelt das Verhältnis von $\dot{V}\text{CO}_2$ zu $\dot{V}\text{O}_2$ unter dem Aspekt, welche Art von Nahrungsstoffen zur Energiegewinnung verbraucht wird, wieder. Die RER steht daher für die äußere Lungenatmung, während der RQ die innere Atmung in der Zelle (Mitochondrium) beschreibt. Unter Ruhebedingungen befinden sich die Werte für RER und RQ in einem Gleichgewicht. Zu Beginn einer Belastungsuntersuchung können Werte <1 des RQs auf eine Energiegewinnung durch β -Oxidation hinweisen. Dieser Stoffwechselprozess benötigt zur Energielieferung im Verhältnis mehr O_2 als CO_2 , sodass der RQ <1 bleibt. Unter steigender körperlicher Betätigung sowie bei Hyper- und Hypoventilation kommt es jedoch zur Entkopplung von RER und RQ: Beide Parameter sind dann einzeln zu betrachten. In der Leistungsdiagnostik ist dafür das Erreichen der anaeroben Schwelle ein Grund. Im Rahmen einer längeren körperlichen Belastung reicht eine rein aerobe Energiegewinnung nicht aus. Dadurch müssen anaerobe Stoffwechselprozesse wie die anaerobe Glykolyse wesentlich zur Energiegewinnung beitragen. Hierbei kommt es zu einer gesteigerten Produktion

von Laktat, welches wiederum einer Elimination durch den körpereigenen HCO_3^- -Puffer bedarf. Dies hat eine gesteigerte CO_2 -Produktion zur Folge (siehe oben). Für den RQ ergibt sich daher, dass dieser ab dem Einsetzen der anaeroben Energiegewinnung nicht mehr aussagekräftig interpretiert werden kann. Die RER wiederum kann weiterhin zur Beurteilung der in der Spirometrie relevanten Lungenatmung verwendet werden.⁴²

1.1.2 Rolle von Stickstoffmonoxid in der Regulation körperlicher Leistungsfähigkeit

Bei NO^\cdot handelt es sich um ein kurzlebiges Radikal, welches endogen über die im Endothel nachgewiesene eNOS enzymatisch gebildet wird.^{3,43} Die eNOS zählt zu den NO-Synthasen (NOS) und benötigt zur Bildung von NO^\cdot die Aminosäure L-Arginin als Edukt, welche sowohl endogen dem Harnstoffzyklus als auch der Nahrung entnommen wird. Zusätzlich benötigt die eNOS molekulares O_2 , um NO^\cdot zu generieren.^{44, 45} Physiologische Funktionen von NO^\cdot im kardiovaskulären System sind u. a. die Regulation des Gefäßtonus⁴ und die Beeinflussung der Gefäßwandarchitektur, der Gefäßpermeabilität und der Thrombozytenfunktionen.⁴⁶ Insgesamt ist für die Aufrechterhaltung der vaskulären Funktionen eine intakte eNOS-Aktivität essentiell.^{5, 6} Besonders hervorzuheben ist die Funktion von NO^\cdot auf die Vasodilatation.⁴⁷ Mittels Wandschubspannung an der Oberfläche vom Endothel beeinflusst der Blutfluss die Freisetzung von NO^\cdot aus den Endothelzellen. Dieses diffundiert dann in die umliegende glatte Muskulatur der Gefäße.⁴⁸ Dort aktiviert es die Guanylylzyklase, die wiederum aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) generiert. cGMP ist in der Lage, die Proteinkinase G zu aktivieren. Diese führt unter anderem über eine Senkung der intrazellulären Kalziumspiegel zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur.^{35, 49}

NO^\cdot selbst kann im Gefäßsystem unterschiedliche Reaktionen eingehen, welche Faktoren wie dem pO_2 , pH, der Blutzusammensetzung und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) unterliegen.^{50, 51} Zusätzlich dazu, dass es eine direkte Verbindung mit Hämoglobin eingeht, oxidiert unter Normoxie enzymatisch gebildetes NO^\cdot weiter zu Nitrit oder Nitrat.⁵²

Somit stellt Nitrit ein Oxidationsprodukt von NO^\cdot dar und kann als Marker für eNOS-abhängige NO-Produktion im Plasma verwendet werden.⁵³

Untersuchungen an Patienten mit einer endothelialen Dysfunktion haben ergeben, dass ein geschädigtes Endothel in einer eingeschränkten eNOS-Funktion in einer signifikant erniedrigten NO-Bioverfügbarkeit resultiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine eingeschränkte vaskuläre Funktion die Leistungsfähigkeit ebenfalls negativ beeinflussen kann.⁵⁴⁻⁵⁶ Da molekularer O₂ für die NO-Generation mittels eNOS essentiell ist, bewirkt eine Hypoxie des Gewebes, wie sie physiologisch beim arbeitenden Muskel vorkommt, eine Einschränkung der eNOS-Funktion und der enzymatischen NO-Bildung.⁵⁷

Als alternative Quelle für bioaktives NO[•] gelten Nitrit und Nitrat. Entgegen der früheren Annahme, derzufolge sie chemisch inert seien, stellen sie im Rahmen des „Nitrat-Nitrit-NO-Weges“ eine Alternative zum zuvor beschriebenen klassischen enzymatischen L-Arginin-NOS-NO-Pfad dar. Für die NO-Generierung aus Nitrat bzw. Nitrit wird kein molekulares O₂ als Kofaktor benötigt. Die NO-Bildung hingegen ist unter Sauerstoffmangel und erniedrigtem pH-Wert augmentiert.^{7, 8, 58} Insbesondere Nitrit wird unter physiologischen hypoxischen Umständen durch verschiedene Mechanismen entlang des Sauerstoffgradienten endogen zu NO[•] reduziert.^{7, 57, 59-61} Außer durch die endogene enzymatische Produktion als Oxidationsprodukt von NO[•] kann der Nitritspiegel auch durch die Ernährung beeinflusst werden.⁶² Die Einnahme anorganischen Nitrats, wie es gehäuft in grünem Salat vorkommt, führt über eine Reduktion des Nitrats durch die Bakterien der physiologischen Mundflora zu einer Erhöhung des Nitritspiegels im Plasma.¹⁹ Sinken der pO₂ und der pH-Wert im Gewebe, kommt es durch endogene Mechanismen zu einer Reduktion von Nitrit zu bioaktivem NO[•]. Körpereigene Enzyme – wie die Xanthinoxidoreduktase⁶³, der Cytochrom-c-Oxidase⁵⁸ der mitochondrialen Elektronentransportkette und Nitritreduktasen in Form der Hämproteine desoxygenierten Hämoglobins⁵⁹ und Myoglobins⁵⁷ – sind dazu in der Lage, Nitrit zu NO[•] zu reduzieren (Nitrat-Nitrit-NO-Weg).

Ausdauersportler, die über die Nahrung zusätzlich Nitrat erhielten, wiesen in Leistungstests einen reduzierten Sauerstoffverbrauch und eine gesteigerte Ausdauerleistung auf.⁶⁴ Dabei konnte gezeigt werden, dass die Nitrataufnahme entsprechend dem Nitrat-Nitrit-NO-Weg zu erhöhten zirkulierenden Nitritspiegeln im Plasma führte und für gleiche Arbeitsleistungen weniger O₂ verbraucht werden musste. Zusätzlich zu einer unter Hypoxie erhöhten NO-Generierung aus Nitrit zur verbesserten Blutversorgung im Sinne einer NO-induzierten Vasodilatation nimmt man hier eine Verbesserung der mitochondrialen Atmung an. Im Verhältnis zum

vergleichsweise konstant gebliebenen Sauerstoffverbrauch (P/O Gradient) wird hierbei mehr ATP gebildet.⁶⁵ Die abschließende Rolle von Nitrat und Nitrit für die Leistungsfähigkeit ist bisher jedoch nicht vollständig geklärt.⁶⁴⁻⁶⁹

1.2 Biochemische Eigenschaften von Flavanolen

Der zirkulierende NO-Pool wird neben der diätetischen Aufnahme von Nitrat auch über Nahrungsflavanole beeinflusst.²⁴⁻²⁶ Flavanole zählen zu den Polyphenolen.⁷⁰ Polyphenole wiederum sind Substanzen, die von Pflanzen produziert werden, um sich gegen natürlich vorkommende Parasiten zu schützen.⁷¹ Sie setzen sich aus den Monomeren Flavanoide, Phenolcarbonsäuren, Stilbene und Ligane zusammen. Vor allem die Subklasse der Flavanoide ist dabei in der Pflanzenwelt verbreitet, um diese gegen Mikroben, Pilze und Insekten zu schützen und als Farbpigment zu dienen.⁷¹ Hauptvertreter in unserer pflanzlichen Nahrung sind ebenfalls die Flavanoide.⁷¹ Flavanoide lassen sich weiter in sechs Untergruppen aufteilen: Flavanole, Flavone, Flavonole, Isoflavone, Anthocyanidine und Flavanone. Sie können aufgrund des Oxidationszustands ihrer Sauerstoffatome am heterozyklischen Ringsystem unterschieden werden.⁷¹ Nahrungsmittel mit hohem Flavanoidgehalt sind grüner Tee, roter Wein und Produkte, die aus Kakaobohnen hergestellt werden.²² Die Polyphenole, die man im Kakao nachweisen kann, sind größtenteils Flavan-3-ole, auch Flavanole genannt.⁷⁰ Flavanole, vor allem die Monomere (-)-Epicatechin oder (+)-Catechin und ihre daraus zusammengesetzten Polymere, die Proanthocyanidine, sind die im Rahmen kardiovaskulärer Untersuchungen bisher am besten untersuchten Polyphenole^{20, 72}

1.2.1 Einfluss diätetischer Flavanole auf kardiovaskuläre Funktionen

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass ein reduziertes kardiovaskuläres Risiko mit einer flavanolreichen Nahrung assoziiert ist.⁷³ Interventionsstudien und experimentelle Daten legen nahe, dass der Wirkmechanismus u. a. auf einer Beeinflussung des zirkulierenden NO-Pools beruhen könnte.^{23, 24} Unter Flavanoleinnahme kommt es über einen signifikanten Anstieg des plasmatischen Nitrits zu einer Modulation des zirkulierenden NO-Pools, in dem ein erhöhter Nitritgehalt als exogene NO-Quelle dienen kann.²⁵ Nahrungsmittelstudien haben

ergeben, dass die diätetische Gabe eines flavanolhaltigen Getränks zu einer Verbesserung der Gefäßfunktion beiträgt, und zwar sowohl bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie z. B. Rauchen, Diabetes und Übergewicht, als auch bei gesunden Probanden.^{23, 27-29} Die Messung der FMD ist dabei eine nichtinvasive Methode zur Bestimmung der endothelialen Funktion.⁷⁴ Sie erfasst mittels hochauflösenden Ultraschalls der peripheren Leitungsbahnen die endothelabhängige Vasodilatation nach einer Ischämie. Im klinischen Gebrauch gilt sie als gut etablierter Surrogatmarker und wurde in zahlreichen Interventionsstudien mit flavanolhaltigen Getränken eingesetzt.^{23, 29, 55}

1.2.2 Experimentelle Daten zur Modulation des zirkulierenden und gewebsständigen Stickstoffmonoxidpools durch Flavane

Die Aufnahme flavanolreicher Nahrung erhöht im Plasma die monomeren Metabolite von Flavanolinen wie (-)-Epicatechin, (+)-Catechin oder Procyanidindimere.⁷² Ein bis zwei Stunden nach der Aufnahme werden dabei maximale Werte gemessen.⁷¹ (-)-Epicatechin wird in der Leber über Glucuronidierung, Methylierung und Sulfatierung metabolisiert.⁷⁵ Ramirez-Sanchez et al. wiesen kürzlich *in vitro* nach, dass das vor allem in Kakao vorkommende Flavan-3-ol (-)-Epicatechin die eNOS gemeinsam mit der abhängigen Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIP₃) aktiviert und die Produktion von NO[•] und Nitrit erhöht.²⁴

Des Weiteren beobachteten Leikert et al. erhöhte Level der eNOS-Expression und NO-Freisetzung, nachdem sie Endothelzellen mit Polyphenolen behandelten.⁷⁶

Insgesamt könnten drei Mechanismen existieren, über die Flavane die Homöostase von NO[•] beeinflussen: (i) eine erhöhte NO-Produktion durch Aktivierung der eNOS, (ii) eine gesteigerte Bereitstellung von aus NO[•] oxidiertem Nitrit als alternative Ressource für NO[•] und (iii) ein erhöhter zirkulierender NO-Pool aufgrund eines modulierten NO-Abbaus.²⁶ Ob es bei Sportlern unter chronischer Einnahme von flavanolreichen oder flavanolarmen Getränken zu einer Erhöhung des zirkulierenden NO-Pools kommt und ob dies die körperliche Leistungsfähigkeit beeinflusst, ist nicht bekannt.

1.3 Fragestellungen

Durch die erhöhte Einnahme diätetischen Nitrats kann die Leistungsfähigkeit gesteigert werden. Über die Konversion durch Bakterien der Mundflora kommt es zur Erhöhung der plasmatischen Nitritspiegel. Dieses Nitrit kann vom Körper als Quelle für NO[•] verwertet werden. Die exogene Steigerung der Nitritspiegel durch Nitrataufnahme wurde bereits in mehreren Interventionsstudien untersucht und belegt. Dagegen ist die Rolle von körpereigenem, endogenem Nitrit für die Leistungsfähigkeit bislang nicht abschließend geklärt. Darüber hinaus ist unklar, ob durch eine diätetische Zufuhr von flavanolreichen oder flavanolarmen Getränken der plasmatische Nitritgehalt, die FMD und die Leistungsfähigkeit beeinflusst werden. Es ergeben sich daher folgende Fragestellungen:

1. Korrelieren basale endogene Nitritwerte positiv mit der Leistungsfähigkeit von Ausdauertrainierten und können sie als Vorhersagewert für Leistung dienen?
2. Modifiziert eine chronische Einnahme eines flavanolreichen bzw. flavanolarmen Getränks den plasmatischen Nitritgehalt und die FMD als Zeichen einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit?
3. Sind ein erhöhter plasmatischer Nitritspiegel und eine gesteigerte FMD nach Flavanoleinnahme mit einer verbesserten Leistungsfähigkeit assoziiert?

2 Material und Methoden

Die nachfolgend beschriebenen Studien (Teilstudie A und Teilstudie B) wurden durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer 3276). Qualifizierte Studienteilnehmer waren dabei freiwillige männliche Probanden im Alter von 20 bis 35 Jahren, die regelmäßig und mehrmals wöchentlich ein Ausdauertraining in Form von Radfahren absolvieren.

In Studie A wird untersucht, welche Bedeutung basale endogene Nitritspiegel für die Leistungsfähigkeit haben. In der Teilstudie B wird der Einfluss von Flavanolen auf die Leistungsfähigkeit untersucht. Die leistungsdiagnostischen Tests beider Studien wurden am Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. H.-G. Predel) durchgeführt. In den Einrichtungen der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erfolgten die Analysen der biochemischen Parameter. Die in der Teilstudie B eingesetzten Getränke wurden durch das Koordinierungszentrum für Klinische Studien der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (KKS) maskiert.

2.1 Biochemische Analytik

2.1.1 Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten bei den hierzu liegenden Probanden über die linke Kubitalvene (BD Vacutainer Safety-Lok™ 21G, Plymouth, Großbritannien). Für die Bestimmung von Nitrit und Nitrat im Plasma wurde den Probanden an den jeweiligen Untersuchungstagen zunächst in zwei 5 ml-Einmalspritzen (BD Discardit™ II, Becton Dickinson, Fraga, Spanien) Blut entnommen. Dieses wurde in 15 ml-Röhrchen (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt, welche bereits mit 5 µl Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) vorgefüllt waren.^{51, 54} In Teilstudie B erfolgte am ersten Untersuchungstag zusätzlich die Entnahme von Blut für ein Routinelabor jeweils in ein Serum- und EDTA-Vakuümrohrchen (beides BD Vacutainer Systems, Becton Dickinson, Plymouth, Großbritannien) (siehe Tab. 2.1). An allen drei Untersuchungstagen der Teilstudie B wurden darüber hinaus zur Quantifizierung der Flavanolspiegel im Blut EDTA-Blutproben gewonnen.

2.1.2 Probenaufarbeitung

Die Zentrifuge und alle Proben wurden auf 4°C gekühlt. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Proben zur Nitrit- und Nitratbestimmung bei 800 g für zehn Minuten zentrifugiert, sodass die zellulären Anteile abgetrennt wurden.^{77, 78}

Der dadurch gewonnene Plasmaüberstand wurde für die Nitrit- und Nitratbestimmung entnommen. Er wurde in 3,6 ml-Cryogefäße (Nunc Cryo Tube Vials, Roskilde, Dänemark) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert (siehe Abb. 2.1).^{54, 55, 77}

Die Probenaufarbeitung der Teilstudie B folgte der der Teilstudie A entsprechend: Gemeinsam mit den Proben zur Nitrit- und Nitratbestimmung wurden EDTA-Vakuurröhrchen zur Flavanolbestimmung bei 800 g für zehn Minuten zentrifugiert. Das aus den EDTA-Vakuurröhrchen gewonnene Plasma wiederum wurde in 1,5 ml-Eppendorfgefäße (Microcentrifuge Tubes, 1,5 ml, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) transferiert. Dabei wurden jeweils 600 µl Plasma mit 3 µl einer Ascorbinsäurelösung aus 200 mg Ascorbinsäure auf 1 ml dest. Wasser (Millipore) inkubiert. Auch dieses wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert (Abb. 2.2).

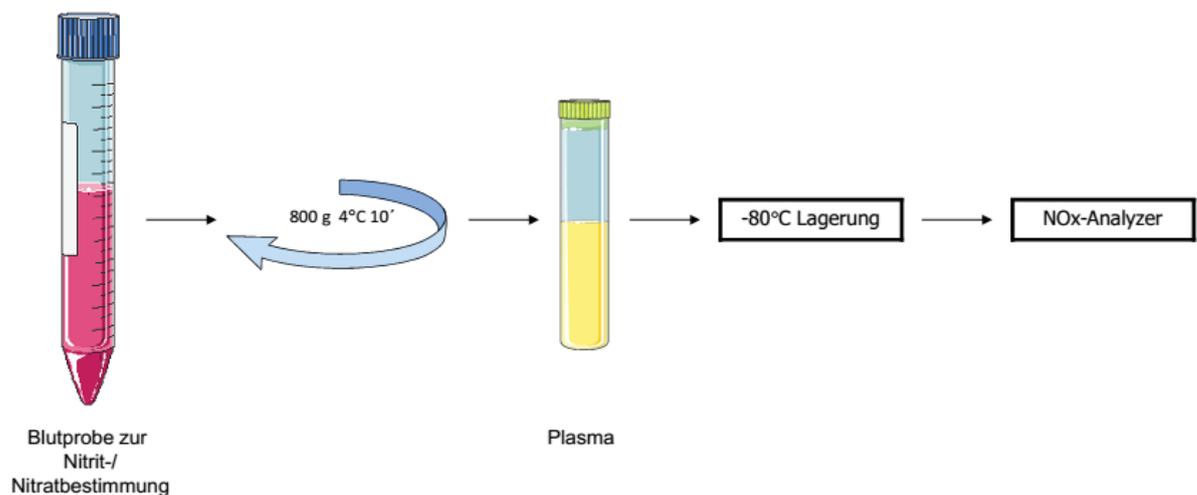


Abb. 2.1: Übersicht Probenaufarbeitung Teilstudie A. Blutentnahme zur Nitrit- und Nitratbestimmung im Plasma an beiden Untersuchungstagen.

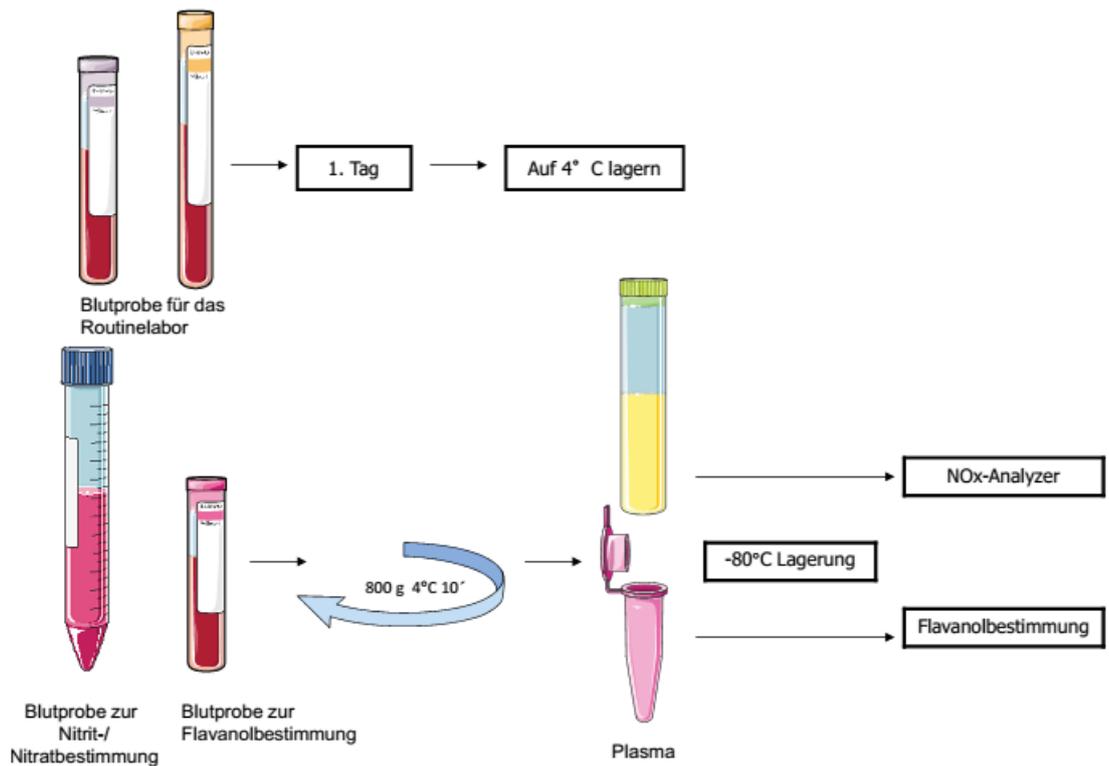


Abb. 2.2 Übersicht Probenaufarbeitung Teilstudie B. Oben: Blutentnahme des Routinelabors am 1. Untersuchungstag; unten: Blutentnahme zur Nitrit- und Nitratbestimmung im Plasma sowie zur Flavanolbestimmung an allen drei Untersuchungstagen.

2.1.3 Klinisch-chemische Laborparameter

Die Abnahme entsprechender Laborparameter zur Beurteilung des Blutbilds, der Elektrolyte und weiterer Stoffwechsellparameter des Routinelabors in der Teilstudie B erfolgte einmalig am ersten Untersuchungstag. Hierzu wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Laborparameter untersucht. Die Analyse und die Auswertung der erhobenen Werte des Routinelabors wurden am Institut für klinische Chemie und Labordiagnostik des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Tabelle 2.1 Erhobene Laborparameter

Albumin	Harnstoff
Blutbild	HbA1c
C-Reaktives Protein	HDL
Calcium	Kreatinin
Chlorid	LDL
Eisen	Magnesium
Gesamtcholesterin	Natrium
Gesamtprotein	Phosphat
Glukose	Transferrin
Harnsäure	Triglyzeride

2.1.4 Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentration mittels NOx-Analyzer

Mittels des automatischen NOx-Analyzers ENO-20 (EiCom, Kyoto, Japan) erfolgte in den Teilstudie A und B die Bestimmung von Nitrit und Nitrat im Plasma der Probanden.^{79, 80} Die für die Messungen bei -80°C asservierten Plasmaproben wurden dafür auf Eis aufgetaut. Dann wurden sie im Verhältnis 1:1 mit eisgekühltem Methanol vermischt und zur Proteinfällung bei 4°C für 10 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde erst in HPLC-Reaktionsgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäß 3810, Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling, Deutschland) und in diesen dann in den vorgeschalteten Autosampler (Varian ProStar 420 Triathlon Cool, Sunchrom, Friedrichsdorf, Deutschland) überführt. Während der gesamten Messung blieb die Kühleinheit des Autosamplers bei 4°C gekühlt.

Bei der Messung von Nitrit und Nitrat mittels NOx-Analyzer handelt es sich um eine Kombination aus Farbstoffbildung (Griess-Reaktion) durch eine Diazokupplung mittels Griess-Reagenz und der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).⁸¹ Mittels einer Umkehrphasenchromatographie wird das Nitrit und das Nitrat einer Probe im System aufgetrennt. Danach reduziert Nitrat mittels Cadmium-Kupfergranulat in der Reduktionssäule zu Nitrit. Durch Zuführen von Griess-Reagenz in das Messsystem kommt es daraufhin zu einer Bildung von Diazo-Verbindungen, welche spektrophotometrisch gemessen werden können.⁸¹ Dieses Messverfahren ermöglicht es, den Nitrit- und Nitratgehalt von Plasma oder Gewebe getrennt

voneinander bei der Analyse einer einzelnen Probe gleichzeitig messen und darstellen zu können.⁸¹

Jeder Probendurchgang dauerte rund elf Minuten, wobei die einzelnen Kurvenverläufe für Nitrit und Nitrat in der dazugehörigen Computersoftware (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) über einen Zeitraum von 10 Minuten aufgenommen wurden. Der Autoinjektor führte je 10 µl einer Plasmaprobe mittels 70 µl einer mobilen Phase aus Chloridpuffer (0,3 M NaCl und 0,1 M NH₄Cl, pH 8,5) über die Vorsäule und den Anionenaustauscher (beides EiCom, Dublin, Irland) in das System des NO_x-Analyzers ein. Bei der mobilen Phase handelt es sich um 1000 ml einer 10%igen Methanollösung mit 0,15 M NaCl/NH₄Cl, 0,5 g/l EDTA-4Na und HPLC-Wasser (Water Chromasolv Plus for HPLC, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) als Grundlage. Diese wird mithilfe einer Pumpe mit einem konstanten Fluss von 0,33 ml/min durch das System geleitet. Die Vorsäule (NO-PrePAK, EiCom, Dublin, Irland) dient dem Abfangen restlicher Proteine, bevor die Probe daraufhin in die nachgeschaltete Trennsäule weitergeleitet wird. Die Trennsäule (NO-PAK, EiCom, Dublin, Irland) ist mit einem Polystyrol-Polymer versehen. Dadurch kommt es aufgrund einer höheren Polymer-Affinität des Nitrats zu einer zeitlichen Trennung von Nitrit und Nitrat, sodass im späteren Kurvenverlauf der Nitritpeak nach ca. 4,5 Minuten und der Nitratpeak nach 8 Minuten durch die Software detektiert wird. In der nun folgenden Reduktionssäule (NO-RED, EiCom, Dublin, Irland), bestehend aus Cadmium-Kupfergranulat, wird im nächsten Schritt Nitrat zu Nitrit reduziert. Nachfolgend reagiert sowohl das ursprünglich bereits in der Probe vorhandene als auch das aus Nitrat reduzierte Nitrit in der Reaktionskapillare bei 35°C nacheinander mit dem Griess-Reagenz (Sulfanilamid und N-(1-naphthyl)ethylendiamin). Die Griess-Lösung besteht aus 1000 ml der 10%igen Methanollösung in HPLC-Wasser als Grundlage. Sie wurde mit 1,25% HCl, 5 g/l Sulfanilamid und 0,25 g/l - (1-naphthyl)ethylendiamin versetzt und mit einem konstanten Fluss von 0,1 ml/min in die Reaktionskapillare gepumpt.

Infolgedessen reagiert das Nitrit mit Sulfanilamid aus der Griess-Lösung zu einem Diazoniumsalz. In einer weiteren Reaktion mit N-(1-naphthyl)ethylendiamindihydrochlorid lässt dieses wiederum ein chromophores Azoprodukt in Form eines rötlich-violetten Diazofarbstoffs entstehen, welches bei einer Wellenlänge von 540 nm stark absorbiert.⁸² Mittels des folgenden UV/Vis-Spektrophometer (EiCom, Dublin, Irland) wurde die Absorption der sauren

Azoverbindung bei 540 nm Wellenlänge gemessen. Über eine PC-Schnittstelle kann dann die Probenkonzentration von Nitrit und Nitrat als eine Fläche unter der Kurve durch die zugehörige Software (eDAQ PowerChrom, Version 2.5.9) berechnet bzw. integriert werden. Diese Software arbeitet dabei den Angaben des Herstellers entsprechend mit Kalibrierungen durch standardisierte Nitrit- und Nitratlösungen. Das System ist dazu fähig, Nitrit bis zu einem Schwellenwert von 1 nmol/l zu detektieren.⁷⁷

Während der kompletten Messung sind die Trenn- und die Reduktionssäule als auch die Reaktionskapillare durch ein Gehäuse geschützt und konstant bei 35°C warm gehalten. Dieses Vorgehen beschleunigt den Reaktionsablauf.

2.2 Teilstudie A: „Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits für die Leistungsfähigkeit“

Verschiedene Studien zeigen, dass nach diätetischer Aufnahme von anorganischem Nitrat über eine stufenweise *in vivo* ablaufende Bioaktivierung von Nitrat zu Nitrit weiter zu NO⁻ eine Steigerung der sportlichen Leistung eintritt.^{54, 65, 83} Während diese Studien die exogene Zufuhr von Nitrat/Nitrit untersuchten, soll in der vorliegenden Teilstudie A untersucht werden, ob basale Nitritspiegel im Plasma bei gesunden männlichen Sportlern mit der Leistungsfähigkeit korrelieren. In der Studie wurden solche Radfahrer oder Triathleten als Testpersonen eingeschlossen, die mindestens ≥ 4 x/Woche trainierten und dabei mindestens 1/5 der Gesamtmuskelmasse über mindestens zehn Minuten einsetzen. Aufgrund ihres Trainingsverhaltens, der Beteiligung an Wettkämpfen in Sportverbänden und der erhobenen Spiroergometriedaten erfüllten sie Kriterien, die einen Leistungssportler definieren. Leistungsorientierte Trainings mit stetiger Verbesserung von Trainingsdaten, wie z. B. einer verkürzten Fahrzeit bei gleichbleibender Trainingsstrecke, ermöglichen einen internationalen Vergleich. Daher sind sie für die in der vorliegenden Studie beschriebenen Versuchsansätze besonders geeignet, um die Probanden mit einem vergleichenden Testsystem in ihrer Leistung zu qualifizieren und untereinander zu vergleichen.

2.2.1 Studiendesign

Die Teilstudie A erfolgte als prospektive Kohortenstudie. Im Rahmen dieser Studie fanden im Abstand von einer Woche zwei Untersuchungstage mit identischem

Ablauf statt. Elf männliche Triathleten bzw. Radsportler mit einer wöchentlichen Trainingsfrequenz von $\geq 4x/\text{Woche}$ waren aufgefordert, ihr reguläres Sporttraining während der gesamten Studiendauer weiter durchzuführen und ihre tägliche Diät nicht umzustellen. Lediglich auf nitrathaltige Produkte, wie z. B. Salat, Spinat oder rote Beete, musste verzichtet werden. Das Protokoll der beiden Untersuchungstage setzte sich aus mehreren Unterpunkten zusammen: der Anamnese, der Blutentnahme und der fahrradergometrischen Untersuchung (siehe Abb. 2.3). Beide Untersuchungstage verliefen identisch, um bei 11 Probanden insgesamt 22 Untersuchungen ($n=22$) durchführen zu können und eine unabhängige Korrelation von zwei aufeinander folgenden gleichen Untersuchungen zu erhalten. Alle Probanden erschienen an den Untersuchungstagen nüchtern. Die Untersuchungen erfolgten morgens zwischen sieben und elf Uhr. Nach einem Frühstück, bestehend aus einem Käsebrötchen und 0,5l Mineralwasser (Evian, Danone Waters Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland), erfolgten die Blutentnahme und die ergometrische Untersuchung auf dem Fahrradergometer.

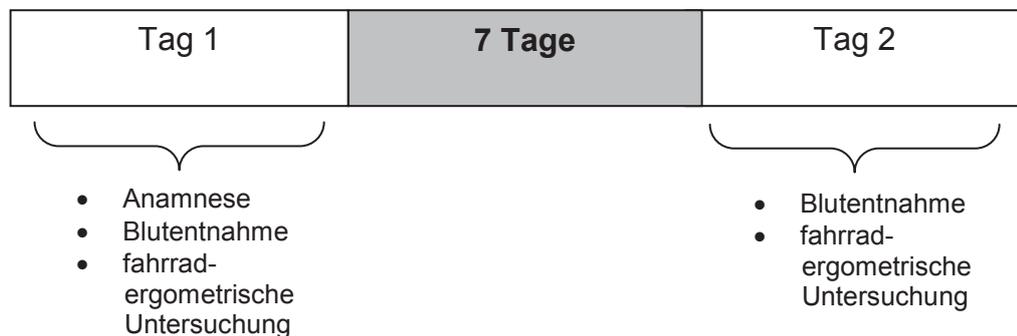


Abb. 2.3 Übersicht über den Verlauf der Teilstudie A. Zwei Untersuchungstage (Tag 1, Tag 2) mit einer 7-tägigen Pause zwischen beiden Untersuchungstagen.

2.2.2 Studienkollektiv

Im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs wurden alle Studienteilnehmer über die Untersuchungen informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.2.2.1 Bestimmung anthropometrischer Größen

Die Studienteilnehmer setzten sich sowohl aus Hochleistungs-Radsportlern als auch aus Triathleten aus dem Bereich des Leistungssports zusammen.

Einschlusskriterien waren:

- Alter: 20-35 Jahre,
- männliches Geschlecht,
- Nichtraucher,
- ≥ 4 x Training/Woche,
- Radfahrer oder Triathlet.

Kriterien, die zum Ausschluss von der Studie führten, waren folgende:

- regelmäßige Medikamenteneinnahme,
- anamnestisch bekannte Erkrankungen des kardiovaskulären und/oder respiratorischen Systems,
- akute Entzündungen (CRP $>0,03$ g/dl, erhöhte Leukozytenwerte),
- aktuelle oder vergangene maligne Erkrankungen,
- aktueller Verzehr von Nahrungsergänzungsmitteln (Glutamat, Kreatinin, L-Arginin, etc.),
- Niereninsuffizienz,
- unregelmäßiges Trainingsverhalten vor und während der Studie.

Die Anamnese umfasste die Fragen nach vergangenen oder aktuellen Erkrankungen, der Medikamentenanamnese, dem Nichtraucherstatus und dem aktuellen Trainings- sowie Nahrungsverhalten. In der klinischen Untersuchung wurden die aktuelle Körpergröße und das aktuelle Gewicht mittels einer Personenwaage mit integriertem verstellbarem manuellem Größenmessstab (eichfähige Personenwaage PCE-PS 200MM, PCE Deutschland GmbH, Meschede, Deutschland), der basale Blutdruck mittels eines elektrischen Handgelenk-Blutdruckmessgeräts (Beurer BC 44 Handgelenk-Blutdruckmessgerät, Beurer GmbH, Ulm, Deutschland) erfasst.

2.2.3 Charakterisierung der Studienpopulation

Die durchschnittlichen Werte bezüglich Alter, Größe, Gewicht, Body Mass Index und Trainingseinheiten pro Woche lassen sich wie in Tabelle 2.2 dargestellt zusammenfassen. Keiner der Probanden nahm während des Untersuchungszeitraums Medikamente ein oder war akut oder chronisch erkrankt. Der systolische Blutdruck betrug bei Studieneinschluss im Mittel 129 ± 8 mmHg, der diastolische Blutdruck 81 ± 5 mmHg (MW \pm SD).

Tabelle 2.2 Kollektiv Teilstudie A

	MW \pm SD (n=11)
Alter (Jahre)	24 \pm 2
Größe (cm)	185 \pm 5
Gewicht (kg)	79 \pm 5
BMI	23.1 \pm 1.2
Trainingseinheiten/Woche	5 \pm 1

2.2.4 Leistungstests

Die leistungsdiagnostischen Fahrradtests (Ergometrie, Zeitfahren) fanden auf einem Fahrradergometer (Excalibur Sport V 2006, Lode, Niederlande) in einem Raum mit kontrollierten Umgebungsbedingungen (Raumtemperatur 21-22°C, 40% rel. Luftfeuchtigkeit) statt. Bei jedem Test wurde das Ergometer mit einem Laptop-Computer (Samsung X20 XVM 1730 V 15 Zoll Notebook, Samsung Electronics GmbH, Schwalbach, Deutschland) verbunden, um eine kontinuierliche Aufzeichnung fahrradergometrischer Daten zu gewährleisten (Lode Ergometry Manager Software, Groningen, Niederlande). Sofern die Probanden eigene Radpedalsysteme besaßen, wurden diese mittels eines Klicksystems an das Fahrradergometer montiert. Auch die aus der individuellen Trainingserfahrung der Probanden herrührenden ergonomischen Einstellungen am Fahrradergometer, etwa Sattelhöhe und Sattel-Lenkrad-Abstand, wurden notiert und bei allen Tests reproduziert. Auf Anfrage wurde den Probanden eine Luftzufuhr mittels Ventilator ermöglicht. Dies wurde ebenfalls vermerkt und an allen weiteren Untersuchungstagen in identischer Art und Weise wiederholt.

2.2.5 Leistungstest mittels Fahrradergometrie

An beiden Untersuchungstagen mussten die Probanden einen ergometrischen Stufentest auf dem Fahrradergometer absolvieren. Die Belastung erfolgte dabei analog des BAL-Schemas (Bundesausschuss für den Leistungssport) mit einer stufenförmigen ergometrischen Belastung.⁸⁴ Begonnen wurde mit einer Aufwärmphase (90 Watt für 5 Min.) und einer Erholungsphase (0 Watt, 5 Min.). Danach begann der ergometrische Test mit 100 Watt. Dabei wurde alle 5 Minuten eine Belastungssteigerung um 50 Watt vorgenommen.⁸⁴ Damit es innerhalb der einzelnen Stufen unabhängig von der erbrachten Drehzahl (RPM, round per minute) bei einer kontinuierlichen Wattzahl blieb, wurde das Ergometer auf einen hyperbolischen Modus eingestellt. Die jeweils individuelle RPM jedes Probanden wurde jedoch berücksichtigt, indem jeder Teilnehmer aufgefordert war, während der ergometrischen Untersuchung kontinuierlich bei seiner optimalen RPM Rad zu fahren. Mittels eines kabellosen Pulsmessers um den Oberkörper und eines telemetrischen Sporttesters (beides Polar Systems, Finnland) wurde die Herzfrequenz kontinuierlich erfasst und registriert. Am Ende jeder einzelnen Stufe wurden die Probanden dazu aufgefordert, ihre subjektive Belastung anhand einer Zahl der Borg RPE Skala (siehe Tabelle 2.3) einzuschätzen.⁸⁵ Zur Laktatbestimmung wurden am Ende jeder Belastungsstufe 20 µl Blut aus dem hyperämisierten Ohrläppchen in geeichte Glaskapilletten (20 µl Glaskapilletten, EKF Diagnostic, Barleben, Deutschland) entnommen. Diese wurden jeweils einzeln in Reaktionsgefäße, welche mit 0,2 ml 0,6-N-Perchlorsäure gefüllt waren, überführt und geschüttelt. Am gleichen Tag erfolgte die Laktatanalyse den Herstellerangaben entsprechend (Eppendorf Ebio Plus, Eppendorf Vertrieb GmbH, Wesseling, Deutschland). Der Stufentest wurde bis zur körperlichen Erschöpfung durchgeführt. Die laktatanaerobe Schwelle (LAT = lactate anaerobic threshold, 4mM) wurde entsprechend eines non-linearen Regressionsmodells mithilfe einer Software (Winlactat Software, Mesics, Deutschland) berechnet.

Tabelle 2.3 Subjektives Belastungsempfinden mittels Borg RPE Skala

Borg RPE Skala	Subjektive Belastung
6	
7	sehr leicht
8	
9	
10	leicht
11	
12	
13	etwas anstrengend
14	
15	
16	anstrengend
17	
18	sehr anstrengend
19	
20	maximale Anstrengung

2.3 Teilstudie B: „Flavanole und Leistungsfähigkeit“

Die Teilstudie B sollte klären, ob es mittels diätetischer Aufnahme eines flavanolreichen bzw. flavanolarmen Getränks zu einer Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit und damit zu einer Verbesserung der kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit kommt.

2.3.1 Studienkollektiv

Die Ergebnisse der Messungen von leistungsdagnostischen Tests, welche sich sequenziell wiederholen, können Trainingseffekten unterliegen. Vor allem bei ungeübten Probanden, Nichtsportlern oder Patienten können sich solche Effekte einstellen.⁸⁶ Um Trainingseffekte in der Teilstudie B zu minimieren, wurden Probanden ausgewählt, die bereits an das Testsystem ‚Fahrradergometer‘ gewöhnt waren. Ist das Testsystem bereits bekannt, sind derartige Effekte nämlich wesentlich reduziert. Dementsprechend wurden zwölf männliche Radsportler in die Teilstudie eingeschlossen. Während der kompletten Studiendauer sollte das

reguläre Trainingsverhalten möglichst beibehalten werden. Bei der Nahrungsaufnahme war nur auf flavanol- und nitrathaltige Komponenten, wie Schokolade, grünen Tee, Erdbeeren, Trauben und gepökelttes Fleisch, zu verzichten. Im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs wurden alle Studienteilnehmer über die Untersuchungen informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.3.1.1 Bestimmung anthropometrischer Größen

Der Einschluss in die Teilstudie B sowie die Charakterisierung des Studienkollektivs erfolgten analog zur Studie A (siehe Punkt 2.2.2.1). Lediglich die Frage nach Allergien gegenüber Inhaltsstoffen der Testgetränke wurde als Ausschlusskriterium hinzugefügt.

2.3.2 Charakterisierung der Studienpopulation

Den Einschlusskriterien gemäß handelte es sich um professionelle Radfahrer oder Triathleten, die bereits an das Testsystem ‚Fahrradergometer‘ gewöhnt waren. Wie in der Teilstudie A lassen sich auch hier die durchschnittlichen Werte bezüglich Alter, Größe, Gewicht, Body Mass Index und Trainingseinheiten pro Woche gemäß Tabelle 2.4 zusammenfassen. Keiner der Probanden nahm während des Untersuchungszeitraums regelmäßig Medikamente ein oder war chronisch oder akut erkrankt. Der mittels Anamnese erhobene basale Blutdruck betrug im Mittel systolisch 129 ± 7 mmHg, der diastolische Blutdruck betrug 81 ± 6 mmHg (MW \pm SD).

Tabelle 2.4 Kollektiv Teilstudie B

	MW\pmSD (n=12)
Alter (Jahre)	24,8 \pm 2,3
Größe (cm)	184,8 \pm 4,5
Gewicht (kg)	79,0 \pm 4,4
BMI	23,1 \pm 1,1
Watt max.	326,2 \pm 54,4
Trainingseinheiten/Woche	5 \pm 3

2.3.3 Zusammensetzung der Testgetränke (niedrig dosiert vs hoch dosiert)

Die beiden Testgetränke (detaillierte Inhaltsstoffe siehe Tabelle 2.5) unterschieden sich weder im Aussehen noch im Löslichkeitsverhalten oder im Geschmack. Das Getränkepulver befand sich in einzelnen Verpackungseinheiten mit einer identischen Füllmenge und sollte von den Probanden selbstständig in ca. 150 ml Wasser aufgelöst eingenommen werden. Um zu kontrollieren, ob die Einnahme erfolgte, wurden die Probanden aufgefordert, sämtliche leeren Getränkverpackungseinheiten mitzubringen. Außerdem wurde die Einnahme post hoc durch die Analyse der Flavanolmetabolite im Plasma nachgewiesen. Über das Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule wurde eine Kontamination der Chargen durch WADA (World Anti-Doping Agency)-gelistete Substanzen ausgeschlossen.

Tabelle 2.5 Inhalt der Testgetränke je Einheit

	niedrig dosiertes Getränk	hoch dosiertes Getränk
Flavanol (mg)	13	596
Monomere (mg)	3	65
Epicatechin (mg)	1	59
Catechin (mg)	2	6
Dimere (mg)	2	53
Trimere-Decamere (mg)	3	258
Theobromin (mg)	96	93
Koffein (mg)	9	11
Energie (kcal)	25	25
Fett (g)	0,3	0,4
Kohlenhydrate (g)	4,6	4,3
Proteine (g)	0,7	0,7

2.3.4 Ablaufprotokoll der Untersuchungstage

Die Teilstudie B erfolgte als Crossoverstudie. Die Probanden wurden im Verlauf derselben zu drei Zeitpunkten untersucht: (1) Basaluntersuchung am Tag 0, (2)

Untersuchung nach Getränk 1 am Tag 7 und (3) Abschlussuntersuchung nach Getränk 2 am Tag 21. Jeder Proband erhielt nacheinander sowohl das hoch dosierte flavanolhaltige Getränk (hoch dosiert) als auch das niedrig dosierte Getränk (niedrig dosiert, Abb. 2.4). Die Reihenfolge der Vergabe der Testgetränke verlief doppelblind und randomisiert aufgrund der Maskierung durch das KKS. Weder der Untersucher noch der Proband wussten, ob das hoch dosierte oder das niedrig dosierte Getränk getrunken wurde.

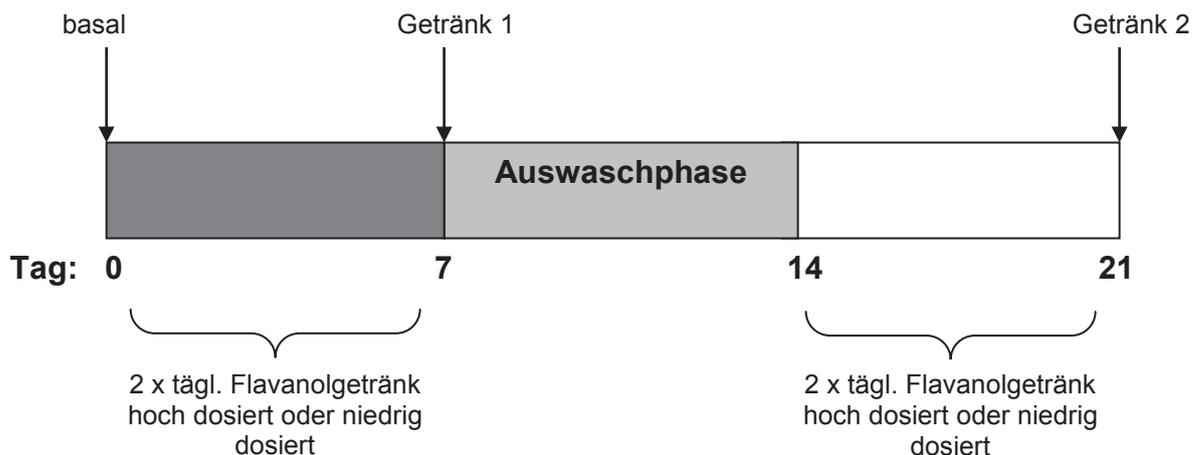


Abb. 2.4 Übersicht über den Verlauf der Teilstudie B. Drei Untersuchungstage: basal – Tag 0, Getränk 1 – Tag 7, Getränk 2 – Tag 21; mind. siebentägige Auswaschphase ohne Testgetränkeinnahme.

Nach den Untersuchungen vom Tag 0 (basal) folgte eine siebentägige Einnahme eines der beiden Getränke (hoch oder niedrig dosiert). Dabei nahmen die Probanden das Testgetränk morgens und abends ein. Nach dieser einwöchigen Testgetränkeinnahme erfolgte die erneute Bestimmung der Leistungsparameter (Tag 7 nach Getränk 1). Dann folgte nach einer siebentägigen Auswaschphase die einwöchige Einnahme des alternierenden Getränkes mit dem abschließenden dritten Untersuchungstag (Tag 21 nach Getränk 2).

Die Reihenfolge der Getränke (hoch dosiert – niedrig dosiert oder niedrig dosiert – hoch dosiert) verlief randomisiert und balanciert. Das Protokoll der Untersuchungstage setzte sich aus mehreren Teilen zusammen: Anamnese, Blutentnahmen, Ultraschalluntersuchung der FMD der Arteria brachialis, fahrradspiroergometrischer Untersuchung und dem Langzeittest im Sinne eines Zeitfahrens. Alle drei Untersuchungstage verliefen vergleichbar (Abb. 2.5). Lediglich die zusätzlich fortgeführte Einnahme der Testgetränke jeweils 2 Stunden

vor der Spiroergometrie und nochmals 2 Stunden vor dem abschließenden Zeitfahren stellten einen Unterschied zum Tag 0 (basal) dar. Alle Probanden erschienen nüchtern und bekamen ein Frühstück bestehend aus einem Käsebrötchen und 0,5 l Mineralwasser (Evian, Danone Waters Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland) gestellt. Darauf folgten die Blutentnahme, die Bestimmung der vaskulären Funktion mittels FMD und die spirometrische Untersuchung auf dem Fahrradergometer. Nach einer fünfstündigen Pause, in der nach zwei Stunden unter Verzicht auf flavanol- und nitrathaltige Komponenten eine standardisierte Mittagsmahlzeit eingenommen wurde, folgte das abschließende Zeitfahren.

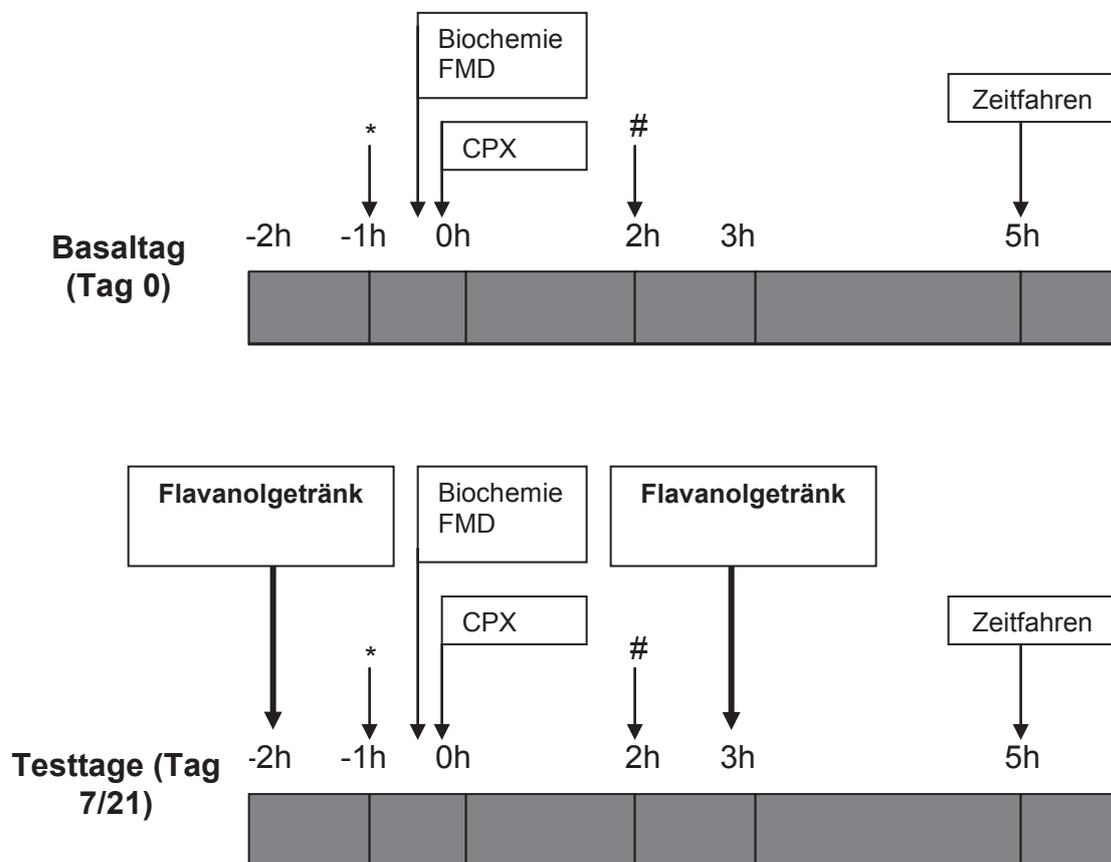


Abb. 2.5 Tagesablauf des Tag 0 (basal, oben) und der Testtage (Tag 7/21, unten) der Teilstudie B (*/# standardisierte Mahlzeiten). Die Probanden erhielten an allen drei Tagen ein standardisiertes Frühstück (*), gefolgt von der Blutentnahme (Biochemie) und der FMD. Danach folgte die spirometrische Untersuchung (CPX). Nach einer standardisierten Mahlzeit (#) am Mittag erfolgte nach dreistündiger Pause das Zeitfahren. Der Ablauf der beiden Testtage (Tag 7/21) wurde durch die zweimalige Einnahme des Flavanolgetränks ergänzt.

2.3.5 Duplexsonographische Untersuchung der vaskulären Funktionen durch Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

In der Teilstudie B wurde die FMD als nichtinvasive Untersuchung zur Beurteilung der Gefäßfunktion verwendet. Bei dieser Methode wird mittels hochauflösenden Dopplerultraschalls die endotheliale Funktion bestimmt.^{55, 74, 87} An allen Untersuchungstagen wurde bei jedem Probanden nach einer 15-minütigen Ruhephase eine Blutdruckmanschette am rechten Unterarm angelegt. Zunächst wurde dann ein longitudinales Bild der Arteria brachialis maximal 2 cm oberhalb einer Manschette aufgezeichnet. Daraufhin erfolgte die Inflation der Blutdruckmanschette auf mindestens 200 mmHg, gefolgt von einer 5-minütigen Ischämiezeit. Danach wurden innerhalb von einer Minute nach Ablassen des Manschettendrucks weitere longitudinale Bilder aufgenommen und die Zunahme des Diameters berechnet sowie die Flussgeschwindigkeit bestimmt. In der Teilstudie B wurde nach einem standardisierten Ultraschallprotokoll (12-MHz Schallkopf, GE vivid i) gearbeitet, worauf eine automatische Analyse (Brachial Analyzer) folgte. Sowohl der Diameter als auch die Flussgeschwindigkeit der Arteria brachiales wurden somit basal und nach Manschettendeflation bestimmt. Die relative FMD wurde folgendermaßen berechnet:

$$(\text{Diameter}_{\text{max}} (\text{nach Deflation}) / \text{Diameter}_{\text{basal}}) * 100$$

2.3.6 Leistungstests

2.3.6.1 Fahrradspiroergometrie

An allen drei Untersuchungstagen der Teilstudie B wurden spiroergometrische Daten erhoben. Dabei waren Rahmenbedingungen und Durchführung identisch zur ergometrischen Leistungsdiagnostik der Teilstudie A. Der ergometrische Stufentest wurde lediglich um die Erfassung spirometrischer Parameter erweitert. Dafür wurde eine Atemmaske über ein Schlauchsystem mit einem Spirometer (ZAN600, Österreich) verbunden. Gemäß der Herstellerangaben erfolgte eine geräteinterne Anpassung des Atemzugvolumens und der Atemfrequenz an BTPS-Bedingungen (Body Temperature Pressure Saturated: 37°C, Druck 760mmHg, Wasserdampfsättigung). Gleichzeitig wurden über installierte Gasanalysatoren,

wie etwa den differential paramagnetischen Sauerstoff- und den Infrarot-Kohlenstoffdioxid-Analysator, die Gaskonzentrationen ermittelt. Daraus erfolgte eine Gasvolumenberechnung Atemzug-um-Atemzug. Vor Beginn der Untersuchung wurde die Einheit nach Herstellerangaben geeicht. Das Spirometer ermittelt in jeder Belastungsstufe Atemzug-um-Atemzug die spirometrischen Parameter (VE, expiratorischer O₂-Gehalt = FEO₂, expiratorischer CO₂-Gehalt = FECO₂). Außerdem berechnet es aus diesen Rohmesswerten geräteintern die abgeleiteten Werte für die $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$ und RER und die Atemäquivalente für Sauerstoff ($A\ddot{A}O_2 = VE/\dot{V}O_2$) und Kohlendioxid ($A\ddot{A}CO_2 = VE/\dot{V}CO_2$). Die Werte für die $\dot{V}O_2$, die $\dot{V}CO_2$ und die VE beziehen sich für die spätere Auswertung auf die Mittelwerte der letzten 30 Sekunden einer jeden Stufe. Für die $\dot{V}O_{2peak}$ wird der höchste mittlere Wert der letzten 30 Sekunden der letzten erreichten Belastungsstufe festgelegt. Da nicht jeder Proband die letzte Stufe der ergometrischen Untersuchung komplettierte, wurde die individuelle $Watt_{max}$ wie folgt berechnet:

$$Watt_{max} = Watt \text{ (letzte vollständige Stufe)} + [50Watt * (\text{abgelaufene Zeit in der finalen Stufe (s)}/300s)]$$

Fünf und zehn Minuten nach Testende wurde zur Untersuchung der Erholungszeit nochmals Blutlaktat abgenommen und die Herzfrequenz wurde notiert.

2.3.6.2 Zeitfahren

Zum Zeitfahren wurde das der Teilstudie A entsprechende Fahrradergometer (Excalibur Sport V 2006, Lode, Niederlande) verwendet. In der ergometrischen Untersuchung war das Ergometer in einem hyperbolischen Modus eingestellt. So konnte der Proband seine optimale, individuelle Trittfrequenz bestimmen, ohne dass sich der Widerstand änderte. Beim Zeitfahren wurde dagegen ein linearer Modus verwendet. Dieses Vorgehen hat zur Folge, dass bei einer höheren RPM durch den Probanden auch ein erhöhter Anteil an verrichteter Arbeit (Joule oder Watt/s) erreicht wird. Um auch bei einem stationär befestigten Fahrrad, das nur ungefähre Entfernungsdaten anzeigt, ein arbeitsabhängiges Protokoll verwenden zu können, orientiert sich das Protokoll des Zeitfahrens an der etablierten und

validierten Methode von Jeukendrup et. al.⁸⁸ Nach dieser Methode entspricht die geleistete Arbeit von approximativ 60 Minuten bei 75% der maximalen Leistung einem Zeitfahrttest von ca. 40km. Hauptkriterium einer verbesserten Leistungsfähigkeit ist demnach eine verbesserte Leistung (kürzere Zeit), die zur Vervollständigung des Tests benötigt wird.

Die jeweils individuell zu verrichtende Arbeitsmenge (Joule oder Watt/s) bezog sich auf den am Tag 0 erfassten spiroergometrischen Stufentest. Hierzu wurden 75% der $Watt_{max}$ mit 3600 Sekunden (1 Stunde) multipliziert:

$$\text{zu leistende Arbeit (kJ)} = 0,75 * Watt_{max} * 3600s$$

Entsprechend der Herstelleranleitung wird ein linearer Faktor berechnet, sodass jeder Proband individuell dann 75% seiner maximalen Arbeit ($Watt_{max}$) erbringt, wenn er bei seiner bevorzugten RPM fährt:

$$\text{Watt (75\% von } Watt_{max}) = \text{Linearer Faktor} * \text{RPM}^2$$

Um die Zeit des Zeitfahrens zu stoppen, wurde das Fahrradergometer mit einem Laptop-Computer verbunden und die Lode Ergometry Manager-Software (Lode Ergometry Manager, Lode B. V. Lode Holding Company, Groningen, Niederlande) benutzt. Diese registriert sowohl die pro Pedalrunde verrichtete Arbeit (Watt) als auch die kumulative Arbeit über die betreffende Zeitspanne hinweg. An jedem der drei Untersuchungstage wurde den Probanden nur die bereits verrichtete Arbeit angezeigt. Sie hatten weder visuell noch akustisch die Möglichkeit, einzuschätzen, wieviel Zeit seit Beginn des Zeitfahrens vergangen ist. Zu Beginn und an weiteren Zeitpunkten (20%, 40%, 60%, 80% und 100% der totalen Arbeit) erfolgten eine Laktatbestimmung, eine Herzfrequenzmessung sowie eine Einschätzung der subjektiven Belastung (analog Borg RPE Skala, siehe Tabelle 2.3).

2.4 Mathematisch-statistische Verfahren

Deskriptive statistische Daten wurden, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwert \pm Standardfehler oder Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SE oder MW \pm SD) angegeben.

Bei der Studie A wurden die Ergebnisse mittels des Student's zweiseitigen t-Tests für gepaarte Daten auf signifikante Unterschiede zwischen Tag 1 und 2 hin geprüft. Die Korrelationen zwischen den individuellen Parametern wurden dabei durch univariate Analysen für normalverteilte Werte berechnet; die Ergebnisse wurden mit Pearson's r und dem dazugehörigen p -Wert angegeben. Um den Zusammenhang zwischen Nitrit und der LAT (Tag 1 vs Tag 2) zu vergleichen, wurden beide Korrelationskoeffizienten r in die Fisher Z-Transformation gebracht und der z -Wert zur Berechnung des Signifikanzlevels verwendet.

In der Studie B wurden zur statistischen Auswertung Varianzanalysen durchgeführt. Es handelte sich dabei im Detail um 1-Wege- und 2-Wege-ANOVA (repeated measures ANOVA) mit post hoc-Tests (Bonferroni) zum Einzelgruppenvergleich. P -Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Für beide Studien wurden zur statistischen Analyse das Computerprogramm SPSS® 20.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) und das Graph Pad Prism 5.0 für Windows (GraphPad Software, Kalifornien, USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Teilstudie A: „Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits für die Leistungsfähigkeit“

Im Mittelpunkt der Teilstudie A stand die Frage, ob basale Nitritspiegel im Plasma bei gesunden männlichen Sportlern mit der Leistung korrelieren. Die Leistungsfähigkeit wurde hierbei über das Erreichen der anaeroben Schwelle definiert.

3.1.1 Quantifizierung zirkulierender Nitrit- und Nitratspiegel

Der durchschnittliche basale Nitritwert im Plasma von Tag 1 betrug $0,087 \pm 0,049$ μM . Am zweiten Tag lag er bei $0,101 \pm 0,038$ μM (Nitrit: Tag 1 vs Tag 2: $p=0,268$) (siehe Abb. 3.1). Der durchschnittliche Nitratwert des ersten Tages lag bei 40 ± 18 μM , am zweiten Tag lag er bei 61 ± 37 μM (Nitrat: Tag 1 vs Tag 2: $p=0,085$) (siehe Abb. 3.2). Der durchschnittliche totale Wert beider Tage betrug für Nitrit $0,094 \pm 0,043$ μM und für Nitrat 50 ± 6 μM (alle Werte MW \pm SD).

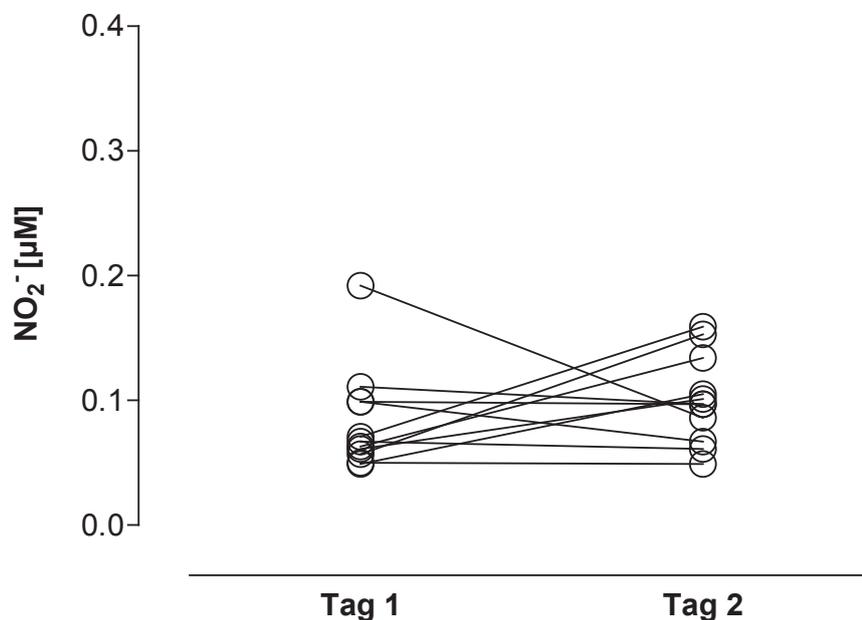


Abb. 3.1 Endogene plasmatische Nitritspiegel (Tag 1 und 2). Dargestellt sind die Einzelwerte (n=11) pro Proband an Tag 1 und Tag 2.

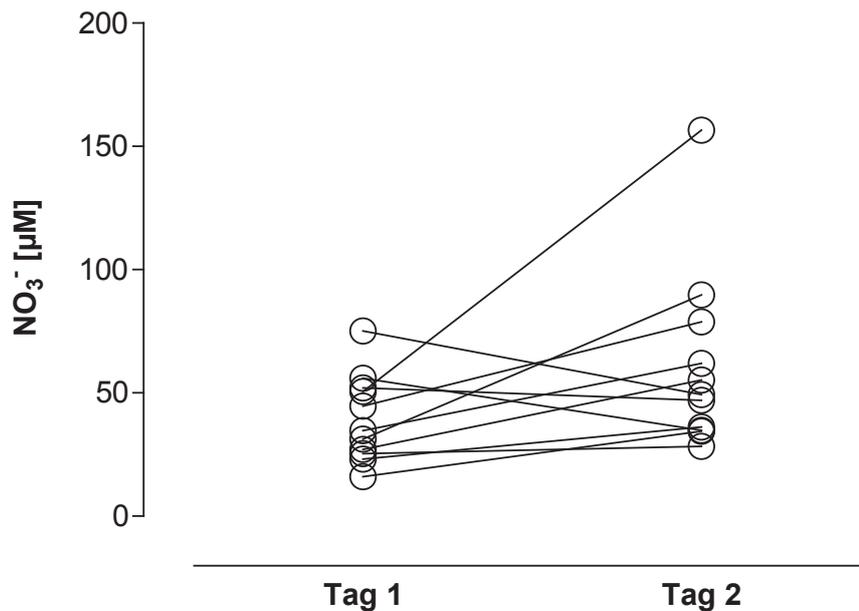


Abb. 3.2 Endogene plasmatische Nitratspiegel (Tag 1 und 2). Dargestellt sind die Einzelwerte (n=11) pro Proband an Tag 1 und Tag 2.

3.1.2 Quantifizierung der Leistung mittels Fahrradergometrie und Laktatanaerober Schwelle

Die $Watt_{max}$ in der fahrradergometrischen Untersuchung betrug am ersten Untersuchungstag 328 ± 44 Watt bzw. $4,2 \pm 0,6$ Watt pro kg Körpergewicht. Am zweiten Tag lagen die Werte bei 330 ± 47 Watt bzw. $4,2 \pm 0,7$ Watt pro kg Körpergewicht ($Watt_{max}$: Tag 1 vs Tag 2: $p=0,266$). Der durchschnittliche totale Wert beider Tage (n=22) betrug 330 ± 44 Watt bzw. $4,2 \pm 0,6$ Watt pro kg Körpergewicht (alle Werte MW \pm SD). Um das individuelle Erreichen der LAT zu veranschaulichen, wurde dem Zeitpunkt, an dem der Schwellenwert für die Blutlaktatkonzentration (4 mM) erreicht war, die zum gleichen Zeitpunkt erfasste Herzfrequenz (beats per minute, bpm) zugeordnet (siehe Abb. 3.3). Am ersten Untersuchungstag lag die LAT bei 160 ± 17 bpm, am zweiten Tag bei 166 ± 15 bpm. Gemessen in Relation zur ermittelten Herzfrequenz lag die LAT somit bei insgesamt 22 Untersuchungen (Tag 1 und 2) bei durchschnittlich 163 ± 16 bpm (Tag 1 vs Tag 2: p -Wert=0,316) (alle Werte MW \pm SD).

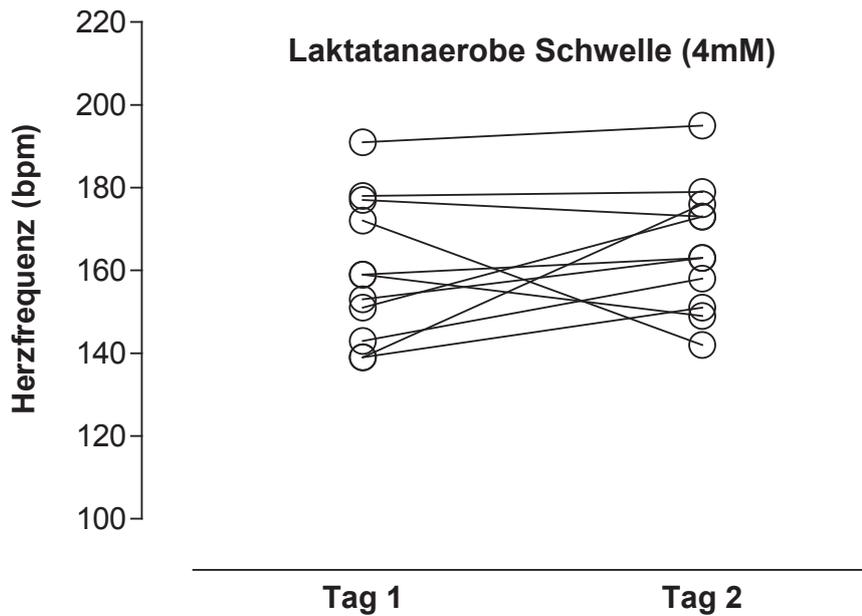


Abb. 3.3 Laktatanaerobe Schwelle (Tag 1 und 2). Dargestellt ist das Erreichen der LAT (LAT = lactate anaerobic threshold, 4mM) in Relation zur Herzfrequenz (bpm) pro Proband an Tag 1 und Tag 2 (Einzelwerte n=11).

3.1.3 Abhängigkeit der laktatanaeroben Schwelle von basalen endogenen Nitritspiegeln im Plasma

Die univariate Analyse zeigte, dass die jeweiligen basalen Nitritwerte der Probanden mit ihrer individuellen LAT korrelierten ($r=0,651$, $p=0,001$) (siehe Abb. 3.4 A). Zur Überprüfung der Korrelation wurde der Korrelationskoeffizient r für den Tag 1 und Tag 2 analysiert. Es zeigte sich hier kein statistischer Unterschied (Tag 1 vs Tag 2: $r=0,68$ vs $r=0,58$; $p=0,719$, $n=11$, siehe Abb. 3.4). Eine Korrelation zwischen Nitrat und der LAT konnte nicht ermittelt werden ($r=0,29$; $p=0,19$).

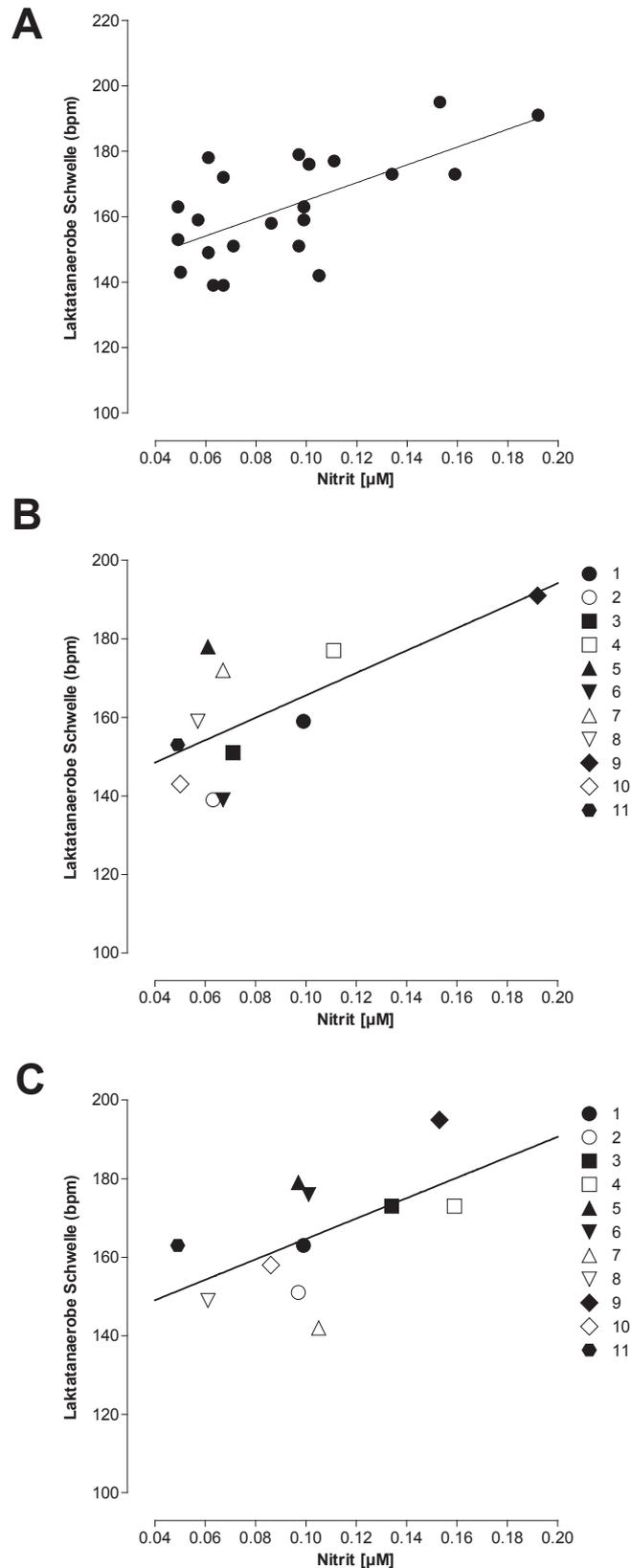


Abb. 3.4 Korrelation des endogenen Nitritplasmagehalts und der laktatanaeroben Schwelle (4 mM) in Relation zur Herzfrequenz (bpm). (A) Einzelwerte für $n=22$ Untersuchungen ($r=0,651$, $p=0,001$). Einzelwerte für Tag 1 (B) und Tag 2 (C), ohne signifikanten Unterschied im Korrelationskoeffizienten (Tag 1 vs Tag 2: $r=0,68$ vs $r=0,58$; $p=0,719$, $n=11$). Die Symbole repräsentieren jeden einzelnen Teilnehmer (B + C).

3.2 Teilstudie B: „Flavanole und Leistungsfähigkeit“

Die Teilstudie B verfolgte den Ansatz, ob es mittels diätetischer Zufuhr eines flavanolreichen oder flavanolarmen Testgetränks über sieben Tage zu einer Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit kommt. Gleichzeitig wurde geprüft, ob es zu einer positiv korrelierenden verbesserten Endothelfunktion und kardiopulmonalen Leistungsfähigkeit kommt.

3.2.1 Quantifizierung klinischer Laborparameter

Das am ersten Untersuchungstag abgenommene Routinelabor zeigte folgende durchschnittliche Laborwerte (Tabelle 3.1):

Tabelle 3.1 Laborparameter

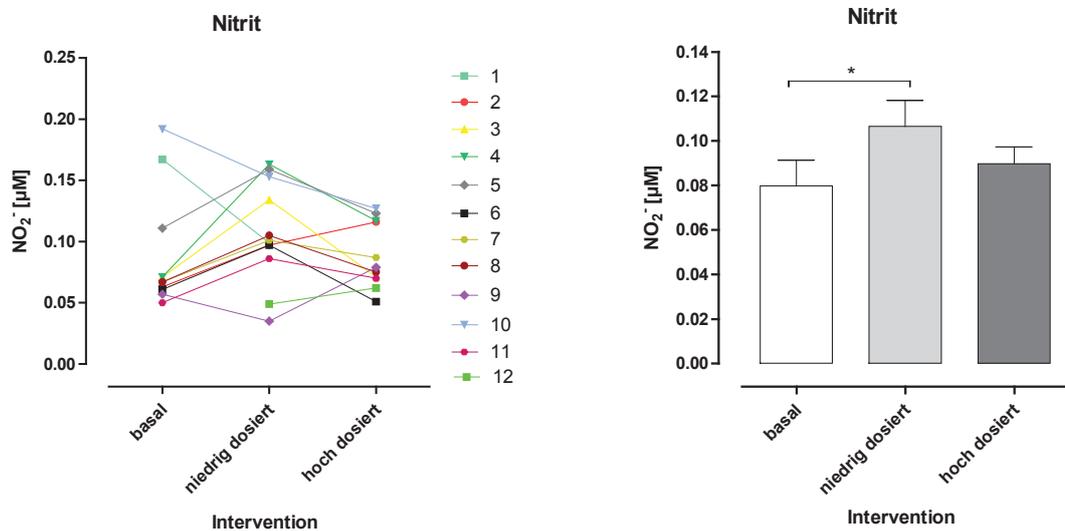
Parameter	Einheit	MW±SD (n=12)
<i>Blutbild</i>		
Erythrozyten	(x 10 ⁶ /µl)	5,1 ± 0,3
Leukozyten	(x 10 ³ /µl)	4,8 ± 1,8
Hämoglobin	[g/dl]	15,3 ± 0,8
Hämatokrit	(%)	45,0 ± 2,5
<i>Klinische Chemie</i>		
Kreatinin	[mg/dl]	1,0 ± 0,1
HDL	[mg/dl]	51,0 ± 4,7
LDL	[mg/dl]	129,8 ± 31,8
Triglyzeride	[mg/dl]	110,5 ± 73,8
CRP	[mg/dl]	<0,3
HbA1c	(%)	5,3 ± 0,2

3.2.2 Quantifizierung zirkulierender Nitrit- und Nitratspiegel

Unter basalen Bedingungen (Tag 1) sowie unter Einnahme jeweils eines der beiden Flavanolgetränke (hoch dosiert vs niedrig dosiert, Tag 2 und 3) wurden in der Teilstudie B zur Quantifizierung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Plasma Blutproben entnommen. Die Abbildung 3.5 zeigt die jeweiligen Einzelwerte für Nitrit und Nitrat an den drei Untersuchungstagen: Die durchschnittlichen Werte für

Nitrit lagen basal bei $0,0855 \pm 0,047 \mu\text{M}$, unter dem hoch dosierten Getränk bei $0,0889 \pm 0,027 \mu\text{M}$ und unter dem niedrig dosierten bei $0,1065 \pm 0,040 \mu\text{M}$ (Abb. 3.5 A). Dabei stieg die Nitritkonzentration unter dem niedrig dosierten Getränk gegenüber dem Tag 0 (basal) und dem Untersuchungstag mit dem hoch dosierten Getränk signifikant an ($*p < 0,05$, siehe Abb. 3.5 A rechts). Die durchschnittlichen Werte für Nitrat lagen basal bei $39 \pm 17 \mu\text{M}$, unter dem hoch dosierten Getränk bei $47 \pm 8 \mu\text{M}$ und unter dem niedrig dosierten bei $59 \pm 36 \mu\text{M}$ (Abb. 3.5 B). Für Nitrat ließ sich dabei unter Einnahme des niedrig dosierten Getränks ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Anstieg ermitteln (Abb. 3.5 B rechts) (alle Werte $\text{MW} \pm \text{SD}$).

A



B

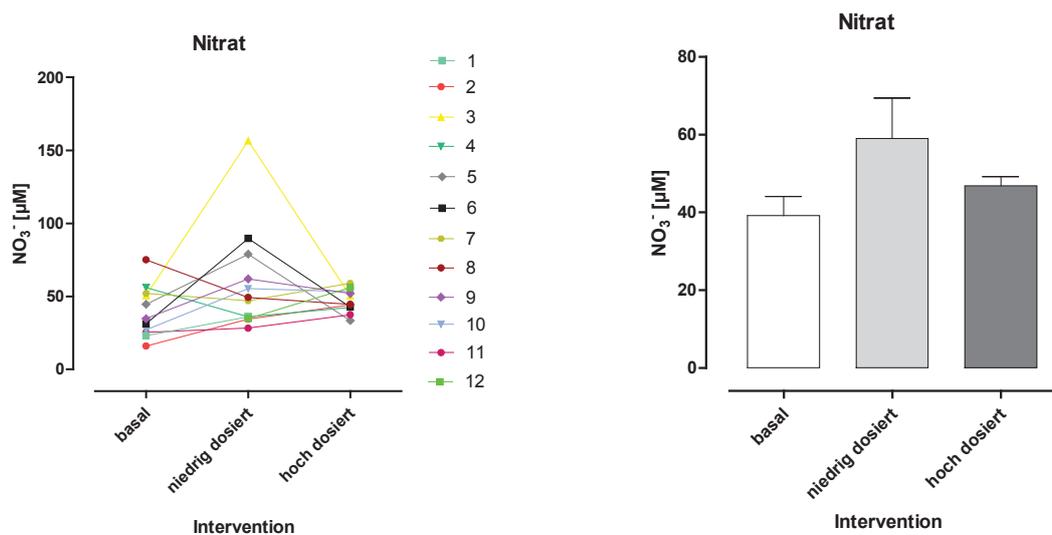


Abb. 3.5 Plasmakonzentration von Nitrit und Nitrat. An allen drei Untersuchungstagen wurde den Probanden Blut zur Quantifizierung der (A) Nitrit- und (B) Nitratplasmakonzentrationen abgenommen. Einzelwerte für Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) links im Bild ($n=12$). Mittelwert \pm Standardfehler rechts im Bild ($*p < 0,05$).

3.2.3 Abhängigkeit der laktatanaeroben Schwelle von Nitritspiegeln im Plasma unter Flavanoleinnahme

Die plasmatischen Nitritspiegel der zwölf Probanden wurden an allen drei Untersuchungstagen hinsichtlich ihrer Korrelation mit der individuellen LAT untersucht. Es ergaben sich für beide Parameter 36 Werte (Drei Untersuchungstage je 12 Probanden: $n=36$). Aus diesen konnte ermittelt werden, dass der individuelle Nitritspiegel im Plasma eines Probanden mit der von ihm erreichten LAT korrelierte ($n=36$, $r=0,37$, $p<0,05$, Abb. 3.6).

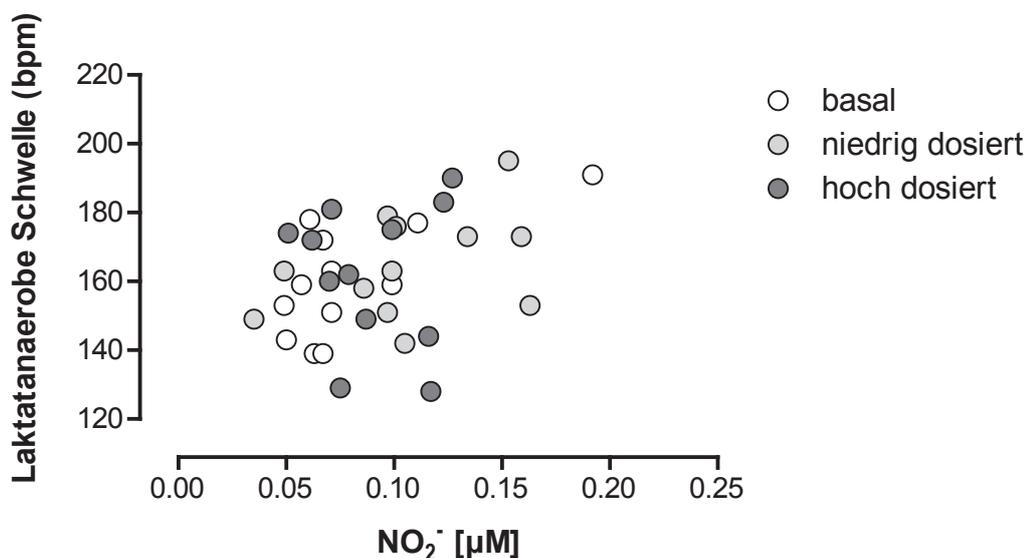


Abb. 3.6 Korrelation des endogenen Nitritplasmagehalts und der laktatanaeroben Schwelle (4 mM) in Relation zur Herzfrequenz (bpm). Einzelwerte für $n=36$ Untersuchungen. Die Symbole repräsentieren jeden einzelnen Teilnehmer an allen drei Tagen (basal, niedrig dosiert, hoch dosiert).

3.2.4 Vaskuläre Effekte unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke

Nach Einnahme des niedrig dosierten Flavanolgetränks zeigte sich gegenüber dem Tag 0 (basal) und dem hoch dosierten Getränk eine signifikante Zunahme der FMD (basal: 6 ± 1 %, niedrig dosiert: 8 ± 2 %, hoch dosiert: 6 ± 2 %, für $n=12$, $\text{MW} \pm \text{SD}$).

Analog zu den Ergebnissen für den zirkulierenden NO-Pool im Plasma zeigte sich auch bei der Charakterisierung der vaskulären Effekte eine signifikante Verbesserung der FMD unter dem niedrig dosierten Getränk gegenüber Tag 0 (basal) und dem hoch dosierten Getränk (basal vs niedrig dosiert: $*p<0,05$; niedrig dosiert vs hoch dosiert: $*p<0,05$, siehe Abb. 3.7) (alle Werte $\text{MW} \pm \text{SD}$).

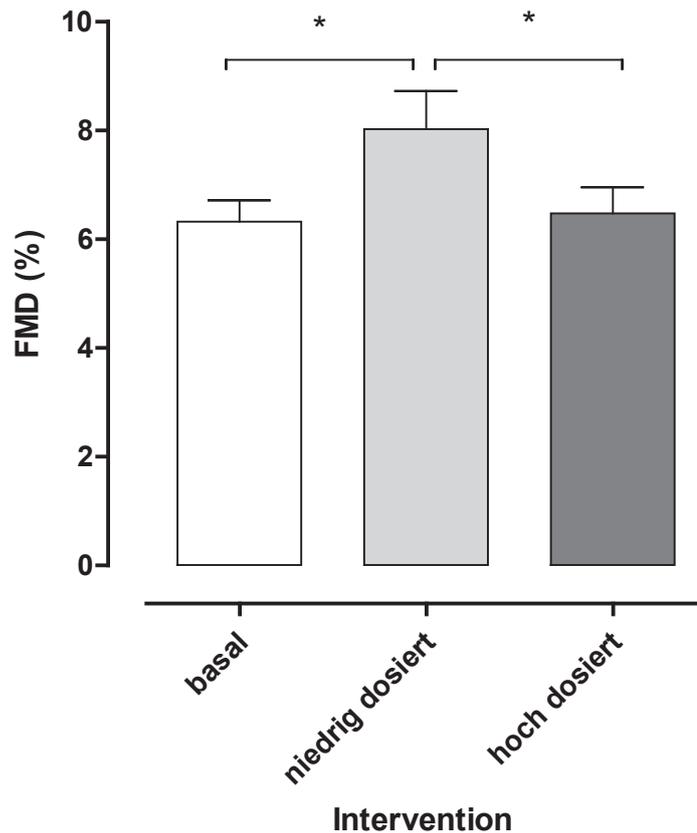


Abb. 3.7 Ergebnisse der ultraschallbasierten Untersuchungen der Endothelfunktion (FMD). Dargestellt ist der durchschnittliche FMD-Wert in mm an allen drei Untersuchungstagen (Abbildung Mittelwert \pm Standardfehler). Nach Einnahme des niedrig dosierten Flavanolgetränks zeigte sich gegenüber ‚basal‘ und dem hoch dosierten Getränk eine signifikante Zunahme der FMD (* $p < 0,05$, basal: 6 ± 1 %, niedrig dosiert: 8 ± 2 %, hoch dosiert: 6 ± 2 %, für $n=12$, MW \pm SD).

3.2.5 Kardiopulmonale Leistungsfähigkeit unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke

Während der Belastungsdauer der spiroergometrischen Untersuchung wurden an allen drei Untersuchungstagen ventilatorische und Herz-Kreislauf-Parameter erfasst (siehe Tabelle 3.2) (alle Werte MW \pm SD, p-Wert n.s. = nicht signifikant).

Tabelle 3.2 Ventilatorische Parameter

Intervention	$\dot{V}O_{2max}$ (ml/min/kg)		\dot{V}_E (l/min)		RER _{max}	
	MW ± SD	p-Wert	MW ± SD	p-Wert	MW ± SD	p-Wert
basal	50,08 ± 8,30	n.s.	146,61 ± 4,24	n.s.	1,10 ± 0,05	n.s.
niedrig dosiert	51,52 ± 7,42	n.s.	152,00 ± 25,08	n.s.	1,11 ± 0,07	n.s.
hoch dosiert	53,25 ± 6,62	n.s.	157,89 ± 20,37	n.s.	1,14 ± 0,04	n.s.

$$\dot{V}O_{2peak} / \dot{V}O_{2max}$$

Der am Tag 0 (basal) erreichte mittlere Wert für $\dot{V}O_{2peak}$ betrug $4,30 \pm 0,61$ l/min. Am Untersuchungstag des niedrig dosierten Getränks konnte eine durchschnittliche $\dot{V}O_{2peak}$ von $4,35 \pm 0,57$ l/min ermittelt werden. Unter dem hoch dosierten Getränk lagen die Werte bei $4,41 \pm 0,46$ l/min. An allen drei Tagen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Bei der relativen $\dot{V}O_{2max}$ (ml/min/kg Körpergewicht unter STPD-Bedingungen) lagen die mittleren Werte basal bei $50,08 \pm 8,30$ ml/min/kg, unter dem niedrig dosierten Getränk bei $51,52 \pm 7,42$ ml/min/kg und unter dem hoch dosierten bei $53,25 \pm 6,62$ ml/min/kg. Bezüglich der maximalen Sauerstoffaufnahme konnten somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Getränken und dem Tag 0 (basal) nachgewiesen werden (alle Werte MW ± SD).

Maximale Ventilation

Auch die \dot{V}_E (l/min) zeigte an allen drei Untersuchungstagen vergleichbare Mittelwerte und keinen signifikanten Unterschied. Basal betrug sie durchschnittlich $146,61 \pm 24,24$ l/min. Am Tag unter dem niedrig dosierten Getränk lag der Wert bei $152,00 \pm 25,08$ l/min, am Tag unter dem hoch dosierten Getränk bei $157,89 \pm 20,37$ l/min (alle Werte MW ± SD).

RER im Verlauf

Die „respiratory exchange ratio“ als Gasaustauschquotient beschreibt das Verhältnis von CO₂-Abgabe zu O₂-Aufnahme ($RER = \dot{V}CO_2 / \dot{V}O_2$).^{35, 42} Um die Ausbelastung der Probanden genauer beurteilen zu können, wurde die RER ebenfalls im Verlauf beurteilt (Abb. 3.8). Zusätzlich zur submaximalen Arbeit bei 100 Watt und zur aeroben Arbeit bei 150 Watt wurde die RER auch bei 200 Watt und in ihrem Maximalwert beurteilt. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Daten konnte hier ein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden: Verglichen mit dem Wert von 150 Watt am Tag 0 (basal) unterscheiden sich sowohl die Werte vom niedrig dosierten als auch die vom hoch dosierten Getränk (basal vs niedrig dosiert vs hoch dosiert: $0,90 \pm 0,05$ vs $0,95 \pm 0,03$ vs $0,95 \pm 0,03$, ** $p < 0,01$, siehe Abb. 3.8 B). Unter dem hoch dosierten Getränk konnte außerdem bei 200 Watt ein signifikanter Unterschied der RER gezeigt werden (basal vs hoch dosiert: $0,93 \pm 0,05$ vs $0,97 \pm 0,03$, * $p < 0,05$, siehe Abb. 3.8 C).

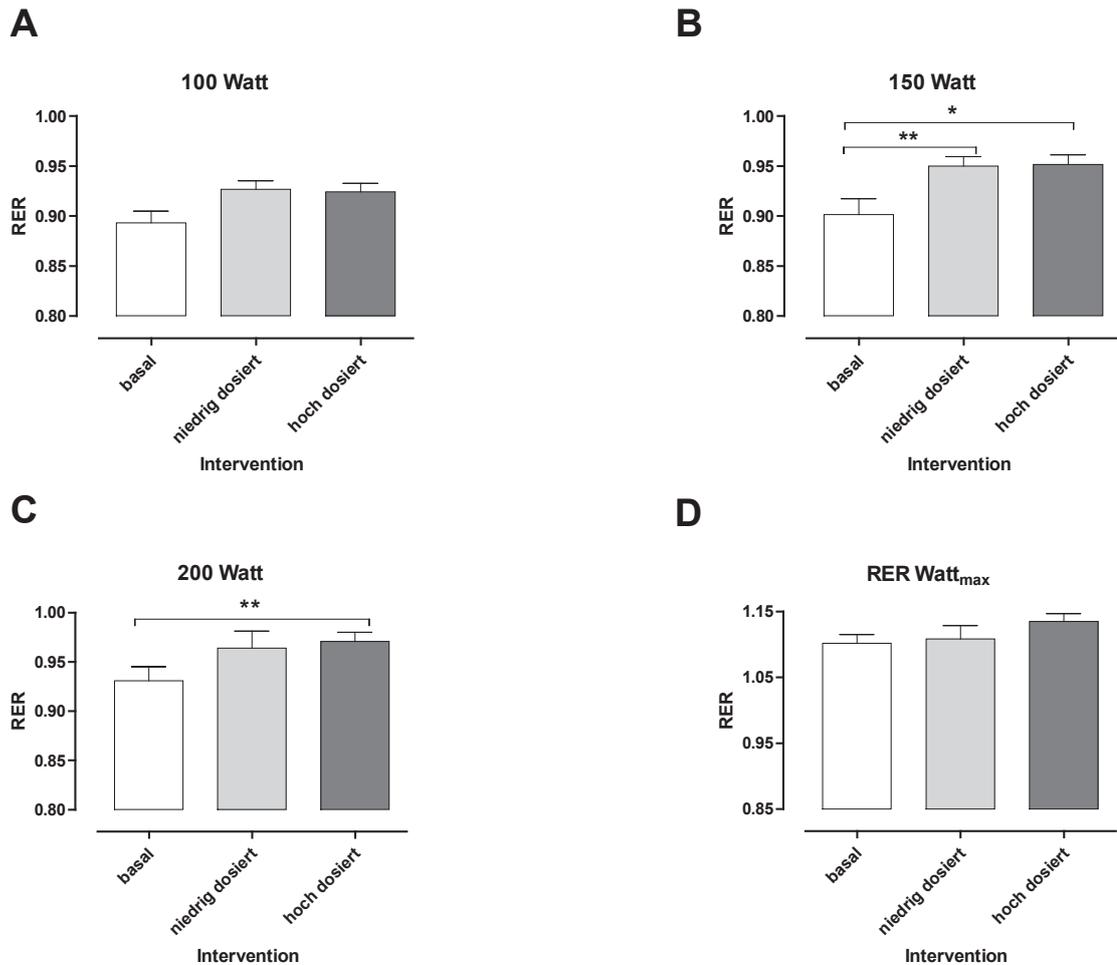


Abb. 3.8 Gasaustauschquotient ($RER = \dot{V}O_2 / \dot{V}CO_2$). Die Abb. zeigt den RER bei 100 Watt (A), 150 (B), 200 (C) und der maximal erreichten Wattzahl (D). Verglichen mit den Werten von Tag 0 (basal) kam es unter dem niedrig dosierten Flavanolgetränk bei einer Belastung von 150 Watt zu einer signifikanten Änderung (** $p < 0,01$), bei dem hoch dosierten bei 150 und 200 Watt (150 Watt: ** $p < 0,01$, 200 Watt: * $p < 0,05$). Der RER bei der maximalen Belastung (Watt_{max}) zeigte keine signifikanten Unterschiede ($n=12$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, repeated measures ANOVA-Messung, Mittelwerte \pm Standardfehler)

Watt_{max}

Die durchschnittlich erreichte maximale Wattzahl betrug an allen drei Untersuchungstagen $4,2 \pm 0,6$ Watt/kg Körpergewicht (siehe Abb. 3.9 A, MW \pm SD).

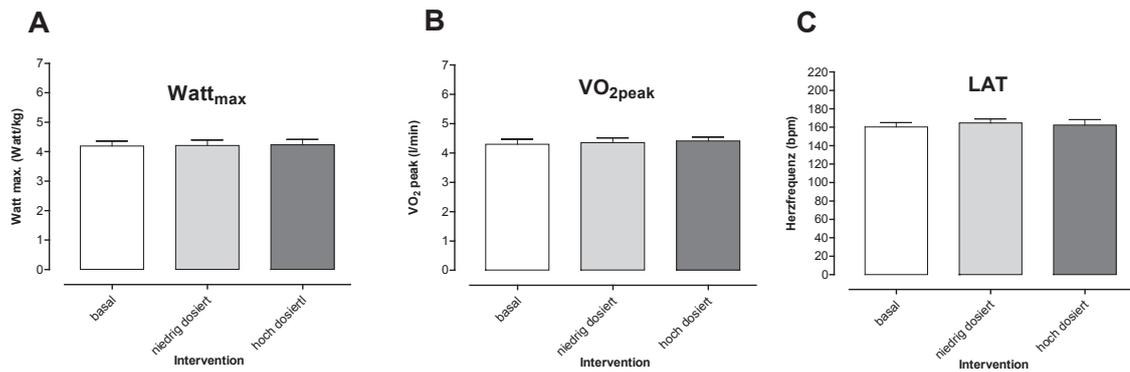


Abb. 3.9 Spiroergometrieergebnisse. An allen drei Untersuchungstagen absolvierten die Probanden (n=12) einen spiroergometrischen Test. Der Test begann mit einer Belastung von 100 Watt, die alle fünf Minuten um 50 Watt gesteigert wurde. Beendet wurde der Test bei Erreichen der subjektiven Erschöpfung. Atemparameter wurden kontinuierlich aufgezeichnet, Laktat wurde zum Ende jeder Stufe gemessen. Die Graphen zeigen die maximale Arbeit (Watt_{max}) (A), die maximale Sauerstoffaufnahme ($\dot{V}O_{2peak}$) (B) und die Herzfrequenz zum Zeitpunkt des Erreichens der lactatanaeroben Schwelle (C). Alle drei Untersuchungstage waren in diesen Werten miteinander vergleichbar (repeated measures ANOVA Messung; n=12, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Herzfrequenz, Laktat, subjektive Belastung

Jeweils zum Ende einer Belastungsstufe wurden die Herzfrequenz, der Laktatspiegel und die subjektive Belastung (entsprechend der Borg-RPE-Skala, siehe Tabelle 2.3) untersucht. Abbildung 3.10 zeigt dabei den Verlauf der Parameter an allen drei Untersuchungstagen. Zwischen dem Tag 0 (basal) und den beiden Getränken konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

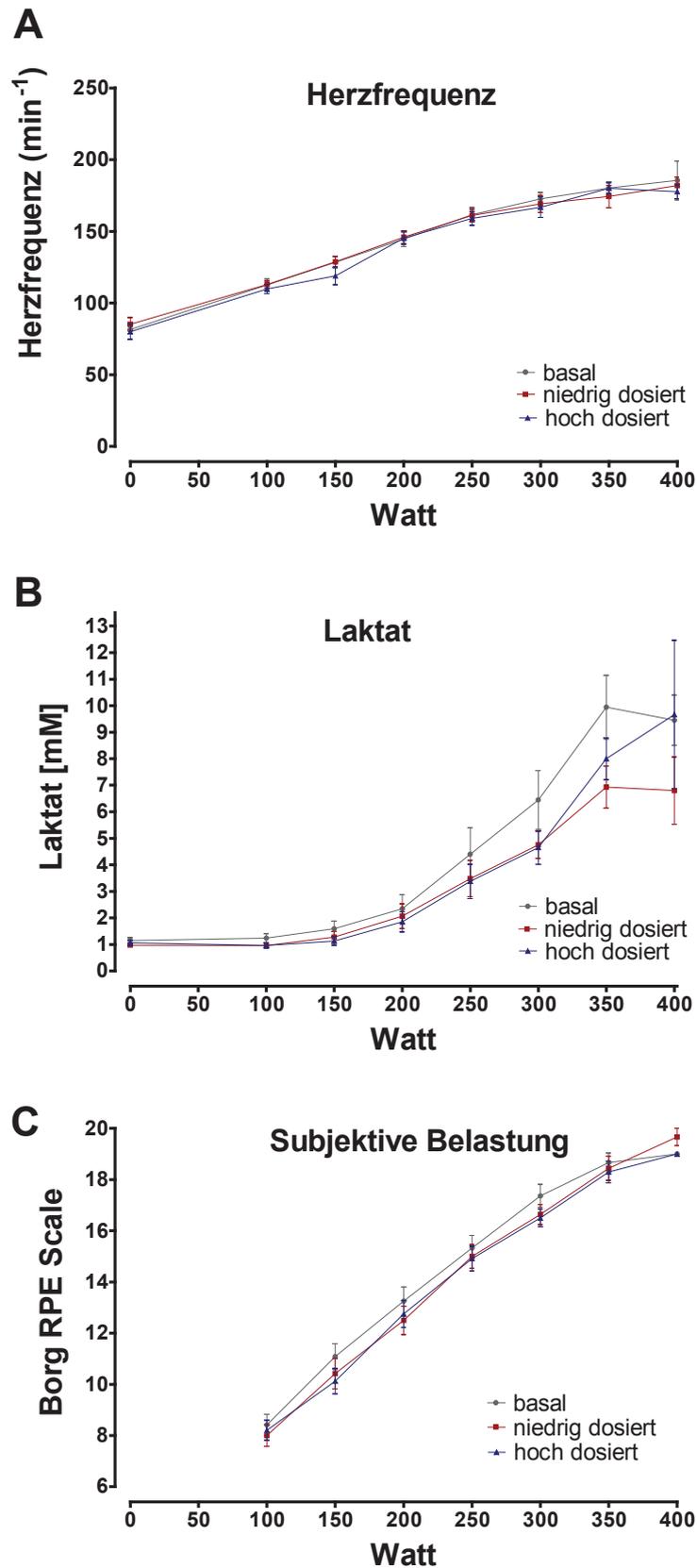


Abb. 3.10 Verlauf von Herzfrequenz (A), Laktat (B) und subjektiv empfundener Belastung nach Borg RPE Skala (C) im Rahmen des spiroergometrischen Tests. Für keines der drei Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungen an den drei Tagen ermittelt werden ($n=12$, Mittelwerte \pm Standardfehler).

3.2.6 Leistungssteigerung unter Einnahme flavanolhaltiger Getränke

Zeitfahren

Der Langzeittest in Form des simulierten Zeitfahrens wurde ebenfalls an allen drei Untersuchungstagen durchgeführt. Dabei folgte das Hauptkriterium für eine verbesserte Leistungsfähigkeit den oben beschriebenen Methoden nach Jeukendrup et al. . Diesen entsprechend bestand eine verbesserte Leistung in kürzerer Zeit, die benötigt wird, um das simulierte Zeitfahren von 40 km zu komplettieren.⁸⁸ In Abbildung 3.11 A+B wird gezeigt, dass es unter dem niedrig dosierten Getränk zu einer verbesserten Leistung beim Zeitfahren kam. Die durchschnittlichen Werte am Tag 0 (basal) und unter dem hoch dosierten Getränk wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (basal vs hoch dosiert: 3561 ± 47 s vs 3475 ± 43 s, $p > 0,05$). Dagegen wurde unter Einnahme des niedrig dosierten Getränks eine mittlere Zeit von 3358 ± 34 s erreicht. Somit zeigte sich ein signifikanter Unterschied zum Tag 0 (basal) und zum Untersuchungstag unter hoch dosiertem Getränk (basal vs niedrig dosiert: $p < 0,001$, niedrig vs hoch dosiert: $p < 0,05$, siehe Abb. 3.11 B). Betrachtet man die Einzelresultate (Abb. 3.11 A), konnten auch hier vergleichbare Ergebnisse verzeichnet werden (alle Werte MW \pm SE). Lediglich die Resultate zweier Probanden stellten dabei eine Ausnahme dar.

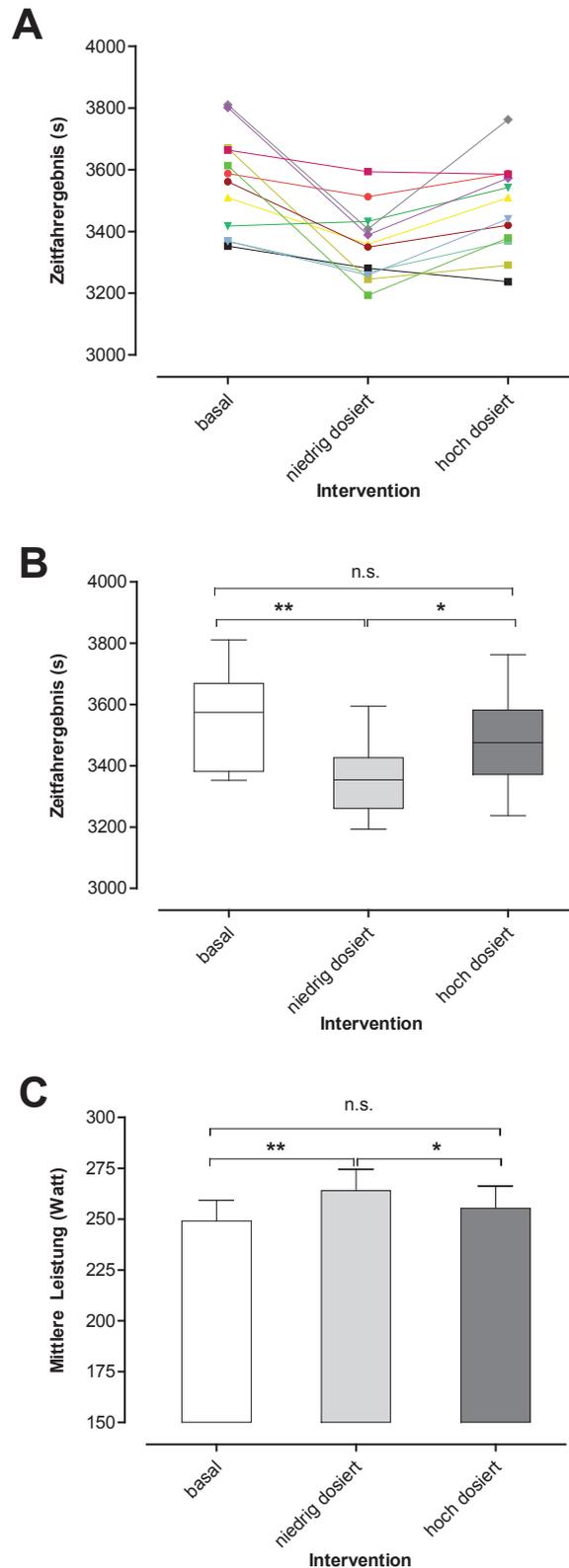


Abb. 3.11 Ergebnis im Zeitfahren unter basalen Bedingungen und unter Einnahme der Flavanolgetränke. (A) Ergebnisse aller Teilnehmer (n=12). (B) Darstellung der mittleren Zeiten als Boxplot-Diagramm. (C) Erhöhung der mittleren erbrachten Leistung unter Intervention mit dem niedrig dosierten Getränk (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; n.s.=nicht signifikant; n=12, Mittelwerte \pm Standardfehler).

Arbeitsleistung

Ebenso zeigte die mittlere Arbeitsleistung während des Zeitfahrens vergleichbare Unterschiede. Im Gegensatz zum Zeitfahren am Tag 0 (basal) und unter dem hoch dosierten Getränk kam es unter dem niedrig dosierten Getränk zu einer signifikant höheren mittleren Arbeitsleistung (basal vs niedrig dosiert vs hoch dosiert: 249 ± 10 Watt vs 264 ± 10 Watt vs 255 ± 11 Watt; basal vs niedrig dosiert: $**p < 0,01$, niedrig dosiert vs hoch dosiert: $*p < 0,05$; basal vs hoch dosiert: n.s.=nicht signifikant, alle Werte MW \pm SE, siehe Abb. 3.11 C). In Anbetracht der randomisierten und balancierten Reihenfolge der Intervention konnte ein Einfluss auf die Leistungssteigerung durch Trainingseffekte ausgeschlossen werden. Um die ermittelten Ergebnisse auf ihre Power hin zu untersuchen, wurde das Niveau des β -Fehlers auf 0,2 festgelegt (Power: $1-\beta=0,8$). In der Teilstudie B zeigten die Mittelwerte der Leistungen im Zeitfahren im Vergleich zwischen niedrig und hoch dosiertem Getränk Werte von $>0,9$ auf. Damit entsprachen sie den festgelegten Anforderungen.

Zeitgewinn

Um genauer bestimmen zu können, an welcher Stelle des Zeitfahrens ein Leistungszuwachs stattgefunden hat, wurden die Ergebnisse aufgeschlüsselt. Dem beschriebenen Ablauf des Zeitfahrens entsprechend geschah dies an den gleichen sechs festgelegten Messpunkten (0%, 20%, 40%, 60%, 80% und 100% der zu erbringenden Leistung). In Abb. 3.12 wird gezeigt, dass unter dem niedrig dosierten Getränk nach ca. 60 % des Zeitfahrens eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit eintrat.

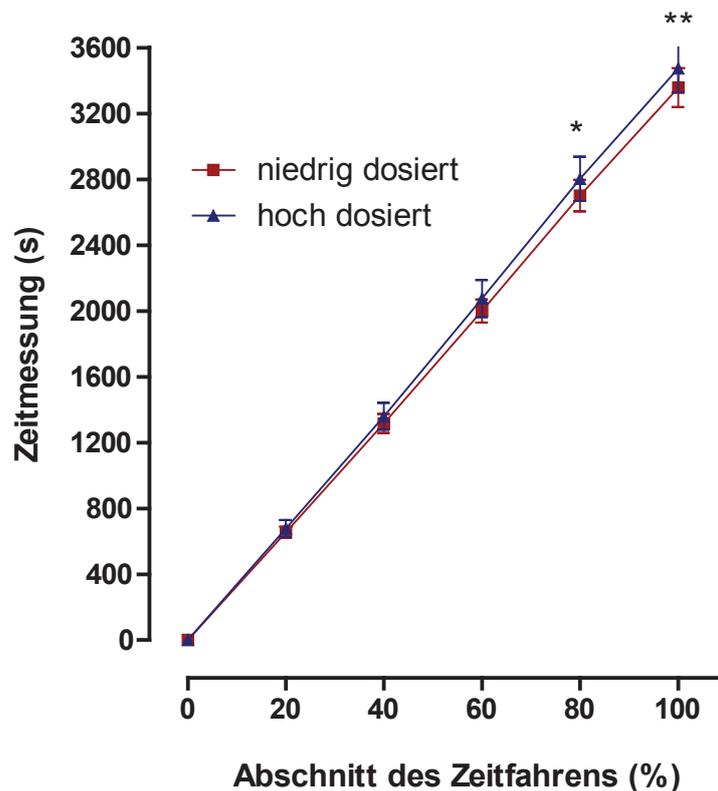


Abb. 3.12 Ergebnisse des Zeitfahrens im Verlauf. Mittelwerte \pm Standardfehler aller Teilnehmer (n=12) unter Einnahme des niedrig dosierten und des hoch dosierten Flavanolgetränks. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist der Tag 0 (basal) nicht dargestellt (*p < 0,05, **p < 0,01; 2-Wege ANOVA für Intervention und Zeitpunkt).

Herzfrequenz, Laktat, subjektive Belastung während des Zeitfahrens

Die Beurteilung der Herz-Kreislauf-Parameter, der metabolischen Marker und des subjektiven Empfindens geschah auch hier anhand von Absolutwerten (Abb. 3.13). Dabei wurden die Herzfrequenz, der Laktatspiegel und die subjektive Belastung (entsprechend der Borg RPE Skala, siehe Tabelle 2.3) an sechs festgelegten Messpunkten (0%, 20%, 40%, 60%, 80% und 100% der zu erbringenden Leistung) untersucht. An allen drei Untersuchungstagen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten am Tag 0 (basal) und denen unter dem niedrig oder dem hoch dosierten Getränk ermittelt werden. Dadurch konnte im Nachhinein von einer insgesamt identischen subjektiven Belastung an den drei Untersuchungstagen ausgegangen werden, was eine Objektivierung der Daten möglich machte. Darüber hinaus konnte somit eine Leistungssteigerung durch eventuell erhöhte Belastung und/oder Motivation unter dem niedrig dosierten Getränk ausgeschlossen werden.

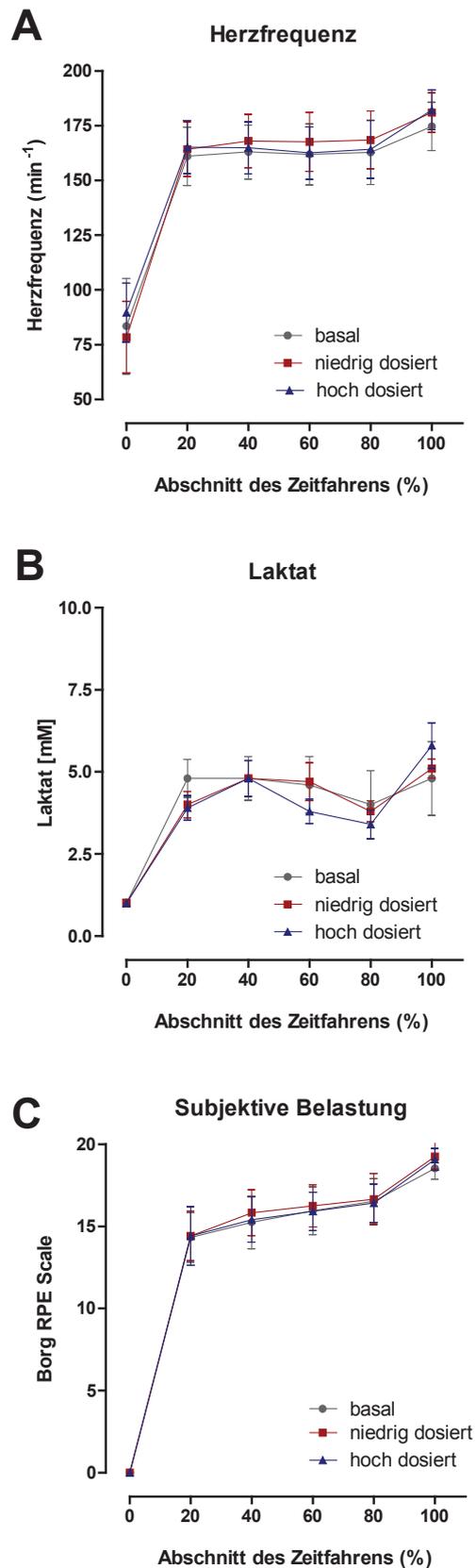


Abb. 3.13 Verlauf von (A) Herzfrequenz, (B) Laktat und (C) subjektiv empfundener Belastung nach Borg RPE Skala im Rahmen des Zeitfahrens. Für alle drei Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungen an den drei Tagen ermittelt werden (n=12, Mittelwerte ± Standardfehler).

4 Diskussion

Steigende Belastungen erfordern multiple Anpassungsvorgänge des gesamten Organismus. Dabei spielen vor allem kardiovaskuläre und metabolische Veränderungen sowie deren Interaktion eine entscheidende Rolle. Faktoren, die die maximale Leistungsfähigkeit, vor allem bei Leistungs- und Ausdauersportlern, limitieren, sind von wesentlichem Interesse. Sowohl im Leistungssport, doch auch für die Rehabilitation von Patienten wird intensiv untersucht, ob endogene Regulationsmechanismen existieren, die in einem Zusammenhang mit der körperlichen Leistungsfähigkeit stehen und gegebenenfalls modifizierbar sind.^{89, 90} Ziel dieser Arbeit war es einerseits, zu untersuchen, ob basales, zirkulierendes Nitrit, welches als endogener Speicher für bioaktives NO⁻ angesehen wird, mit der Leistungsfähigkeit korreliert. Des Weiteren sollte bestimmt werden, ob die chronische Einnahme von Flavanolen zu einer Erhöhung des plasmatischen Nitritgehalts führt und dabei mit einer verbesserten Leistungsfähigkeit verbunden ist. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden:

1. Basale endogene Nitritspiegel im Plasma korrelieren gemessen anhand der LAT positiv mit der Leistungsfähigkeit (Teilstudie A).
2. Die chronische Einnahme eines an Flavanolen niedrig dosierten Getränks führt zu einer Erhöhung des zirkulierenden NO-Pools und zu einer verbesserten vaskulären Funktion (Teilstudie B).
3. Die chronische Einnahme eines an Flavanolen niedrig dosierten Getränks führt bei trainierten Radsportlern zu einer Leistungssteigerung (Teilstudie B).

Im Folgenden soll zunächst auf die Bedeutung endogenen Nitrits eingegangen werden. Im Kontext mit der gängigen Literatur wird diskutiert, welche möglichen Wirkmechanismen für körpereigenes Nitrit während körperlicher Belastung existieren könnten. Danach wird auf die Effekte der chronischen Einnahme eines flavanolhaltigen Getränks eingegangen. Hierbei sollen speziell die Effekte von Flavanolen im Sport hervorgehoben und die Ergebnisse der vorliegenden Studie diesbezüglich eingeordnet werden.

4.1 Die Bedeutung basalen endogenen Nitrits

Nitrit kann nicht länger als ein ausschließlich inertes Oxidationsprodukt von NO[·] charakterisiert werden.^{7, 8} Es wird als biologischer Marker für die Aktivität der NOS⁵³ angesehen. Als alternative Quelle für bioaktives NO[·] übernimmt es eine Vielzahl von Aufgaben in der Regulation von Herz- und Kreislauffunktionen.^{43, 91} Der Mechanismus der NO-Generierung aus Nitrit wird vor allem mit physiologischen und pathologischen Hypoxiezuständen, wie sie z. B. beim arbeitenden Muskel vorkommen, relevant.^{45, 79, 92} Grundlage ist eine eingeschränkte NOS-abhängige NO-Produktion durch den entstandenen O₂-Mangel.⁵⁸ Darüber hinaus spielt Nitrit für verschiedene Zellsignalwege und in der Regulation verschiedener Genexpressionsantworten eine Rolle.⁹³ In experimentellen Ansätzen konnten für Nitrit auch zytoprotektive Wirkungen, vor allem in pathologischen Ischämie-Reperfusionsvorgängen, bestimmt werden.^{94, 95} Die Nitritkonzentrationen im Menschen variieren abhängig vom untersuchten Kompartiment.⁷⁸ Im Plasma finden sich Konzentrationen von 20 bis 100 nM^{51, 62}, im Vollblut 0,2 µM⁹⁶, in Erythrozyten 0,3 bis 0,7 µM^{96, 97}; im Gewebe finden sich Konzentrationen von 450 nM bis zu 22,5 µM.⁹⁷ Das im Plasma bestimmte Nitrit entstammt größtenteils der Oxidation aus NO[·]. Dieses wird von der eNOS enzymatisch gebildet und reagiert dann mit molekularem O₂ zu Nitrit.⁹⁸ Die körpereigenen Nitritlevel können zusätzlich zur Bildung durch den klassischen enzymatischen L-Arginin-NOS-NO-Pfad auch diätetisch beeinflusst werden: Über die Aufnahme von anorganischem Nitrat, wie es insbesondere in grünem Blattgemüse vermehrt vorkommt¹⁰, und über die konsekutive Reduktion durch die physiologischen Bakterien der Mundhöhle kommt es zu einer Erhöhung der plasmatischen Nitritlevel.^{11, 12}

Im Vergleich zum L-Arginin-NOS-NO-Weg benötigt die Reduktion von exogen zugeführtem Nitrat zu Nitrit bzw. NO[·] O₂ nicht als Kofaktor. Bei diesem alternativen Mechanismus ist die Bildung von NO[·] aus Nitrit bei niedrigem pH-Wert sowie bei Sauerstoffmangel sogar augmentiert.^{7, 8, 58} Verschiedene Mechanismen, die potentiell in der Lage sind, aus Nitrit bioaktives NO[·] zu generieren, sind in Abhängigkeit von untersuchten Geweben beschrieben worden. Hierzu zählen die mitochondriale Elektronentransportkette, die Xanthinoxidoreduktase und die Hämproteine desoxygenierten Hämoglobins und Myoglobins.^{59, 63, 99, 100}

Nach Generierung über den enzymatischen und nichtenzymatischen Weg beeinflusst NO⁻ die mitochondriale Atmungskette unter anderem über zwei Mechanismen. Brown und Cooper ermittelten, dass NO⁻ in der Lage ist, sich in Konkurrenz zu O₂ reversibel an den vierten Komplex der Atmungskette, die Cytochrom-C-Oxidase (COX), zu binden und diesen teilweise zu hemmen.¹⁰¹ Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten darüber hinaus eine S-Nitrosierung vom Komplex I und eine subsequente Hemmung der Bildung von ROS nachweisen.⁹⁵ Zudem stimuliert NO⁻ die Mitochondrienbiogenese über einen cGMP-abhängigen Weg.¹⁰²

Basierend auf dem beschriebenen Nitrat-Nitrit-NO-Weg untersuchten mehrere aktuelle Interventionsstudien den diätetischen Einfluss von Nitrat auf kardiovaskuläre Funktionen. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verbesserung der Blutdruckwerte in gesunden Probanden kam^{19, 80} und die Leistungsfähigkeit bei Sportlern positiv beeinflusst werden konnte.^{19, 64-69, 103, 104} Im Rahmen letzterer Studien wurden sowohl Kurzzeitrainingsprotokolle⁶⁵ als auch Ausdauertests⁶⁶ und Kraftmessungen von Muskelkontraktionen⁶⁷ durchgeführt. Mechanistisch konnte eine Beeinflussung von mitochondrialer Funktion bestimmt werden.⁶⁵ Alle entsprechenden Studien untersuchten die Effekte zwischen basalen und diätisch bedingt erhöhten Nitritspiegeln, die durch die Nitrataufnahme bis zu 2- bis 4-fach erhöht wurden. Dabei blieb jedoch ungeklärt, ob basale Nitritlevel mit der körperlichen Leistungsfähigkeit korrelieren.

4.1.1 Der Einfluss endogenen Nitrits auf die Leistungsfähigkeit

Mehrere Interventionsstudien konnten bereits zeigen, dass eine diätetische Modifikation des alternativen Nitrat-Nitrit-NO-Weges eine Rolle für die körperliche Leistungsfähigkeit spielt. Unter Nitrataufnahme zeigten Lansley et al. eine verbesserte Leistung im Rahmen eines Zeitfahrttests auf einem Fahrradergometer auf. Diese Ergebnisse führten sie auf einen zellulären Mechanismus zurück.⁶⁶ Ebenso konnten Larsen et al. bei einem fahrradergometrischen Leistungstest nachweisen, dass die $\dot{V}O_{2peak}$ nach einer dreitägigen Intervention mit Nitrat reduziert war.⁶⁵ Dabei trat dieser O₂-sparende Effekt ohne Änderungen der Blutlaktatspiegel oder verringerte Maximalleistungen auf.⁶⁵ Dies wurde als Hinweis auf einen verbesserten aeroben Stoffwechsel und als optimierte Arbeitseffizienz interpretiert. Die sogenannte P/O-Ratio kann hierfür als Maß für die mitochondriale

Effizienz definiert werden: Sie spiegelt das Verhältnis des ventilatorisch aufgenommenen O_2 zur ATP-Produktion bzw. die Menge an ATP, die pro reduzierten O_2 -Atoms in der Atmungskette produziert wird, wieder.¹⁰⁵ Auch dabei sahen Larsen et al. den Mechanismus auf zellulärer Ebene begründet, und zwar als Interaktion zwischen Nitrit bzw. NO und den Mitochondrien.⁶⁵ Dagegen beschrieben Vanhatalo et al. den Nutzen einer Nitratdiät als eine durch Nitrit und NO vermittelte verbesserte Verteilung von O_2 im Gewebe.¹⁰⁶ Es wird angenommen, dass es ein vom Körper streng reguliertes Gleichgewicht bezüglich des Nitritgehalts verschiedener Kompartimente (Plasma, Vollblut, Gewebe) gibt. Vor allem unter Hypoxie muss Nitrit eine Reservoirfunktion für NO zugewiesen werden. Gewebe, welches einen erniedrigten pO_2 und damit ein hohes hypoxisches Level aufweist, führt zu einem Übertritt von plasmatischem Nitrit in das Gewebe und dadurch zu einem Anstieg des Nitritgehalts in demselben.^{97, 107} Auch die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass es über einen höheren endogenen Nitrit-Pool zu einer verbesserten O_2 -Verteilung und damit zu einem späteren Erreichen der LAT kommt. Zudem betonen sie die Bedeutung von Nitrit und NO für eine verbesserte O_2 -Zufuhr in das beanspruchte Gewebe (Muskeln). Die Ergebnisse der Teilstudie A der vorliegenden Arbeit zeigen hierzu im Detail, dass endogenes Nitrit eine assoziative Bedeutung für die Leistungsfähigkeit hat. Bezüglich der Nitrat-, Nitrit- und NO -Level unter basalen Bedingungen erweitert diese Arbeit die bestehenden Erkenntnisse. Anders als bei der Mehrzahl früherer Studien wurden hier nicht exogen erhöhte NO_x -Level interpretiert: Stattdessen wurde vielmehr das Wissen um endogen vorliegende erhöhte Nitrat-, Nitrit- und NO -Level erweitert. Die univariate Analyse der basalen endogenen Plasmanitritwerte zeigte eine signifikante Korrelation mit der dazugehörigen individuell erreichten LAT als Maß für die Leistungsfähigkeit ($r=0,651$, $p=0,001$, Studie A Abb.3.4 A). Darüber hinaus konnte über multivariate Analysen gefolgert werden, dass der basale endogene Nitritspiegel im Plasma ein unabhängiger Prädiktor für die Leistungsfähigkeit ist und erhöhte Basalwerte eine mögliche verbesserte Leistung bei trainierten Sportlern vorhersagen können. Es muss jedoch angemerkt werden, dass es zwischen den zwei Untersuchungstagen bei jeweils zwei Probanden zu einer Veränderung im Sinne eines stärker abweichenden Wertes kam. Dies betraf sowohl den jeweiligen Wert für den endogenen Plasmanitritgehalt als auch den für die LAT. Gegebenenfalls sind hierfür äußere Faktoren verantwortlich zu machen, die verhindern, dass für

den Korrelationskoeffizienten gegebenenfalls höhere Werte ermittelt werden können. Diesbezüglich existieren viele mögliche Einflussgrößen, die in dieser Arbeit nicht bestimmt werden konnten. Beispielsweise muss die in dieser Studie verwendete Sportart kritisch hinterfragt werden. Das in der Studie verwendete Rad konnte zwar für den einzelnen Sportler optimal auf seine individuellen ergonomischen Einstellungen wie Sattelhöhe, Sattel-Lenkrad-Abstand und Radpedalart adaptiert werden. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass manche Probanden durch ihr Training und aus ihrer Erfahrung heraus bereits eine für sie persönlich besonders geeignete Radfahrposition etabliert hatten, andere Versuchspersonen jedoch noch nicht. Den oben genannten Publikationen und den dort verwendeten Sportarten entsprechend sollte in weiteren Studien auch der Versuch einer Validierung der Ergebnisse mittels Lauffests und Tests mit Kraftmessungen der Knie-Extensoren (e.g. *Musculus vastus lateralis*) unternommen werden.

Bezüglich der Nitritwirkung müssen im Wesentlichen zwei Mechanismen diskutiert werden: (i) die Regulation der Mitochondrien und (ii) die Regulation der Gefäße. Unter verminderter O_2 -Verfügbarkeit im Mitochondrium kommt es zu einer Konkurrenz zwischen NO und O_2 um die Bindung an die Häm-a3-Bindungsstelle der reduzierten COX.¹⁰¹ Als Folge der NO -Bindung wird das freie O_2 in das umliegende Gewebe umverteilt.¹⁰⁸ Ist die COX reduziert, spricht dies für eine erhöhte metabolische Rate, zum Beispiel bei körperlicher Belastung.^{109, 110} Larsen et al. nehmen an, dass es über die NO -Generierung und über die Konkurrenz zwischen O_2 und NO an der COX in der Zelle zu einem milden Hypoxie-Signal kommt. Daraufhin wird die Expression der Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) herunterreguliert und die Protonenleitfähigkeit über die Mitochondrienmembran wird verringert. Als Folge kommt es gemessen an der P/O-Ratio zur Optimierung der ATP-Produktion.⁶⁵ In der vorliegenden Studie könnte erhöhten endogenen Nitritplasmaspiegeln nach Larsen et al. ein Einfluss bezüglich einer verbesserten Mitochondrieneffizienz zugeschrieben werden.⁶⁵ Durch regelmäßiges Training setzen hochtrainierte Leistungssportler ihre Muskeln wiederholte Male hypoxischen Zuständen aus. Dieses chronische Hypoxiesignal könnte den oben genannten Mechanismus also regelmäßig aktivieren. Ein verspätetes Erreichen der LAT (=verbesserte Leistungsfähigkeit) in positiver Korrelation mit basalen endogenen plasmatischen Nitritspiegeln könnte diesen Zusammenhang bewirken. Vor allem der verminderte O_2 -Verbrauch der Sportler bei gleichbleibendem Laktat

und verbesserter Leistungsfähigkeit scheint den Hinweis auf einen verbesserten aeroben Stoffwechsel zu geben. Darauf weist vor allem die Korrelation der basalen Nitritplasmawerte mit der LAT der Studie A im Kontext mit der Studie von Larsen et al. hin.

Einerseits zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass der basale endogene Nitritspiegel mit der LAT korreliert. Andererseits wiesen Larsen et al. in ihrer Studie gleichbleibende Blutlaktatspiegel bei verringerter $\dot{V}O_2$ und verbesserter Leistung unter Nitratdiät nach. Berücksichtigt man beide Tatsachen, liegt es nahe, dass auch endogenes Nitrit die mitochondriale Effizienz auf längere Sicht beeinflussen könnte. Da es während körperlicher Aktivität zu einem physiologischen Abfall von O_2 kommt und dies zu einer Reduktion von Nitrit zu NO bzw. zu anderen reaktiven Nitrospezies führt, regulieren diese Produkte möglicherweise die Mitochondrieneffizienz.

Die lokal eintretende Hypoxie, wie sie bei vermehrter Muskelarbeit durch Kontraktionen hervorgerufen wird, ist ebenfalls als Stimulus der kompensatorischen Vasodilatation für eine verbesserte O_2 -Versorgung der aktiven Muskelgruppen bekannt.¹⁰⁹ Neben einer Vielzahl vasodilatatorischer Mechanismen gelten Nitrit und daraus entstehendes NO selbst als repräsentative Schlüsselsubstanzen in dieser Signalkaskade.^{8, 91, 109, 111} Maher et al. untersuchten den Einfluss von intravenös zugeführtem exogenem Nitrit getrennt auf Venen und Arterien. Sie zeigten, dass Nitrit venös unter Normoxie und Hypoxie dilatatorisch wirkte und arteriell weniger unter Normoxie, aber sehr potent unter Hypoxie eine nitritvermittelte Vasodilatation *in vivo* bewirkt.⁹¹ Zudem wollten sie nachweisen, dass Nitrit autark und nicht nur ausschließlich über die Reduktion zu NO über zirkulierende Nitritreduktasen, wie zum Beispiel Hämoglobin, eine Wirkung auf die Gefäßwand besitzt. Zu diesem Zweck untersuchten sie an isolierten Aorten- und Vena-cava-Ringen von Kaninchen den Hb-unabhängigen Einfluss von Nitrit unter Normoxie und Hypoxie.⁹¹ Sie zeigten dabei, dass unter Abwesenheit von Hb eine nitritinduzierte Vasodilatation eintrat. Dies war vor allem unter Hypoxie der Fall. Lange Zeit war jedoch nicht vollständig geklärt, ob und über welche Mechanismen die *in vitro* laufenden nichtenzymatischen chemischen Reaktionen⁷ und die enzymatischen Nitritreduktasen¹¹² (wie Hb^{59, 113}, Xanthinoxidase⁹⁴ oder eNOS¹¹⁴) sowie die mitochondrialen Enzyme (wie die COX⁹⁹) auch *in vivo* unter Hypoxie vasodilatatorisch ablaufen würden.^{91, 115} Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten diesbezüglich erstmalig, dass endogenem Nitrit und den mit Myoglobin

assoziierten Signalmechanismen eine physiologische Rolle *in vivo* zugesprochen werden kann.⁴⁵ Kritisch sei hier angemerkt, dass über die beschriebene Assoziation von basalen Nitritspiegeln und körperlicher Leistungsfähigkeit in der vorliegenden Arbeit keine Muskelbiopsien zur Untersuchung der oben beschriebenen möglichen Wirkmechanismen durchgeführt wurden. Dies sollte Grundlage zukünftiger Arbeiten sein.

4.2 Flavanole und ihre Rolle in der Beeinflussung von Herz-Kreislauf-Funktionen

Dass Flavanole eine modulierende Wirkung auf den zirkulierenden NO-Pool haben, wurde in verschiedenen Interventionsstudien und experimentellen Forschungsansätzen untersucht.^{23, 24} Demnach kommt es nach Flavanoleinnahme unter anderem zu einem signifikanten Anstieg des Plasmanitritgehalts.²⁵ Über welche Mechanismen dies genau geschieht, ist noch nicht hinreichend geklärt. Flavanole könnten die NO-Homöostase über drei Mechanismen beeinflussen: (i) eine erhöhte NO-Produktion via eNOS, (ii) einen modulierten NO-Abbau und (iii) eine erhöhte Bereitstellung von Nitrit als alternative Ressource für NO.²⁶

In den eigenen Untersuchungen der Teilstudie B kam es unter dem niedrig dosierten Flavanolgetränk erstens zu einer signifikanten Verbesserung des Zeitfahrens und damit zu einer gesteigerten Leistungsfähigkeit. Außerdem kam es zweitens zu einer verbesserten vaskulären Funktion in Form eines Anstiegs der FMD als Marker für die Gefäßfunktion. Unter dem hoch dosierten Getränk konnte im Vergleich zum Tag 0 (basal) keine signifikante Änderung in den untersuchten Parametern festgestellt werden. Darüber hinaus war die Nitritplasmamenge bei Einnahme des niedrig dosierten Flavanolgetränks gegenüber dem Tag 0 (basal) und der Einnahme des hoch dosierten Flavanolgetränks signifikant erhöht.

Schroeter et al. zeigten, dass (-)-Epicatechin der wesentliche Wirkmetabolit von Kakaoflavanolen ist.²⁵ (-)-Epicatechin kann Einfluss auf die vaskuläre Funktion (FMD) nehmen und zu einer Modulation des zirkulierenden NO-Pools führen, was dann über einen Anstieg des plasmatischen Nitritgehalts ermittelt werden kann.²⁵ Entsprechend der aktuellen Studienlage wurde allgemein angenommen, dass es unter Flavanoleinnahme zu einer verbesserten FMD, einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit und einer Stimulation der eNOS kommt. Dies solle zu einem verbesserten Blutfluss im Skelettmuskel unter körperlicher Belastung führen.

Verschiedene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten einen signifikanten Einfluss auf die FMD nach Flavanoleinnahme. Ebenso stellten auch Taubert et al. und Grassi et al. verringerte Blutdruckwerte aufgrund verbesserter endothelabhängiger Vasodilatation nach Flavanoleinnahme fest.^{23, 28, 116, 117} Berry et al. untersuchten diesbezüglich die Blutdruckantwort auf körperliches Training nach Kakaoflavanoleinnahme. Dabei zeigten sie, dass eine akute Einnahme von hoch dosiertem Flavanolkakao (701 mg) im Gegensatz zur einmaligen Einnahme von niedrig dosiertem (22 mg) die Blutdruckantwort auf sportliche Betätigung bei übergewichtigen, älteren Probanden abschwächte und die FMD gesteigert war. Darin sahen sie einen möglichen kardiovaskulären Benefit bei der Ausübung von moderatem Ausdauertraining für Personen mit kardiovaskulären Risikofaktoren.¹¹⁸ Zwar stellten all diese Arbeiten im Vergleich zwischen flavanolreichen und flavanolarmen Testgetränken oben genannte Effekte vor allem unter den hoch dosierten flavanolhaltigen Testsubstanzen fest. Die in dieser Arbeit ermittelten und vorliegenden Ergebnisse wiesen jedoch nach, dass die Steigerung der Leistungsfähigkeit in Form eines verbesserten Zeitfahrttests durch das niedrig dosierte flavanolhaltige Getränk hervorgerufen wurde. Gleiches äußerte sich auch in der Erhöhung des zirkulierenden NO-Pools und in der verbesserten vaskulären Funktion. Unklar ist, warum die chronische Einnahme einer hohen Flavandosis keine Steigerung der Leistungsfähigkeit und der Gefäßfunktion bewirkte.

4.2.1 Mögliche Wirkmechanismen

In den vorliegenden Ergebnissen konnten die bekannten Eigenschaften für flavanolhaltige Getränke zwar für das flavanolarme Getränk nachgewiesen werden, nicht jedoch für das flavanolreiche Getränk. Im Folgenden sollen mögliche Erklärungsansätze hierfür diskutiert werden.

Aus Metaanalysen der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen Kakaoflavanolen und der endothelialen Funktion (FMD) aus früheren Interventionsstudien des kardiologischen Forschungslabors der Universität Düsseldorf lassen sich für die chronische Einnahme von Flavanolen umgekehrt-U-förmige Dosis-Wirkungs-Beziehungen postulieren. Die Frage, ob vor allem die chronische Einnahme von Kakaoflavanol-Testsubstanzen mit steigenden Konzentrationen nicht linearen bzw. Sättigungskinetiken folgt, sondern möglicherweise eine ‚glocken-‘ bzw. umgekehrt-U-förmige Dosis-Antwortkurve zeigt, ist ein zentraler Gegenstand in der Forschung

diskutierter Erklärungsansätze. Dies soll in aktuellen Studien der eigenen Arbeitsgruppe weiter untersucht werden. Nichtlineare Regressionsmodelle zeigen für die akute Kakaoflavanoleinnahme eine Sättigung der FMD-Antwort bei Dosierungen >300 mg/d. Die chronische Einnahme hingegen zeigt hierbei oben beschriebenen Dosis-Wirkungs-Verlauf mit umgekehrt-U-förmiger Kurve. Darüber hinaus zeigten Regressionsanalysen, dass 73% der Variation der FMD auf letztgenannte Beziehung rückführbar sind (Heiss et al. *unveröffentlichte Daten*).

Des Weiteren muss geklärt werden, aufgrund welcher Mechanismen der höhere Flavanolgehalt der hoch dosierten Getränke keinen der erwarteten Effekte hervorrief. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in vermehrtem oxidativem Stress unter dem hoch dosierten Getränk. Oxidativer Stress entsteht durch ein Ungleichgewicht von pro- und antioxidativen Substanzen hin zu mehr Prooxidantien.³⁹ Prooxidantien sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), $O_2^{\cdot-}$ und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}). Als Nebenprodukte entstammen sie der mitochondrialen Atmungskette oder verschiedenen Oxidasen, wie der NADPH-Oxidase oder der NO-Synthase selbst.¹¹⁹ Die reaktiven Sauerstoffspezies führen dann u. a. zu einem schnelleren Abbau von NO^{\cdot} im Gefäßsystem. Mehrere Studien beschrieben, dass Flavanole als Untergruppe der Polyphenole die Fähigkeit besitzen, freie Radikale abzufangen und mit $O_2^{\cdot-}$ zu reagieren. Dadurch wird eine direkte Reaktion von $O_2^{\cdot-}$ mit NO^{\cdot} verhindert und so eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit verringert.^{120, 121} Gleichzeitig zeigten Schubert et al., dass die Polyphenole des Granatapfelsaftes proinflammatorische und prooxidative Enzyme, wie die Lipooxygenasen und Zyklooxygenasen, hemmen können.^{122, 123} Dass Polyphenole nicht nur antioxidative, sondern auch prooxidative Eigenschaften haben, beschrieben Lambert et al.¹²⁴ Neben der antioxidativen Wirkung und damit einem verbesserten Zellüberleben scheint der prooxidative Effekt möglicherweise in einer induzierten Apoptose und verringertem Tumorwachstum zu liegen. Fukumato und Mazza untersuchten weiter verschiedene Untergruppen der Polyphenole: Sie konnten auch für (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, dem Hauptwirkmetabolit der Kakaoflavanole, neben antioxidativen auch prooxidative Eigenschaften *in vitro* nachweisen.¹²⁵ Für die Ergebnisse der Teilstudie B bezüglich des hoch dosierten Getränks muss daher die Möglichkeit eines Ungleichgewichts anti- und prooxidativer Effekte und damit gesteigerten oxidativen Stresses in Betracht gezogen werden. Extremsportler sind per se schon einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt.¹²⁶ Vor allem

O₂-deaktiviert hierbei NO[•] unter Bildung von Peroxynitrit, welches dann die NOS inhibieren und so zu einer verringerten NO-Bildung führen kann.¹²⁷ In den vorliegenden Ergebnissen kam es unter dem hoch dosierten Getränk im Vergleich zum Tag 0 (basal) zu einem Anstieg des plasmatischen Nitritgehalts. Dieser war jedoch nicht signifikant und geringer als unter dem niedrig dosierten Getränk. Möglicherweise zeigt sich hier, dass eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit über oben genannte Mechanismen unter Flavanolgabe auftrat, dass diese jedoch durch einen erhöhten oxidativen Stress durch die möglicherweise erhöhte prooxidative Aktivität des hoch dosierten Flavanolgetränks gedämpft wurde. Darüber hinaus muss die Methodik kritisch hinterfragt werden. In einer Metaanalyse zahlreicher Studien über den Einfluss von Flavanolen auf den Blutdruck kamen Ried et al. aktuell zu folgendem Ergebnis: Nur in den Studien, in denen als Zweitgetränk ein vollständig flavanolfreies Testgetränk verwendet wurde, kam es zu einer signifikanten Reduktion des Blutdrucks.¹²⁸ In weiteren Studien ist der Einsatz eines Placebos, also die Verwendung eines flavanolfreien Testgetränks, zu evaluieren.

Abschließend liegen die in der aktuellen Studie ermittelten Werte bezüglich eines verbesserten Zeitfahrens unter dem niedrig dosierten Getränk mit einer Zeitfahrverbesserung von 3358 ± 34 s im Gegensatz zu 3561 ± 47 s am Tag 0 (basal) und 3475 ± 43 s unter dem hoch dosierten Getränk zwar in einem Bereich, der eine Signifikanz aufzeigte (basal vs niedrig dosiert: p<0,001, niedrig vs hoch dosiert: p<0,05). Dieser belief sich jedoch auf eine Verbesserung im Sekundenbereich. Die Verbesserung der durchschnittlichen Arbeitsleistung zeigte diesbezüglich ein besseres Outcome bei einer Steigerung um durchschnittlich 15 Watt (basal vs niedrig dosiert vs hoch dosiert: 249 ± 10 Watt vs 264 ± 10 Watt vs 255 ± 11 Watt; basal vs niedrig dosiert: **p <0,01, niedrig dosiert vs hoch dosiert: *p<0,05; basal vs hoch dosiert: n.s. = nicht signifikant).

Insgesamt hatte das niedrig dosierte Flavanolgetränk also einen signifikanten Einfluss auf die plasmatischen Nitritlevel und die FMD sowie auf das Zeitfahren und die erbrachte Arbeitsleistung. Die Gründe für einen fehlenden positiven Effekt unter dem hoch dosierten Getränk müssen in weiteren Studien erforscht werden.

4.3 Ausblick und klinische Bedeutung

NO[•] als Signalmolekül, endogen durch die NO-Synthasen oder exogen aus der Reduktion von Nitrat und Nitrit gebildet, spielt seit vielen Jahren eine zentrale Rolle in experimenteller sowie klinischer Forschung. Vor allem die gefäßregulierenden Eigenschaften von NO[•] scheinen dabei von besonderer Bedeutung zu sein. Die aktuelle Forschung konnte zeigen, dass die Bioverfügbarkeit von NO[•] auch diätetisch über die Nahrung durch Nitrat und Nitrit als NO-Donoren beeinflusst werden kann. Gerade infolge dieser Erkenntnis ist die Charakterisierung des sogenannten Nitrat-Nitrit-NO-Weges als möglicher Angriffspunkt für die Modulation kardiovaskulärer Funktion von immer größerem Interesse.¹⁰⁻¹² Mehrere Interventionsstudien zeigten, dass die NO-Bioverfügbarkeit durch die diätetische Aufnahme von anorganischem Nitrat mittels Reduktion über Nitrit zu NO[•] gesteigert werden konnte. Bei Gesunden kam es dabei zu einer Blutdruckreduktion, Sportler zeigten eine verbesserte Leistung auf.^{19, 64-69, 103} Während sich die aktuelle Forschung vor allem mit den Wirkungen diätetisch zugeführten anorganischen Nitrats beschäftigt, ist die Rolle des ‚Zwischenprodukts‘ Nitrit nicht vollends geklärt. Mittels der vorliegenden Untersuchungen (Teilstudie A) konnte gezeigt werden, dass körpereigene plasmatische Nitritlevel positiv mit der Leistungsfähigkeit korrelieren. Dadurch erweitert sich das bisherige Wissen zu basalen Nitritleveln. Gemäß der gesteigerten NO-Generierung durch Reduktion von Nitrit, vor allem unter hypoxisch-aziden Zuständen, sollte zukünftig überprüft werden, welche Rolle körpereigenes Nitrit in Bezug auf die Mikrozirkulation einnimmt.

Bei mikrozirkulatorischen Zuständen, beispielsweise im Gewebe, kommt es zu noch stärkeren pH- und O₂-Abfällen als beim beanspruchten Muskel und der Einfluss dessen auf die körperliche Leistungsfähigkeit ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Zusätzlich zur Annahme, dass NO[•] und seine Derivate über eine Niederregulation der ANT die Mitochondrieneffizienz steigern⁶⁵, sollte in folgenden Studien weiter untersucht werden, inwiefern Muskelzellen von Ausdauertrainierten möglicherweise durch sich wiederholende hypoxische Zustände während der Trainingsphasen auf molekularer Ebene die mitochondriale Effizienz im Vergleich zu Untrainierten besser steigern können. Gerade die Frage, welche Rolle Nitrit dabei spielt, wäre von besonderem Interesse. Zusammengefasst konnte die

Teilstudie A mit dem Ergebnis, dass erhöhte basale Nitritlevel mit einer verbesserten Leistung korrelieren, einen weiteren Marker für die Leistungsfähigkeit bei Ausdauertrainierten aufzeigen.

Mit der Teilstudie B wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob flavanolreiche bzw. flavanolarme Getränke ebenfalls über zugrunde liegende Wirkungen von NO Einfluss auf die Leistungsfähigkeit nehmen. Flavanole stellen unter anderem über eine erhöhte Bereitstellung von Nitrit eine alternative NO-Quelle dar. Die Teilstudie B ging von der Annahme aus, dass Flavanole eine modulierende Wirkung auf den NO-Pool haben. Dieser entsprechend wurde hier untersucht, ob eine diätetische Zufuhr von flavanolreichen bzw. flavanolarmen Getränken den plasmatischen Nitritgehalt, die FMD und die Leistungsfähigkeit beeinflusst.^{23, 24, 26} Dabei konnte gezeigt werden, dass es unter dem niedrig dosierten Flavanolgetränk zu mehreren Effekten kam: Erstens konnte eine signifikante Verbesserung des Zeitfahrens und damit eine gesteigerte Leistungsfähigkeit und zweitens eine verbesserte vaskuläre Funktion in Form eines Anstiegs der FMD nachgewiesen werden. Auch die plasmatischen Nitritspiegel waren unter dem niedrig dosierten Getränk signifikant erhöht. Allerdings kam es im Gegensatz zur Ausgangshypothese zu keiner signifikanten Steigerung der gemessenen Parameter unter dem hoch dosierten Getränk. Weitere Studien müssen klären, welchen Dosis-Wirkungs-Beziehungen flavanolhaltige Getränke folgen und welche Sättigungskinetik die chronische Einnahme von Flavanolen aufweist.

5 Literaturverzeichnis

1. Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep.* 2008;60(1):119-126.
2. Kelm M, Feelisch M, Schrader J. Release of the free nitric oxide radical (NO) and EDRF from endothelial cells. *Z Kardiol.* 1989;78 Suppl 6:70-74.
3. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:535-560.
4. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res.* 1990;66(6):1561-1575.
5. Rassaf T, Poll LW, Brouzos P, Lauer T, Totzeck M, Kleinbongard P, Gharini P, Andersen K, Schulz R, Heusch G, Mıdder U, Kelm M. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans. *Eur Heart J.* 2006;27(14):1699-1705.
6. Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circ Res.* 1994;74(2):349-353.
7. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995;1(8):804-809.
8. Modin A, Bjerne H, Herulf M, Alving K, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand.* 2001;171(1):9-16.
9. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide.* 2009;21(2):77-91.
10. Meah MN, Harrison N, Davies A. Nitrate and nitrite in foods and the diet. *Food Addit Contam.* 1994;11(4):519-532.
11. Tannenbaum SR, Sinskey AJ, Weisman M, Bishop W. Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(1):79-84.
12. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(3):395-400.
13. Special issue - Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: scientific background papers of the joint WHO/FAO expert consultation, Geneva, 28 January - 1 February 2002. *Nutrition PH.* 2004 Feb;7: No. 1(A) Suppl 1001.
14. John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;359(9322):1969-1974.
15. Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH, Karanja N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med.* 1997;336(16):1117-1124.
16. Pauwels EK. The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract.* 2011;20(2):103-111.
17. Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Curr Pharm Des.* 2009;15(10):1072-1084.
18. Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA.* 2002;288(20):2569-2578.

19. Larsen FJ, Ekblom B, Sahlin K, Lundberg JO, Weitzberg E. Effects of dietary nitrate on blood pressure in healthy volunteers. *N Engl J Med.* 2006;355(26):2792-2793.
20. Barnard K. Flavanols, cocoa, and cardiology. *Circulation.* 2006;114(23):f191-192.
21. Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. *Br J Nutr.* 2010;104 Suppl 3:S28-39.
22. Lazarus SA, Hammerstone JF, Schmitz HH. Chocolate contains additional flavonoids not found in tea. *Lancet.* 1999;354(9192):1825.
23. Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA.* 2003;290(8):1030-1031.
24. Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension.* 2010;55(6):1398-1405.
25. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(4):1024-1029.
26. Totzeck M, Kelm M, Rassaf T. Dietary Flavonoids as Modulators of NO bioavailability in Acute and Chronic Cardiovascular Disease. In: Bryan NS, Loscalzo J, eds. *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease.* 1 ed. Berlin: Springer; 2011:300.
27. Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, Merx MW, Heussen N, Gross HB, Keen CL, Schroeter H, Kelm M. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in mediated diabetic patients: a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(22):2141-2149.
28. Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;49(2):74-80.
29. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46(7):1276-1283.
30. Fleg JL, Pina IL, Balady GJ, Chaitman BR, Fletcher B, Lavie C, Limacher MC, Stein RA, Williams M, Bazzarre T. Assessment of functional capacity in clinical and research applications: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association. *Circulation.* 2000;102(13):1591-1597.
31. Wasserman K. *Principles of exercise testing and interpretation.* Vol 2. New York: Lea and Febiger; 1994.
32. Hall JJE, Guyton AC. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* Vol 12. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2011.
33. Hollmann W, Prinz JP. Zur Geschichte und klinischen Bedeutung der kardiopulmonalen Arbeitsuntersuchung unter besonderer Berücksichtigung der Spiroergometrie. *Z Kardiol.* 1994;83(4):247-257.
34. Ahonen J. *Sportmedizin und Trainingslehre.* Vol 2. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2008.
35. Klinker R, Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagel, S. *Physiologie.* Vol 6. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
36. Loellgen H, Erdmann E, Gitt AK. *Ergometrie: Belastungsuntersuchungen in Klinik und Praxis.* Vol 3. Heidelberg: Springer; 2009

37. Silbernagel S, Despopoulos A. *Taschenatlas Physiologie*. Vol 7. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2007.
38. Crimi E, Ignarro LJ, Cacciatore F, Napoli C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):292-300.
39. Schmidt R, Lang F, Heckmann M. *Physiologie des Menschen*. Vol 31. Heidelberg: Springer; 2010.
40. Pokan R, Hofmann P, Von Duvillard SP, Beaufort F, Schumacher M, Fruhwald FM, Zweiker R, Eber B, Gasser R, Brandt D, Smekal G, Klein W, Schmid P. Left ventricular function in response to the transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Med Sci Sports Exerc*. 1997;29(8):1040-1047.
41. Wonisch M, Fruhwald FM, Hofmann P, Hoedl R, Klein W, Kraxner W, Maier R, Pokan R, Smekal G, Watzinger N. Spiroergometrie in der Kardiologie-Grundlagen der Physiologie und Terminologie. *J Kardiol*. 2003;10(9):383-390.
42. Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. *J Appl Physiol*. 1986;60(6):2020-2027.
43. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993;329(27):2002-2012.
44. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988;333(6174):664-666.
45. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, Berenbrink M, Klare JP, Steinhoff HJ, Semmler D, Shiva S, Williams D, Kipar A, Gladwin MT, Schrader J, Kelm M, Cossins AR, Rassaf T. Nitrite Regulates Hypoxic Vasodilation via Myoglobin-Dependent Nitric Oxide Generation. *Circulation*. 2012;126(3):325-334.
46. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80 Suppl. 5:3-6.
47. Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*. 1989;65(1):1-21.
48. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*. 2001;89(11):1073-1080.
49. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-142.
50. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1411(2-3):273-289.
51. Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating NO pool: Assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(4):413-422.
52. May JM, Qu ZC, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279(6):C1946-1954.
53. Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12814-12819.
54. Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C, Kelm M. Nitric oxide synthase-derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *Br J Sports Med*. 2007;41(10):669-673.

55. Rassaf T, Heiss C, Mangold S, Leyendecker T, Kehmeier ES, Kelm M, Lauer T. Vascular formation of nitrite after exercise is abolished in patients with cardiovascular risk factors and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(14):1502-1503.
56. Lauer T, Heiss C, Balzer J, Kehmeier E, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Meyer C, Merx MW, Kelm M, Rassaf T. Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(3):291-297.
57. Rassaf T, Flogel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res*. 2007;100(12):1749-1754.
58. Castello PR, David PS, McClure T, Crook Z, Poyton RO. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. *Cell Metab*. 2006;3(4):277-287.
59. Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med*. 2003;9(12):1498-1505.
60. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP, Cannon RO 3rd. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(21):11482-11487.
61. Basu S, Azarova NA, Font MD, King SB, Hogg N, Gladwin MT, Shiva S, Kim-Shapiro DB. Nitrite reductase activity of cytochrome c. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32590-32597.
62. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):156-167.
63. Zhang Z, Naughton DP, Blake DR, Benjamin N, Stevens CR, Winyard PG, Symons MC, Harrison R. Human xanthine oxidase converts nitrite ions into nitric oxide (NO). *Biochem Soc Trans*. 1997;25(3):524S.
64. Lansley KE, Winyard PG, Fulford J, Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, DiMenna FJ, Gilchrist M, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of walking and running: a placebo-controlled study. *J Appl Physiol*. 2011;110(3):591-600.
65. Larsen FJ, Schiffer TA, Borniquel S, Sahlin K, Ekblom B, Lundberg JO, Weitzberg E. Dietary inorganic nitrate improves mitochondrial efficiency in humans. *Cell Metab*. 2011;13(2):149-159.
66. Lansley KE, Winyard PG, Bailey SJ, Vanhatalo A, Wilkerson DP, Blackwell JR, Gilchrist M, Benjamin N, Jones AM. Acute Dietary Nitrate Supplementation Improves Cycling Time Trial Performance. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(6):1125-1131.
67. Bailey SJ, Fulford J, Vanhatalo A, Winyard PG, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2010;109(1):135-148.
68. Bailey SJ, Winyard P, Vanhatalo A, Blackwell JR, DiMenna FJ, Wilkerson DP, Tarr J, Benjamin N, Jones AM. Dietary nitrate supplementation reduces the O₂ cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. *J Appl Physiol*. 2009;107(4):1144-1155.

69. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;191(1):59-66.
70. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(1 Suppl):243S-255S.
71. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000;130(8S Suppl):2073S-2085S.
72. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(4):798-804.
73. Fisher ND, Hollenberg NK. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *J Hypertens*. 2006;24(8):1575-1580.
74. Corretti M, Anderson T, Benjamin E, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):257-265.
75. Natsume M, Osakabe N, Oyama M, Sasaki M, Baba S, Nakamura Y, Osawa T, Terao J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic Biol Med*. 2003;34(7):840-849.
76. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation*. 2002;106(13):1614-1617.
77. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1590-1596.
78. Hendgen-Cotta U, Grau M, Rassaf T, Gharini P, Kelm M, Kleinbongard P. Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices. *Methods Enzymol*. 2008;441:295-315.
79. Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. Crosstalk between nitrite, myoglobin and reactive oxygen species to regulate vasodilation under hypoxia. *PLoS One*. 2014;9(8):e105951.
80. Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, Bernard A, Kelm M, Rassaf T. Dietary nitrate reverses vascular dysfunction in older adults with moderately increased cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(15):1584-1585.
81. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(5):645-657.
82. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR, Jr. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*. 1996;268:237-246.
83. Lundberg JO, Carlstrom M, Larsen FJ, Weitzberg E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc Res*. 2011;89(3):525-532.
84. Trappe HJ, Lollgen H. [Guidelines for ergometry. German Society of Cardiology--Heart and Cardiovascular Research]. *Z Kardiol*. 2000;89(9):821-831.
85. Borg G. Perceived exertion as an indicator of somatic stress. *Scand J Rehabil Med*. 1970;2(2):92-98.

86. Seals DR, Hagberg JM, Hurley BF, Ehsani AA, Holloszy JO. Endurance training in older men and women. I. Cardiovascular responses to exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1984;57(4):1024-1029.
87. Rassaf T, Heiss C, Hendgen-Cotta U, Balzer J, Matern S, Kleinbongard P, Lee A, Lauer T, Kelm M. Plasma nitrite reserve and endothelial function in the human forearm circulation. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(2):295-301.
88. Jeukendrup A, Saris WH, Brouns F, Kester AD. A new validated endurance performance test. *Med Sci Sports Exerc.* 1996;28(2):266-270.
89. Bang O. The lactate content of the blood during and after muscular exercise in man. *Skandinav. Arch. f. Physiol.* 1936;74(supplement 10):49.
90. Tepperman J, Tepperman HM. On the blood lactic acid response to measured exercise in hypoxic human subjects. *J Clin Invest.* 1948;27(2):176-186.
91. Maher AR, Milsom AB, Gunaruwan P, Abozguia K, Ahmed I, Weaver RA, Thomas P, Ashrafian H, Born GV, James PE, Frenneaux MP. Hypoxic modulation of exogenous nitrite-induced vasodilation in humans. *Circulation.* 2008;117(5):670-677.
92. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. *Blood.* 2008;112(7):2636-2647.
93. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer SM, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T, Maloney RE, Bharti A, Rodriguez J, Feelisch M. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nat Chem Biol.* 2005;1(5):290-297.
94. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13683-13688.
95. Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, Schmitz J, Becher S, Klare JP, Steinhoff HJ, Goedecke A, Schrader J, Gladwin MT, Kelm M, Rassaf T. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(29):10256-10261.
96. Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood.* 2005;106(2):734-739.
97. Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(12):4308-4313.
98. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003;35(7):790-796.
99. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* 1999;454(1-2):127-130.
100. Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res.* 2007;100(5):654-661.

101. Brown GC, Cooper CE. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 1994;356(2-3):295-298.
102. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003;299(5608):896-899.
103. Vanhatalo A, Bailey SJ, Blackwell JR, Dimenna FJ, Pavey TG, Wilkerson DP, Benjamin N, Winyard PG, Jones AM. Acute and chronic effects of dietary nitrate supplementation on blood pressure and the physiological responses to moderate-intensity and incremental exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(4):R1121-31.
104. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(2):342-347.
105. Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1706(1-2):1-11.
106. Vanhatalo A, Fulford J, Bailey SJ, Blackwell JR, Winyard PG, Jones AM. Dietary nitrate reduces muscle metabolic perturbation and improves exercise tolerance in hypoxia. *J Physiol.* 2011;589(Pt 22):5517-5528.
107. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: cause or consequence? A systems-based review. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(5):691-701.
108. Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S. Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. *Science.* 2003;302(5652):1975-1978.
109. Casey DP, Madery BD, Curry TB, Eisenach JH, Wilkins BW, Joyner MJ. Nitric oxide contributes to the augmented vasodilatation during hypoxic exercise. *J Physiol.* 2010;588(Pt 2):373-385.
110. Taylor CT, Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):643-647.
111. Casey DP, Curry TB, Wilkins BW, Joyner MJ. Nitric oxide-mediated vasodilation becomes independent of beta-adrenergic receptor activation with increased intensity of hypoxic exercise. *J Appl Physiol.* 2011;110(3):687-694.
112. Lundberg JO, Weitzberg E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):915-922.
113. Doyle MP, Pickering RA, DeWeert TM, Hoekstra JW, Pater D. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J Biol Chem.* 1981;256(23):12393-12398.
114. 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.* 2006;341(3):816-821.
115. Gladwin MT, Raat NJ, Shiva S, Dezfulian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, Patel RP. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2026-2035.
116. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2007;298(1):49-60.
117. Grassi D, Necozione S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin

- resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*. 2005;46(2):398-405.
118. Berry NM, Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Impact of cocoa flavanol consumption on blood pressure responsiveness to exercise. *Br J Nutr*. 103(10):1480-1484.
 119. Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *J Toxicol*. 2011;2011:467305.
 120. Bors W, Michel C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(11-12):1413-1426.
 121. Girard P, Sercombe R, Sercombe C, Le Lem G, Seylaz J, Potier P. A new synthetic flavonoid protects endothelium-derived relaxing factor-induced relaxation in rabbit arteries in vitro: evidence for superoxide scavenging. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(10):1533-1539.
 122. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol*. 1999;66(1):11-17.
 123. Schewe T, Sadik C, Klotz LO, Yoshimoto T, Kuhn H, Sies H. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol Chem*. 2001;382(12):1687-1696.
 124. Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):65-72.
 125. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*. 2000;48(8):3597-3604.
 126. Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res*. 2007;73(2):326-340.
 127. McCarty MF. Scavenging of peroxynitrite-derived radicals by flavonoids may support endothelial NO synthase activity, contributing to the vascular protection associated with high fruit and vegetable intakes. *Med Hypotheses*. 2008;70(1):170-181.
 128. Ried K, Sullivan TR, Fakler P, Frank OR, Stocks NP. Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;8:CD008893.

Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Tienush Rassaf danke ich für die Überlassung des Themas, für sein Engagement und die Möglichkeit selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. Matthias Totzeck. Vor allem möchte ich mich für seine hervorragende Betreuung, Unterstützung und sein nicht endendes Engagement bedanken. Speziell die Einarbeitung in die Thematik der Dissertation und den Messtechniken der Spiroergometrie und Leistungsdiagnostik, sowie das Vertrauen in meine organisatorischen Fähigkeiten rechne ich ihm hoch an. Seine vielfältige Unterstützung ging über das übliche Maß bei der Betreuung einer Doktorarbeit weit hinaus. Ich war mir stets meines Glückes über diesen Betreuer bewusst und werde seine Herangehensweise an wissenschaftliches Arbeiten in eindrucksvoller Erinnerung behalten.

Frau Dr. rer. nat. Ulrike Hendgen-Cotta bin ich zu besonderem Dank verpflichtet, für die Bereitschaft jederzeit theoretische Probleme zu lösen und ungeklärte Fragen zu beantworten. Ferner werde ich die Gespräche und Unterstützung über die Doktorarbeit hinaus in schöner Erinnerung behalten.

Herrn MTA Dominik Semmler danke ich für seine zuverlässige Hilfe und konsequente Betreuung im Labor. Er ermöglichte mir durch seine Einweisung in labortechnische Vorgänge und Arbeitsweisen eine sehr gute Grundlage, um selbstständig wissenschaftlich zu arbeiten.

Allen Mitarbeiter des Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Sporthochschule Köln, vor allem Frau MTA Anke Schmitz, danke ich für die gute Kommunikation in organisatorischen Fragen, sowie die Einarbeitung in die biochemische Laktatbestimmung.

Auch allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des kardiologischen Labors danke ich für die gute Atmosphäre, ihre Unterstützung und die lehr- sowie erfahrungsreiche Zeit.

Meinem lieben Freund C. H. danke ich für seine immerwährende Unterstützung, sein Verständnis und seinen Humor in allen Lebenslagen. Auch wenn die Promotion manchmal ein kritisches Thema war, stand sie am Ende des Tages nie zwischen uns.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen lieben Eltern S. F.-M. und Herrn Dr. med. F. M. und bei meinen Geschwistern L. und L. M. bedanken. Ihre Unterstützung, ihr Glaube an mich und ihr familiärer Rückhalt sind mir in allen Lebenslagen eine unersetzliche Hilfe. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift