Die gewebespezifische endotheliale NO-Synthase ist der Keyplayer in durch Scherkräfte vermittelter kardiovaskulärer Protektion durch körperliches Training

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Beate Hutzler aus Berlin

Düsseldorf, März 2020

aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor Prof. Dr. med Malte Kelm

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Doktormutter: Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Axel Gödecke

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf" erstellt worden ist.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem erkläre ich, dass ich bisher noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf, den

Beate Hutzler

Meinen Eltern und Freunden gewidmet

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden auf Fachtagungen vorgestellt oder befinden sich in Vorbereitung auf eine Publikation.

Publikationen:

F. Leo*, **B. Hutzler***, C. A. Ruddiman, B. E. Isakson, M. M. Cortese-Krott, Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells, Nitric Oxide, Volume 96, 2020, Pages 44-53, ISSN 1089-8603, https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.01.002. *contributed equally

Poster:

B. Hutzler, J. Hocks, N. Thomas, S. Becher, M. Kelm, M. M. Cortese-Krott, T.Suvorava NOS3-dependent cardiac adaptation to exercise and cardioprotection: role of RBC NOS3?, CaVaD Symposium, Düsseldorf, Deutschland 15.03-16.03.2018

B. Hutzler, F. Leo, F. Barbarino, J. Hocks, N. Thomas, S. Becher, M. Kelm, M. M. Cortese-Krott, T. Suvorava, "Gene targeting approach to study the specific role of vascular endothelial nitric oxide synthase in cardiovascular effects of exercise and cardioprotection", SPP1710 THIOL-BASED SWITCHES AND REDOX-REGULATION- FROM MICROBES TO MEN", St. Feliu, Spanien 15.-20.09.2019

In Vorbereitung befindliches Manuskript: B. Hutzler, F. Barbarino, J. Hocks, N. Thomas, S. Becher, T. Suvorava, M. M. Cortese-Krott, The vascular NOS3 is the keyplayer in exercise-dependent cardioprotection

Talk

"Gene targeting approach to study the specific role of vascular endothelial nitric oxide synthase in cardiovascular effects of exercise and cardioprotection" SPP1710 THIOL-BASED SWITCHES AND REDOX-REGULATION- FROM MICROBES TO MEN", St. Feliu, Spanien 15.-20.09.2019

Abstract

Background: Moderate exercise training is a key aspect of primary and secondary prevention strategies of cardiac diseases. Clinical studies showed that regular exercise training improves cardiac function, reduces resting heart rate and blood pressure and protects against acute myocardial infarction. Basic science studies demonstrate that exercise-induced shear stress upregulates vascular endothelial NO-synthase (NOS3) and increases NO production, an important determinant of vascular tone, systemic hemodynamics and cardioprotection. NOS3 is expressed not only in endothelial cells (ECs), but also in red blood cells (RBCs). However the tissue specific role of NOS3 in exercise-induced changes of cardiac function and cardioprotection is unknown.

Aim: The aim of this study was to elucidate the role of vascular and RBC NOS3 in cardiovascular effects of moderate exercise training and cardioprotection.

Materials & Methods: Global NOS3 knockout (KO) mice, RBC NOS3 KO mice, EC NOS3 KO mice and their corresponding controls global competent for NOS3 were subjected to 4 weeks of voluntary wheel running or sedentary housing. Changes in anatomical and hematological parameters and cardiac and vascular function were assessed by blood count analysis, ektacytometry, echocardiography and measurement of flow mediated dilation (FMD). Infarct size per area at risk was determined in exercised and sedentary mice after 45 min of left descending artery ligation (LAD) and 24 h of reperfusion by TTC staining. In untrained and trained EC NOS3 KO mice NO-metabolites were measured by CLD. Thiols and nucleotide phosphates were measured by UPLC QToF.

Results: The global and EC-specific loss of NOS3 significantly decreased mean running distance in mice. Voluntary running was efficient in WT mice, control littermates and RBC NOS3 KO mice as evident by changes of anatomical parameters: bodyweight (BW), HW/BW (heartweight/BW ratio) and soleus weight to BW ratios. In contrast, exercise had little effect on HW/BW ratio in EC and global NOS3 KO mice. No FMD was found in global and EC NOS3 KO mice. Furthermore, control mice and RBC NOS3 KO mice but not global and EC NOS3 KO mice have a significantly reduced infarct size after voluntary running. No exercise-induced changes in blood count parameters and viscosity were measured in all studied strains. RBC deformability was increased in EC NOS3 and global NOS3 KO mice at baseline or after exercise, respectively. EC NOS3 KO mice showed at baseline a reduced NO-bioavailability.

That is compensated by exercise. Furthermore the depletion of vascular NOS3 leads to a decreased total GSH-pool. Finally EC NOS3 KO mice showed an increased adenosine production at baseline in the heart and an increased AMP accumulation during physical activity in plasma compared to CTRL littermates.

Conclusion: Taken together, EC NOS3 KO mice show strong limitations in exercise capacity, a lack of cardiac and vascular adaptation to exercise and a loss of exercise-induced cardioprotection against ischemia / reperfusion (I/R) injury, but not RBC NOS3 KO. Thus, the vascular NOS3 pathway is likely the key player in NOS3-dependent beneficial effects of moderate physical activity on the cardiovascular system. At the cellular level EC NOS3 KO mice showed decreased NO-metabolites, a reduced redox capacity and a limited ATP-metabolism. Nevertheless the NO-metabolites seem to be compensated by exercise. The EC NOS3 plays a major role in cardioprotective effects induced by exercise and is connected to the redox capacity and energy metabolism, allowing a target for new therapeutic strategies against cardiovascular diseases.

Zusammenfassung

Hintergrund: Moderate physische Aktivität ist der Schlüsselpunkt primärer und sekundärer Präventionsstrategien kardiologischer Erkrankungen. Klinische Studien zeigten, dass reguläres körperliches Training die kardiale Funktion verbessert, den Ruhepuls und Blutdruck senkt und protektiv gegen einen akuten Myokardinfarkt wirkt. Wissenschaftliche Studien zeigten der durch physische Aktivität induzierte Scherstress zu weiterhin. dass einer Aktivitätssteigerung der endothelialen NO-Synthase (EC NOS3) führt und damit zu einer erhöhten NO-Produktion, welche ein wichtiger Aspekt des vaskulären Tonus, der systemischen Hämodynamik und der Kardioprotektion ist. Die NOS3 ist jedoch nicht nur in den Endothelzellen exprimiert sondern u.a. auch in Erythrozyten (RBC NOS3). Die gewebespezifische Rolle der NOS3 in durch körperliches Training induzierter Kardioprotektion ist bis jetzt jedoch unbekannt.

Ziel: Das Ziel dieser Studie war es, die Rolle der EC und RBC NOS3 in adaptiven Mechanismen an physische Bewegung und die daraus resultierende Kardioprotektion zu untersuchen.

Material & Methoden: Globale NOS3 Knockout (KO) Mäuse, RBC NOS3 KO Mäuse, EC NOS3 KO Mäuse und die dazugehörigen Kontrolllinien, welche NOS3 global exprimieren, wurden 4 Wochen einem freiwilligen Laufradtraining bzw. einer sesshaften Haltung unterzogen. Veränderungen der anatomischen und hämatologischen Parameter wurden mittels Blutbildanalyse, Ektazytometrie, Echokardiographie und Messung der Fluss-mediierten Vasodilatation (FMD) ermittelt. Die Infarktgröße des Risikoareals wurde nach einer 45 min. Ligatur der proximalen linken Koronararterie und 24 h Reperfusion mittels TTC-Färbung analysiert. NO-Metabolite der trainierten und untrainierten EC NOS3 KO Mäuse wurden mittels CLD, Thiole und Nukleotidphosphate mittels UPLC-QToF gemessen.

Ergebnisse: Die globale und endotheliale Depletion der NOS3 reduzierte signifikant die Laufdistanz der Mäuse. Das Trainingsprotokoll führte in den global kompetenten NOS3 Kontrollmäusen, sowie in den RBC NOS3 Mäusen zu Veränderungen in den anatomischen Parametern (reduziertes Körpergewicht, erhöhtes Herz-/Körpergewicht-Verhältnis und ein erhöhtes Muskel- Körpergewicht-Verhältnis). In den EC NOS3 KO und in den globalen NOS3 KO Mäusen ist keine FMD vorhanden. Weiterhin zeigten die Kontrollmäuse sowie die RBC NOS3 KO Mäuse eine signifikant reduzierte Infarktgröße nach dem freiwilligen Laufrad-

Training, jedoch nicht die EC NOS3 KO und globalen NOS3 KO Mäuse. Das Blutbild und die Viskosität blieben nach dem Training unverändert. Globale und EC NOS3 KO Mäuse zeigten eine erhöhte RBC-Flexibilität nach physischer Aktivität bzw. auf dem Basallevel. EC NOS3 KO Mäuse zeigten weiterhin im untrainierten Zustand eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit, welche jedoch durch physische Aktivität kompensiert wird. Zusätzlich führte die Depletion der EC NOS3 zu einem verminderten totalen GSH-Pool. Ebenfalls zeigten untrainierte EC NOS3 KO Mäuse eine erhöhte Adenosinkonzentration im Herzen gegenüber untrainierten CTRL und eine erhöhte AMP-Akkumulation in trainierten Mäusen im Plasma.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung: Die EC NOS3 KO Mäuse zeigten starke Limitierungen in der Leistungskapazität, den kardialen und vaskulären Adaptionen sowie der Trainings-induzierten Kardioprotektion, jedoch nicht die RBC NOS3 KO Mäuse. Folglich ist der vaskuläre NOS3 Signalweg die Schlüsselrolle in den NOS3-abhängigen vorteilhaften Effekten moderater physischer Aktivität auf das kardiovaskuläre System. Mögliche Ursachen für die Leistungslimitierung aufgrund der NOS3 Depletion in EC sind hierfür eine reduzierte Redoxkapazität und ein verminderter ATP-Metabolismus. Der verminderte NO-Pool stieg nach dem Training, welches auf eine Kompensation durch noch unbekannte Mechanismen hindeutet. Insgesamt zeigen die Daten, dass die vaskuläre NOS3 eine Hauptrolle in der durch Training induzierten Kardioprotektion spielt. Die EC NOS3 steht ebenfalls im Zusammenhang mit der Redox-Kapazität und dem Energiemetabolismus und bietet somit neue Ansätze für Therapien kardiovaskulär Erkrankter.

Inhaltsverzeichnis

1 Einlei	itung	1
1.1 He	erz-Kreislauf-Erkrankungen und physische Aktivität	1
1.2 Pr	otektive Effekte physischer Aktivität auf das kardiovaskuläre System	2
1.2.1	Kardiale Adaptionsmechanismen	2
1.2.2	Vaskuläre Adaptation an physische Aktivität	3
1.2.3	Die endotheliale NO-Synthase	3
1.2.4	Murine NOS3 KO –Linien	6
1.2.5	Der NO-Metabolismus	6
1.3 De	er Energiestoffwechsel im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität	7
1.1 De	er Myokardinfarkt	8
1.1.1	Experimentelle Ansätze zur Untersuchung von I/R-Verletzungen	11
1.2 Ox	xidativer Stress, physische Bewegung und das Redox-System	11
1.3 Di	ie Rolle der NOS3 in der Trainings-induzierten Kardioprotektion	13
1.3.1	Trainings-Protokolle	13
1.3.2	Untersuchungen zur Rolle der NOS3 in der Kardioprotektion	14
1.4 Zie	elstellung	15
2 Mater	rial und Methoden	.18
2.1 Ma	aterial	18
2.1.1	Stocklösungen und Puffer	18
2.1.2	Mauslinien	18
2.2 M	lethoden	19
2.2.1	Versuchsprotokolle körperliches Training	19
2.2.2	Hämatologische Untersuchungen	21
2.2.3	Anatomische Analysen	22
2.2.4	Kardiologische Analysen	22
2.2.5	Vaskuläre Analysen	25

	2.2.6	Messung der NO-Metabolite, Thiole und Nukleotidphosphate	26
	2.2.7	Statistische Auswertung der Ergebnisse	30
3	Ergeb	nisse	32
	3.1 Au	swahl des Trainings-Protokolls	32
	3.2 Die	e Rolle der gewebespezifischen NOS3 in der Adaptation an physische Aktivität	33
	3.2.1 geweb	Laufkapazität und anatomische Adaptation an physische Aktivität respezifischen NOS3 KO Mäuse	der 34
	3.2.2	Hämatologische Adaptation	37
	3.2.3	Vaskuläre Adaptation	44
	3.2.4	Kardiale Adaptation	45
	3.3 Die vermittel	e Rolle der gewebespezifischen NOS3 in der durch körperliches Trair Iten Kardioprotektion	1111 1111 1111 1111 1111 1111 1111 111
	3.3.1	Myokardinfarkt	47
	3.3.2	Kardiale Parameter post I/R	50
	3.3.3	Hämatologische Parameter post I/R	52
	3.4 Zu	sammenfassung der bisherigen Ergebnisse	58
	3.5 Die KO Mäu	e systemischen NO-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NO	DS3 58
	3.6 Th 60	iol-Metabolismus der trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mä	iuse
	3.7 Nu NOS3 K	kleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelia O Mäusen	alen 64
4	Disku	ssion	70
	4.1 Be	reits freiwillige physische Aktivität führt zu kardioprotektiven Effekten	71
	4.2 Die Adaptati	e Expression der vaskulären NOS3 ist ausschlaggebend für die Leistung on an physische Aktivität	und 72
	4.3 Die Kardiopr	e RBC NOS3 hat keinen Einfluss auf die durch physische Aktivität induzi rotektion, vielmehr ist die vaskuläre NOS3 der Keyplayer	erte 77

4	.4 NC	D-Metabolite, Redoxmechanismen, Antioxidanssysteme und physische Aktivität in	m
Z	lusamm	enhang mit der endothelialen NOS38	1
	4.4.1	Physische Aktivität kompensiert den erniedrigten NO-Pool in EC NOS3 Ko	0
	Mäuse	en	1
	4.4.2	Das Fehlen der vaskulären NOS3 führt zu einem reduzierten GSH-Pool im Plasm	ıa
	und zu	a einer verminderten Redoxkapazität während physischer Aktivität	2
	4.4.3	Eine Depletion der EC NOS3 führt zu einer limitierten Adenosin-Produktion in	m
	Herzei	n während physischer Aktivität, sowie zu einer Akkumulation von AMP im Plasma	a.
		85	
	4.4.4	Limitierungen der vorliegenden Arbeit	7
	4.4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	8
5	Literat	turverzeichnis	I
6	Danks	agung104	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 NO-aktiviernde Signalwege in Endothelzellen		
Abbildung 2 Abbau und Salvage-Pathway der A-Nukleotide (ATP, ADP, AMP)		
Abbildung 3 Schematische Darstellung molekularer Vorgänge in I/R-Verletzungen		
Abbildung 4 De novo Synthese und Recycling-Pathway des Gluthations (GSH)		
Abbildung 5 Graphische Darstellung der Zielsetzungen dieser Arbeit		
Abbildung 6 Experimentelles Setup der Mäuse der jeweiligen Trainings- und Kontrollgruppen		
Abbildung 7 Schematische Darstellung der CLD		
Abbildung 8 Area at Risk des linken Ventrikels und die Infarktgröße pro AAR in der		
Gruppenhaltung (A, B) freiwillig trainierten (C, D) und gezwungen trainierten (E, F) WT.		
Abbildung 9 Zurückgelegte Laufstrecke der gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und den		
jeweiligen Kontrolllinien		
Abbildung 10 Delta Körpergewicht (A), das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht		
(B), das Muskelgewicht (C) und das Verhältnis von Muskelgewicht zu Körpergewicht (D)		
der trainierten und untrainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der		
Kontrolllinien		
Abbildung 11 Vollblutviskosität der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3		
KO Mäuse sowie der Kontrolllinien40		
Abbildung 12 Maximaler Elongationsindex (EImax) und Scherstress der notwendig ist, um die		
Hälfte des EI_{max} zu erreichen (SS _{1/2}) der untrainierten und trainierten gewebespezifischen		
NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien		
Abbildung 13 FMD der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und		
der Kontrolllinien		
Abbildung 14 Area at Risk des linken Ventrikels und die Infarktgröße pro AAR in trainierten		
und untrainierten WT (A, C) und globalen NOS3 KO Mäusen (B, D)48		
Abbildung 15 Area at Risk des linken Ventrikels und Infarktgröße pro AAR in trainierten und		
untrainierten EC NOS3 KO (A, C) und der EC NOS3 WT Kontrollinie (B, D)49		
Abbildung 16 Area at Risk des linken Ventrikels und Infarktgröße pro AAR in trainierten und		
untrainierten RBC NOS3 KO (A, C) und der loxP NOS3 Kontrollinie (B, D)50		

Abbildung 17 Maximaler Elongationsindex (EImax) und Scherstress der notwendig ist, um die		
Hälfte des EI_{max} zu erreichen (SS _{1/2}) der untrainierten und trainierten gewebespezifischen		
NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien		
Abbildung 18 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO		
Mäusen und den Kontrollen63		
Abbildung 19 Konzentration von cGMP im Plasma (A) und in der Aorta (B) sowie Adenosin-		
(C) und Xanthin-Konzentration (D) im Herzen und die Plasma-AMP-Konzentration (E) in		
trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen sowie deren Kontrollen 69		
Abbildung 20 Western Blot des Aorta-Gewebes zum Nachweis der NOS379		
Abbildung 21 Graphische Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse dieser Arbeit88		

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Körper-, Herz- und Muskelgewicht, sowie das auf das Körpergewicht bezogene
Verhältnis der trainierten und untrainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der
Kontrolllinien
Tabelle 2 Blutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse
sowie der Kontrolllinien
Tabelle 3 Differentialblutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO
Mäuse und der Kontrolllinien
Tabelle 4 Erythrozytäre Verformbarkeit der untrainierten und trainierten gewebespezifischen
NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien unter verschiedenen Schergeschwindigkeiten
Tabelle 5 Kardiale Parameter der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO
Mäuse und der Kontrolllinien
Tabelle 6 Kardiale Parameter der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO
Mäuse und der Kontrolllinien 24 h nach dem MI
Tabelle 7 Blutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und
der Kontrolllinien 24 h post I/R
Tabelle 8 Differentialblutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO
Mäuse und der Kontrolllinien 24 h post I/R
Tabelle 9 Erythrozytäre Verformbarkeit der untrainierten und trainierten gewebespezifischen
NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien post I/R unter verschiedenen
Schergeschwindigkeiten
Tabelle 10 NO-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen und
der Kontrolllinie 59
Tabelle 11 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen
61
Tabelle 12 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen
fuberie 12 Tillot Wetabolite in trainerten und untrainerten endotnenaten (1055 KO Wadsen.
Tabelle 13 Nukleotidnhosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelialen
NOS3 KO Mäusen 66
Tabelle 14 Nukleotidnhosnbate und Nukleoside in trainierten und untrainierten andothalialen
NOS2 KO Mäuson
1000 IVI IVI IVI IVI IVI IVI IVI IVI IVI

Tabelle 15 Nukleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endot	thelialen
NOS3 KO Mäusen.	68

Abkürzungsverzeichnis

AAR	Risiko-Areal
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	B-natriuretisches Peptid
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAT-1	kationischer Aminosäuretransporter
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHIP	C-terminal Hsp70-interagierendes Protein
CTRL	Kontrolle
Cys	Cystein
CytB5R3	Cytochrome b 5 Reduktase 3
EC	Endothelzellen
EDV	enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	endsystolisches Volumen
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMD	Fluss-mediierte Vasodilatation
FND	Flavin-Mononukleotid
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Herzrate
HSP	Hitzeschockprotein
HW	Herzgewicht
HZV	Herzzeitvolumen
I/R	Ischämie/Reperfusion
IMP	Inosinmonophosphat

INF	Infarkt
КО	Depletion eines Gens
KW	Körpergewicht
LAD	linksabsteigende Koronararterie
LoxP	mit LoxP-Sequenz flankiertes Gen
LV	linker Ventrikel
MEJ	myoendotheliale Einstülpungen
MI	Myokardinfarkt
MPTP	mitochondriale Permiabilitäts-Transitions-Pore
MW	M.soleus-Gewicht
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleinimid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS3	endotheliale NO-Synthase NOS3 (eNOS)
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
РУК2	Prolin-reiche Tyrosin- Kinase 2
RBC	Erythrozyten
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SMC	glatte Muskulatur
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
TAM	Tamoxifen
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
UPLC-QToF	Ultrapressure liquid chromatography- Quadrupol time of flight
WT	Wildtyp
XO	Xanthin-Oxidase

1 Einleitung

1.1 Herz-Kreislauf-Erkrankungen und physische Aktivität

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind mit 37 % noch vor Krebs (27 %) die häufigste Todesursache in Deutschland (*Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland*, 2015). Hierbei stehen an erster Stelle die chronisch ischämische Herzkrankheit mit rund 77.000 Erkrankten sowie der akute Myokardinfarkt mit rund 47.000 Erkrankungen deutschlandweit (*Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen - Statistisches Bundesamt*, 2017).

Physische Aktivität und die daraus resultierende körperliche Fitness stehen im starken Zusammenhang mit einer niedrigeren Prävalenz chronischer Krankheiten wie Diabetes, Bluthochdruck oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Rivera-Brown and Frontera, 2012).

Die Überlebensrate kardiovaskulär Erkrankter steigt ebenfalls bei physisch aktiven Menschen im Vergleich zu inaktiven Individuen (Blair *et al.*, 1989; Kodama *et al.*, 2009; Wei, Liu and Rosenzweig, 2015; Chomistek *et al.*, 2016). Die Vorteile physischer Aktivität auf das Herz und den gesamten Organismus wurden bereits ausführlich untersucht und anerkannt (Pedersen and Saltin, 2006). Körperliches Training hat einen direkten positiven Einfluss auf zahlreiche Zellarten im Herzen aber auch im vaskulären System, Skelettmuskel und Fettgewebe, welche sekundäre Effekte auf das Herz haben (Adams, Doring and Schuler, 2008; Haram, Kemi and Wisloff, 2008; Kemi and Wisløff, 2010; Bernardo *et al.*, 2017).

Insbesondere der Myokardinfarkt, eine Obstruktion bzw. auch Okklusion der Koronararterien, ist ein lebensbedrohliches akutes Ereignis, dem physische Aktivität sowohl präventiv als auch kurativ entgegenwirken kann.

Im heutigen Zeitalter der Industrialisierung geht der Trend immer mehr in Richtung physischer Inaktivität (Hallal *et al.*, 2012). Gerade aus diesem Grund ist es wichtig, die Mechanismen der durch Sport induzierten Kardioprotektion genauestens zu analysieren und mögliche therapeutische Strategien zu entwickeln, welche gezielt die pathophysiologischen Vorgänge in kardiovaskulären Erkrankungen bekämpfen.

1.2 Protektive Effekte physischer Aktivität auf das kardiovaskuläre System

1.2.1 Kardiale Adaptionsmechanismen

Während körperlicher Aktivität steigt der Sauerstoffverbrauch in den Muskeln an. Um dem Sauerstoffbedarf gerecht zu werden, werden durch die Aktivierung des sympathetischen Nervensystems Katecholamine und Norepinephrine ausgeschüttet, die wiederum für eine Erhöhung des Herzschlages und der myokardialen Kontraktilität sorgen und damit für ein erhöhtes Schlagvolumen und kardiales Output (Bernardo et al., 2017). Der Blutfluss zum Herzen und den beanspruchten Skelettmuskeln wird durch lokale Vasodilatatoren wie NO erhöht, während der Blutfluss in der Peripherie gesenkt wird, um den Blutdruck konstant zu halten. Alles zusammen führt zu einem ansteigenden Blutfluss zurück ins Herz. Dies wiederum führt zu einer verstärkten Dehnung der kardialen Wand und damit zu einer Zunahme der Kontraktionsstärke (Frank-Starling Mechanismus). Chronische physische Aktivität führt zu einer Zunahme der Wanddicke und der Größe des Herzens, auch bekannt als physiologische kardiale Hypertrophie (erhöhte Herzmasse, normale/verbesserte Herzfunktion und keine fibrotischen Veränderungen). Die pathologische Hypertrophie hingegen zeichnet sich aus durch eine verminderte Herzfunktion, Fibrose, Zelltod und vermehrter Expression von kardialen Stressmarkern wie das atriale natriuretische Peptid (ANP) und das B-natriuretische Peptid (BNP) (Bernardo et al., 2010).

Ein weiterer Anpassungsmechanismus gegenüber sportlicher Aktivität findet auf der zellulären Ebene statt. Mitochondrien spielen eine wichtige Rolle in der Energiebereitstellung (Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion), Redox-Kontrolle, Kalzium-Homöostase, Ionen-Gradienten und dem Überleben der Zelle (Bernardo *et al.*, 2017). Während physischer Aktivität steigt der Energieverbrauch des Herzens dramatisch an, mehr Sauerstoff wird verbraucht und mehr mitochondriales ATP produziert und verbraucht. Circa 23% der Volumendichte im humanen Herzen nehmen Mitochondrien ein (Schaper, Meiser and Stammler, 1985). Die mitochondriale Größe und Anzahl wird hierbei reguliert durch Fusions- oder Teilungsprozesse der Organellen. Dies konnte auch in einer Studie gezeigt werden, aerobes Intervalltraining führt zu einer erhöhten Teilungsrate der Mitochondrien und zeitgleich zu einer Absenkung der mitochondrialen Dysfunktion während eines Myokardinfarktes (Jiang *et al.*, 2014). Weiterhin kann chronische physische Aktivität mit einer erhöhten Fettsäure- und Glukose-Oxidation

assoziiert werden (Ventura-Clapier, Mettauer and Bigard, 2007), welche bei kardialem Stress als protektiver metabolischer Phänotyp angesehen wird (Bernardo *et al.*, 2017).

1.2.2 Vaskuläre Adaptation an physische Aktivität

Physische Aktivität führt zu einem erhöhten Scherstress in den Blutgefäßen, welcher bei regulären Wiederholungen zu antiartherogenen Anpassungen der Vaskulatur, sowohl strukturell als auch funktional, führt (Fiuza-Luces et al., 2018). Bei Sportlern konnte beobachtet werden, dass die Durchmesser der Koronararterien und auch die Dilatationskapazität zunahmen (Haskell et al., 1993). Generell weisen die peripheren Arterien einen größeren luminalen Durchmesser in Sportlern auf verglichen zu inaktiven Menschen (Green et al., 2017). Die Ausbildung von koronaren Kollateralarterien ist ebenfalls eine strukturelle Anpassung der Gefäße an aerobes Training, welche die Infarktgröße des Herzens limitieren können (Heaps et al., 2014). Weiterhin konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden, dass körperliches Training die vaskuläre Funktion in einer Dosis-abhängigen Weise verbessert (Ashor et al., 2015). Hierbei ist die vaskuläre Funktion hauptsächlich über die Endotheliumabhängige Vasodilatation definiert. Der erhöhte Scherstress führt zu einer erhöhten Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Expressions- und Aktivitäts-Steigerung der endothelialen NO-Synthase (NOS3) (Erkens et al., 2016). Körperliches Training führt zu einer erhöhten NOS3 Expression in den Gefäßen und im Herzen (Suvorava, Lauer and Kojda, 2004), welche zum Einen während eines Myokardinfarktes eine bessere Durchblutung aufgrund der vasodilatativen Funktion bewirkt und zum Anderen vor ROS (reaktive Sauerstoffspezies) schützt und somit die Folgeschäden reduziert. Selbst nach einem Myokardinfarkt bewirkt physische Aktivität eine Verbesserung der kardialen und vaskulären Funktion. Dieser Prozess ist NOS3 abhängig (de Waard et al., 2010).

1.2.3 Die endotheliale NO-Synthase

Es gibt 3 Isotypen von NO-Synthasen, die nNOS (neuronale NO-Synthase, NOS1), die iNOS (induzierbare NO-Synthase, NOS2) und die eNOS (endotheliale NO-Synthase, NOS3). Die NOS2 wird durch inflammatorische Prozesse induziert, während die NOS3 in den Endothelzellen und die NOS1 in den Skelettmuskeln oder in neuronalen Zellen konstitutiv exprimiert wird (Förstermann and Sessa, 2012). Die NO-Synthasen katalysieren hierbei die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO mit Hilfe der Kofaktoren und Substrate

Sauerstoff (O₂), Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) (Förstermann and Sessa, 2012)(Gleichung 1).

Gleichung (1): 2 L-Arginin + 3 NADPH + 4 O2 \rightarrow 2-L-Citrullin+3 NADP + 4 H₂O+ 2 NO

Das in den Endothelzellen produzierte NO diffundiert in die umliegenden glatten Muskelzellen (SMC) und aktiviert dort den cGMP-Signalweg, welcher zur Vasodilatation der Blutgefäße führt (**Abbildung 1**). Hierbei bindet NO an eine Häm-Gruppe der löslichen Guanylatzyklase (sGC), welche die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) katalysiert. Steigende Level der cGMP-Konzentration führen zu einer Aktivierung der Proteinkinase G (PKG), welches wiederum zu einer Absenkung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration führt und zur Muskelrelaxation der SMC (Breitenstein *et al.*, 2017).

Die Regulation der enzymatischen Aktivität der vaskulären NOS3 erfolgt insbesondere durch mechanische Stimuli, wie Scherstress oder Gefäßwandausdehnungen. Unterschiedlichste Signaltransduktionswege in Mikrodomänen, ausgelöst durch die Glykokalix, Ionenkanäle, Substrat-Kanäle für L-Arginin, das Zytoskelett oder auch in den interendothelialen Verbindungskomplexen, führen letztendlich zu einer Aktivierung der NOS3 (Abbildung 1). Eine ausführliche Beschreibung der Signaltransduktionswege wurde vor kurzem in *Nitric Oxide* von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Leo, Hutzler *et al.*, 2020).

Eine aktive Form der NOS3 konnte nicht nur in den Endothelzellen nachgewiesen werden, sondern auch in Erythrozyten (Kleinbongard *et al.*, 2006; Cortese-Krott *et al.*, 2012) und Kardiomyozyten (Balligand *et al.*, 1993). Experimente mit Maus-Chimära, welche keine NOS3 in Blutzellen exprimierten, zeigten beispielsweise eine signifikant vergrößerte Infarktgröße (Merx *et al.*, 2014) und einen Einfluss der RBC NOS3 auf den Blutdruck (Wood *et al.*, 2013). Des Weiteren zeigte Suhr et al, dass physische Aktivität auch einen Einfluss auf die RBC NOS3 Aktivität haben kann (Suhr *et al.*, 2012). Elrod *et al.* zeigte, dass eine Überexpression der NOS3 in Kardiomyozyten ebenfalls protektiv gegen Ischämie-/Reperfusionsverletzungen (I/R) wirkt (2006).

Die Rolle der NOS3 in den einzelnen Kompartimenten im Zusammenhang mit der durch physische Aktivität induzierten Kardioprotektion wurde jedoch bis jetzt noch nicht analysiert.



Abbildung 1 NO-aktivierende Signalwege in Endothelzellen. NO vermittelte Signalmikrodomänen befinden sich sowohl auf der luminalen Seite der EC, als auch in den interendothelialen Verbindungen und den myoendothelialen Einstülpungen. Mechanische Kräfte oder auch Rezeptor-aktivierende Substrate führen zur Aktivierung der NOS3. Die NOS3 wird downstream durch extrazelluläre Signale, Aktivierung von Membran-Kanälen oder durch Scherstress aktiviert, welche letztendlich entweder die intrazelluläre Ca2+-Konzentration erhöhen, die NOS3-Phosphorylierung verändern oder mehr Substrat zur Verfügung stellen. Auf der luminalen Oberfläche der EC führen durch Scherstress aktivierte Ionen-Kanäle, die Glykokalix, GPCR und Cav-1 zu einem Ca²⁺-Influx, welcher die NOS3 via des CAM-Signalweges aktiviert. Die direkte Verbindung von Cav-1 zu NOS3 führt zur Inhibition des Enzyms. Hitzeschockproteine sind direkte Bindungspartner der NOS3 und steigern (HSP90) oder senken (HSP70) die Aktivität. Integrine binden an Kollagen oder Laminin und aktivieren die NOS3 über den PI3-Akt-Kinase Signalweg. Weiterhin beeinflusst der Polymerisationsstatus der Aktin-Filamente die NOS3 Aktivität. Zwischen den EC sind Verbindungskomplexe, welche die NOS3 via des PYK-2 oder PI3-Akt-Kinase Signalweges regulieren. In Widerstandsgefäßen sind MEJ (myoendotheliale Einstülpungen) eine heterozelluläre Kommunikationsmikrodomäne zwischen den EC und den SMC. In den MEJ formt Hämoglobin α einen Komplex mit der NOS3 und der Reduktase CytB5R3. Die Diffusion des in den MEJ produzierten NO ist hierbei streng von dem Redoxstatus des Hämoglobin a abhängig. Im oxidierten Zustand kann NO in die SMC diffundieren. Im reduzierten Zustand (durch CytB5R3) hingegen bindet das Fe²⁺ NO und fängt es ein. CAT-1 ist ein Scherstress-sensitiver Aminosäure-Transporter, welcher den L-Arg-Influx erhöhen kann. GPCR: G-Protein gekoppelte Rezeptoren, PKA: Proteinkinase A, PKB: Proteinkinase B, CaM:Calmodulin, PYK2: Prolin-reiche Tyrosin- Kinase 2, HSP: Hitzeschockprotein, CHIP: C-terminal Hsp70-interagierendes Protein, CAT-1: kationischer Aminosäuretransporter, CytB5R3: Cytochrom b 5 Reduktase 3, MEJ: Myoendotheliale Einstülpungen, NO: Stickstoffmonoxid. Grafik adaptiert aus (Leo, Hutzler et al., 2020).

1.2.4 Murine NOS3 KO – Linien

Um NOS3-abhängige Funktionen zu analysieren, wurden bereits verschiedene KO-Mauslinien entwickelt. Die bekanntesten globalen KO Linien sind von Huang (Huang *et al.*, 1995), Sheasley (Shesely *et al.*, 1996), und Gödecke (Gödecke *et al.*, 1998). Allerdings zeigen die Mauslinien unterschiedliche phänotypische Eigenschaften und unterscheiden sich z.B. in den Reaktionen auf I/R-Verletzungen.

Neben den globalen NOS3 KO Mäusen, fanden auch erste Ansätze zur Untersuchung der RBC spezifischen NOS3 mit Maus-Chimära statt, welche generiert wurden durch eine Knochenmarkstransplantation von globalen NOS3 KO in bestrahlte WT. (Wood *et al.*, 2013; Merx *et al.*, 2014).

1.2.5 Der NO-Metabolismus

NO hat einen bedeutenden Einfluss auf die Sauerstoff-Verteilung und den Sauerstoffverbrauch im Organismus. Es reguliert den Gefäßtonus und damit den Blutfluss und es kontrolliert den mitochondrialen O₂-Verbauch durch die Inhibition der Cytochrom C Oxidase. Eine dysfunktionale NO-Produktion wurde oft in Zusammenhang gebracht mit kardiovaskulären Erkrankungen, wie Bluthochdruck oder Arteriosklerose (Chen, Pittman and Popel, 2008).

Endogenes NO kann sowohl von enzymatischen Quellen, wie der NO-Synthase, aber auch von nicht enzymatischen Quellen (meist unter hypoxischen Bedingungen) produziert werden.

Das von der NO-Synthase produzierte NO kann durch die Oxidation zu Nitrit oder Nitrat im Blut oder Gewebe gespeichert werden und unter bestimmten physiologischen Bedingungen wieder zu NO reduziert werden (Lundberg, Weitzberg and Gladwin, 2008). Hierbei können u.A. Hämoglobin (Cosby *et al.*, 2003), Myoglobin (Shiva *et al.*, 2007) oder die Xanthin-Oxidoreduktase (Godber *et al.*, 2000) das endogene oder exogen durch die Nahrung zugeführte Nitrit zu NO reduzieren. Die Rückgewinnung des Stickstoffmonoxids ist verstärkt unter hypoxischen oder azidösen Bedingungen, wie z.B. während körperlicher Bewegung oder in Folge eines Myokardinfarktes (Lundberg, Weitzberg and Gladwin, 2008).

Des Weiteren kann NO mit GSH zu S-Nitrosoglutathion reagieren, welches als endogene NO-Reserve angesehen wird und zellulären Stress, ausgelöst durch Nitroso-Radikale, reguliert (Foster, Hess and Stamler, 2009). NO schützt ebenfalls Thiolgruppen reaktiver Cysteine an Proteinen vor oxidativem Stress (Baldelli *et al.*, 2019). Die Nitrosylierung der Thiolgruppen ist reversibel und kann wieder zu SH-Gruppen durch thiolabhängige Reaktionen konvertiert werden (Foster, Hess and Stamler, 2009).

1.3 Der Energiestoffwechsel im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität

Purine, wie Adenin und Guanin, bilden zusammen mit Pyrimidinen die Grundbausteine des genetischen Erbgutes und sind ein wichtiger Bestandteil von Coenzymen, vor allem des Energiestoffwechsels (Gröbner, 2001).

Während physischer Bewegung steigt der Energiebedarf in Form von ATP des Muskels um ein Vielfaches. Die ATP-Versorgung des Skelett- und Herzmuskels ist essentiell für die Kontraktion. Die frei gesetzte Energie der ATP-Hydrolyse wird für die zyklische Interaktion zwischen Aktin und Myosin verwendet (Eisenberg and Hill, 1979). Die Abbauprodukte der ATP-Hydrolyse (Adenosindiphosphat (ADP), Adenosinmonophosphat (AMP), Xanthin, Hypoxanthin und Harnsäure) akkumulieren während sportlicher Aktivität im interstitiellen Bereich des Muskels (Mo and Ballard, 2001) oder werden in die Blutbahn ausgeschieden, wenn die Kapazität der Rephosphorylierung ausgelastet ist (Sahlin and Broberg, 1990). Die Akkumulation von ADP und AMP führt zu einer Aktivierung des Purin-Metabolismus (Sahlin and Broberg, 1990). Im Purinstoffwechsel wird der durch physische Aktivität degradierte Adenin-Nukleotid-Pool (ATP, ADP, AMP) wiederhergestellt (Abbildung 2). Das akkumulierte AMP kann entweder zu IMP (Inosinmonophosphat) deaminiert werden oder zu Adenosin dephosphoryliert werden, wobei im Herz überwiegend die Dephosphorylierung zu Adenosin und im Skelettmuskel überwiegend die Deaminierung zu IMP stattfindet unter der Bildung von Ammoniak (Rubio, Berne and Dobson, 1973). Das IMP wird weiter verstoffwechselt zu Inosin, Hypoxanthin, Xanthin bis hin zur Harnsäure, welche über den Urin ausgeschieden werden kann. Dieser Entsorgungsweg spielt jedoch nicht die Hauptrolle im Skelettmuskel, sondern der Salvage-Pathway von Hypoxanthin zu IMP bis hin zu AMP (Sahlin and Broberg, 1990).



Abbildung 2 Abbau und Salvage-Pathway der A-Nukleotide (ATP, ADP, AMP). Die Kontraktion der Muskeln ist ATP-abhängig. Das daraus resultierende ADP wird mittels der oxidativen Phosphorylierung wieder zu ATP konvertiert. Ist die Kapazität der Rephosphorylierung überschritten, akkumuliert ADP und AMP in der Zelle, welches wiederum den Purin-Syntheseweg aktiviert. Hierbei kann ADP entweder zu Harnsäure abgebaut und ausgeschieden werden oder aber über den Recycle-Weg wieder zu ATP transformiert werden. ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, AMP, Adenosinmonophosphat, IMP: Inosinmonophosphat, NH₃: Ammoniak. Grafik modifiziert nach (Johnson, Jinnah and Kamatani, 2019).

1.1 Der Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt (MI) kann unterschiedlichen physiologischen Mechanismen zu Grunde liegen. Hauptursachen sind jedoch arteriosklerotisch bedingte Verengungen der Herzkranzgefäße, welche zur Okklusion führen können (Thygesen *et al.*, 2018). Der pathologische Verlauf des MI ist hierbei in 2 Phasen unterteilt; der Ischämie- und der Reperfusionsphase (I/R) (**Abbildung 3**).



Abbildung 3 Schematische Darstellung molekularer Vorgänge in I/R-Verletzungen. Während eines akuten Herzinfarktes kommt es aufgrund des Mangels an der Blut- und damit Sauerstoffversorgung zur Hypoxie. Die Zellen wechseln von der aeroben zur anaeroben Energiegewinnung. Dabei kommt es zur Anhäufung von Laktat in den Zellen, welches zu einem Absinken des pH's führt. Um den pH-Wert wiederherzustellen, werden die Na $^+$ /H $^+$ -ATPase Pumpen aktiviert, was wiederum zu einer Akkumulation von Na⁺ führt. Um die Natrium-Ionen auszuschleusen werden im Gegenzug die 2Na⁺/Ca²⁺Pumpen aktiviert, welches zu einem Calcium-Überschuss in den Zellen führt. Na⁺/K⁺ATPasen sind funktionsunfähig während der Ischämie. Die azidösen Bedingungen in der Zelle inhibieren das Öffnen der MPTP und die Hyperkontraktion der Kardiomyozyten. In der Reperfusionsphase werden die Zellen reoxygeniert, die Elektronentransportkette der Mitochondrien arbeitet wieder und produziert ROS. Weitere ROS-Ouellen sind die Xanthin-Oxidase (XO), NADPH-Oxidase (NOX), sowie die NO-Synthase (NOS). Die starke Akkumulation von ROS führt zum Öffnen der MPTP, zur Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), sowie zur Chemotaxis von Neutrophilen. Das dysfunktionale SR führt zu einer weiter erhöhten Ca²⁺-Konzentration. Dies führt zu einer Hyperkontraktion der Zellen sowie zur Aufhebung des inhibitorischen Effektes der MPTP-Öffnung. Des Weiteren wird der physiologische pH der Zelle durch die Na⁺ /H⁺-ATPase Pumpen wieder hergestellt, welches ebenfalls zur Öffnung der MPTP führen kann. Die Akkumulation von ROS kann zu Lipidperoxidationen, Proteinoxidationen, DNA-Schäden und final zum Zelltod führen. Neutrophile, welche zu einem späteren Zeitpunkt in das Gewebe migrieren, setzen proteolytische Enzyme frei. Modifiziert nach (Hausenloy and Yellon, 2013)

Zu Beginn der Gefäßokklusion kommt es zu einer Hypoperfusion bzw. zu einem kompletten Stillstand des Blutflusses. Die betroffenen Bereiche können nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden und beginnen ischämisch (mangelhaft durchblutet) zu werden. Aufgrund der auftretenden Hypoxie (Minderversorgung des Gewebes mit O₂) wird die Elektronentransportkette der Mitochondrien beeinträchtigt und wechselt zu anaerober Respiration, es wird weniger ATP produziert (Lesnefsky *et al.*, 2001). Zeitgleich kommt es zu einer Akkumulation von Laktat, da weniger Pyruvat oxidiert wird und somit zu einer metabolischen Azidose der Zelle (Wu *et al.*, 2018). Des Weiteren führt der Mangel an ATP zu einer Fehlfunktion der Ionen-Transport-Kanäle (Na⁺ /K⁺-ATPase Pumpen und Ca²⁺-ATPase Pumpen) (Hilgemann, 1997), welche wiederum zu einer erhöhten Akkumulation von Wasserstoff, Kalzium und Natrium führt. Die Zelle geht in einen hyperosmolaren Status über, Wasser dringt in das Zytoplasma und führt zu einem Anschwellen der Zelle (Wu *et al.*, 2018). Die Akkumulation des Laktates sowie des Wasserstoffs im Zytoplasma der Zellen führt zu einem pH-Abfall, welcher wiederum zur Inaktivierung von Enzymen, Inhibition der Kontraktion von Myofibrillen und Prävention des Öffnens der MPTP (mitochondrial permeability transition pore) führt (Hausenloy and Yellon, 2013). Eine Öffnung der MPTP hat das Anschwellen der Mitochondrien bis hin zum Reißen der Membran zur Folge, welches zum nekrotischen Zelltod führen kann (Kwong and Molkentin, 2015).

Um größere Ischämieverletzungen des Herzens zu vermeiden, besteht die primäre Therapie in einer Wiederherstellung des Blutflusses, bzw. dem Entfernen des Thrombus durch thrombolytische Therapien oder perkutanen Koronarinterventionen, wie z.B. die Nutzung eines Katheters zur Erweitung des Gefäßes und eine anschließende Stent-Einsetzung zur permanenten Stabilität (Hausenloy and Yellon, 2013). Während dieser Intervention beginnt die 2. Phase des MI, die Reperfusion. In der Reperfusionsphase ist der Blutfluss wieder hergestellt und die Zellen werden mit Sauerstoff versorgt. Die Elektronentransportkette der Mitochondrien wird reaktiviert und produziert reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Neben der mitochondrialen Atmungskette produzieren ebenfalls die Xanthin-Oxidase, NADPH-Oxidase und die ungekoppelte NOS3, ROS (Wu et al., 2018). ROS verursachen oxidativen Stress, welcher zur endothelialen Dysfunktion, DNA-Schäden und Entzündungsreaktionen führen kann bis hin zum Zelltod. Aufgrund der Akkumulation von ROS in der Zelle kommt es zum Öffnen der MPTP, zur Anlockung von Neutrophilen und zur Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) (Hausenloy and Yellon, 2013). Dies wiederum trägt zu einer weiteren Kalziumanhäufung Zellmembranschädigung bei. zur durch Lipidperoxidation, Enzymdenaturierung und DNA-Schäden, bis hin zum Zelltod. In der Reperfusionsphase wird die Funktion der Ionen-Transport-Kanäle wieder hergestellt, das angehäufte Laktat wird ausgeschleust und der natürliche pH-Wert der Zelle wieder erreicht. Dies hebt zusätzlich den inhibitorischen Effekt der MPTP-Öffnung und der myofibrilliären Kontraktion auf. Die Wiederherstellung des mitochondrialen Membranpotentials führt zu einem Kalzium-Influx in die Mitochondrien, welcher ebenfalls zu einer Öffnung der MPTP führen kann (Hausenloy and Yellon, 2013). Wenige Stunden später kommt es zu einer Ansammlung von Neutrophilen in dem Infarktareal, welche proteolytische Enzyme freisetzen (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

1.1.1 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung von I/R-Verletzungen

Typischerweise wird für die Simulation von Ischämie-/Reperfusionsverletzungen in Tieren die linke absteigende Koronararterie mit Hilfe eines Fadens verschlossen und nach einer definierten Zeit wieder eröffnet. Hierbei gibt es sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* Modelle.

In den *ex vivo* Modellen wird das Herz aus dem Organismus isoliert und perfundiert (Langendorff-Modell) (Farah *et al.*, 2017). Dies erlaubt eine bessere Kontrolle der physiologischen Konditionen, berücksichtigt jedoch nicht die komplexen Signalwege, welche in einem Organismus durch I/R-Verletzungen ausgelöst werden (Chen and Vunjak-Novakovic, 2018).

In den *in vivo* Modellen wird wie bereits erwähnt, die LAD verschlossen und nach 30 min, 45 min oder 60 min Okklusion wieder eröffnet. Die Zeit der Reperfusion variiert ebenfalls zwischen 2-24 Stunden (Calvert *et al.*, 2008; Erkens *et al.*, 2018). Aufgrund der hohen Variabilität der I/R-Protokolle ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse nur bedingt möglich.

1.2 Oxidativer Stress, physische Bewegung und das Redox-System

Oxidativer Stress ist ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien in einer Zelle, wobei Ersteres überwiegt. Dies wiederum führt zu Störungen von Signalkaskaden, der Oxidation von Proteinen und schlussendlich zu Zellschäden (Sies, 2015). Ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxid, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale oder auch reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit, kann eine exzessive Zunahme von ROS, bekannt als "Distress", schädlich für die Zellen sein (Gomez-Cabrera *et al.*, 2015; Sies, 2015). Es ist jedoch mittlerweile sehr gut belegt, dass ROS wichtige Signalmoleküle in den Zellen sind, welche die Gewebshomöostase aufrechterhalten, die Transkription von Proteinen regulieren ebenso wie die Zellproliferation und Differentiation und somit als "Eustress" positive Auswirkungen auf die Zellhomöostase haben (Sundaresan *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 2000; Janssen-Heininger *et al.*, 2008; Finkel, 2011).

Die durch physische Aktivität ausgelöste Kontraktion der Skelettmuskeln oder erhöhte Kontraktion des Herzmuskels löst eine steigende ROS-Produktion aus, welche oxidativen Stress in den Zellen hervorruft (Davies *et al.*, 1982; Reid *et al.*, 1992). Die gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies sind jedoch nicht, wie lange Zeit vermutet, nur mitochondrialem Ursprungs, sondern hauptsächlich von der NADPH-Oxidase (NOX) oder der Xanthin-Oxidase (XO)

(Sakellariou *et al.*, 2013). Diese Redox-Signalwege sind ausschlaggebend für die adaptiven Mechanismen des Muskels an die physische Bewegung, wie z.B. die mitochondriale Biogenese, die Kontraktionskraft des Muskels (Paulsen *et al.*, 2014), die Muskelhypertrophy (Makanae *et al.*, 2013) oder auch die Hochregulierung der Antioxidans-Enzym-Level (Alessio and Goldfarb, 1988; Gore *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2000). Ein erhöhter ROS-Spiegel kann jedoch zu Muskelschwäche und sogar kontraktiler Dysfunktion führen (Powers *et al.*, 2011). Die durch chronisches körperliches Training ausgelösten erhöhten Antioxidanslevel führen so zu einer adaptiv verbesserten Redoxkapazität, um der steigenden ROS-Produktion entgegenzuwirken. Somit kann eine höhere Leistungskapazität erreicht werden unter einer verlangsamten Muskelermüdung (Reid *et al.*, 1994).

Die erhöhten ROS-Level führen zu einer Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren, unter anderem dem Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), welcher zur Transkription verschiedener Antioxidansenzyme und kleinen Molekülen führt, wie die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalasen, Thioredoxine, Peroxyredoxine oder Glutathion (GSH γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin) (Done and Traustadóttir, 2016).

GSH ist das am häufigsten vorkommende, nicht proteinogene Thiol in tierischen Zellen, welches zusammen mit dem Glutathiondisulfid (GSSG) das wichtigste Redoxpaar darstellt (Wu et al., 2004). GSH wird in allen Zelltypen aus Glutamat, Cystein und Glycin durch die γ -Glutamylcystein-Synthetase und GSH-Synthetase synthetisiert (Abbildung 4), wobei die Leber der Hauptproduzent ist, welcher GSH durch das Plasma im Organismus verteilt (Wu et al., 2004). GSH schützt vor oxidativem Stress durch verschiedene Mechanismen: Es reduziert Wasserstoffperoxid und organische Peroxidlevel über die Reaktion durch die GSH Peroxidase (Steinbacher and Eckl, 2015). Zusätzlich ist GSH ein Substrat für die Dehydroascorbat Reduktase für das Recycling von Ascorbinsäure (Halliwell and Gutteridge, 2015). GSH ist weiterhin ein Fänger für Hydroxylradikale und Hyperoxid Anionen direkt oder indirekt durch enzymatische Reaktionen. Hierbei oxidiert GSH zu Glutathiondisulfid (GSSG). GSSG wiederum wird wieder reduziert zu GSH mit Hilfe der Glutathionreduktase (Halliwell and Gutteridge, 2015). Insbesondere während der körperlichen Bewegung ist es wichtig, das Verhältnis von GSH/GSSG konstant zu halten. Die Aufnahme von GSH aus dem Plasma in den Muskel wird während körperlicher Aktivität gesteigert (Li Li Ji, Fu and Mitchell, 1992). Aus diesem Grund ist das Verhältnis von GSH zu GSSG in den Zellen ein verbreiteter Marker des Redoxstatus (He et al., 2016)



Abbildung 4 *De novo* Synthese und Recycling-Pathway des Glutathions (GSH). GSH kann in allen Zellen entweder *de novo* aus Glutamat, Cystein und Glycin durch die γ -Glutamylcystein-Synthetase und GSH-Synthetase synthetisiert werden oder aber aus der oxidierten Form (GSSG) recycled werden. Hierbei reduziert die GSH-Reduktase unter Verwendung von NADPH+H⁺ das GSSG in 2 Moleküle GSH.

Oxidativer Stress ist die Hauptursache des myokardialen Zelltodes während eines Myokardinfarktes. Physische Aktivität kann hierbei die Antioxidanskapazität des Herzens erhöhen und so einem durch ROS-Bildung getriggerten Zelltod entgegenwirken (Gielen, Schuler and Adams, 2010).

1.3 Die Rolle der NOS3 in der Trainings-induzierten Kardioprotektion

Um die Rolle der NOS3 in der durch physische Aktivität ausgelösten Kardioprotektion zu untersuchen, wurden verschiedenste Trainingsprotokolle, hauptsächlich für murine Lebewesen, entwickelt.

1.3.1 Trainings-Protokolle

Zur Bestimmung der Leistungskapazität oder durch Training veränderte Parameter wurden verschiedenste Trainings-Protokolle etabliert und publiziert. Zum einen gibt es das gezwungene Lauftraining, in dem die Tiere über einen definierten Zeitraum mit einer festgelegten Geschwindigkeit rennen müssen (kurzes aber hoch-intensives Training) (Farah *et al.*, 2013), zum anderen gibt es das freiwillige Lauftraining, in dem die Versuchstiere, meist in einem Laufrad, selbst entscheiden können in welcher Intensität und Zeit sie rennen möchten (lange aber niedrige Intensität) (Manzanares, Brito-da-Silva and Gandra, 2018). Des Weiteren wurden

in zahlreichen Studien auch Schwimmprotokolle verwendet, in denen die Mäuse über einen definierten Zeitraum mit oder ohne Gewicht über Wasser bleiben müssen (Kim *et al.*, 2008). Die Protokolle variieren jedoch in den Studien von der Zeit und Intensität, sodass es immer wieder zu gewissen Inkonsistenzen in den Ergebnissen der jeweiligen Publikationen kommen kann.

1.3.2 Untersuchungen zur Rolle der NOS3 in der Kardioprotektion

Es ist jedoch bereits sehr gut etabliert, dass physisches Training, unabhängig vom angewandten Trainingsprotokoll und I/R-Protokoll, eine effiziente Strategie gegen Ischämie-/Reperfusionsverletzungen darstellt. Ebenfalls ist bekannt, dass die NOS3 Aktivität durch den erhöhten Scherstress während des Trainings hochreguliert wird. Aus diesem Grund wurde die Rolle der NOS3 in der Trainingskapazität und Trainings-induzierten Kardioprotektion bereits in zahlreichen Studien untersucht. Globale NOS3 KO Mäuse oder auch Mäuse, in denen die NO-Synthase inhibiert wurde (z.B. L-NAME), zeigten eine reduzierte Trainingskapazität (Wang et al., 2001; Momken et al., 2004; Ojaimi et al., 2005), eine reduzierte mitochondriale oxidative Kapazität (Momken et al., 2004) sowie keine Trainings-induzierte Kardioprotektion (Calvert et al., 2011; Farah et al., 2013). In humanen Studien konnte gezeigt werden, dass die Plasmanitritlevel (ein Indikator der NOS3 Aktivität) ansteigen nach akuter physischer Bewegung. Dieser Effekt blieb bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion aus (Ashor et al., 2015).

Die spezifische Rolle der RBC NOS3 und EC NOS3 in der durch körperliche Aktivität induzierten Kardioprotektion wurde bis jetzt jedoch noch nicht analysiert.

1.4 Zielstellung



Abbildung 5 Graphische Darstellung der Zielsetzungen dieser Arbeit. Die NOS3 spielt eine wichtige Rolle in der Trainings-induzierten Kardioprotektion, jedoch wurde nicht genau analysiert, welche gewebespezifische NOS3 ausschlaggebende Effekte auf die Kardioprotektion erzielt. Aus diesem Grund ergaben sich in dieser Arbeit 6 offene Fragestellungen. 1. Welches Trainingsprotokoll (freiwilliges oder gezwungenes Laufradtraining oder Gruppenhaltung) erzielt kardioprotektive Effekte? 2. Welche Auswirkungen hat eine Depletion der NOS3 in den RBC, den EC oder global auf die Adaption und 3. Kardioprotektion in trainierten Mäusen? Welche Auswirkungen hat die EC NOS3-Depletion auf 4. die NO-Metabolite, 5. den Redoxstatus und 6. die Nukleotidphosphate in den Organen trainierter und untrainierter Mäuse?

Die endotheliale NO-Synthase spielt eine wichtige Rolle in der durch physische Aktivität induzierten Kardioprotektion. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die NOS3 nicht nur in Endothelzellen sondern unter anderem auch in Erythrozyten exprimiert wird. Bis jetzt wurde noch keine gewebespezifische Analyse der NOS3 durchgeführt, welche eindeutig aussagt, welche NOS3 eine essentielle Rolle bezüglich der Kardioprotektion spielt.

In diesem Projekt soll die gewebespezifische Rolle der NOS3 in den Erythrozyten, den Endothelzellen sowie global in der durch Training induzierten Kardioprotektion anhand muriner KO-Mausmodelle analysiert werden. Die folgenden Fragestellungen sollen daher in dieser Arbeit beantwortet werden.

1. Spricht man von einer durch Training induzierten Kardioprotektion ist zunächst die Frage zu beantworten, welche Art von physischer Aktivität notwendig ist, um die vor einem Myokardinfarkt schützenden Effekte zu erzielen. Durch verschiedene Trainingsprotokolle (dynamische Gruppenbewegung, freiwilliges Laufradtraining oder gezwungenes Laufradtraining) soll daher zunächst an Wildtyp-Mäusen untersucht werden, welches der Bewegungsmuster kardioprotektiv wirkt.

2. Um die genaue Rolle der in den jeweiligen Kompartimenten (Endothelzellen, Erythrozyten oder global) lokalisierten NOS3 an der Adaptation an physische Bewegung zu untersuchen, werden die jeweils gewebespezifischen KO Mäuse einem 4-wöchigen freiwilligem Trainingsprotokoll bzw. einem 6-wöchigen physischen Inaktivitätsprotokoll unterzogen. Mit Hilfe anatomischer, hämatologischer und kardialer Analysen soll die Anpassung der Mäuse an physische Bewegung analysiert werden.

3. In wie weit die gewebespezifische NOS3 einen Einfluss auf die durch physische Aktivität induzierte kardiale Protektion bei einer Ischämie/Reperfusions-Verletzung hat, wird durch eine induzierte Ischämie der linken Koronararterie untersucht. Hierbei sollen die Mäuse 24 h nach den jeweiligen Protokollen einer 45 minütigen Koronar-Ischämie mit anschließender 24 stündiger Reperfusion unterzogen werden. Die kardiale Funktion wird analysiert sowie die Infarktgröße mittels TTC-Färbung ausgewertet.

4. Die vaskuläre NOS3 ist essentiell für den systemischen NO-Metabolismus. Durch Nitrit-/Nitrosospezies-Messungen mittels CLD soll untersucht werden, inwieweit eine Depletion der vaskulären NOS3 den NO-Metabolismus verändert und welche Auswirkungen physische Bewegung auf den NO-Metabolismus hat.

5. Physische Aktivität führt zur Bildung freier Radikale, welche im Normalzustand durch adaptive Prozesse des Redoxsystems neutralisiert werden können. Anhand von GSH/GSSG-Messungen soll analysiert werden, welchen Einfluss der KO der vaskulären NOS3 auf den Redoxstatus der Gewebe nach physischer Bewegung hat.

6. Nukleotidphosphate wie ATP sind wichtige Energieträger während physischer Aktivität. Ob eine Depletion der endothelialen NOS3 den Energiehaushalt physisch aktiver Mäuse verändert, wird durch die Analyse verschiedener Nukleotidphosphate in den Organen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stocklösungen und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich (St. Louis, USA) in der höchsten verfügbaren Reinheit bezogen. Hauptsächlich wurde PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, St. Louis, USA: 136.9 mM NaCl, 8.1 mM Na2HPO4, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH2PO4, 0.9 mM CaCl2 x H2O, 0.5 mM MgCl2 x 6 H2O, pH = 7.4) verwendet. Alle nicht kommerziell erworbenen Lösungen und Puffer wurden mit Millipore-Wasser aus einer hausinternen Anlage (Millipore, Darmstadt, Germany) hergestellt.

2.1.2 Mauslinien

Alle gewebespezifischen KO-Mauslinien wurden aus eigener Zucht aus der Tierversuchsanstalt Düsseldorf bezogen, bzw. die Wildtypmäuse von Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, Frankreich). Die globalen NOS3 KO Mäuse wurden von Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke entwickelt (Gödecke *et al.*, 1998).

Der KO der endothelspezifischen NOS3, wird durch die Injektion von Tamoxifen (Sigma-Aldrich, CAS #10540-29-1) in der 8. bis 9. Lebenswoche induziert. Tamoxifen wird in einer Konzentration von 20 mg/mL in Erdnussöl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst und an 5 aufeinander folgenden Tagen in einem Abstand von 24 h den Mäusen i.p. (75 mg Tamoxifen/kg Körpergewicht) injiziert.
Linienbezeichnung	Offizielle Bezeichnung	Phänotyp		
Globale NOS3 KO	C57BL/6(NOS3)TmPhänotyp-/-	globaler K.O. der NOS3 (Gödecke et al., 1998)		
CTRL WT	C57BL/6JRj	Wildtyp		
EC NOS3 KO		endothelspezifischer K.O. der NOS3 nach Tamoxifenbehandlung (in		
(loxP-NOS3 Cdh5 CreERT2+		einer Vehikelflüssigkeit gelöst) zeigt physiologische Effekte der		
+ TAM)	C57BL/6J;Cg-	NOS3 ohne die NOS3 der En- dothelzellen		
CTRL EC NOS3	Tg(NOS33flox/flox)(Cdh5(PAC)- CreERT2	kein veränderter Phänotyp		
WT		Kontrolle, dass Tamoxifenbehandlung (in einer Vehikelflüssigkeit gelöst) keine		
loxP-NOS3 Cdh5 CreERT2-				
+ TAM		Parameter hat		
	C57BL/6J;129SvB6F1(B6N)-	erythrozytärspezifischer K.O. der NOS3		
RBC NOS3 KO	Tg(NOS33flox/flox)(HBB- cre)12Kpe/J	zeigen die physiologischen Effekte der NOS3 ohne Beitrag der erythrozytären NOS3		
CTRL loxP NOS3	C57BL/6J;129SvB6F1(B6N)- TgH(NOS3 ^{flox/flox})	Kein veränderter Phänotyp		

Tabelle 1 Verwendete genetisch veränderte Mauslinien mit den dazugehörigen jeweiligen Kontroll-Linien.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsprotokolle körperliches Training

Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV, Aktenzeichen 84-02.04.2016.A170) und gemäß den Vorgaben der *European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes* durchgeführt.

Für die Versuchsprotokolle wurden männliche, 7-8 Wochen alte Mäuse verwendet.

Den Tieren stand Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Um eine konstante Nitrit-/Nitratkonzentration zu gewährleisten, erhielten die Mäuse kommerziell erwerbliches stilles Trinkwasser (Aqua Culinaris, Refresco Deutschland GmbH, Erfstadt). Nitrit (0,08±0,023 μM), Nitrat (1,25±0,08 μM).

2.2.1.1 Freiwilliges Training

Die Mäuse wurden singularisiert und für das freiwillige Training in speziellen Käfigen mit Laufrädern gehalten. Nach einer einwöchigen Adaptation wurde die Laufradumdrehung/24 h über einen Zeitraum von 3 Wochen dokumentiert.

2.2.1.2 Gezwungenes Training

Das gezwungene körperliche Training erfolgte in speziellen motorisierten Laufrädern. Die Mäuse wurden zunächst zwei Wochen jeden 2. Tag an die Laufräder gewöhnt durch ein initiales Training von 10 min bei einer Geschwindigkeit von 2,5 m/min. Die Geschwindigkeit wurde schrittweise auf 15 m/min erhöht. Nach der Adaptationsphase erfolgte während der aktiven Phase der Mäuse eine 30 minütige Trainingseinheit mit einer Geschwindigkeit von 15 m/min an jeweils 5 aufeinander folgenden Tagen über einen Zeitraum von 4 Wochen. Die physisch inaktive, singularisierte Kontrollgruppe wird in einem Standardkäfig über einen Zeitraum von 6 Wochen gehalten und ist den gleichen Geräuschen, Vibrationen und Lichtverhältnissen, wie die Trainingsgruppe ausgesetzt.

2.2.1.3 Experimentelles Setup

24 Stunden nach den abgeschlossenen Trainingsprotokollen erfolgte die Untersuchung der kardialen Funktion mittels Echokardiographie, der vaskulären Funktion mittels Messung der FMD (Fluss-mediierter Vasodilatation) und hämatologische Untersuchungen (Vollblutviskosität, erythrozytäre Verformbarkeit, Blutbild). Anschließend wurden die Mäuse einer Ischämie/Reperfusions-OP unterzogen, in welcher die proximale linke Koronararterie über einen Zeitraum von 45 min okkludiert wurde. Nach 24 stündiger Reperfusion erfolgte erneut die Untersuchung der myokardialen Funktion und der hämatologischen Parameter. Final wurde die Infarktgröße mittels TTC-Färbung analysiert (**Abbildung 6**).



Physisch inaktive

Kontrollen



Freiwilliges Training



Gezwungenes Training

Abbildung 6 Experimentelles Setup der Mäuse der jeweiligen Trainings- und Kontrollgruppen. Nach Abschluss des jeweiligen Trainingsprotokolls erfolgten myokardiale, vaskuläre, hämatologische und anatomische Analysen der Mäuse. Anschließend erfolgte eine I/R-OP mit 45 min. Ischämie und 24 h Reperfusion. Final erfolgten post I/R erneut kardiale, hämatologische und anatomische Analysen.

2.2.2 Hämatologische Untersuchungen

Der mit Isofluran (Piramal Critical Care, West Drayton, England) narkotisierten Maus wurde retroorbital mit einer heparinisierten (Ratiopharm, Deutschland, Ulm, 5000U/mL) Glaskapillare ca. 100 μ L Vollblut entnommen. Zur Bestimmung der Vollblutviskosität sowie der erythrozytären Verformbarkeit wurden 90 μ L in ein heparinisiertes (5 μ L) 1,5 mL Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Messung des Blutbildes wurden 10 μ L Vollblut in ein 1 mL EDTA-Röhrchen überführt (Greiner Bio-One GmbH, Deutschland, Frickenhausen).

2.2.2.1 Viskosität

Zur Messung der Vollblutviskosität wurden 70 μ L des heparinisierten Vollblutes in ein Low Shear Viscosimeter LS 300 (proRheo, Althengstett, Deutschland) überführt und die Viskosität unter folgenden aufsteigenden Schergeschwindigkeiten bei 37°C gemessen: 5, 10, 17,7, 25,5, 33,2, 41,0 48,7, 56,4, 64,2, 71,9, 79,6 [s⁻¹].

Das LS 300 ist ein Rotationsrheometer, welches nach dem Couette- Prinzip funktioniert. Hierbei befindet sich die zu analysierende Flüssigkeit in einem auf 37°C vorgewärmten Messbecher, welcher um einen ruhenden Messkörper rotiert. Unter definierten Drehmomenten wird die Schubspannung gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Herstellersoftware Low Shear LS 300.

2.2.2.2 Erythrozytäre Verformbarkeit

Die Bestimmung der Scherstress-abhängigen erythrozytären Verformbarkeit erfolgte mittels Ektazytometrie in einem optisch rotierendem Laser Erythrozyten-Analysator (Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer (Lorrca), RR Mechatronics[®], Zwaag, Niederlande). Hierfür wurden 25 μ L Vollblut in 5 mL vorgewärmter (37°C) PVP-Lösung (RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande) pipettiert und durch leichtes Schwenken vorsichtig vermischt. Jeweils 1 mL der Lösung wurde im Lorrca analysiert. Die Elongation der Erythrozyten wurde hierbei unter aufsteigendem Scherstress gemessen (0,3-53,33 Pa). Für die Kalkulation des maximalen Elongationsindexes (EI_{max}) und der Scherrate, die notwendig ist, um die Hälfte der maximalen Elongation (SS_{1/2}) zu erreichen, wurde eine Lineweaver-Burk Transformation angewandt. Hierbei wurden die reziproken Werte des Elongationsindexes und der jeweiligen Scherrate aufgetragen und eine lineare Regression berechnet. Der Schnittpunkt mit der Y-Achse ist hierbei 1/EI_{max} und der Schnittpunkt mit der X-Achse -1/SS_{1/2}. Die Steigung der Geraden bildet den Quotienten aus SS_{1/2}/EI_{max}- (nach Baskurt and Meiselman, 2013).

2.2.2.3 Blutbild

Das Blutbild wurde mit Hilfe des vet abcTm animal blood counter (scil animal care a division of Henry Schein Animal Health, USA, Gurnee) bestimmt.

2.2.3 Anatomische Analysen

Der jeweiligen Maus wurde *post mortem* der *Musculus soleus* sowie das Herz entnommen und nach leichtem Trockentupfen das Feuchtgewicht bestimmt. Ebenfalls zur Kalkulation des Verhältnisses von Herz bzw. Muskel zu Körpergewicht wurde das Gewicht der Mäuse prä I/R-OP ermittelt.

2.2.4 Kardiologische Analysen

2.2.4.1 Echokardiographie

Die kardiologische Untersuchung der Tiere jeder Gruppe erfolgte nach den jeweiligen Protokollen an Tag 28 (24 h prä I/R) sowie 24 h nach der Ischämie-Induktion mittels Echokardiographie, einer nicht invasiven Bildgebung durch ein hochauflösendes Ultraschallgerät mit einem 18-38 MHz Schallkopf (Vevo2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada). Die Maus wurde in einer Induktionskammer mit 2 Vol. % Isofluran (Piramal Critical Care, West Drayton, England) narkotisiert und anschließend in Rückenlage auf einem beheizbaren Tisch fixiert. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske aufrechterhalten (2 Vol. % Isofluran). Über Elektroden am Tisch erfolgten kontinuierlich EKG sowie Herzfrequenz (HR) Aufzeichnungen. Die Körpertemperatur der Maus wurde mittels eines rektalen Thermometers überwacht und durch den beheizbaren Tisch konstant auf 37°C gehalten.

Vor Beginn der echokardiographischen Untersuchung wurden die Haare am Thorax mit einer Haarentfernungscreme entfernt (Veet, RB Healthcare UK, Dansom lane) und zur verbesserten Bildgebung vorgewärmtes Ultraschallgel (Aquasonic 100 gel, Parker Laboratories, New Jersey, USA) aufgetragen. Es erfolgte die Aufnahme der parasternalen Längsachse (PSLA) sowie der kurzen Achse (SAX) des linken Ventrikels zur Ermittlung des endsystolischen (ESV) und enddiastolischen Volumens (EDV). Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe der Vevo 2100 Software (VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada). Aus den ermittelten Volumina wurden folgende Parameter kalkuliert: Schlagvolumen (SV=EDV-ESV), Herzzeitvolumen (HZV=SVxHR) und Ejektionsfraktion (EF=((EDV-ESV)/EDV*100)) Die Echokardiographie wurde mit freundlicher Unterstützung von Julia Hocks, sowie Jean-Luc Niederst und Dr. rer. nat. Tatsiana Suvorava durchgeführt.

2.2.4.2 Ischämie/Reperfusions-Induktion

Die Maus wurde in einer Induktionskammer mit 2 Vol. % Isofluran narkotisiert und anschließend intubiert. Die Beatmung erfolgte über einen murinen Respirator (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland) mit 40 Vol. % O₂ und 2 Vol. % Isofluran. Zur Überwachung der Temperatur diente eine rektale Temperatursonde (Testo AG, Deutschland, Lenzkirch). Die Kerntemperatur der Maus wurde durch den beheizbaren OP-Tisch (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland) und einer zusätzlichen Infrarotlampe IL21 (Beurer GmbH, Ulm, Deutschland) konstant auf 37°C gehalten. Über die Gliedmaßen der frontal auf dem OP-Tisch fixierten Maus wurde ein EKG (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland) abgeleitet und zur Überwachung der Narkose sowie der I/R-Induktion permanent aufgezeichnet. Mittels eines interkostalen Zugangs wurde der Thorax eröffnet und das Herz vom Perikard befreit. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops wurde die proximale linke Koronararterie mit einem 7-0 Prolenefaden (Ethicon, USA, New Jersey) unterstochen, die Enden des Fadens durch einen ca. 3 mm breiten

PE10 Schlauchring geführt und durch leichtes auseinanderziehen die Ischämie ausgelöst. Zur Kontrolle der adäquaten Okklusion der Koronararterie diente die Überwachung des EKG mit charakteristischen ST-Strecken, welche per Ausdruck dokumentiert wurden. Während der gesamten Ischämie-Phase wurde die Kerntemperatur der Maus von 37°C aufrechterhalten. Nach 45 minütiger Ischämie wurden die Zugfäden gelöst, sodass eine vollständige Reperfusion erfolgen konnte und der Schlauch entfernt. Die Fäden verblieben als lockere Schlaufe im Herzen, um eine spätere Infarktgrößenbestimmung durchführen zu können. Nach vollständiger Reventilation der Lunge wurde der Thorax sowie die darüber liegenden Muskeln mit 4/0 Seide (Ethicon, USA, New Jersey) und die Haut in Einzelknopfnähten mit 5-0 Prolene (Ethicon, USA, New Jersey) verschlossen. Zur Ausleitung der Narkose wurde das Isofluran abgedreht und die Maus beim Einsetzen des Eigenatemreflexes extubiert. Die Analgesie erfolgte mit Temgesic (0,05 mg/kg, Indivior, Mannheim, Deutschland) subcutan alle 6-8h. Nach 24 h Reperfusion wurde die Maus für die Organentnahme final mit Ketamin (100mg/kg, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin Deutschland) und Xylazin (10 mg/kg, Indivior, Virginia, USA) intraperetoneal (i.p.) narkotisiert. Um eine vorzeitige Koagulation des Blutes zu verhindern, wurde zusätzlich 200 µL Heparin (5000U/mL, Braun, Melsungen, Deutschland) i.p. injiziert. Das Gewicht der entnommenen Organe wurde bestimmt und diese anschließend für weitere Analysen oder molekularbiologische Aufarbeitungen verwendet.

2.2.4.3 Ermittlung der Infarktgröße

Zur genauen Größenbestimmung des induzierten myokardialen Infarktes wurde das frisch entnommene Herz in eine auf 4°C gekühlte mit 0,9% Kochsalzlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) und Heparin (5000U/mL, Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllte Kaltschale überführt und vom umliegenden Gewebe befreit. Mittels einer Kanüle, welche in der Aorta *ascendens* befestigt wurde, wurde das Herz mit 0,9% Kochsalzlösung gespült. Es erfolgte eine erneute Anlage der RIVA-Ligatur mit 7-0 Seide (Serag Wiessner, Naila, Deutschland) und eine anschließende retrograde Perfusion mit 1% Evan's Blue Lösung (in PBS) (Merck, Darmstadt, Deutschland), um das myokardiale Risiko Areal (AAR) zu bestimmen. Nach mind. einstündigem Kühlen bei -20°C erfolgte das Zuschneiden des Herzens in 1 mm dicke Scheiben, welche 5 min. in 1% 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) (Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert wurden. TTC führt zu einer Rotfärbung vitaler Zellen im Myokardgewebe, sodass eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Gewebeabschnitten möglich ist. Die Herzschnitte wurden mikroskopisch fotografiert und planimetrisch mit DISKUS VIEW (Technisches Büro Hilgers, Königswinter, Deutschland) ausgewertet. Blaue Gewebeareale wurden hierbei als gesundes, nicht vom Infarkt betroffenes Gewebe, rote Areale als vom Infarkt betroffene, jedoch vitale Gewebe und weiße Areale als vom Infarkt betroffene tote Gewebe, gewertet. Die Berechnung der Risiko Area erfolgte prozentual auf den linken Ventrikel (AAR/LV). Der Infarkt wurde prozentual zur Risikofläche errechnet (Inf/AAR).

2.2.5 Vaskuläre Analysen

2.2.5.1 Messung der Fluss mediierten Dilatation (FMD)

Die FMD-Messung erfolgte nicht invasiv mittels eines hochauflösenden Ultraschallgerätes und eines 30-70 MHz Schallkopfes (Vevo2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada). Die Narkoseeinleitung, Fixierung auf dem Echotisch, Überwachung der Temperatur und Herzfrequenz der Tiere erfolgte wie bereits unter Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben. Zur verbesserten Bildgebung wurden die Haare am Hinterlauf mit Haarentfernungscreme (Veet, RB Healthcare UK, Dansom lane, England) entfernt. Um den Hinterlauf wurde eine steuerbare Druckmanschette (Vascular Occluder 10 mm, OC10, Kent scientific, Torrington, USA) angelegt und distal der Schallkopf mit Ultraschallgel aufgesetzt. Nach der Ultraschall-Visualisierung der Arteria iliaca und eindeutiger Identifizierung durch den PW-Doppler wurde mittels eines Druckkalibriergerätes (KAL 84, Halstrup Walcher, Kirchzarten, Deutschland) die Beinmanschette auf 200 mmHg aufgepumpt und somit die A. iliaca für 5 min. okkludiert. Es erfolgten Aufnahmen des Gefäßdurchmessers vor der Okklusion als Baseline-Messung. Durch Druckablassung der Beinmanschette erfolgte die Reperfusion. Während der Reperfusionsphase erfolgten in einem Abstand von 30 sek Aufnahmen des Gefäßdurchmessers, um die Vasodilatation dokumentieren zu können. Die Auswertung der FMD erfolgte mittels der Brachial Analyzer Software (Medical Imaging Applications, USA). Der Durchmesser des Gefäßes wird in allen Aufnahmen ermittelt und die Dilatation in der Reperfusion prozentual zum Baseline-Durchmesser berechnet. Die FMD-Messung wurde mit freundlicher Unterstützung von Julia Hocks, Tatsiana Suvorava sowie Jean-Luc Niederst durchgeführt.

2.2.6 Messung der NO-Metabolite, Thiole und Nukleotidphosphate

2.2.6.1 Probenvorbereitung

Den mit 3 % Isofluran narkotisierten Mäusen wurde intrakardial 900 μ L Blut in einer heparinisierten Spritze entnommen und sofort 1:10 mit einer NEM/EDTA-Lösung (100 mM NEM, 20 mM EDTA in PBS) vermischt. Die Trennung des Plasmas von den Erythrozyten erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C, 3000 g für 3 min. Das Plasma und die Erythrozyten wurden nach Entfernung des Buffy-Coats sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren und abschließend bei -80°C gelagert.

Anschließend erfolgte eine systemische Perfusion der Maus mit einer NEM/EDTA-Lösung (10 mM NEM, 2 mM EDTA). Die Organe wurden entnommen, gewogen, schock gefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Unmittelbar vor der Analyse wurden die Organe in dem 3-fachen Volumen [µL] NEM/EDTA-Puffer (100 mM NEM, 20 mM EDTA in PBS) des jeweiligen Gewichtes der Organe mit einem TissueRuptor (Qiagen, Venlo, Niederlande) homogenisiert. Alle verwendeten Materialien wurden zuvor mit Millipore-Wasser gereinigt, um eventuelle Nitrat-/Nitritkontaminationen zu vermeiden.

2.2.6.2 Bestimmung von Nitrit und RXNO

Nitrit- bzw. RXNO wurde mit Hilfe der CLD88e (ECO PHYSICS GmbH, München, Deutschland) (Chemilumineszenzdetektion) gemessen.

Die in den Geweben enthaltenen Nitroso-Verbindungen werden in einer auf 60°C temperierten, reduktiven Reaktionskammer (45 mM Kaliumiodid, 10 mM Iodid in Essigsäure gelöst) reduziert und NO wird freigesetzt. Das in die Gasphase freigesetzte NO wird durch einen konstanten Heliumstrom durch den Detektor transportiert und reagiert mit Ozon (O₃) zu Stickstoffdioxid (NO₂). Dabei werden Elektronen angeregt, welche bei der Rückkehr in den Grundzustand Licht im nahen Infrarotbereich emittieren. Das Licht wird von einem Photomultiplier PowerChrom 280 (eDAQ Pty Ltd, Denistone East, Australien) quantifiziert. Das Ozon ist im Überschuss vorhanden und die Reaktionskonditionen werden konstant gehalten. Die Intensität des emittierten Lichts ist direkt proportional zur NO-Konzentration.



Abbildung 7 Schematische Darstellung der CLD.

Zur Nitritbestimmung wurden 50 μ L der zuvor homogenisierten Organe direkt in die Reaktionskammer injiziert. Durch die Zugabe von 10% (v/v) einer 5 %igen Sulfanilamidlösung in 1 M HCl und einer 15 minütigen Inkubation der Proben auf Eis konnten die Nitroso-Spezies (RXNO) gemessen werden. Die reine Nitrit-Konzentration wurde aus der Differenz der totalen RXNO-Spezies minus der NO-Konzentration unbehandelter Proben berechnet.

Alle beschriebenen Inkubationsschritte und Lösungen wurden unter Ausschluss von Licht durchgeführt und auf Eis gelagert. Zur direkten Quantifizierung wurden in Millipore-Wasser gelöste Natriumnitrit-Standards in einer Range von 0 -1000 nM verwendet.

Die Auswertung der Peaks erfolgte mit der Software eDAQ Powerchrom (eDAQ, Warschau, Polen).

2.2.6.3 Messung der Thiole mittels UPLC-QToF

Die Quantifizierung der Thiole (Cystein, und Glutathion sowie der jeweiligen Disulfide) erfolgte mittels UPLC-QToF (UPLC 1290 Infinity binäre Pumpe, 6550 iFunnel QToF:Agilent, Santa Clara, USA).

Probenvorbereitung des Gewebes

Die Zelllyse und Proteinpräzipitation in dem jeweiligen Gewebehomogenisat erfolgte durch die Zugabe von 0,33% des Probenvolumens einer 20 % SSA-Lösung (5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, 10 mM NEM in Millipore-Wasser (w/v)). Um eventuelle Analytverluste in der Probenvorbereitung zu korrigieren, wurden die Isotope Glutathiondisulfid ${}^{13}C_{2}{}^{15}N$ und Glutathion ${}^{13}C_{2}{}^{15}N$ (0,6 mM und 4 mM in Millipore-Wasser) als interner Standard im Verhältnis 1:64 hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 min, 10.000 *g* und 4°C. Der Überstand wurde in ein separates Eppendorfgefäß überführt und das Pellet erneut mit einer 5 % SSA-Lösung (5-Sulfosalicylsäure Dihydrat, 10 mM NEM in Millipore-Wasser (w/v)) extrahiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min., 10.000 *g*, 4°C) wurden die Überstände der Extraktion vereint und gemessen.

Probenvorbereitung des Plasmas und des Erythrozytenpellets

Zu 150 μ L Plasma wurden 150 μ L 5% SSA-Lösung zugeführt sowie der interne Standard im Verhältnis 1:20. Das Erythrozytenpellet wurde in einem Verhältnis von 5:1 mit der 5 % SSA-Lösung vermischt. Der interne Standard wurde im Verhältnis 1:40 zugefügt. Die Proben wurden bei 10.000 g, 4°C, 10 min zentrifugiert, der Überstand gesammelt und das Pellet erneut mit 5 % SSA-Lösung extrahiert. Die Überstände wurden vereint und anschließend gemessen.

Messparameter

Die Auftrennung der Analyte erfolgte mit einer C18-Säule (Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 2.1x50 mm 1.8 Micron), wobei die mobilen Phasen A und B aus jeweils Millipore-Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und Acetonitril bestanden.

Parameter	Setpoint
Gas Temperature	220 °C
Drying Gas	12 l/min
Nebulizer	35 psig
Sheath Gas Temperature	330 °C
Sheath Gas Flow	11 l/min
VCapillary	2500 V
Nozzle Voltage	1000 V
Fragmentor	30 V
Oct 1 RF Vpp	750 V

Die Analyte wurden im positiven Modus (ESI) unter den folgenden Bedingungen ionisiert:

Die Quantifizierung der Analyte erfolgte über eine externe Kalibrationsreihe. Hierbei wurden die Analyte Glutathion (10 mM), Glutathiondisulfid (1 mM), L-Cystin (1 mM), L-Cystein (1 mM) und h-Cystein (0,1 mM) in Millipore-Wasser gelöst. Zum Lösen von L-Cystin und L-Homocystin wurde zusätzlich 1 % 37,5 %ige HCl hinzugefügt. Die Kalibrationsreihe wurde nach folgendem Schema verdünnt:

Analyte	Konzentration							
	[mm	ol/L]		[µmol/L]				
	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6		
Glutathione	10	1	100	10	1	100		
GSSG	1	0.1	10	1	0.1	10		
L-Cystine	1	0.1	10	1	0.1	10		
L-Cystein	1	0.1	10	1	0.1	10		
h-Cystine	0.1	0.01	1	0.1	0.01	1		
h-Cystein	1	0.1	10	1	0.1	10		

2.2.6.4 Messung von Nukleotidphosphaten und Nukleosiden mittels UPLC-QToF

Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.6.4 beschrieben. Als interne Standards wurden cAMP ${}^{13}C_5$, ATP ${}^{13}C^{15}N$ und AMP ${}^{15}N$ in einer Konzentration von 1 mM zugegeben.

Messparameter

Die Quantifizierung der Analyte erfolgte auch hier über eine externe Kalibrationsreihe. Folgende Analyte wurden in Millipore-Wasser gelöst: Adenin, Adenosin, cAMP, cGMP, Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin (je 1 mM), AMP, ADP, ATP, GMP, GDP, GTP (je 10 mM). Für die Löslichkeit musste den Nukleosiden und cyclischen Nukleotidphosphaten 1 % Ameisensäure hinzugefügt werden. Die Verdünnung der jeweiligen Analyte erfolgte nach folgendem Schema:

Analyte	Konzentration					
	[mmol/L]		[µmol/L]			[nmol/L]
	STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5	STD 6
Adenin, Adenosin, cAMP,	1	0,1	10	1	0,1	10
cGMP, Harnsäure,						
Hypoxanthin, Xanthin						
AMP,ADP,ATP,	10	1	100	10	1	100
GMP,GDP, GTP						

Die Auftrennung der Analyte erfolgte mit einer C18-Säule (siehe Thiolmessung 3.2.6.4). Die mobile Phase A beinhaltete 0,1 % Ameisensäure in Millipore-Wasser und B 0,33 % Acetonitril, 0,66 % Millipore-Wasser und 0,1 % Ameisensäure (v/v).

Setpoint Parameter Gas Temperature 250 °C Drying Gas 12 l/min Nebulizer 35 psig Sheath Gas Temperature 250 °C Sheath Gas Flow 11 l/min 2500 V VCapillary Nozzle Voltage 1000 V Fragmentor 15 V Oct 1 RF Vpp 750 V

Die Analyte wurden im positiven Modus (ESI) unter den folgenden Bedingungen ionisiert:

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm Agilent MassHunter Qualitative analysis B.07.00

Die Analyse der Thiole und Nukleotidphosphate erfolgte durch Herrn Dr. rer. nat. Frederik Barbarino.

2.2.6.5 Proteinbestimmung

Da die NO-Metabolite, Thiole und Nukleotidphosphate auf den Proteingehalt der Probe bezogen wurden, erfolgte eine Proteinquantifizierung mit dem Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,2-2 mg/mL. Alle Proben wurden in Duplikaten bei 740 nm gemessen mittels eines UV/VIS Platereader (FluoStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Baden-Württemberg).

2.2.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 6 (USA, La Jolla) durchgeführt. Es erfolgte zunächst ein Test auf Ausreißer (Rout-Test) der Daten, welche von der weiteren Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Daten wurden anschließend auf eine Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests geprüft. War dies der Fall, wurde bei einem Vergleich von drei oder mehr Gruppen eine zweifaktorielle Varianzanalyse mittels 2way ANOVA durchgeführt und die Werte mit Hilfe des Sidak's multiple comparison Test

hinsichtlich ihrer Signifikanz geprüft. Bei einem Vergleich von zwei Gruppen wurde der zweiseitige T-Test angewandt, bzw. bei keiner Normalverteilung der Wilcoxon-Test. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant (*), kleiner 0,01 als hoch signifikant (**) und kleiner 0,001 als höchst signifikant (***) angenommen. P-Werte größer 0,05 wurden als nicht signifikant anerkannt. Die Daten sind jeweils als Mittelwerte +/- SEM dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswahl des Trainings-Protokolls

Zunächst wurde getestet, welche Art von körperlicher Bewegung der Mäuse notwendig ist, um einen kardioprotektiven Effekt zu erzielen. Hierfür wurden 7-8 Wochen alte Wildtyp-Mäuse in drei experimentelle Gruppen unterteilt. Eine Gruppe in der standardisierten Gruppenhaltung mit 9 Mäusen in einem Käfig, eine Gruppe für freiwilliges Training mit einem Laufrad im Käfig und eine Gruppe, welche einem gezwungenem Trainingsprogramm unterzogen wurde mit einem motorisierten Laufrad. Als Kontrollen dienten in jeder Gruppe vereinzelte, untrainierte Mäuse, welchen den jeweils gleichen Geräuschkulissen und Umweltbedingungen ausgesetzt wurden. 24 h nach Beendigung des jeweiligen Trainingsprotokolls wurden die Mäuse einer I/R-OP unterzogen und die Infarktgröße analysiert (Abbildung 8).



Abbildung 8 Area at Risk des linken Ventrikels und die Infarktgröße pro AAR in der Gruppenhaltung (A, B) freiwillig trainierten (C, D) und gezwungen trainierten (E, F) WT. Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte 24 h post Protokoll durch eine 45 min. Ligation der LAD und anschließender 24 h Reperfusion. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte durch TTC-Färbung. Gezwungen trainierte und freiwillig trainierte WT zeigten bei gleicher AAR einen signifikant kleineren Infarkt im Vergleich zu physisch inaktiven Mäusen (ungepaarter t-Test *p<0,05, **p<0,01). Die Bewegung in der Gruppenhaltung allein hat keinen Effekt auf die Infarktgröße.

Bei einer gleichen Area at Risk zeigten die Mäuse in der Gruppenhaltung keine signifikanten Unterschiede der Infarktgröße im Vergleich zu singularisierten Mäusen. Die physisch aktiven Mäuse des freiwilligen Trainingsprotokolls wiesen eine signifikant um 14% verringerte Infarktgröße und die Mäuse des gezwungenen Trainingsprotokolls eine hoch signifikant um 15% verringerte Infarktgröße auf. Die Versuche zeigten, dass bereits freiwillige physische Aktivität der Mäuse ausreicht, um einen kardioprotektiven Effekt zu erzielen. Aus diesem Grund wurden für die weitergehenden Versuche ausschließlich die Protokolle des freiwilligen Trainings verwendet.

3.2 Die Rolle der gewebespezifischen NOS3 in der Adaptation an physische Aktivität

Die zweite Zielstellung des Projektes war die Untersuchung der Rolle der gewebespezifischen NOS3 in der Leistungs-Kapazität und Adaptation an physische Bewegung. Um die genaue Rolle der in den jeweiligen Kompartimenten (Endothelzellen, Erythrozyten oder global) lokalisierten NOS3 zu untersuchen, wurden im Folgenden globale NOS3 KO Mäuse (C57BL/6(NOS3)TmPhänotyp-/-)(Gödecke et al., 1998), endotheliale NOS3 KO Mäuse (EC NOS3 KO (C57BL/6J;Cg-Tg(NOS33flox/flox)(Cdh5(PAC)- CreERT2⁺ + TAM)) sowie erythrozytäre NOS3 KO Mäuse (RBC NOS3 KO (C57BL/6J;129SvB6F1(B6N)-Tg(NOS33flox/flox)(HBB-cre)12Kpe/J)) einem 4-wöchigen freiwilligem Trainingsprotokoll bzw. einem 6-wöchigen physischen Inaktivitätsprotokoll unterzogen. Parallel wurden für jede KO-Linie die jeweiligen Kontrollen (WT: C57BL/6J, EC NOS3 WT: C57BL/6J;Cg-Tg(NOS33flox/flox)(Cdh5(PAC)-CreERT2⁻ +TAM LoxPNOS3: und C57BL/6J;129SvB6F1(B6N)-TgH(NOS3^{flox/flox})) mitgeführt (siehe Tabelle 1). Hierbei stammen die Kontrolllinien der globalen NOS3 KO und der RBC NOS3 KO aus der gleichen Gründungszuchtlinie, die Kontrollen der EC NOS3 KO sind Wurfgeschwister. Für die Untersuchung möglicher Adaptationen an die physische Bewegung bzw. die Auswirkung eines sesshaften Lebensstils der Mäuse wurde die Laufkapazität, anatomische Veränderungen, sowie der Einfluss auf die kardiale und vaskuläre Funktion untersucht. Weiterhin wurde auf der hämatologischen Ebene die Zusammensetzung des Blutes, die Viskosität sowie eventuelle Veränderungen der erythrozytären Verformbarkeit bestimmt.

3.2.1 Laufkapazität und anatomische Adaptation an physische Aktivität der gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse

3.2.1.1 Laufkapazität

Die Laufkapazität der Mäuse wurde mit einem Magnetsensor, welcher die Umdrehungen des Laufrades aufzeichnet, ermittelt und in km/24 h umgerechnet. Alle Mauslinien zeigten einen progressiven Anstieg der zurückgelegten Wegstrecke pro 24 h. Sowohl globale $(5,0\pm0,3 \text{ km/24 h})$ (Abbildung 9b) als auch endotheliale NOS3 KO Mäuse $(5,1\pm0,3 \text{ km/24 h})$ (Abbildung 9c) zeigten eine signifikant verringerte mittlere zurückgelegte Wegstrecke pro 24 h auf im Vergleich zu den Kontrollen $(6,1\pm0,3 \text{ bzw}. 7,0\pm0,7 \text{ km/24 h})$ (Abbildung 9a). Wohingegen die erythrozytären NOS3 KO Mäuse $(6,4\pm0,5 \text{ km/24 h})$ keine Unterschiede in der zurückgelegten Laufstrecke im Vergleich zu den Kontrollen $(6,1\pm0,5 \text{ km/24 h})$ zeigten (Abbildung 9d).



Abbildung 9 Zurückgelegte Laufstrecke der gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und den jeweiligen Kontrolllinien. Zur Ermittlung der Laufdistanz wurde über 28 Tage täglich die Laufradumdrehung mittels eines Magnetsensors abgelesen und in km/24 h umgerechnet. (A) Mittlere zurückgelegte Wegstrecke der transgenen Mäuse in km/24 h (ungepaarter t-Test, *p<0,05). Die globalen KO Mäuse (B) und endothelialen KO Mäuse (C) laufen signifikant weniger als die jeweiligen Kontrollmäuse (RM-two-way ANOVA Sidak's multiple comparison test (B) *p<0,05). Die erythrozytären NOS3 KO Mäuse (D) zeigten keine verminderte Laufkapazität im Vergleich zu ihren Kontrollen.

3.2.1.2 Anatomische Adaptation

Die durch freiwillige physische Aktivität bedingten anatomischen Adaptationen wurden durch folgende Parameter ermittelt: Das Delta des Körpergewichtes jeweils vor und nach Beendigung des Protokolls, post I/R wurde zudem das Gewicht des Herzens sowie des *M. soleus* bestimmt und im Verhältnis zum Körpergewicht berechnet (**Tabelle 1**, **Abbildung 10**).

Tabelle 1 Körper-, Herz- und Muskelgewicht, sowie das auf das Körpergewicht bezogene Verhältnis der trainierten und untrainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien. Zur Analyse der anatomischen Adaptation wurde jeweils das Gewicht der Mäuse prä und post Protokoll sowie das Herz- und M. soleus-Gewicht post I/R ermittelt und die Relationen zum Körpergewicht berechnet. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und Sidak's multiple comparisons test). Freiwilliges Laufradtraining führt in WT, RBC NOS3 KO und den Kontrollmäusen zu einer anatomischen Adaptation an das freiwillige Laufradtraining, jedoch nicht in den globalen und EC NOS3 KO Mäusen.

Mittelwert±SEM								
Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert			
	Δ	Körpergev	wicht					
Global NOS3 KO	1,8±0,7	7	1,3±0,5	8	n.s.			
WT	4,0±0,3	14	2,3±0,3	12	**0,0017			
EC NOS3 KO	2,5±0,6	6	2,3±0,6	7	n.s.			
EC NOS3 WT	3,6±0,3	7	4,1±0,7	8	n.s.			
RBC NOS3 KO	3,3±0,5	12	0,1±0,6	12	***<0,001			
LoxP NOS3	3,7±0,4	9	$1,4\pm0,4$	8	***<0,001			
	He	erzgewicht	[mg]					
Global NOS3 KO	173,9±6,1	7	180,4±7,7	8	n.s.			
WT	145,5±6,7	14	157,8±4,0	12	***<0,001			
EC NOS3 KO	166,1±4,1	6	161,7±4,0	7	n.s.			
EC NOS3 WT	162,0±3,0	7	167,0±8,2	8	n.s.			
RBC NOS3 KO	181,5±7,1	12	182,8±4,1	12	n.s.			
LoxP NOS3	175,3±9,2	6	177,6±5,2	7	n.s.			
		HG/KC	Ĵ					
Global NOS3 KO	6,0±0,2	7	6,2±0,2	8	n.s.			
WT	5,4±0,3	14	6,1±0,2	12	***<0,001			
EC NOS3 KO	6,5±0,3	6	6,4±0,1	7	n.s.			
EC NOS3 WT	6,1±0,2	7	6,4±0,3	8	*0,046			
RBC NOS3 KO	6,0±0,2	12	6,7±0,2	12	***<0,001			
LoxP NOS3	6,7±0,3	6	7,2±0,3	7	**0,0013			
	Ĩ	M. soleus [[mg]					
Global NOS3 KO	5,8±0,4	7	8,4±0,6	8	***0,0001			
WT	$7,8\pm0,1$	14	8,8±0,2	12	***0,0001			
EC NOS3 KO	8,2±0,1	6	9,0±0,5	7	***0,0008			
EC NOS3 WT	8,9±0,2	7	9,4±0,4	8	*0,0210			
RBC NOS3 KO	9,2±0,2	12	9,5±0,2	12	n.s.			
LoxP NOS3	8,1±0,7	6	9,2±0,7	7	***0,0001			
		MG/KC	Ĵ					
Global NOS3 KO	0,2±0,01	7	0,3±0,02	8	***<0,001			
WT	0,3±0,01	14	$0,4{\pm}0,01$	12	***<0,001			
EC NOS3 KO	0,3±0,02	6	0,4±0,01	7	***<0,001			
EC NOS3 WT	$0,3\pm 0,01$	7	$0,4{\pm}0,02$	8	***<0,001			
RBC NOS3 KO	0,3±0,001	12	0,3±0,01	12	n.s.			
LoxP NOS3	$0,3\pm 0,02$	6	$0,4\pm0,02$	7	***<0,001			



Abbildung 10 Delta Körpergewicht (A), das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (B), das Muskelgewicht (C) und das Verhältnis von Muskelgewicht zu Körpergewicht (D) der trainierten und untrainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien. Graphische Darstellung ausgewählter Tabellenwerte aus Tabelle 1. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Trainierte WT, RBC NOS3 KO sowie die dazugehörigen Kontrollen (LoxP NOS3) zeigten eine signifikant geringere Körpergewichtzunahme im Vergleich zu den sesshaften Mäusen. Das Herzgewicht post I/R blieb in allen Linien, mit Ausnahme der WT, unabhängig vom Protokoll unverändert. Trainierte WT-Mäuse zeigten eine signifikante Erhöhung des Herzgewichtes im Vergleich zu den sesshaften Mäusen. Die physisch aktiven Kontrollmäuse und RBC NOS3 KO Mäuse zeigten ein signifikant erhöhtes Herzgewicht/Körpergewicht Verhältnis. Eine Zunahme der Soleus-Muskelmasse nach 4 wöchigem freiwilligen Training konnte in allen Linien bis auf die RBC NOS3 KO beobachtet werden. Ebenso stieg das Verhältnis von Muskelgewicht zu Körpergewicht in allen Linien signifikant im Vergleich zu den sesshaften Mäusen, mit Ausnahme der RBC NOS3 KO Mäuse.

3.2.2 Hämatologische Adaptation

Physische Aktivität kann hämatologische Adaptationen zur Folge haben. Um diese im Zusammenhang mit der gewebespezifischen NOS3 zu analysieren, wurden in den KO Linien das Blutbild sowie das Differentialblutbild, die Vollblutviskosität und die erythrozytäre Verformbarkeit bestimmt.

3.2.2.1 Blutbild

Zur Bestimmung des Blutbildes wurde den Mäusen retrorbital Blut abgenommen und in einem animal blood counter analysiert (**Tabelle 2**). Trainierte WT zeigten eine signifikant verringerte Blutplättchenkonzentration im Vergleich zu sesshaften Mäusen. Die Anzahl der weißen Blutzellen sank signifikant in trainierten RBC NOS3 KO Mäusen. Alle weiteren Parameter blieben unverändert.

Tabelle 2 Blutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien. Das Blutbild der jeweiligen Mäuse wurde nach Beendigung der Laufprotokolle mittels des vet abc Tm animal blood counter bestimmt (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und Sidak's multiple comparisons test). RBC: Erythrozyten, HGB: Hämoglobin, HCT: Hämatokrit, RDW: relative Verteilung der roten Blutzellen, MCV: mittleres zelluläres Volumen, MCH: mittleres korpuskuläres Hämoglobinkonzentration, PLT: Thrombozyten, MPV: mittleres Thrombozytenvolumen, WBC: weiße Blutzellen.

		Mi	ttelwert±SEM				
Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert		
RBC [10 ⁶ /mm ³]							
Global NOS3 KO	9,26±0,29	7	9,58±0,25	8	n.s.		
WT	10,31±0,31	18	10,12±0,34	16	n.s.		
EC NOS3 KO	8,73±0,58	9	8,61±0,62	9	n.s.		
EC NOS3 WT	9,02±0,07	6	9,61±0,31	9	n.s.		
RBC NOS3 KO	9,72±0,12	12	9,87±0,22	12	n.s.		
LoxP NOS3	9,85±0,18	9	9,77±0,34	8	n.s.		
		HGB [g/d]]				
Global NOS3 KO	15,47±0,57	7	15,85±0,35	8	n.s.		
WT	16,16±0,54	18	15,68±0,56	16	n.s.		
EC NOS3 KO	14,56±0,74	9	14,10±0,98	9	n.s.		
EC NOS3 WT	14,70±1,16	6	15,57±0,46	9	n.s.		
RBC NOS3 KO	14,79±0,28	12	14,43±0,46	12	n.s.		
LoxP NOS3	15,62±0,33	9	15,71±0,53	8	n.s.		
		HCT [%]					
Global NOS3 KO	52,34±2,07	7	52,39±2,80	8	n.s.		
WT	52,31±1,47	17	53,03±1,87	16	n.s.		
EC NOS3 KO	49,12±4,13	9	46,30±3,19	9	n.s.		
EC NOS3 WT	47,74±0,61	5	52,39±2,44	9	n.s.		
RBC NOS3 KO	50,68±1,25	12	52,93±1,79	12	n.s.		
LoxP NOS3	51,67±1,25	9	53,61±2,78	8	n.s.		

	ŀ	RDW [%]		
Global NOS3 KO	16,11±0,26	7	16,09±0,51	8	n.s.
WT	14,64±0,17	15	14,97±0,26	14	n.s.
EC NOS3 KO	15,54±0,42	9	15,67±0,59	9	n.s.
EC NOS3 WT	15,83±0,45	6	15,73±0,22	9	n.s.
RBC NOS3 KO	14,43±0,32	12	14,47±0,43	12	n.s.
LoxP NOS3	14,76±0,66	9	15,26±0,57	8	n.s.
	N	ICV [µ	m ³]		
Global NOS3 KO	56,43±0,86	7	57,25±1,97	8	n.s.
WT	51,83±0,39	18	51,81±0,46	16	n.s.
EC NOS3 KO	55,77±1,25	9	53,88±0,81	9	n.s.
EC NOS3 WT	52,67±0,33	6	53,83±0,95	9	n.s.
RBC NOS3 KO	51,92±0,9	12	53,50±1,24	12	n.s.
LoxP NOS3	52,44±0,53	9	54,62±1,22	8	n.s.
	N	MCH []	og]		
Global NOS3 KO	16,69±0,23	7	16,55±0,21	8	n.s.
WT	$15,65\pm0,12$	18	15,93±0,09	17	n.s.
EC NOS3 KO	16,88±0,47	9	16,47±0,40	9	n.s.
EC NOS3 WT	16,73±0,27	6	16,21±0,23	9	n.s.
RBC NOS3 KO	15,17±0,20	12	14,95±0,33	12	n.s.
LoxP NOS3	15,87±0,15	9	16,12±0,26	8	n.s.
	Μ	CHC [g/dl]		
Global NOS3 KO	29,61±0,51	7	29,09±0,71	8	n.s.
WT	30,28±0,21	18	30,74±0,29	16	n.s.
EC NOS3 KO	30,46±1,37	9	30,57±0,93	9	n.s.
EC NOS3 WT	31,70±0,62	6	29,97±0,74	9	n.s.
RBC NOS3 KO	29,23±0,52	12	27,40±0,74	12	n.s.
LoxP NOS3	30,27±0,42	9	29,56±0,93	8	n.s.
	PL	$T [10^3/$	mm ³]		
Global NOS3 KO	1737±110,2	7	1632±59,51	7	n.s.
WT	1752±47,21	18	1459±96,88	16	**0,0092
EC NOS3 KO	1598±162,59	9	1392±71,16	9	n.s.
EC NOS3 WT	1583±94,17	6	1517±88,31	9	n.s.
RBC NOS3 KO	1653±84,5	12	1489±74,68	12	n.s.
LoxP NOS3	1522±91,24	9	1369±85,37	8	n.s.
	Ν	1PV [µ	m ³]		
Global NOS3 KO	5,45±0,13	7	5,15±0,07	7	n.s.
WT	5,93±0,15	10	6,10±0,23	9	n.s.
EC NOS3 KO	6,0±0,1	9	5,76±0,16	8	n.s.
EC NOS3 WT	5,80±0,18	6	5,71±0,10	9	n.s.
RBC NOS3 KO	5,79±0,14	12	5,90±0,14	12	n.s.
LoxP NOS3	5,96±0,18	9	5,93±0,10	8	n.s.
	WB	$C [10^3]$	/mm ³]		
Global NOS3 KO	5,17±0,68	7	4,56±0,40	8	n.s.
WT	8,03±0,61	18	6,48±0,65	17	n.s.
EC NOS3 KO	6,64±0,36	9	5,24±0,53	9	n.s.
EC NOS3 WT	8,12±1,24	6	6,41±1,48	9	n.s.
RBC NOS3 KO	6,99±0,53	12	4,60±0,64	12	**0,0076
LoxP NOS3	8,56±0,51	9	6,92±0,64	8	n.s.

Des Weiteren wurde das Differentialblutbild bestimmt, in dem die Unterformen der Leukozyten bestimmt und quantifiziert wurden (**Tabelle 3**). Die Differentialblutbilder zeigten keine Trainings-abhängigen Veränderungen, mit Ausnahme der signifikanten Zunahme von Lymphozyten in den trainierten RBC NOS3 KO Mäusen im Vergleich zu physisch inaktiven Mäusen.

Tabelle 3 Differentialblutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien. Das EDTA-Blut der jeweiligen Mäuse wurde nach Beendigung der Laufprotokolle mittels des vet abc Tm animal blood counter analysiert (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und Sidak`s multiple comparisons test).

		Mit	telwert±SEM		
Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert
	Gr	anulozyter	n [%]		
Global NOS3 KO	15,14±2,76	7	13,04±1,06	8	n.s.
WT	21,78±2,53	14	16,70±1,35	13	n.s.
EC NOS3 KO	22,03±1,59	9	27,82±3,76	9	n.s.
EC NOS3 WT	19,27±2,53	6	19,25±2,47	9	n.s.
RBC NOS3 KO	16,96±1,22	9	13,00±1,67	10	n.s.
LoxP NOS3	14,53±1,56	9	14,96±2,38	8	n.s.
	Ly	mphozyter	n [%]		
Global NOS3 KO	80,91±3,20	7	83,03±1,24	8	n.s.
WT	73,52±2,78	14	78,59±1,57	13	n.s.
EC NOS3 KO	73,17±1,61	9	67,01±4,06	9	n.s.
EC NOS3 WT	75,72±2,35	6	76,86±2,57	8	n.s.
RBC NOS3 KO	78,65±1,41	11	85,76±2,41	12	*0,0284
LoxP NOS3	81,66±1,73	9	80,68±2,59	8	n.s.
	Ν	Ionozyten	[%]		
Global NOS3 KO	3,94±0,51	7	3,93±0,39	8	n.s.
WT	4,69±0,31	14	4,28±0,24	13	n.s.
EC NOS3 KO	4,78±0,36	9	5,16±0,45	9	n.s.
EC NOS3 WT	5,01±0,30	6	4,51±0,64	8	n.s.
RBC NOS3 KO	4,10±0,26	11	3,18±0,54	12	n.s.
LoxP NOS3	3,71±0,31	9	4,35±0,45	8	n.s.

3.2.2.2 Vollblutviskosität

Die Vollblutviskosität wurde mit heparinisierten Proben in einem Low Shear Viscosimeter (LS 300) untersucht. Die Messung der Viskosität [mPa*s] wurde bei 37°C dynamisch unter folgenden aufsteigenden Schergeschwindigkeiten gemessen: 5, 10, 17,7, 25,5, 33,2, 41,0 48,7, 56,4, 64,2, 71,9, 79,6 [s⁻¹] (**Abbildung 11**).

Physische Aktivität führte zu keiner Veränderung der Vollblutviskosität, weder in den KO Mauslinien, noch in den Kontrolllinien.



Abbildung 11 Vollblutviskosität der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien. Die Vollblutviskosität wurde mittels des Low Shear LS 300 bei 37°C unter aufsteigender Schergeschwindigkeit (5-79s⁻¹) gemessen. Die Viskosität des Blutes blieb nach 4 Wochen freiwilliger physischer Aktivität in den globalen NOS3 KO (A), WT (B), EC NOS3 KO (C) RBC NOS3 KO (E) sowie deren Kontrolllinie (D, F) unverändert (RM two-way ANOVA Sidak's multiple comparisons test).

3.2.2.3 Erythrozytäre Verformbarkeit

Die Verformbarkeit der roten Blutkörperchen wurde mittels Ektazytometrie in einem optisch rotierendem Laser Erythrozyten-Analysator unter steigendem Scherstress (Pa) gemessen (**Tabelle 4**). Es konnten keine signifikanten Trainings-abhängigen Unterschiede in der Deformierbarkeit der Erythrozyten in gewebespezifischen NOS3 KO Mäusen und den Kontrolllinien gemessen werden.

Tabelle 4 Erythrozytäre Verformbarkeit der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien unter verschiedenen Schergeschwindigkeiten. Die Messung erfolgte bei 37°C im LORRCA unter steigendem Scherstress (Pa). Die Erythrozyten der physisch aktiven Mäuse zeigten keine signifikanten Veränderungen der Deformierbarkeit im Vergleich zu den inaktiven Mäusen in allen KO Linien und den dazugehörigen Kontrolllinien (Multipler t-Test korrigiert mit Holm-Sidak).

pos	t Protokoll	EI (A.U.) Mittelwert±SEM					
	Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert	
	global NOS3 KO	0,23±0,012	7	$0,22\pm0,023$	8	n.s.	
	wt	$0,18\pm0,009$	17	0,19±0,01	16	n.s.	
3	EC NOS3 KO	0,15±0,009	8	0,17±0,007	8	n.s.	
0,	EC NOS3 WT	0,19±0,020	3	0,16±0,009	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	0,16±0,004	12	0,16±0,01	12	n.s.	
	LoxP NOS3	$0,17\pm0,004$	8	$0,17\pm0,004$	6	n.s.	
53	global NOS3 KO	0,28±0,012	7	0,28±0,021	8	n.s.	
	wt	$0,24{\pm}0,008$	17	$0,24\pm0,009$	16	n.s.	
	EC NOS3 KO	$0,20\pm0,009$	8	$0,22\pm0,006$	8	n.s.	
0,	EC NOS3 WT	$0,24{\pm}0,030$	3	0,21±0,010	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	0,21±0,004	12	0,23±0,01	12	n.s.	
	LoxP NOS3	$0,23\pm0,004$	8	$0,23\pm0,004$	6	n.s.	
	global NOS3 KO	0,35±0,010	7	$0,35\pm0,017$	8	n.s.	
	wt	0,31±0,007	17	$0,32\pm0,008$	16	n.s.	
95	EC NOS3 KO	$0,28\pm0,008$	8	$0,30\pm0,005$	8	n.s.	
0,0	EC NOS3 WT	0,31±0,020	3	0,29±0,010	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	0,29±0,004	12	$0,30\pm0,001$	12	n.s.	
	LoxP NOS3	0,31±0,003	8	0,31±0,003	6	n.s.	
	global NOS3 KO	0,41±0,009	7	0,41±0,014	8	n.s.	
	wt	$0,38\pm0,006$	17	$0,39{\pm}0,006$	16	n.s.	
69	EC NOS3 KO	$0,35\pm0,007$	8	$0,37\pm0,004$	8	n.s.	
1,	EC NOS3 WT	0,39±0,014	3	$0,36\pm0,009$	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	0,37±0,004	12	0,38±0,009	12	n.s.	
	LoxP NOS3	$0,38\pm0,003$	8	$0,38\pm0,003$	6	n.s.	
	global NOS3 KO	$0,47\pm0,007$	7	0,47±0,010	8	n.s.	
	wt	$0,45\pm0,004$	17	0,45±0,005	16	n.s.	
~	EC NOS3 KO	$0,42\pm0,005$	8	0,43±0,003	8	n.s.	
	EC NOS3 WT	$0,45\pm0,008$	3	0,43±0,007	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	0,43±0,003	12	0,44±0,005	12	n.s.	
	LoxP NOS3	0,44±0,002	8	0,44±0,002	6	n.s.	
	global NOS3 KO	0,51±0,005	7	$0,51\pm0,008$	8	n.s.	
	wt	0,49±0,003	17	$0,50\pm0,004$	16	n.s.	
33	EC NOS3 KO	$0,48\pm0,004$	8	$0,48\pm0,003$	8	n.s.	
5,	EC NOS3 WT	$0,50\pm0,005$	3	$0,48\pm0,006$	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	$0,49\pm0,003$	12	$0,50\pm0,009$	12	n.s.	
	LoxP NOS3	0,49±0,002	8	$0,49\pm0,002$	6	n.s.	
	global NOS3 KO	$0,54{\pm}0,002$	7	$0,54{\pm}0,005$	8	n.s.	
∞	wt	$0,53\pm0,003$	17	0,53±0,003	16	n.s.	
9,4	EC NOS3 KO	$0,52\pm0,003$	8	$0,52\pm0,003$	8	n.s.	
	EC NOS3 WT	$0,53\pm0,004$	3	$0,52\pm0,005$	6	n.s.	
	RBC NOS3 KO	$0,53\pm0,003$	12	$0,53\pm0,004$	12	n.s.	

	LoxP NOS3	0,53±0,002	8	0,53±0,002	6	n.s.
	global NOS3 KO	0,56±0,001	7	0,57±0,002	8	n.s.
	wt	0,56±0,002	17	$0,56\pm0,002$	16	n.s.
87	EC NOS3 KO	0,55±0,003	8	0,55±0,003	8	n.s.
16.	EC NOS3 WT	0,56±0,003	3	$0,55\pm0,005$	6	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,56±0,003	12	0,56±0,004	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,56±0,002	8	$0,59\pm0,002$	6	n.s.
	global NOS3 KO	0,58±0,003	7	$0,59\pm0,002$	8	n.s.
	wt	$0,58\pm0,002$	17	$0,58\pm0,002$	16	n.s.
66	EC NOS3 KO	0,58±0,002	8	0,58±0,003	8	n.s.
29.	EC NOS3 WT	0,59±0,002	3	$0,58\pm0,004$	6	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,58±0,003	12	0,59±0,003	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,59±0,001	8	$0,56\pm0,002$	6	n.s.
	global NOS3 KO	0,60±0,005	7	$0,60\pm0,004$	8	n.s.
	wt	0,60±0,001	17	$0,60\pm0,002$	16	n.s.
33	EC NOS3 KO	0,61±0,003	8	0,61±0,003	8	n.s.
53.	EC NOS3 WT	0,61±0,005	3	$0,60\pm0,002$	6	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,60±0,002	12	0,60±0,001	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,61±0,001	8	0,61±0,001	6	n.s.

Zusätzlich wurde die maximale Elongation (EI_{max}) und die Scherrate, die notwendig ist um die Hälfte der maximalen Elongation ($SS_{1/2}$) zu erreichen, berechnet (**Abbildung 12**).

Der maximale Elongationsindex der NOS3 KO Mäuse und Kontrolllinien blieb unabhängig vom Training unverändert (Abbildung 12A, C, E).

Bei dem Scherstress, welcher nötig ist, um die Hälfte der maximalen Elongation zu erreichen, gab es jedoch Unterschiede zwischen den Globalen NOS3 KO und WT und in den EC NOS3 KO Mäusen. Die untrainierten Globalen NOS3 KO Mäuse zeigten einen verringerten $SS_{1/2}$ gegenüber untrainierten WT (**Abbildung 12B**). Die untrainierten EC NOS3 KO Mäuse zeigten gegenüber den Trainierten einen erhöhten $SS_{1/2}$ (**Abbildung 12D**). In den RBC NOS3 und der dazugehörigen Kontrollgruppe wurden keine Unterschiede festgestellt (**Abbildung 12F**).



Abbildung 12 Maximaler Elongationsindex (EImax) und Scherstress der notwendig ist, um die Hälfte des EI_{max} zu erreichen (SS_{1/2}) der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien. Der EImax blieb in allen Mauslinien (A) WT und Global NOS3 KO, (C) EC NOS3 KO und EC NOS3 WT und (E) RBC NOS3 KO und LoxP unverändert. Untrainierte globale NOS3 KO Mäuse zeigten gegenüber den WT einen verminderten SS_{1/2}, (B). Der SS_{1/2}-Wert untrainierter EC NOS3 KO Mäuse ist gegenüber den Trainierten erhöht (D). Die RBC NOS3 KO Mäuse und CTRL zeigten keine Unterschiede im SS_{1/2}-Wert. 2wayANOVA und Sidak`s multiple comparisons test *p<0,05, untrainiert/trainiert n: WT=17/16, Global NOS3 KO n=7/8, EC NOS3 WT n=3/6, EC NOS3 KO n=8/8, RBC NOS3 KO n=12/12, LoxP NOS3 n=8/6. Darstellung als Boxplot (Tukey's).

3.2.3 Vaskuläre Adaptation

Um die vaskuläre Adaptation an physische Aktivität zu untersuchen, wurde die Fluss-mediierte Dilatation (FMD) *in vivo* gemessen (**Abbildung 13**). Hierfür wurde eine Druckmanschette am Hinterlauf der jeweiligen Mäuse befestigt und für 5 min. die *Arteria iliaca* okkludiert. Mittels Ultraschall wurden in der darauf folgenden Reperfusion die Veränderungen des Gefäßquerschnitts aufgenommen und vermessen. Im Normalfall tritt bei einer Gefäßstauung eine Vasokonstriktion auf, bei anschließender Lösung des Gefäßstaus eine Vasodilatation, wie es in die Kontrollgruppen (**Abbildung 13**B, D, F) sowie in den RBC NOS3 KO Mäusen (**Abbildung 13**E) der Fall ist. Es konnte keine Fluss-mediierte Vasodilatation in den globalen (**Abbildung 13**A) und endothelialen NOS3 KO Mäusen (**Abbildung 13**C) festgestellt werden. Generell führte die freiwillige körperliche Aktivität der Mäuse zu keiner signifikanten Erhöhung der Gefäßdilatation, jedoch konnte in den CTRL der global NOS3 KO eine signifikant länger anhaltende Gefäßweitung im Vergleich zu den sesshaften Mäusen gemessen werden (**Abbildung 13**B).



Abbildung 13 FMD der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien. Zur Messung der endothelialen Funktion wurde die Fluss-vermittelte Dilatation (FMD) mittels Ultraschall bestimmt. Nach einer 5 minütigen Okklusion der Beinarterie wurde diese gelöst und im Abstand von 20 s Aufnahmen des in der Reperfusion dilatierenden Gefäßquerschnitts gemacht. Die Gefäßdilatation wurde prozentual zum Ausgangsdurchmesser der Arterie unter normalen Flussbedingungen berechnet. Globale (A) und EC NOS3 KO (C) zeigten unabhängig von der physischen Aktivität keine FMD. In trainierten WT (B) wurde eine prolongierte Vasodilatation, im Vergleich zu den inaktiven Mäusen festgestellt (**p<0,01). Die Fluss vermittelte Vasodilatation in RBC NOS3 KO (E) sowie der dazugehörigen CTRL und der CTRL der EC NOS3 KO (D) blieb unverändert nach physischer Aktivität. Die statistische Auswertung zwischen den FMD-Werten der trainierten und untrainierten Mäuse erfolgte mittels einer RM 2way ANOVA Sidak's multiple comparison test.

3.2.4 Kardiale Adaptation

Mögliche kardiale Adaptationen der gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse wurden mittels Echokardiographie jeweils 24 h nach Beendigung der Protokolle untersucht (**Tabelle 5**). Hierbei wurden folgende Parameter analysiert: die Herzrate in Schlägen pro Minute (HR), das in der Systole vom Herzen ausgestoßene Schlagvolumen in μ L (SV), das Herzzeitvolumen in ml/min (HZV), das enddiastolische (EDV) – und endsystolische Volumen (ESV) in μ L sowie die Ejektionsfraktion (EF) in %, welche die Fraktion des enddiastolischen Volumens, welches bei jedem Herzschlag ausgestoßen wird, angibt.

Tabelle 5 Kardiale Parameter der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien. Die kardiale Adaptation der Mäuse an chronische physiologische Belastungen wurde mit Hilfe der Echokardiographie im sedierten Zustand analysiert. Die Ultraschallanalyse erfolgte unmittelbar nach Beendigung des Trainings- bzw. sesshaften Protokolls. HR Herzrate, SV Schlagvolumen, HZV Herzzeitvolumen, EDV enddiastolisches Volumen, ESV endsystolisches Volumen. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test).

	Mittelwert±SEM					
Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert	
		HR [BPN	[]			
Global NOS3 KO	360,1±12,1	7	372,7±12,0	8	n.s.	
WT	449,8±12,4	14	438,5±16,8	12	n.s.	
EC NOS3 KO	457,2±16,7	8	421,6±8,3	10	n.s.	
EC NOS3 WT	463,2±13,1	10	438,1±12,4	10	n.s.	
RBC NOS3 KO	440,9±13,2	11	423±14,0	12	n.s.	
LoxP NOS3	455,3±16,3	8	460,6±13,7	6	n.s.	
		SV [µL]]			
Global NOS3 KO	33,5±2,2	7	31,4±2,7	8	n.s.	
WT	26,9±1,3	14	32,1±0,8	12	*0,03	
EC NOS3 KO	26,7±2,5	8	30,1±2,2	10	n.s.	
EC NOS3 WT	32,2±1,7	10	38,5±1,7	9	n.s. 0,06	
RBC NOS3 KO	36,1±2,4	11	41,5±1,6	12	n.s. 0,06	
LoxP NOS3	31,6±2,9	8	35,3±3,5	6	n.s.	
	Н	ZV [mL/r	nin]			
Global NOS3 KO	12,4±0,6	7	11,7±1,1	8	n.s.	
WT	12,0±0,5	14	13,9±0,5	12	*0,05	
EC NOS3 KO	12,4±1,4	8	12,6±1,0	10	n.s.	
EC NOS3 WT	14,9±0,9	10	15,9±0,9	10	n.s.	
RBC NOS3 KO	15,9±1,2	11	17,5±0,9	12	n.s.	
LoxP NOS3	14,5±1,5	8	16,1±1,2	6	n.s.	
		EDV [µI	[_]			
Global NOS3 KO	70,2±4,1	7	73,3±3,3	8	n.s.	
WT	61,5±2,2	14	70,8±3,8	12	n.s. 0,06	
EC NOS3 KO	59,3±3,4	8	64,5±2,1	10	n.s.	
EC NOS3 WT	63,8±2,8	10	72,4±3,4	9	n.s.	
RBC NOS3 KO	73,1±3,6	11	76,5±2,7	12	n.s.	
LoxP NOS3	67,3±4,6	8	67,4±5,3	6	n.s.	
		ESV [μΙ	_]			
Global NOS3 KO	38,1±2,2	7	41,9±2,7	8	n.s.	
WT	34,5±1,8	14	36,6±2,5	12	n.s.	
EC NOS3 KO	32,6±2,6	8	34,4±2,9	10	n.s.	
EC NOS3 WT	31,5±1,9	10	36,3±2,3	10	n.s.	

RBC NOS3 KO	37,1±3,0	11	35,1±2,4	12	n.s.
LoxP NOS3	35,7±3,0	8	32,1±2,6	6	n.s.
		EF [%]		
Global NOS3 KO	45,4±2,7	7	42,9±3,5	8	n.s.
WT	43,8±1,7	14	48,6±1,9	12	n.s.
EC NOS3 KO	42,7±3,6	8	44,7±3,0	10	n.s.
EC NOS3 WT	50,5±2,0	10	51,7±2,2	10	n.s.
RBC NOS3 KO	49,5±3,1	11	54,5±2,1	12	n.s.
LoxP NOS3	46,2±2,9	8	52,4±2,0	6	n.s.

Trainierte WT zeigten ein um 14 % signifikant erhöhtes Schlagvolumen im Vergleich zu untrainierten Mäusen. Aufgrund des erhöhten Schlagvolumens stieg ebenfalls das Herzzeitvolumen signifikant um 1,9 mL/min, da es von der Herzrate und dem Schlagvolumen abhängig ist. Zusätzlich zeigten trainierte WT ein um 9 µL tendenziell erhöhtes enddiastolisches Volumen. Eine tendenzielle Erhöhung des Schlagvolumens konnte ebenfalls in physisch aktiven Kontrollmäusen der EC NOS3 KO gemessen werden und in den RBC NOS3 KO Mäusen.

3.3 Die Rolle der gewebespezifischen NOS3 in der durch körperliches Training vermittelten Kardioprotektion

In wie weit die gewebespezifische NOS3 einen Einfluss auf die durch physische Aktivität induzierte kardiale Protektion nach einer Ischämie/Reperfusions-Verletzung hat, wurde durch eine experimentell ausgelöste Ischämie der linken Koronararterie untersucht. Hierbei wurden die Mäuse 24 h nach den jeweiligen Lauf- oder sesshaften Protokollen einer 45-minütigen Koronar-Ischämie mit anschließender 24-stündiger Reperfusion unterzogen. Die Infarktgröße wurde mittels TTC-Färbung ausgewertet.

3.3.1 Myokardinfarkt

Physisch aktive und sesshafte globale NOS3 KO Mäuse zeigten keine Unterschiede in der Infarktgröße bei einem gleich großen Risikoareal. Wohingegen die trainierten Kontrollmäuse eine signifikant um 13,9% verringerte Infarktgröße aufwiesen (Abbildung 14).



Abbildung 14 Area at Risk des linken Ventrikels und die Infarktgröße pro AAR in trainierten und untrainierten WT (A, C) und globalen NOS3 KO Mäusen (B, D). Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte 24 h post Protokoll durch eine 45 min. Ligation der LAD und anschließender 24 h Reperfusion. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte durch TTC-Färbung. Trainierte WT zeigten bei gleicher AAR einen signifikant kleineren Infarkt im Vergleich zu physisch inaktiven Mäusen (ungepaarter t-Test *p<0,05). Wohingegen es keine Unterschiede in globalen NOS3 KO Mäusen gab. Darstellung als Boxplot (Tukey's). Repräsentative Schnitte des Herzens.

Die EC NOS3 KO Mäuse zeigten ebenfalls wie die globalen NOS3 KO Mäuse keine durch das freiwillige Training veränderte Infarktgröße. Konträr dazu zeigte die Kontrolllinie eine durch physische Aktivität um 14 % verminderte Infarktgröße (**Abbildung 15**).



Abbildung 15 Area at Risk des linken Ventrikels und Infarktgröße pro AAR in trainierten und untrainierten EC NOS3 KO (A, C) und der EC NOS3 WT Kontrolllinie (B, D). Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte 24 h post Protokoll durch eine 45 min. Ligation der LAD und anschließender 24 h Reperfusion. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte durch TTC-Färbung. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infarktgrößen der untrainierten und trainierten EC NOS3 KO Mäusen. Trainierte EC NOS3 WT zeigten bei gleicher AAR einen signifikant kleineren Infarkt im Vergleich zu physisch inaktiven Mäusen (ungepaarter t-Test *p<0,05). Darstellung als Boxplot (Tukey's). Repräsentative Schnitte des Herzens.

Physische Aktivität führte sowohl in den erythrozytären NOS3 KO Mäusen als auch in der korrespondierenden Kontrolllinie zu einer signifikanten Verminderung der Infarktgröße (Abbildung 16).



Abbildung 16 Area at Risk des linken Ventrikels und Infarktgröße pro AAR in trainierten und untrainierten RBC NOS3 KO (A, C) und der loxP NOS3 Kontrolllinie (B, D). Die Induktion des Myokardinfarktes erfolgte 24 h post Protokoll durch eine 45 min. Ligation der LAD und anschließender 24 h Reperfusion. Die Ermittlung der Infarktgröße erfolgte durch TTC-Färbung. Sowohl in den RBC NOS3 KO (*p<0,05) als auch in der Kontrolllinie (p=0,011), zeigten trainierte Mäuse einen signifikant kleinen MI im Vergleich zu den physisch inaktiven Mäusen bei gleicher AAR (ungepaarter t-Test). Darstellung als Boxplot (Tukey's). Repräsentative Schnitte des Herzens.

3.3.2 Kardiale Parameter post I/R

Um die Auswirkungen des induzierten Myokardinfarktes auf die kardiale Funktion zu evaluieren, wurden die Mäuse nach der 24 stündigen Reperfusion erneut einer Echokardiographie unterzogen (**Tabelle 6**).

Die trainierten globalen NOS3 KO Mäuse zeigten ein vergrößertes EDV sowie ESV gegenüber den sesshaften Mäusen. Die trainierte WT Kontrolllinie hingegen zeigte gegenüber den physisch inaktiven Mäusen ein um 7 μ L erhöhtes SV sowie ein vergrößertes HZV. In WT führt die körperliche Bewegung zu einer besser konservierten kardialen Funktion post I/R. Die endothelialen NOS3 KO Mäuse sowie die dazugehörige Kontrolllinie zeigten keine Trainingsabhängigen Unterschiede post I/R in der kardialen Funktion. Die erythrozytären NOS3 KO Mäuse hingegen zeigten, wie bereits bei den WT, eine durch Training besser konservierte kardiale Funktion post I/R im Vergleich zu den sesshaften Mäusen. Dies spiegelt sich in einer erhöhten Herzrate (HR), einem größeren HZV, einem verminderten ESV und einer erhöhten Ejektionsfraktion (EF) wider. Die Kontrolllinie zeigte keine Unterschiede in der HR, des SV und HZV. Alle weiteren Parameter stimmen jedoch überein mit den RBC NOS3 KO Mäusen.

Tabelle 6 Kardiale Parameter der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien 24 h nach dem MI. Die kardiale Funktion der Mäuse wurde 24 h nach der Induktion des Myokardinfarktes mit Hilfe der Echokardiographie im sedierten Zustand analysiert. HR Herzrate, SV Schlagvolumen, HZV Herzzeitvolumen, EDV enddiastolisches Volumen, ESV endsystolisches Volumen. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test).

	Mittelwert±SEM							
untrainiert								
Mauslinie	I/R	n-Zahl	trainiert I/R	n-Zahl	p-Wert			
		HR [BPN	Л]					
Global NOS3 KO	370,4±58,9	7	384,7±36,7	7	n.s.			
WT	489,7±13,0	13	474,4±14,8	12	n.s.			
EC NOS3 KO	491,3±19,3	6	482,5±14,8	7	n.s.			
EC NOS3 WT	465,0±17,2	7	436,0±14,4	8	n.s			
RBC NOS3 KO	451,2±15,4	11	506,4±13,7	12	*0,0372			
LoxP NOS3	472,0±27,5	4	478,5±30,6	5	n.s.			
		SV [µL]					
Global NOS3 KO	22,38±1,2	7	28,95±3,5	7	n.s.			
WT	20,69±1,6	13	27,09±1,9	12	*0,0356			
EC NOS3 KO	20,41±2,4	6	21,93±1,4	7	n.s.			
EC NOS3 WT	22,90±2,8	7	24,20±2,1	8	n.s			
RBC NOS3 KO	23,60±1,9	11	30,28±1,8	12	n.s			
LoxP NOS3	26,29±8,5	4	30,41±3,4	5	n.s.			
HZV[mL/min]								
Global NOS3 KO	7,86±0,4	7	11,06±1,3	7	n.s.			
WT	$10,02\pm0,7$	13	12,91±1,0	12	*0,0323			
EC NOS3 KO	9,95±1,2	6	10,66±0,9	7	n.s.			
EC NOS3 WT	$10,60\pm1,1$	7	11,90±1,3	8	n.s			
RBC NOS3 KO	10,64±1,0	11	15,45±1,1	12	*0,0234			
LoxP NOS3	12,50±4,3	4	14,69±1,0	5	n.s. 0,6321			
EDV [µL]								
Global NOS3 KO	54,06±2,9	7	72,76±5,1	7	**0,0075			
WT	53,07±2,6	13	62,85±3,2	12	n.s.			
EC NOS3 KO	54,51±3,8	6	58,78±4,6	7	n.s.			
EC NOS3 WT	53,70±4,1	7	54,90±2,3	8	n.s			
RBC NOS3 KO	66,49±4,1	11	65,45±2,8	12	n.s.			
LoxP NOS3	68,37±7,5	4	60,25±5,0	5	n.s.			
		ESV [μΙ	_]					
Global NOS3 KO	30,34±2,6	7	43,81±4,8	7	*0,0212			

WT	32,39±2,5	13	35,76±2,5	12	n.s.
EC NOS3 KO	34,09±3,4	6	36,85±4,8	7	n.s.
EC NOS3 WT	$30,80\pm3,1$	7	30,81±3,2	8	n.s
RBC NOS3 KO	42,89±2,7	11	35,17±2,2	12	n.s.0,05
LoxP NOS3	42,08±3,9	4	29,84±3,0	5	n.s. 0,06
		EF [%]		
Global NOS3 KO	44,21±2,5	7	40,01±4,3	7	n.s.
WT	39,50±3,2	13	43,22±2,1	12	n.s.
EC NOS3 KO	34,66±4,4	6	39,13±2,7	7	n.s.
EC NOS3 WT	42,42±4,0	7	42,20±4,3	8	n.s
RBC NOS3 KO	35,24±1,8	11	46,31±2,1	12	***0,0006
LoxP NOS3	28,40±2,2	4	51,88±3,4	5	***<0,0010

3.3.3 Hämatologische Parameter post I/R

Nachdem die gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse einer I/R-Operation unterzogen wurden, wurden nach anschließenden 24 Stunden die hämatologischen Parameter untersucht.

3.3.3.1 Blutbild

Die post operative Analyse des Blutbildes zeigte bezüglich der erythrozytären Zusammensetzung keine Trainings-abhängigen Unterschiede, sowohl in den gewebespezifischen NOS3 KO Mäusen, als auch in den Kontrolllinien (**Tabelle 7**). Aktive WT zeigten post I/R eine erhöhte mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration sowie eine reduzierte Anzahl der weißen Blutzellen (WBC).

Tabelle 7 Blutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien 24 h post I/R. Das Blutbild der jeweiligen Mäuse wurde 24 h nach der Induktion eines Myokardinfarktes mittels des vet abcTm animal blood counter bestimmt. (Vergleich zwischen untrainierten und trainierten Mäusen mit einem ungepaarten T-test). RBC: Erythrozyten, HGB: Hämoglobin, HCT: Hämatokrit, RDW: relative Verteilung der roten Blutzellen, MCV: mittleres zelluläres Volumen, MCH: mittleres korpuskuläres Hämoglobin, MCHC: mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration, PLT: Thrombozyten, MPV: mittleres Thrombozytenvolumen, WBC: weiße Blutzellen. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test).

	Mittelwert±SEM					
Mauslinie	untrainiert I/R	n-Zahl	trainiert I/R	n-Zahl	p-Wert	
$RBC [10^6/mm^3]$						
Global NOS3 KO	8,64±0,25	7	8,63±0,2	7	n.s.	
WT	8,45±0,26	18	8,74±0,27	16	n.s.	
EC NOS3 KO	7,46±0,53	6	7,93±0,09	7	n.s.	
EC NOS3 WT	6,99±0,45	5	7,53 0,55	6	n.s.	
RBC NOS3 KO	8,57±0,27	11	8,18±0,48	12	n.s.	
LoxP NOS3	7,4±0,29	6	7,57±0,58	6	n.s.	
HGB [g/dl]						

Global NOS3 KO	14,81±0,42	7	14,87±0,27	7	n.s.			
WT	$13,56\pm0,40$	18	14,0±0,43	16	n.s.			
EC NOS3 KO	12,28±0,93	6	13,04±0,16	7	n.s.			
EC NOS3 WT	11,74±0,63	5	12,58±1,01	6	n.s.			
RBC NOS3 KO	13,20±0,42	11	13,08±0,72	12	n.s.			
LoxP NOS3	12,1±0,37	6	12,61±0,84	6	n.s.			
	H	HCT [%]					
Global NOS3 KO	47,13±1,38	7	47,76±1,02	7	n.s.			
WT	43,76±1,22	18	45,42±1,42	16	n.s.			
EC NOS3 KO	39,6±2,94	6	44,41±0,95	7	n.s.			
EC NOS3 WT	37,88±2,16	5	40,62±3,29	6	n.s.			
RBC NOS3 KO	45,6±1,59	11	44,4±2,55	12	n.s.			
LoxP NOS3	37,91±1,67	6	39,87±3,02	6	n.s.			
	R	DW	%]					
Global NOS3 KO	15,71±0,09	7	15,91±0,19	7	n.s.			
WT	15,64±0,54	15	14,95±0,12	13	n.s.			
EC NOS3 KO	13.93±1.55	9	16.72±0.59	7	n.s.			
EC NOS3 WT	16.24±0.61	5	16.02 ± 0.37	6	n.s.			
RBC NOS3 KO	15.24±0.34	11	14.86±0.22	12	n.s.			
LoxP NOS3	14.68 ± 0.53	6	14.83 ± 0.24	6	n s			
	M	CV [u	m^{3}]					
Global NOS3 KO	54 43±0 20	7	55.43 ± 0.29	7	ns			
WT	$52,50\pm0,71$	18	51.93 ± 0.43	16	n s			
EC NOS3 KO	<u>52 83+0 79</u>	6	56 14+1 33	7	n s			
EC NOS3 WT	54 60+0 87	6	53 83+0 95	5	n s			
RBC NOS3 KO	53 18+0 77	11	54 33+1 01	12	n s			
LoxP NOS3	$53,10\pm0,77$ 51 16+0 47	6	$57,35\pm1,01$ 52,83+0,7	6	n.s.			
MCH [pg]								
Global NOS3 KO	17 14+0 11	<u>7</u>	17 23+0 26	7	ns			
WT	$15,67\pm0,15$	18	16,09+0,13	16	n.s.			
FC NOS3 KO	$16,07\pm0,13$	6	$16,09\pm0,19$	7	n s			
EC NOS3 WT	16,88+0,34	5	16, 70+0.40	6	n.s.			
RBC NOS3 KO	$15,00\pm0,019$	11	$16,70\pm0,10$ 16,05±0,18	12	n s			
LovP NOS3	$15,40\pm0,19$ 15 86+0 49	6	$16,05\pm0,10$ 16,76+0,42	6	n.s.			
LOAI NOBS	10,00±0,47 M(o/dl]	0	11.5.			
Global NOS3 KO	31 /1+0 13	$\frac{110}{7}$	31 16+0 37	7	ne			
WT	$31,41\pm0,13$ 20 07 ±0.38	18	$31,10\pm0,37$ $30,00\pm0,21$	16	*0 0300			
FC NOS3 KO	2,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	6	$30,77\pm0,21$	7	0,0507			
EC NOS3 WT	$31,0\pm0,07$ 31,02\pm0.85	5	$29,44\pm0,71$ 31.07 ±0.04	6	n.s.			
PPC NOS2 KO	$31,02\pm0,03$ 20.01±0.40	11	$\frac{31,07\pm0,94}{20,62\pm0.50}$	12	n.s.			
L ov D NOS3 KU	$29,01\pm0,49$	6	$29,02\pm0,39$ 21.21 ±0.20	12	11.S.			
LUXF NOSS		$\frac{0}{10^{3}}$	$\frac{31,01\pm0,09}{100000000000000000000000000000000000$	0	11.5.			
$\frac{\Gamma L I \left[1 V / IIIII \right]}{Clobal NOS2 KO} = \frac{1000 \pm 49.29}{5} = \frac{5}{1721 \pm 27.79} = 7$								
GIODAI NOSS KU	1989±48,28) 17	$1/21\pm 3/,/8$ 1620 ± 61.56	16	n.s.			
	1/09±58,61	1/	1630±61,56	16	n.s.			
EC NOS3 KO	1704±60,38	6	$1502\pm/3,49$	1	n.s.			
EC NUS3 WT	1841±182,/	4	1039±10,02	4	n.s.			
KBC NOS3 KO	1632±65,29	10	1386±106,57	12	n.s.			
LOXP NOS3	1508±48,21	0	$\frac{12/3\pm109,6}{31}$	6	n.s.			
01.1.1.1.2000.220	M	<u></u> ΥΥ [μ	<u>m[°]]</u>					
Global NOS3 KO	5,06±0,02	5	5,07±0,03	7	n.s.			

WT	5,91±0,15	12	5,81±0,11	10	n.s.		
EC NOS3 KO	6,16±0,08	6	6,36±0,26	6	n.s.		
EC NOS3 WT	6,23±0,19	4	5,98±0,21	5	n.s.		
RBC NOS3 KO	5,89±0,09	10	5,9±0,11	12	n.s.		
LoxP NOS3	5,9±0,14	6	5,93±0,13	6	n.s.		
WBC [10 ³ /mm ³]							
Global NOS3 KO	4,41±0,32	7	4,85±0,34	7	n.s.		
WT	6,90±0,60	18	4,97±0,66	16	*0,0329		
EC NOS3 KO	$5,56\pm0,78$	6	6,31±0,99	7	n.s.		
EC NOS3 WT	5,06±1,11	5	4,40±0,87	6	n.s.		
RBC NOS3 KO	5,0±0,66	11	4,29±0,63	12	n.s.		
LoxP NOS3	3,95±0,54	6	4,5±0,97	6	n.s.		

Ebenfalls wurde post I/R eine Analyse des Differentialblutbildes durchgeführt (**Tabelle 8**). Der prozentuale Anteil der Granulozyten und Lymphozyten blieb in allen Linien unabhängig vom aktiven oder inaktiven Status unverändert. Die trainierten LoxP NOS3 Mäuse zeigten eine signifikante Abnahme der Monozyten im Vergleich zu den physisch inaktiven Mäusen.

Tabelle 8 Differentialblutbild der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse und der Kontrolllinien 24 h post I/R. Das EDTA-Blut der jeweiligen Mäuse wurde nach Beendigung der Laufprotokolle mittels des vet abc Tm animal blood counter analysiert. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test).

	Mittelwert±SEM						
Mauslinie	untrainiert I/R	n-Zahl	trainiert I/R	n-Zahl	p-Wert		
Granulozyten [%]							
Global NOS3 KO	25,82±1,74	7	31,36±1,77	7	n.s.		
WT	33,62±3,40	14	28,67±0,83	10	n.s.		
EC NOS3 KO	41,88±4,31	6	36,75±3,61	7	n.s.		
EC NOS3 WT	29,00±4,40	5	28,04±1,43	5	n.s.		
RBC NOS3 KO	35,48±3,28	9	27,13±2,79	10	n.s.		
LoxP NOS3	32,65±5,87	6	29,96±4,18	6	n.s.		
	Lymp	hozyten	[%]				
Global NOS3 KO	66,60±2,21	7	60,39±1,90	7	n.s.		
WT	59,94±3,88	14	62,69±2,33	10	n.s.		
EC NOS3 KO	51,64±5,36	6	57,08±3,66	7	n.s.		
EC NOS3 WT	63,86±3,95	5	62,98±1,80	5	n.s.		
RBC NOS3 KO	55,53±3,94	10	64,55±3,29	12	n.s.		
LoxP NOS3	56,93±5,98	6	64,26±3,91	6	n.s.		
Monozyten [%]							
Global NOS3 KO	7,61±0,54	7	8,25±0,23	7	n.s.		
WT	6,42±0,54	14	5,76±0,45	10	n.s.		
EC NOS3 KO	8,38±0,88	6	6,15±0,63	7	n.s.		
EC NOS3 WT	7,14±0,94	5	6,65±0,95	6	n.s.		
RBC NOS3 KO	7,22±0,68	10	5,78±0,49	12	n.s.		
LoxP NOS3	10,41±1,48	6	5,76±0,49	6	**0,002		
3.3.3.2 Erythrozytäre Verformbarkeit post I/R

Weder aktive noch physisch inaktive Mäuse zeigten post operativ gemessene Veränderungen der erythrozytären Verformbarkeit, unabhängig von der jeweiligen Mauslinie (Tabelle 9).

Tabelle 9 Erythrozytäre Verformbarkeit der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien post I/R unter verschiedenen Schergeschwindigkeiten [Pa]. Die Messung erfolgte bei 37°C im LORRCA. Die Erythrozyten der physisch aktiven Mäuse zeigten keine signifikanten Veränderungen der Deformierbarkeit im Vergleich zu den inaktiven Mäusen in allen KO Linien und den dazugehörigen Kontrolllinien (Multipler t-Test korrigiert mit Holm-Sidak).

pos	t I/R	EI ((A.U.) Mi	ttelwert±SEM		
	Mauslinie	untrainiert	n-Zahl	trainiert	n-Zahl	p-Wert
	Global NOS3 KO	0,24±0,019	5	0,22±0,019	4	n.s.
	WT	0,20±0,02	10	0,19±0,02	8	n.s.
3	EC NOS3 KO	0,14±0,014	5	0,16±0,009	7	n.s.
0,	EC NOS3 WT	0,17±0,018	3	$0,15\pm0,008$	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,16±0,009	11	0,14±0,014	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,14±0,005	5	0,16±0,01	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,29±0,017	5	0,27±0,020	4	n.s.
	WT	$0,24{\pm}0,02$	10	$0,25\pm0,02$	8	n.s.
53	EC NOS3 KO	0,20±0,012	5	0,21±0,007	7	n.s.
0,:	EC NOS3 WT	0,23±0,016	3	$0,20\pm0,006$	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,21±0,008	11	0,21±0,007	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,20±0,003	5	$0,22\pm0,008$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,35±0,012	5	0,34±0,018	4	n.s.
	WT	$0,32\pm0,01$	10	0,31±0,01	8	n.s.
95	EC NOS3 KO	0,27±0,012	5	0,28±0,007	7	n.s.
0,0	EC NOS3 WT	0,30±0,014	3	0,28±0,006	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,28±0,008	11	0,28±0,007	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,27±0,002	5	$0,29\pm0,009$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,41±0,010	5	0,41±0,015	4	n.s.
	WT	$0,39{\pm}0,01$	10	0,39±0,01	8	n.s.
69	EC NOS3 KO	0,35±0,013	5	0,36±0,005	7	n.s.
1,	EC NOS3 WT	0,37±0,012	3	0,36±0,005	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,36±0,007	11	0,36±0,006	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,35±0,003	5	0,37±0,009	5	n.s.
	Global NOS3 KO	$0,47\pm0,008$	5	0,46±0,011	4	n.s.
	WT	0,44±0,009	10	0,45±0,008	8	n.s.
~	EC NOS3 KO	0,41±0,011	5	$0,42\pm0,005$	7	n.s.
	EC NOS3 WT	0,44±0,009	3	0,42±0,005	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,43±0,006	11	0,43±0,005	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,41±0,002	5	0,43±0,008	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,51±0,006	5	0,51±0,009	4	n.s.
3	WT	0,49±0,008	10	0,50±0,006	8	n.s.
5,3,	EC NOS3 KO	0,47±0,009	5	$0,47\pm0,004$	7	n.s.
	EC NOS3 WT	0,49±0,007	3	0,47±0,005	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	$0,48\pm0,004$	11	$0,48\pm0,003$	12	n.s.

	LoxP NOS3	$0,47{\pm}0,002$	5	$0,\!48\pm\!0,\!008$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,54±0,004	5	$0,54{\pm}0,007$	4	n.s.
	WT	$0,52\pm0,006$	10	$0,53\pm0,005$	8	n.s.
48	EC NOS3 KO	0,51±0,007	5	0,51±0,004	7	n.s.
9,	EC NOS3 WT	$0,52\pm0,006$	3	$0,52\pm0,004$	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	$0,52\pm0,004$	11	0,52±0,003	12	n.s.
	LoxP NOS3	$0,50\pm0,002$	5	$0,52{\pm}0,007$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,56±0,003	5	$0,56\pm0,005$	4	n.s.
	WT	0,55±0,005	10	$0,56\pm0,004$	8	n.s.
87	EC NOS3 KO	0,54±0,007	5	$0,54{\pm}0,004$	7	n.s.
16.	EC NOS3 WT	$0,56\pm0,005$	3	$0,55\pm0,003$	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	0,55±0,004	11	$0,55\pm0,003$	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,54±0,003	5	$0,55\pm0,007$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,59±0,003	5	$0,58\pm0,004$	4	n.s.
	WT	$0,58\pm0,004$	10	$0,59{\pm}0,002$	8	n.s.
66	EC NOS3 KO	0,57±0,005	5	$0,58\pm0,004$	7	n.s.
29.	EC NOS3 WT	0,58±0,002	3	$0,58\pm0,004$	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	$0,58\pm0,004$	11	$0,58\pm0,003$	12	n.s.
	LoxP NOS3	0,57±0,004	5	$0,58\pm0,006$	5	n.s.
	Global NOS3 KO	0,60±0,005	5	0,60±0,003	4	n.s.
	WT	0,61±0,003	10	$0,61\pm 0,001$	8	n.s.
33	EC NOS3 KO	0,60±0,005	5	$0,60\pm 0,004$	7	n.s.
53	EC NOS3 WT	0,61±0,001	3	0,61±0,005	5	n.s.
	RBC NOS3 KO	$0,\overline{60\pm0,004}$	11	0,60±0,003	12	n.s.
	LoxP NOS3	$0,60\pm0,004$	5	0,61±0,005	5	n.s.

Zusätzlich wurde auch hier die maximale Elongation (EI_{max}) und die Scherrate, die notwendig ist um die Hälfte der maximalen Elongation ($SS_{1/2}$) zu erreichen, berechnet (**Abbildung 17**).

Trainierte globale NOS3 KO Mäuse zeigten post I/R einen signifikant verringerten maximalen Elongationsindex im Vergleich zu trainierten WT. Alle weiteren Mauslinien zeigten keinen Unterschied im EI_{max} . Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der Scherrate, welche nötig ist um die halbmaximale Elongation der Erythrozyten zu erreichen, festgestellt werden.



Abbildung 17 Maximaler Elongationsindex (EImax) und Scherstress der notwendig ist, um die Hälfte des EI_{max} zu erreichen (SS_{1/2}) der untrainierten und trainierten gewebespezifischen NOS3 KO Mäuse sowie der Kontrolllinien. Der SS_{1/2} blieb in allen Mauslinien (B) WT und Global NOS3 KO, (D) EC NOS3 KO und EC NOS3 WT und (F) RBC NOS3 KO und LoxP unverändert. Trainierte globale NOS3 KO Mäuse zeigten gegenüber den WT einen verminderten EI_{max}, (A). 2wayANOVA und Sidak's multiple comparisons test *p<0,05. untrainiert/trainiert n: WT=10/8, Global NOS3 KO n=5/4, EC NOS3 WT n=3/5, EC NOS3 KO n=5/7, RBC NOS3 KO n=11/12, LoxP NOS3 n=5/5. Darstellung als Boxplot (Tukey's).

3.4 Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse

Die oben aufgeführten Versuche zeigten, dass die erythrozytäre NOS3 in diesem Versuchsmodell der moderaten langanhaltenden physischen Aktivität keinen Einfluss auf die durch körperliche Bewegung ausgeübte Kardioprotektion hat. Vielmehr spielt die endotheliale NOS3 eine entscheidende Rolle in der durch physische Aktivität induzierten Kardioprotektion.

Eine naheliegende Annahme war, dass durch das Fehlen der EC NOS3 ein verminderter Pool an NO-Metaboliten zur Verfügung steht, welche in Ischämie-Reperfusions-Verletzungen kardioprotektiv wirken können. Aus diesem Grund erfolgte eine Analyse der Nitrit- und Nitroso-Konzentrationen in den EC NOS3 KO Mäusen, sowie der Kontrolllinie nach dem jeweiligen freiwilligen Laufradtraining bzw. sesshaften Protokoll.

3.5 Die systemischen NO-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen

Die vierte Zielsetzung dieser Studie sollte die Beteiligung der endothelialen NOS3 am NO-Metabolismus im Zusammenhang mit physischer Aktivität aufklären. Die Aktivität der EC NOS3 wird durch Scherkräfte stimuliert. Das produzierte NO kann zu Nitrit bzw. Nitrat in stabilere Formen oxidiert werden oder reagiert mit Thiol-/Amino-Gruppen (RXNO), welches zu einer Speicherung des NO führt. Im Falle einer Ischämie könnten diese gespeicherten NO-Metabolite wieder zu NO reduziert werden und somit kardioprotektiv wirken. Physische Aktivität steigert die NO-Produktion der vaskulären NOS3. Die Frage hierbei ist nun, welche Auswirkung hat eine Depletion der EC NOS3 auf den systemischen NO-Metabolismus und in wie fern wird dieser durch chronisches freiwilliges Laufradtraining verändert?

Hierfür wurden die Nitrit-/ RXNO-Konzentrationen in den Organen der EC NOS3 KO Mäuse sowie deren Kontrolllinien EC NOS3 WT nach Beendigung der jeweiligen Protokolle mittels CLD analysiert (**Tabelle 10**).

Die Nitritkonzentration der physisch inaktiven EC NOS3 KO Mäuse ist in den Erythrozyten, dem Plasma (tendenziell) und der Aorta (tendenziell) erniedrigt gegenüber den sesshaften Kontrollmäusen. In der Aorta ist ebenfalls die RXNO-Konzentration der EC NOS3 KO Mäuse signifikant geringer gegenüber den Kontrollmäusen.

Die physisch aktiven Mäuse der KO Gruppe zeigten keine Unterschiede zu der Kontrolllinie.

Die Nitrit-/RXNO-Konzentrationen in den Erythrozyten, im Plasma, der Aorta sowie dem Skelett- und Herzmuskel der Kontrollinie zeigten keine Unterschiede zu den sesshaften Kontrollmäusen. Die trainierten EC NOS3 KO Mäuse zeigten eine tendenziell erhöhte Nitritkonzentration und eine signifikant erhöhte RXNO-Konzentration im Plasma sowie eine tendenziell erhöhte Nitritkonzentration in der Aorta gegenüber den sesshaften KO-Mäusen.

Tabelle 10 NO-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen und der Kontrolllinie. Nitrit- und RXNO-Konzentrationen im Blut und den Organen der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test). ↓ erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert↑, erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt.

		Mittelwe	ert ± SEM			P-V	Vert	
Analvt/	C.	ſRL	EC NO	S3 KO	CTDI	CTRL	CTRL	EC NOS3
Konz.	untrainiert (n= 4)	trainiert (n= 7)	untrainiert (n= 7)	trainiert (n= 7)	CIRL trainiert/ untrainiert	untrainiert / EC NOS3 KO untrainiert	trainiert/ EC NOS3 KO trainiert	KO trainiert/ untrainiert
			Eryth	rozyten				
Nitrit [nmol/g]	0,43 ± 0,11	$0,\!17\pm0,\!08$	0,06 ± 0,08	0,14 ± 0,03	n.s. 0,0905	↓** 0,0089	n.s. 0,7236	n.s. 0,4364
RXNO [nmol/g]	0,162±0,074	0,081±0,024	0,0827±0,030	0,0248±0,007	n.s. 0,6512	n.s. 0,7057	n.s. 0,0666	n.s. 0,0926
			Pla	asma				
Nitrit [nmol/g]	0,19±0,02	0,2±0,02	0,13±0,02	0,2±0,04	n.s. 0,5405	n.s. ↓0,0520	n.s. 0,9375	n.s. ↑0,0758
RXNO [nmol/g]	0,02 ± 0,0008	0,02±0,003	0,01±0,002	0,02±0,003	n.s 0,3020	n.s 0,5465	n.s 0,6381	†*0,0209
			A	orta				
Nitrit [µmol/g]	1,9±0,1	2,4±0,8	0,8±0,3	2,6±0,6	n.s 0,6236	n.s↓ 0,0724	n.s. 0,8939	n.s↑ 0,0574
RXNO [μmol/g]	0,05±0,01	0,03±0,008	0,008±0,002	0,02±0,004	n.s 0,3020	↓*** 0,0004	n.s. 0,0801	n.s. 0,1422
			Skelet	tmuskel				
Nitrit [µmol/g]	0,05±0,01	0,08±0,02	0,12±0,04	0,08±0,02	n.s 0,5041	n.s.0,2326	n.s 0,9980	n.s 0,1084
RXNO [nmol/g]	0,18±0,04	0,14±0,04	0,14±0,05	0,22±0,06	n.s 0,6495	n.s 0,7409	n.s 0,3014	n.s 0,3634
			Н	erz				
Nitrit [µmol/g]	0,04±0,005	0,06±0,001	0,05±0,01	0,06±0,007	n.s 0,3242	n.s 0,6201	n.s 0,8557	n.s 0,8644
RXNO [nmol/g]	0,30±0,02	0,41±0,1	0,48±0,1	0,63±0,2	n.s 0,2641	n.s 0,4968	n.s 0,2795	n.s 0,2922

Die Trainingsprotokolle haben keinen Einfluss auf die NO-Metabolite in den einzelnen Organ-Kompartimenten der Kontrollgruppe. In der endothelialen NOS3 KO Gruppe führte die physische Aktivität zu einer tendenziell erhöhten Nitritkonzentration im Plasma und in der Aorta. Betrachtet man nur die sesshaften Mäuse, so zeigte sich, dass die EC NOS3 KO's einen tendenziell geringeren NO-Metaboliten Pool in den roten Blutkörperchen, Plasma und der Aorta gegenüber den Kontrollen aufweisen. Das Laufradtraining führt zu einer Kompensation dieser NO-Metabolit-Defizite.

3.6 Thiol-Metabolismus der trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäuse

Das Fehlen der vaskulären NOS3 führte zu einer verringerten Leistungskapazität sowie dem Verlust der durch körperliche Aktivität induzierten Kardioprotektion. Einen beeinflussenden Faktor der physischen Leistungskapazität und der kardialen Protektion stellt der Redox-Status in den Zellen der Organe dar. Durch physische Aktivität kommt es zu erhöhtem oxidativen Stress. Aufgrund der Tatsache, dass oxidativer Stress ebenfalls einer der Hauptauslöser kardialer Zellschäden während Ischämie-/Reperfusions-Verletzungen ist, wurde in dieser Studie der Redox-Status durch GSH/GSSG-Messung sowie des Precursors Cystein trainierter und untrainierter EC NOS3 KO Mäuse sowie deren Kontrollen (EC NOS3 WT) in den verschiedenen Organen gemessen (Tabelle 11).

In den trainierten Kontrollmäusen führte die physische Aktivität zu einer Absenkung des GSH-, GSSG- sowie des totalen GSH-Spiegels im Plasma. Das Verhältnis hingegen von GSH zu GSSG sowie die Cystein-Konzentration blieb unverändert. In den EC NOS3 KO Mäusen führte körperliche Betätigung zu keiner Veränderung der totalen Plasma GSH- Konzentration, der GSSG-Konzentration und Cystein-Konzentration. Der Vergleich untrainierter Kontrollmäuse mit untrainierten KO Mäusen zeigte jedoch, dass die EC NOS3 KO Mäuse eine signifikant verringerte GSH-Konzentration (sowohl freies als auch totales) im Plasma aufwiesen. Des Weiteren ist die GSSG-Konzentration der untrainierten KO Mäuse im Vergleich zu den untrainierten CTRL um 0,14 pmol/mg im Plasma verringert. Das Verhältnis von GSH zu GSSG blieb in den KO-Mäusen unverändert.

Die Analyse des Redox-Status im Skelettmuskel zeigte keine Unterschiede der GSH-/GSSG-Konzentration in den CTRL und EC NOS3 KO Mäusen. Lediglich die Cysteinkonzentration in den trainierten KO Mäusen ist signifikant erniedrigt verglichen mit den sesshaften KO Mäusen.

Auch im Herzen führte das freiwillige Training zu keiner Konzentrationsveränderung der Thiole in den CTRL und EC NOS3 KO Mäusen. Ein Vergleich der totalen GSH Konzentration untrainierter CTRL-Mäuse $(0,0177\pm0,003)$ mit der untrainierter EC NOS3 KO Mäuse $(0,0129\pm0,001)$ zeigte jedoch eine signifikant geringere Konzentration in den KO Mäusen.

Der Redox-Status in den Erythrozyten und der Aorta blieb in beiden Mauslinien unverändert nach physischer Aktivität.

Tabelle 11 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen. Konzentrationen des totalen und freien GSH, GSSG und Cystein sowie der Rate zwischen GSH und GSSG im Blut, der Aorta und des Skelettmuskels der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test). \downarrow erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert, \uparrow erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erhöht gegenüber untrainiert.

		Mittelwe	$rt \pm SEM$			P-V	Vert	
Analvt/	C	IRL	EC NO	OS3 KO	CTRL	CTRL	CTRL	EC NOS3 KO
Konz.	untrainiert	trainiant (m= 7)	untrainiert	trainiat (n= 7)	untrainiert/ CTRL	EC NOS3	EC NOS3	untrainiert/ EC NOS3 KO
	(n= 4)		(n= 7)		trainiert	untrainiert	trainiert	trainiert
			Erythroz	zyten				
Total GSH [nmol/mg]	$0,37 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,28$	$0,44 \pm 0,48$	n.s. 0,2736	n.s. 0,9143	n.s. 0,5063	n.s. 0,8175
GSH [nmol/mg]	$0,36 \pm 0,09$	$0,29 \pm 0,07$	$0,37 \pm 0,28$	$0,43 \pm 0,48$	n.s. 0,2761	n.s. 0,8182	n.s. 0,9300	n.s. 0,5169
GSSG [nmol/mg]	$0,003 \pm 0,002$	$0,005 \pm 0,004$	$0,005 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,002$	n.s. 0,3726	n.s. 0,2628	n.s. 0,6488	n.s. 0,896
GSH/GSSG	178 ± 164	128 ± 153	82 ± 47	81 ± 66	n.s. 0,6977	n.s. 0,2047	n.s. 0,5610	n.s. 0,9754
Cys [nmol/mg]	$0,04 \pm 0,02$	$0,03 \pm 0,006$	$0,04 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	n.s. 0,3686	n.s. 0,9126	n.s. 0,4213	n.s. 0,7749
			Plasır	เล				
Total GSH [nmol/mg]	$0,08 \pm 0,009$	$0,05 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,002$	↓**0,0031	J**0,0021	n.s. 0,5940	n.s. 0,6143
GSH [nmol/mg]	$0,08 \pm 0,009$	$0,05 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,002$	↓** 0,0041	J**0,0029	n.s. 0,5913	n.s. 0,4456
GSSG [pmol/mg]	$0,25 \pm 0,1$	$0,13 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,08$	↓*0,0402	J* 0,0160	n.s. 0,3438	n.s. 0,1603
GSH/GSSG	432 ± 182	476 ± 92	564 ± 164	427 ± 190	n.s. 0,6034	n.s. 0,2461	n.s. 0,5564	n.s. 0,1737
Cys [nmol/mg]	$0,008 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	n.s. 0,0798	n.s. 0,4182	n.s. 0,2445	n.s. 0,9879
			Aort	ม				
Total GSH [nmol/mg]	$0,56 \pm 0,62$	$0,33 \pm 0,11$	$0,77 \pm 0,92$	$0,47 \pm 0,2$	n.s. 0,3448	n.s. 0,699	n.s. 0,1301	n.s. 0,4184
GSH [nmol/mg]	$0,56 \pm 0,62$	$0,33 \pm 0,1$	$0,77 \pm 0,92$	$0,47 \pm 0,2$	n.s. 0,2803	n.s. 0,6972	n.s. 0,128	n.s. 0,4151
GSSG [pmol/mg]	$1,2 \pm 0,6$	$1,6 \pm 1,3$	$1,4 \pm 1,8$	$2,5 \pm 2,3$	n.s. 0,546	n.s. 0,8197	n.s. 0,443	n.s. 0,3871
GSH/GSSG	222 ± 40	321 ± 221	522 ± 328	299 ± 217	n.s. 0,4032	n.s. 0,1078	n.s. 0,8506	n.s. 0,1587
Cys [nmol/mg]	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,04$	$0,01 \pm 0,005$	n.s. 0,5737	n.s. 0,5966	n.s. 0,8034	n.s. 0,2942
			Skelettm	uskel				
Total GSH [nmol/mg]	$0,41 \pm 0,13$	0,46±0,02	$0,56\pm0,03$	$0,44{\pm}0,08$	n.s 0,6227	n.s 0,2077	n.s 0,8651	n.s 0,2574
GSH [nmol/mg]	$0,41\pm 0,13$	0,46±0,02	$0,56\pm0,03$	0,44±0,08	n.s. 0,6226	n.s 0,2053	n.s 0,8657	n.s 0,2544
GSSG [pmol/mg]	$0,04\pm0,01$	$0,06\pm 0,01$	$0,06\pm0,01$	$0,06\pm 0,0003$	n.s 0,7106	n.s 0,3993	n.s 0,5447	n.s 0,9163
GSH/GSSG	11910±4436	9208±1272	9220±2197	6198±1212	n.s 0,5297	n.s 0,5541	n.s 0,1716	n.s 0,2516
Cys [pmol/mg]	0,38±0,02	0,36±0,02	0,45±0,03	0,34±0,01	n.s. 0,4665	n.s. 0,1590	n.s. 0,5251	↓**0,0024

Tabelle 12 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen. Konzentrationen des totalen und freien GSH, GSSG und Cystein sowie der Rate zwischen GSH und GSSG im Herz der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test). ↓ erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert, ↑erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erhöht gegenüber untrainiert.

		Mittelwe	rt ± SEM			P-V	Vert		
Analyt/	G	TRL	EC NC)S3 KO	CTRL	CTRL	CTRL	EC NOS3 KO	
Konz.	untrainiert (n= 4)	trainiert (n= 7)	untrainiert (n= 7)	trainiert (n= 7)	untrainiert/ CTRL trainiert	EC NOS3 KO untrainiert	traumery EC NOS3 KO trainiert	untrainiert/ EC NOS3 KO trainiert	
			Herz						
Total GSH [nmol/mg]	$0,0177\pm0,003$	$0,0130\pm 0,0009$	$0,0129\pm0,001$	$0,0104\pm0,0007$	n.s. 0,0510	↓*0,0454	n.s. 0,2502	n.s. 0,1110	
GSH [nmol/mg]	$0,015\pm0,003$	$0,0130\pm0,017$	0,0119±0,017	$0,0101\pm0,0006$	n.s. 0,4225	n.s. 0,2684	n.s. 0,9695	n.s. 0,2142	
GSSG [pmol/mg]	$0,0583\pm0,0176$	$0,068\pm0,0168$	$0,039\pm0,012$	$0,0385\pm0,0129$	n.s. 0,7310	n.s. 0,3875	n.s. 0,1939	n.s. 0,9798	
GSH/GSSG	$192 \pm 0,005$	$154\pm0,004$	$234\pm0,071$	$214\pm0,043$	n.s. 0,6076	n.s. 0,6776	n.s. 0,3511	n.s. 0,5018	
Cys [pmol/mg]	$0,189\pm 0,04$	0,186±0,03	0,226±0,05	$0,157\pm0,01$	n.s. 0,9384	n.s. 0,6239	n.s. 0,3575	n.s. 0,2167	

Auserwählte Ergebnisse der Thiol-Metabolite in den Kompartimenten der trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäuse, sowie den Kontrollen wurden zusammenfassend grafisch dargestellt (Abbildung 18).



Abbildung 18 Thiol-Metabolite in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen und den Kontrollen. Im Plasma der Mäuse wurden signifikante Unterschiede in den Konzentrationen des (A) totalen GSH, (B) GSH und (C) GSSG gemessen. Das Verhältnis von GSH zu GSSG blieb jedoch unverändert (D). Im Herzen der Mäuse konnte ein Unterschied in der totalen GSH-Konzentration (E) festgestellt werden. Auch hier blieb die Rate zwischen GSH und GSSG unverändert (F). Grafische Darstellung wichtiger Parameter aus Tabelle 11 und Tabelle 12. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test, *p<0,05, **p<0,01, untrainiert: CTRL n=4, EC NOS3 KO n=7, trainiert: n=7 in jeder Gruppe).

3.7 Nukleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen

Für körperliche Bewegung benötigen insbesondere Muskelzellen Energie in Form von ATP, welches zu ADP und AMP abgebaut wird. Des Weiteren sind Hypoxanthin und Xanthin Abbauprodukte der ATP-Degradierung, welche im Muskel akkumulieren oder in die Blutbahn ausgeschieden werden und so zu einer Verringerung der Adenosinnukleotid-Precursor führen. Ein weiteres wichtiges Nukleotidphosphat ist cGMP. Das von der NOS3 gebildete NO hat einen Einfluss auf den cGMP-Spiegel, welches durch die Guanylatzyklase (GC) aus GTP synthetisiert wird und durch Aktivierung der PKG zur Vasodilatation führt. Das cyclische Adenosinmonophosphat ist ein Signalmolekül (second messenger), welches vor allem Proteinkinasen aktiviert und eine NO-unabhängige Vasodilatation auslösen kann. Da ein Fehlen der endothelialen NOS3 zu einer verringerten Leistungskapazität führte, war nun die letzte Zielsetzung dieser Arbeit den Einfluss der vaskulären NOS3 auf Veränderungen des Nukleotidphosphat-Metabolismus im Zusammenhang mit körperlicher Aktivität zu untersuchen. Hierfür wurden massenspektrometrisch die folgenden Nukleotidphosphate bzw. Abbauprodukte in den Organen der trainierten und untrainierten EC NOS3 KO Mäuse sowie deren Kontrolllinie gemessen: Hypoxanthin, Xanthin, Adenosin, cAMP, cGMP, AMP, GMP, ADP, GDP, ATP und GTP (Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15).

In den Erythrozyten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 13).

Im Plasma bezogen sich die wesentlichen Unterschiede auf den cGMP und AMP-Spiegel. Die AMP-Konzentration trainierter Kontrollmäuse war um das 3,5-fache geringer gegenüber den sesshaften Mäusen. Konträr dazu stieg in den trainierten EC NOS3 KO Mäusen die AMP-Konzentration um das 1,2-fache im Vergleich zu den untrainierten KO Mäusen. Ein Vergleich der untrainierten Kontrollmäuse mit den untrainierten EC NOS3 KO Mäusen zeigte eine verringerte AMP-Plasmakonzentration in den KO Mäusen, wohingegen die trainierten EC NOS3 KO Mäuse eine höhere AMP-Konzentration verglichen zu den trainierten Kontrollmäusen zeigten (Tabelle 13).

In den trainierten vaskulären NOS3-defizienten Mäusen stieg die cGMP-Plasma-Konzentration um den Faktor 2 gegenüber den physisch inaktiven KO Mäusen. Generell ist die cGMP-Konzentration in den trainierten EC NOS3 KO Mäusen um 53% höher im Vergleich zu den trainierten CTRL (**Tabelle 13**). In der Aorta und dem Skelettmuskel konnten keine Unterschiede in den Nukleotidphosphaten bzw. Nukleosiden weder in der CTRL-Gruppe noch in den KO Mäusen festgestellt werden (**Tabelle 14**).

Im Herz konnte nur in den aktiven Kontrollmäusen eine um den Faktor 2 erhöhte Xanthin-Konzentration sowie eine erhöhte Adenosin-Konzentration gemessen werden. Die Adenosin-Konzentration der untrainierten EC NOS3 KO Mäuse war signifikant erhöht gegenüber den untrainierten Kontrollmäusen. Trainierte KO-Mäuse zeigten bezüglich der Adenosinkonzentration keine Unterschiede (**Tabelle 15**).

3 Ergebnisse

und GTP in den Erythrozyten und Plasma der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen 2 Gruppen mit einem ungepaarten T-test). ↓ erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert[↑], erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erhöht gegenüber untrainiert.

		Mittelwe	rt ± SEM			P-V	Vert	
Analyt/	C	TRL	EC NC	53 KO		CTRL	CTRL	EC NOS3
Konz.	untrainiert (n= 4)	trainiert (n= 7)	untrainiert (n= 6)	trainiert (n= 7)	CIKL untrainiert / trainiert	untrainiert /ECNOS3 KO untrainiert	trainiert / EC NOS3 KO trainiert	KO untrainiert / trainiert
			Erythrozy	ten				
Hypoxanthin [pmol/mg]	5,1±2,3	7,9±2,0	4,9±0,6	4,9±0,8	n.s. 0,4200	n.s. 0,9141	n.s. 0,1991	n.s. 0,9613
Xanthin [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Adenosin [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
cAMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
cGMP [fmol/mg]	0,6±0,3	$1,0\pm 0,2$	$0,5\pm 0,1$	$1,0\pm 0,2$	n.s. 0,2207	n.s. 0,7501	n.s. 0,8028	n.s. 0,1264
AMP [pmol/mg]	$0,3\pm 0,1$	0,3±0,4	0,3±0,1	0,2±0,02	n.s. 0,7128	n.s. 0,6493	n.s. 0,4144	n.s. 0,6382
GMP [fmol/mg]	0,0026±0,003	0,004±0,0002	0,002±0,0001	$0,003\pm0,0001$	n.s. 0,5661	n.s. 0,4727	n.s. 0,6682	n.s. 0,3604
ADP [nmol/mg]	0,03±0,008	0,03±0,003	0,03±0,005	0,04±0,008	n.s. 0,9732	n.s. 0,8398	n.s. 0,1118	n.s. 0,3971
GDP [nmol/mg]	0,05±0,01	0°,05±0,005	0,06±0,01	0,07±0,008	n.s. 0,9542	n.s. 0,8782	n.s. 0,1118	n.s. 0,3971
ATP [nmol/mg]	0,08±0,03	0,10±0,007	$0,10\pm0,01$	$0,1 \pm 0,008$	n.s. 0,3682	n.s. 0,4560	n.s. 0,8149	n.s. 0,9640
GTP [nmol/mg]	$0,12\pm0,03$	$0,10\pm0,008$	$0,10\pm0,009$	$0,11\pm0,008$	n.s. 0,7804	n.s. 0,8019	n.s. 0,3111	n.s. 0,3628
			Plasma					
Hypoxanthin [nmol/mg]	0,015±0,003	0,015±0,002	0,015±0,0005	0,015±0,002	n.s. 0,9827	n.s. 0,7499	n.s. 0,9084	n.s. 0,8736
Xanthin [nmol/mg]	0,08±0,03	0,04±0,004	0,05±0,1	0,04±0,007	n.s. 0,1255	n.s. 0,3112	n.s. 0,8903	n.s. 0,4847
Adenosin [nmol/mg]	$0,012\pm0,002$	$0,016\pm0,0016$	0,011±0,0015	$0,017\pm0,004$	n.s. 0,1255	n.s. 0,3112	n.s. 0,8903	n.s. 0,4847
cAMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
cGMP [fmol/mg]	0,51±0,25	0,39±0,11	0,42±0,16	0,83±0,06	n.s. 0,6473	n.s. 0,7936	*10,0425	n.s. 0,0722
AMP [fmol/mg]	2,28±0,07	0,65±0,013	0,98±0,013	$1,19\pm0,036$	***↓<0,001	***\<0,001	***^<0,001	***↑<0,001
GMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
ADP [fmol/mg]	3,75±1,77	$1,12\pm0,74$	4,77±0,018	3,37±1,6	n.s. 0,1583	n.s. 0,1606	n.s. 0,1967	n.s. 0,6933
GDP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
ATP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
GTP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

66

Tabelle 14 Nukleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen. Konzentrationen von Hypoxanthin, Xanthin, Adenosin, cAMP, cGMP, AMP, GMP, ADP, GDP, ATP und GTP in der Aorta und dem Skelettmuskel der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test). \downarrow erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert[†], erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erhöht gegenüber untrainiert.

$ \begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$			Mittelwe	ert ± SEM			P-V	Vert	
	A malert /	C	TRL	EC NO	DS3 KO		CTRL	CTRL	EC NOS3
	Anaryu Konz.	untrainiert		untrainiert		CTRL untrainiert	untrainiert / EC NOS3	trainiert / EC NOS3	ко
Aorta Approxambin [nmol/mg] 32,5 \pm 20,7 12,4 \pm 2,6 28,3 \pm 12,7 16,8 \pm 3,1 n.s. 0,2753 n.s. 0,3090 n.s. 0,3174 n.s. 0,33174 n.s. 0,33174		(n= 4)	trainiert (n= 7)	(II= 6)	trainiert (n= 7)	/ trainiert	KO untrainiert	KO trainiert	trainiert/
				Aorta					
	Hypoxanthin [nmol/mg]	32,5±20,7	12,4±2,6	28,3±12,7	16,8±3,1	n.s. 0,2253	n.s. 0,8598	n.s. 0,3090	n.s. 0,3949
Adenosin [nmol/mg] $5,46\pm1,16$ $4,17\pm0,7$ $4,64\pm1,93$ $6,3\pm0,91$ $n.s.0,5315$ $n.s.0,7870$ $n.s.0,0800$ $n.s.0,4121$ $CAMP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $CAMP [nmol/mg]$ $233,2\pm95,7$ $2.78,1\pm97,1$ $33.8\pm153,2$ $415,7\pm88,8$ $n.s.0,7816$ $n.s.0,6697$ $n.s.0,6697$ $AMP [nmol/mg]$ $0,42\pm0,06$ $0,40\pm0,08$ $0,52\pm0,21$ $0,55\pm0,08$ $n.s.0,7816$ $n.s.0,6807$ $n.s.0,6807$ $AMP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $ADP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $ADP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $ATP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $ADP [nmol/mg]$ $0,012\pm0,01$ $0,112\pm0,003$ $0,122\pm0,005$ $n.s.0,1643$ $n.s.0,736$ $n.s.0,972$ $n.s.0,9956$ $AMP [nmol/mg]$ $0,013\pm0,01$ $0,012\pm0,003$ $0,012\pm0,003$ $0,012\pm0,002$ $n.s.0,2961$ $n.s.0,1643$ $n.s.0,3961$ $n.s.0,1645$ $AMP [nmol/mg]$ $0,013\pm0,01$ $0,012\pm0,003$ $0,012\pm0,003$ $n.s.0,2961$ $n.s.0,2966$ $n.s.0,2966$ $AMP [nmol/mg]$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $AMP [nmol/mg]$ $n.b.$	Xanthin [nmol/mg]	8,78±4,42	4,21±0,89	13,0±5,98	7,71±1,8	n.s. 0,2145	n.s. 0,6395	n.s. 0,1058	n.s. 0,4141
cAMP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.GAMP [fmol/mg] $233, \pm 95, 7$ $278, \pm 97, 1$ $338, \pm 153, 2$ $415, 7\pm 88, 8$ $n.s. 0, 7816$ $n.s. 0, 6697$ $n.s. 0, 3174$ $n.s. 0, 6697$ AMP [mmol/mg] $0, 42\pm 0, 06$ $0, 40\pm 0, 08$ $0, 52\pm 0, 21$ $0, 52\pm 0, 08$ $n.s. 0, 8905$ $n.s. 0, 7620$ $n.s. 0, 7620$ $n.s. 0, 7620$ $n.s. 0, 7620$ $n.s. 0, 2172$ $n.s. 0, 8933$ GMP [mmol/mg] $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ GDP [mmol/mg] $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ GDP [mmol/mg] $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ GDP [mmol/mg] $0, 107\pm 0, 04$ $0, 17\pm 0, 03$ $0, 127\pm 0, 005$ $n.s. 0, 1643$ $n.s. 0, 7336$ $n.s. 0, 9467$ $n.s. 0, 9456$ AMP [mmol/mg] $0, 107\pm 0, 01$ $0, 112\pm 0, 003$ $0, 012\pm 0, 005$ $n.s. 0, 1643$ $n.s. 0, 3951$ $n.s. 0, 9456$ AMP [mmol/mg] $0, 013\pm 0, 01$ $0, 011\pm 0, 003$ $0, 012\pm 0, 005$ $n.s. 0, 1643$ $n.s. 0, 9487$ $n.s. 0, 9456$ AMP [mmol/mg] $0, 013\pm 0, 01$ $0, 1126\pm 0, 03$ $0, 112\pm 0, 025$ $n.s. 0, 9456$ $n.s. 0, 9456$ $n.s. 0, 9456$ AMP [mmol/mg] $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ $n.b.$ AMP [fmol/mg]<	Adenosin [nmol/mg]	5,46±1,16	4,17±0,7	4,64±1,93	6,38±0,91	n.s. 0,3515	n.s. 0,7870	n.s. 0,0800	n.s. 0,4121
	cAMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AMP [nmol/mg] $0,42\pm0,06$ $0,40\pm0,08$ $0,52\pm0,21$ $0,55\pm0,08$ $n.s.0,8905$ $n.s.0,7620$ $n.s.0,7620$ $n.s.0,2172$ $n.s.0,8935$ GMP [fmol/mg] $n.b.$	cGMP [fmol/mg]	233,3±95,7	278,1±97,1	338,8±153,2	415,7±88,8	n.s. 0,7816	n.s. 0,6697	n.s. 0,3174	n.s. 0,6650
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	AMP [nmol/mg]	0,42±0,06	0,40±0,08	0,52±0,21	0,55±0,08	n.s. 0,8905	n.s. 0,7620	n.s. 0,2172	n.s. 0,8933
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	GMP [fmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	ADP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	GDP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	ATP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SkeletimuskelHypoxanthin[nmol/mg]0,107±0,040,159±0,010,126±0,030,127±0,005n.s.0,1643n.s.0,7336n.s.0,7336n.s.0,9656Xanthin[nmol/mg]0,013±0,0010,011±0,0030,017±0,0030,012±0,0005n.s.0,1643n.s.0,3361n.s.0,3961n.s.0,1060n.s.0,2199Adenosin[pmol/mg]0,013±0,0010,011±0,0030,017±0,0030,012±0,0005n.s.0,2741n.s.0,3961n.s.0,3961n.s.0,2199Adenosin[pmol/mg]0,11±0,082,8±0,043,1±0,022,8±0,02n.s.0,6987n.s.0,5987n.s.0,3961n.s.0,9487n.s.0,4950cGMP[fmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.ADP[pmol/mg]0,41±0,130,24±0,110,38±0,030,41±0,11n.s.0,4298n.s.0,4800n.s.0,3524n.s.0,7089GDP[nmol/mg]0,41±0,130,24±0,110,38±0,030,41±0,11n.s.0,4298n.s.0,6800n.s.0,3524n.s.0,7089GDP[nmol/mg]0,041±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s.0,4228n.s.0,2703n.s.0,703n.b.GTP [pmol/mg]0,01±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s.0,4228n.s.0,2703n.s.0,7804n.s.0,6241	GTP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Hypoxanthin[nnmol/mg]0,107±0,040,159±0,010,126±0,030,127±0,005n.s.0,1643n.s.0,7336n.s.0,7326n.s.0,9696Xanthin[nnmol/mg]0,013±0,0010,011±0,0030,017±0,0030,012±0,0005n.s.0,2741n.s.0,3961n.s.0,3961n.s.0,2199Adenosin[pmol/mg]3,1±0,082,8±0,043,1±0,022,8±0,02n.s.0,6987n.s.0,6987n.s.0,9296n.s.0,9487n.s.0,4950cAMP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.GMP [fmol/mg]1,82±0,71,18±0,11,31±0,21,31±0,2n.s.0,3988n.s.0,3845n.s.0,5661n.s.0,9988GMP [fmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.ADP [pmol/mg]0,41±0,130,24±0,110,38±0,030,41±0,11n.s.0,4298n.s.0,6800n.s.0,3524n.s.0,7089GDP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.ATP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.GTP [pmol/mg]0,001±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s.0,4228n.s.0,2703n.s.0,7804n.s.0,6241ATP [nmol/mg]0,001±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s.0,4228n.s.0,2703n.s.0,7804n.s.0,6241				Skelettmus	skel				
Xanthin [nmol/mg]0,013±0,0010,011±0,0030,017±0,0030,012±0,0005n.s. 0,2741n.s. 0,3961n.s. 0,3160n.s. 0,2199Adenosin [pmol/mg]3,1±0,082,8±0,043,1±0,022,8±0,02n.s. 0,6987n.s. 0,6987n.s. 0,9296n.s. 0,9296n.s. 0,4487n.s. 0,4950cAMP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.AMP [pmol/mg]1,82±0,71,18±0,11,31±0,21,31±0,21,31±0,2n.s. 0,3098n.s. 0,3845n.s. 0,6561n.s. 0,9988GMP [fmol/mg]1,82±0,71,18±0,11,31±0,21,31±0,2n.s. 0,3098n.s. 0,3845n.s. 0,6561n.s. 0,9988GMP [fmol/mg]0,41±0,130,24±0,110,38±0,030,41±0,11n.s. 0,4298n.s. 0,6800n.s. 0,3524n.s. 0,7089GDP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.ATP [nmol/mg]n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.n.b.GTP [pmol/mg]0,001±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s. 0,4228n.s. 0,703n.s. 0,6241GTP [pmol/mg]0,001±0,013,69±3,691,92±0,812,7±1,35n.s. 0,4228n.s. 0,703n.s. 0,6241	Hypoxanthin [nmol/mg]	0,107±0,04	0,159 <u>+</u> 0,01	0,126 <u>+</u> 0,03	0,127±0,005	n.s. 0,1643	n.s. 0,7336	n.s. 0,0792	n.s. 0,9656
	Xanthin [nmol/mg]	0,013±0,001	$0,011\pm0,003$	0,017±0,003	0,012±0,0005	n.s. 0,2741	n.s. 0,3961	n.s. 0,1060	n.s. 0,2199
$ \begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	Adenosin [pmol/mg]	3,1±0,08	2,8±0,04	3,1±0,02	2,8±0,02	n.s. 0,6987	n.s. 0,9296	n.s. 0,9487	n.s. 0,4950
cGMP [fmol/mg] n.b.	cAMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AMP [pmol/mg] 1,82±0,7 1,18±0,1 1,31±0,2 1,31±0,2 n.s. 0,3098 n.s. 0,3845 n.s. 0,6561 n.s. 0,9988 GMP [fmol/mg] n.b. </td <td>cGMP [fmol/mg]</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td> <td>n.b.</td>	cGMP [fmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
GMP [fmol/mg] n.b.	AMP [pmol/mg]	1,82±0,7	$1,18\pm0,1$	1,31±0,2	1,31±0,2	n.s. 0,3098	n.s. 0,3845	n.s. 0,6561	n.s. 0,9988
ADP [pmol/mg] 0,41±0,13 0,24±0,11 0,38±0,03 0,41±0,1 n.s. 0,4298 n.s. 0,6800 n.s. 0,3524 n.s. 0,7089 GDP [nmol/mg] n.b. n.b	GMP [fmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
GDP [nmol/mg] n.b.	ADP [pmol/mg]	0,41±0,13	0,24±0,11	0,38±0,03	$0,41\pm0,1$	n.s. 0,4298	n.s. 0,6800	n.s. 0,3524	n.s. 0,7089
ATP [nmol/mg] n.b.	GDP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
GTP [pmol/mg] 0,001±0,01 3,69±3,69 1,92±0,81 2,7±1,35 n.s. 0,4228 n.s. 0,2703 n.s. 0,7804 n.s. 0,6241	ATP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	GTP [pmol/mg]	$0,001\pm0,01$	3,69±3,69	1,92±0,81	2,7±1,35	n.s. 0,4228	n.s. 0,2703	n.s. 0,7804	n.s. 0,6241

Tabelle 15 Nukleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen. Konzentrationen von Hypoxanthin, Xanthin, Adenosin, cAMP, cGMP, AMP, GMP, ADP, GDP, ATP und GTP im Herz der EC NOS3 KO und CTRL Mäuse. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak`s multiple comparisons test). ↓ erniedrigt gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erniedrigt gegenüber untrainiert↑, erhöht gegenüber Kontrolle (CTRL), bzw. erhöht gegenüber untrainiert.

		Mittelwei	rt ± SEM			M-q	Vert	
Analyt/	G	ſŔĹ	EC NC	S3 K0		CTRL	CTRL	EC NOS3
лиацу и Конz.	untrainiert (n= 4)	trainiert (n= 7)	untrainiert (n= 6)	trainiert (n= 7)	CTRL untrainiert / trainiert	untrainiert / EC NOS3 KO untrainiert	trainiert / EC NOS3 KO trainiert	KO untrainiert / trainiert
			Herz					
Hypoxanthin [nmol/mg]	0,05±0,01	0,06±0,005	0,05±0,007	0,05±0,008	n.s. 0,5008	n.s. 0,8988	n.s. 0,9968	n.s. 0,5427
Xanthin [nmol/mg]	0,03±0,01	0,06±0,004	0,04±0,006	0,05±0,003	***10,001	n.s. 0,3206	n.s. 0,2836	n.s. 0,3378
Adenosin [nmol/mg]	$0,01\pm0,003$	0,02±0,001	0,02±0,002	0,02±0,003	*10,0228	*10,0228	n.s. 0,9230	n.s. 0,8752
cAMP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
cGMP [fmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
AMP [pmol/mg]	$1,1\pm 0,2$	$1,1\pm 0,2$	$1,2\pm 0,2$	0,9±0,3	n.s. 0,9670	n.s. 0,7155	n.s. 0,6539	n.s. 0,4290
GMP [fmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
ADP [nmol/mg]	0,03±0,03	0,08±0,02	0,07±0,02	0,05±0,005	n.s. 0,2626	n.s. 0,1120	n.s. 0,1005	n.s. 0,2382
GDP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
ATP [nmol/mg]	1,55±1,55	2,85±0,86	2,78±0,64	2,36±0,57	n.s. 0,5426	n.s. 0,4178	n.s. 0,6549	n.s. 0,7054
GTP [nmol/mg]	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Zusammenfassend wurden ausgewählte Ergebnisse der Nukleotidphosphate und Nukleoside in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen grafisch dargestellt (**Abbildung 19**). Lediglich in zwei Kompartimenten, im Plasma und im Herzen, wurden durch Training induzierte Unterschiede festgestellt.



Abbildung 19 Konzentration von cGMP im Plasma (A) und in der Aorta (B) sowie Adenosin- (C) und Xanthin-Konzentration (D) im Herzen und die Plasma-AMP-Konzentration (E) in trainierten und untrainierten endothelialen NOS3 KO Mäusen sowie deren Kontrollen. Grafische Darstellung ausgewählter Werte aus Tabelle 13, 14 und Tabelle 15. (Vergleich zwischen Kontrollgruppen und KO Mäusen mit einer 2wayANOVA und anschließendem Sidak's multiple comparisons test, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, untrainiert: CTRL n=4, EC NOS3 KO n=6, trainiert n=7 in jeder Gruppe).

4 Diskussion

Ziel der Studie war die Untersuchung der Rolle der gewebespezifischen NOS3 in den Erythrozyten, den Endothelzellen sowie global in der durch Training induzierten Kardioprotektion anhand muriner KO-Mausmodelle. Die folgenden Fragestellungen sollten daher in dieser Arbeit beantwortet werden.

Zunächst galt es herauszufinden, welche Art von Bewegung notwendig ist, um kardioprotektive Effekte zu erzielen. Es wurden für verschiedene Trainingsmuster Protokolle etabliert (1). Darauf aufbauend wurde dann die Rolle der gewebespezifischen NOS3 mittels globalen, endothelialen und erythrozytären NOS3 KO Mäusen in der Adaptation an physische Bewegung (2) und in der durch körperliches Training induzierten Kardioprotektion untersucht (3).

Des Weiteren sollte die Rolle der vaskulären NOS3 im systemischen NO-Metabolismus und dessen Veränderungen durch physische Aktivität untersucht werden (4). Abschließend wurden die Auswirkungen des Fehlens der vaskulären NOS3 auf den Redoxstatus (5) und Nukleotidphosphat-Metabolismus (6) im Zusammenhang mit physischer Aktivität analysiert.

Folgende Hauptaussagen ließen sich aus der hier vorliegenden Arbeit ableiten und werden im Weiteren diskutiert.

- 1. Bereits freiwilliges Training ist ausreichend um einen kardioprotektiven Effekt zu erzielen.
- Die Expression der vaskulären NOS3 ist ausschlaggebend für die Leistung und Adaptation an physische Aktivität. Die erythrozytäre NOS3 (RBC NOS3) spielt keine Rolle in der durch Scherstress induzierten Adaptation an körperliches Training.
- Die RBC NOS3 hat weiterhin keinen Einfluss auf die Trainings-induzierte Kardioprotektion, vielmehr ist die vaskuläre NOS3 der Keyplayer.
- Sesshafte NOS3-defiziente Mäuse haben gegenüber CTRL-Mäusen eine geringere NO-Bioverfügbarkeit. Physische Aktivität führt zu einer Kompensation des erniedrigten NO-Pools in EC NOS3 defizienten Mäusen.
- 5. Das Fehlen der vaskulären NOS3 führt zu einem erniedrigten GSH-Pool in den Zellen und zu einer verminderten Redoxkapazität während physischer Aktivität.
- 6. Eine Depletion der EC NOS3 führt zu keiner erhöhten Adenosin-Produktion während physischer Aktivität sowie zu einer Akkumulation von AMP.

4.1 Bereits freiwillige physische Aktivität führt zu kardioprotektiven Effekten

Zu Beginn der Studie musste zunächst die Frage geklärt werden, in welchem Umfang physische Bewegung der Mäuse notwendig ist, um kardioprotektive Effekte zu erzielen. Hierbei wurden die natürliche Bewegung der Mäuse in Gruppenhaltung, das freiwillige sowie das gezwungene Laufradtraining miteinander verglichen.

Der in dieser Studie durchgeführte Versuch der verschiedenen Bewegungs-Protokolle mit Wildtyp Mäusen zeigte, dass eine natürliche Bewegung der Mäuse innerhalb einer Gruppe nicht zu den Trainings-induzierten kardioprotektiven Effekten führte. Aber bereits freiwilliges Laufradtraining reichte aus, um den induzierten Myokardinfarkt signifikant zu verkleinern im Vergleich zu sesshaften Mäusen. Das freiwillige Laufradtraining ist eine etablierte Versuchsmethode und das Ergebnis wurde demzufolge von zahlreichen Arbeitsgruppen bestätigt (Suvorava, Lauer and Kojda, 2004; Calvert et al., 2011; Barr et al., 2017). Verglichen mit dem gezwungenen Laufradtraining ist das freiwillige Training zudem stressfreier und mehr dem natürlichen Rennverhalten der Mäuse angepasst (Svensson et al., 2016; Manzanares, Brito-da-Silva and Gandra, 2018). Svensson et al. zeigte, dass das gezwungene Laufradtraining zu einer Erhöhung des Corticosteron-Spiegels führte im Vergleich zum freiwilligen Training. Corticosteron ist ein Indikator für Stress und kann die akute Myokardinfarktgröße negativ beeinflussen (D. A. Scheuer, and S. W. Mifflin). Ein vergrößerter Myokardinfarkt konnte in unsere Studie jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 8). Um dennoch mögliche stressinduzierte Veränderungen der Ergebnisse auszuschließen, wurde das freiwillige Versuchsprotokoll angewandt.

Die Mäuse können beliebig laufen, welches einen Verlust der Kontrolle einer festen Versuchsvariable mit sich bringt, der zurückgelegten Wegstrecke. Zudem gibt es äußere Einflussfaktoren, wie Geräusche oder Erschütterungen, welche das freiwillige Laufverhalten der Mäuse beeinflussen können. Eine Korrelationsanalyse zwischen Infarktgröße und zurückgelegter Wegstrecke in WT zeigte jedoch keinen Zusammenhang (Pearson r: 0,01273, R²: 0,0001620, P-Wert: 0,9641), sodass die nicht festgelegte Variable der Wegstrecke unabhängig für die kardioprotektiven Effekte ist.

Insgesamt ist das freiwillige Laufradtraining eine gute Methode, um die chronischen Adaptationen an physische Aktivität zu untersuchen und ist mit dem humanen Intervall-Training gleich zu stellen (Manzanares, Brito-da-Silva and Gandra, 2018).

4.2 Die Expression der vaskulären NOS3 ist ausschlaggebend für die Leistung und Adaptation an physische Aktivität

Die endotheliale NO-Synthase wird nicht nur in Endothelzellen, sondern unter anderem auch in Erythrozyten (Kleinbongard *et al.*, 2006; Cortese-Krott *et al.*, 2012) B- und T-Lymphozyten (Reiling *et al.*, 1996), Eosinophilen (Zanardo *et al.*, 1997) und Kardiomyozyten (Balligand *et al.*, 1995) exprimiert. Bis jetzt konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, inwieweit die jeweils gewebespezifische bzw. zellspezifische NOS3 einen Einfluss auf die Leistungskapazität und Adaptation an chronische körperliche Bewegung hat.

Anatomische Parameter

Chronische physische Bewegung führt zu hämatologischen, kardiorespiratorischen und metabolischen Adaptationen des Organismus an die Bewegung (Romain *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2017; Fiuza-Luces *et al.*, 2018). Das globale Fehlen der NOS3 führt zu einer limitierten physischen Leistungskapazität (Momken *et al.*, 2004; Ojaimi *et al.*, 2005). Da auch die endothelialen NOS3 KO Mäuse diese Limitierung aufzeigten, steht fest, dass bereits das Fehlen der vaskulären NOS3 zu Limitierungen der Leistungskapazität führt. Im Gegensatz dazu zeigte die RBC NOS3 KO Linie keine Beeinträchtigung der Laufkapazität, was darauf schließen lässt, dass die erythrozytäre NOS3 keine Rolle in der physischen Leistungskapazität spielt.

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Körpergewichtsanalyse wider. Freiwilliges Laufradtraining führt zu einer Gewichtsreduktion (De Bono *et al.*, 2006; Personius *et al.*, 2010). Dies konnte sowohl in den Kontrolllinien (WT, LoxP NOS3) als auch in den RBC NOS3 KO Mäusen beobachtet werden, wohingegen das Gewicht der globalen und endothelialen KO unverändert blieb. Es konnte jedoch auch keine Gewichtsreduktion der EC NOS3 WT beobachtet werden. Studien unserer Gruppe zeigten, dass Tamoxifen keine Auswirkungen auf die Gewichtszunahme der Mäuse hat (Vornholz, 2018), jedoch wurden nicht die Auswirkungen auf Gewichtsreduktion trainierter mit Tamoxifen injizierter EC NOS3 WT muss in weiteren Versuchen analysiert werden und kann in dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden.

Physische Aktivität führt zu einer Zunahme der Skelettmuskelmasse (Momken *et al.*, 2004; Konhilas *et al.*, 2005). In allen physisch aktiven Linien konnte eine Zunahme, in RBC NOS3 KO eine tendenzielle Zunahme des Soleus-Muskelgewichtes beobachtet werden, auch in den globalen NOS3 KO Mäusen. Eine Reduktion des Körpergewichtes sowie die Zunahme der Soleus-Muskelmasse führten folglich auch zu einem erhöhten Muskelgewicht-/Körpergewicht-Verhältnis. Momken et al. zeigte jedoch konträre Ergebnisse bezogen auf die Muskelmassen-Zunahme in NOS3 KO Mäusen. Er konnte die Zunahme der Soleus-Muskelmasse in WT bestätigen, jedoch zeigten die globalen NOS3 KO keine Veränderung. Während in WT das metabolische Profil im Musculus soleus unverändert bleibt, wurde in Studien gezeigt, dass ein Fehlen der NOS3 sogar zu einer Verschlechterung des metabolischen Profils führen kann (Momken et al., 2004), welches wiederum negative Auswirkungen auf die Laufkapazität hat. Weiterhin wurde in Momken et al.'s Studie gezeigt, dass ein Fehlen der NOS3 zu keiner Veränderung des kardialen Metabolismus führt, vielmehr ist die mitochondriale oxidative Kapazität in den Skelettmuskeln, wie dem Soleus vermindert (Momken et al., 2004), sodass daraus geschlussfolgert werden kann, dass die verminderte Trainingskapazität auf die NOS3 abhängigen metabolischen Limitierungen im Skelettmuskel zurückzuführen sind. Da auch die endothelialen NOS3 KO Mäuse die Limitierung der Laufkapazität zeigten, kann hier die vaskuläre NOS3 eindeutig als die ausschlaggebende NOS3, welche zu Limitierungen der Leistungskapazität führt, bestimmt werden.

Physische Aktivität führt ebenfalls zu Veränderungen des Herzmuskels. Chronische Bewegung führt zu einer physiologischen kardialen Hypertrophie, welche einhergeht mit einer Zunahme der kardialen Masse (Wisløff, 2002; McMullen *et al.*, 2003; Carneiro-Júnior *et al.*, 2013). Da in dieser Studie die kardiale Masse post I/R bestimmt wurde, konnte kein Unterschied bis auf eine Zunahme in den WT Mäusen detektiert werden. Aufgrund der Manipulationen während der I/R-OP kann es zu Einblutungen im Herzen kommen, welche das ursprüngliche Gewicht verfälschen.

Hämatologische Parameter

Im Menschen führt reguläre sportliche Aktivität zu einer verringerten Blutviskosität (Brun *et al.*, 2010; Romain *et al.*, 2011; Kilic-Toprak *et al.*, 2012). Das Plasmavolumen steigt nach physischer Bewegung und führt somit zur Autohämodilution und zu einer Absenkung des Hämatokrits (Brun *et al.*, 1998; Kilic-Toprak *et al.*, 2012). Zudem hat physische Aktivität ebenfalls einen Einfluss auf die erythrozytäre rheologische Adaptation. Zahlreiche Studien zeigten in trainierten Personen eine erhöhte Deformierbarkeit der Erythrozyten unter geringem Scherstress (Smith *et al.*, 1999; Brun *et al.*, 2010; Kilic-Toprak *et al.*, 2012), welche aufgrund der erhöhten Anzahl jüngerer Erythrozyten zustande kommt (Tomschi *et al.*, 2018).

Diese durch chronisches physisches Training induzierten hämatologischen Veränderungen, konnten in den Kontrolllinien des murinen Mausmodells dieser Studie nicht gezeigt werden. Wahrscheinlich ist die Intensität der Laufintervalle nicht ausreichend gewesen, um einen adaptiven Stimulus der hämatologischen Parameter auszulösen.

Eine Ausnahme bildeten allerdings die EC NOS3 KO Mäuse, welche im trainierten Zustand einen erniedrigten SS_{1/2}-Wert zeigten. Die Erythrozyten der trainierten Mäuse sind flexibler, als die der untrainierten. Ebenfalls zeigten die Globalen NOS3 KO Mäuse im Basalzustand flexiblere Erythrozyten im Vergleich zu WT Mäusen. Post I/R konnte in den globalen NOS3 KO Mäusen eine Abnahme der maximalen Elongation in den trainierten Mäusen gegenüber den Kontrollmäusen gemessen werden. Da von den Veränderungen nur NOS3 KO Linien betroffen waren, ist davon auszugehen, dass die Verformbarkeit der Erythrozyten im Zusammenhang mit der NO-Synthase steht. Ob die Flexibilität direkt NO-abhängig ist oder ob NO einen Einfluss auf die erythrozytäre Reifung hat, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

Vereinzelte Unterschiede konnten auch im Blutbild der WT-Mäuse und der RBC NOS3 KO Mäuse festgestellt werden. Die trainierten WT zeigten eine verringerte Blutplättchenanzahl. Eine Review zu Trainings-induzierten Veränderungen der Blutplättchen zeigte jedoch zahlreiche kontroverse Studien (Garai *et al.*, 2017). Generell ist eine Tendenz in allen Mauslinien zur verringerten Blutplättchenanzahl erkennbar, sodass kein Einfluss der NOS3 erkennbar ist.

In den trainierten RBC NOS3 KO's konnte eine Abnahme der Leukozyten und gleichzeitig eine prozentuale Zunahme der Lymphozyten beobachtet werden. Dieses Ergebnis konnte auch in anderen Studien, welche die systemische Verteilung und die mitogene Antwort der T-Lymphozyten in der Milz nach körperlicher Aktivität untersuchten, beobachtet werden (Tharp and Preuss, 1991; Lancaster *et al.*, 2004). Training ist ein physiologischer Stressfaktor, welcher Intensitätsabhängig zur Freisetzung von Katecholaminen führt (Ottaviani and Franceschi, 1996). Dies beeinflusst immunologische Prozesse, wie die T-Lymphozytenproliferation, insbesondere durch die Ausschüttung von Epinephrin und Norepinephrin (Benschop *et al.*, 1993). Kappel *et al.*, (1991) konnte eine statistische Korrelation zwischen in physischem Training ausgeschütteten Stresshormonen und zirkulierenden Lymphozyten nachweisen, sodass RBC NOS3 KO Mäuse entweder mehr Stresshormone ausschütten während des Trainings oder die Trainings-Intensität höher ist. Allerdings ist auch hier eine gewisse Inkonsistenz der Ergebnisse, wie in (Tharp and Preuss, 1991) dargestellt, in den einzelnen Studien zu finden. Die Art des Trainingsprotokolls sowie der Grad der Adaptation können die Variabilität der Ergebnisse beeinflussen (Tharp and Preuss, 1991).

Weiterhin konnten keine NOS3-abhängigen Trainings-induzierten Veränderungen in der Vollblutviskosität festgestellt werden. Diese Ergebnisse der unveränderten Vollblutviskosität in Abhängigkeit von NO wurden ebenfalls durch (Diederich *et al.*, 2018) festgestellt.

Da die Kontrolllinien keine hämatologischen Veränderungen zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass die NOS3 in hämatologischen Adaptionen in global kompetenten NOS3 Mäusen keine Rolle spielt und somit die hämatologischen Faktoren auch keinen Einfluss auf die durch physische Bewegung induzierte Adaption und Kardioprotektion haben. Inwieweit die globale oder endotheliale Depletion der NOS3 und die damit verbundene veränderte erythrozytäre Elastizität eine Rolle in der durch Training induzierten Adaption und Kardioprotektion spielt, muss in weiteren Versuchen analysiert werden.

Vaskuläre Parameter

Körperliche Aktivität führt zu Adaptationen der vaskulären Funktion, in Form einer verbesserten Vasodilatation und auch Neovaskularisierung (Green et al., 2017). Chronische physische Bewegung führt zu einem erhöhten Blutfluss und damit zu erhöhtem Scherstress in den Blutgefäßen. Dies wiederum hat eine erhöhte NOS3 Expression sowie Aktivität (Phosphorylierung an Ser1177) als adaptiven Prozess zur Folge (Hambrecht et al., 2003). Entgegen anderer Studien (Sun et al., 1994; Delp and Laughlin, 1997; McAllister and Laughlin, 1997; Johnson et al., 2001) konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das 4wöchige freiwillige Laufradtraining keinen Effekt auf die Fluss-mediierte Vasodilatation hat, weder in den Kontrollmäusen, noch in den gewebespezifischen NOS3 KO Mäusen. Eine Ursache hierfür könnte allerdings das Analyseverfahren sein. Während in den hier aufgelisteten Studien die Vasodilatation in vitro durch Acetylcholin stimuliert wurde, wurde in dieser Studie in vivo und ohne externe Zugabe von Vasodilatatoren, sondern mittels eines physiologischen Stimulus die Vasodilatation gemessen. Zudem wurde 24 h post Training die Messung durchgeführt. Vielmehr zeigten die Messungen, dass die FMD hauptsächlich von der NOS3-Expression abhängt. Diese Ergebnisse konnten durch andere Arbeitsgruppen ebenfalls bestätigt werden (Schuler et al., 2014; Erkens et al., 2015). Eine weitere Studie zeigte, dass die FMD mit zirkulierenden RXNO-Level (Summe der S-nitrosothiole, N-nitrosamine und Eisen-nitrosyl Spezies) im Plasma korreliert (Heiss et al., 2006). Dies konnte hier nicht gezeigt werden, denn die Nitrit-Werte erhöhten sich in trainierten EC NOS3 KO Mäusen (siehe Abschnitt 4.4.1). Eine verbesserte FMD konnte dennoch nicht beobachtet werden.

Ausnahme ist die Kontrollgruppe der globalen NOS3 KO Mäuse. Hierbei handelt es sich um C57BL/6JRj Wildtyp Mäuse, welche im trainierten Zustand eine prolongierte Vasodilatation zeigten. Dies könnte jedoch durch NOS3 unabhängige Signalwege ausgelöst worden sein, wie z.B. Prostaglandin I₂ Freisetzung in endothelialen Zellen (Russell-Puleri *et al.*, 2017) oder aufgrund der intra- and interindividuellen Variabilität, da die Versuche von 3 unterschiedlichen Personen durchgeführt worden sind.

Kardiale Parameter

Das freiwillige 4-wöchige Laufradtraining führte in den Kontrolllinien und den RBC NOS3 KOs (tendenziell) zu einer verbesserten kardialen Funktion in Form eines erhöhten Schlagvolumens. Ursache des erhöhten Schlagvolumens ist meist eine kardiale Hypertrophie, welche in zahlreichen anderen Studien mit freiwilligem Laufradtraining nachgewiesen werden konnte (Konhilas *et al.*, 2004; De Bono *et al.*, 2006; LaBarge *et al.*, 2016; Walker and Mason, 2018). Das Herzgewicht konnte in dieser Studie nur post I/R bestimmt werden. Aufgrund von Manipulationen am Herzen (Perikardentfernung, Fadenunterstechung der Koronararterie) kam es zu Hämatombildungen, welche das Ursprungsgewicht des Herzens verfälschen könnten.

Die kardiale Adaptation an die physische Aktivität blieb sowohl in den globalen als auch in den endothelialen NOS3 KO Mäusen aus. Es konnte gezeigt werden, dass globale KO Mäuse bereits ohne Trainingsinterventionen eine konzentrische kardiale Hypertrophie entwickeln, (Yang *et al.*, 1999), welche eine kardiale Adaptation an physische Aktivität vermindern könnte. In EC NOS3 KO Mäusen konnte die pathologische Hypertrophie allerdings nicht beobachtet werden. Vermutlich reicht eine induzierte Hypertonie von 4 Wochen nicht aus, um kardiale Remodellierungen zu bewirken.

Da beide KO Linien eine ebenfalls verminderte Trainingskapazität zeigten, stellt sich nun die Frage, ob keine kardiale Adaptation aufgrund zu geringer physischer Aktivität stattfand oder aufgrund molekularer NOS3 abhängiger Mechanismen, welche an der kardialen Modellierung beteiligt sind. Diese Frage sollte in weiteren Studien mit einem gezwungenen Laufprotokoll, welches fest definierte Wegstrecken und Geschwindigkeiten besitzt, geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen die hier gezeigten Ergebnisse, dass die vaskuläre NOS3 eine wichtige, wenn nicht sogar ausschlaggebende Rolle in der Adaptation an körperliches Training spielt.

4.3 Die RBC NOS3 hat keinen Einfluss auf die durch physische Aktivität induzierte Kardioprotektion, vielmehr ist die vaskuläre NOS3 der Keyplayer

Inwieweit die gewebespezifische NOS3 einen Einfluss auf die durch physisches Training induzierte Kardioprotektion hat, wurde durch einen experimentell induzierten Myokardinfarkt untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in allen Kontrolllinien physische Aktivität zu einer signifikant geringeren Infarktgröße führte. Dieser Effekt konnte auch in den RBC NOS3 KO Mäusen beobachtet werden, sodass davon auszugehen ist, dass die erythrozytäre NO-Synthase keinen Effekt auf die durch physische Aktivität induzierte Kardioprotektion hat. Allerdings konnte in Experimenten mit Maus-Chimära, welche keine NOS3 in Blutzellen exprimierten, gezeigt werden, dass die RBC NOS3 einen Einfluss auf die Infarktgröße und kardiale Funktion post I/R hat. Maus-Chimära ohne eine zirkulierende NOS3 zeigten einen größeren Infarkt auf. (Merx et al., 2014). Die in dieser Studie verwendete Methode der Bestrahlung und Knochenmarkstransplantation löst jedoch weitere Signalwege im Organismus aus, sodass das Ergebnis nicht eindeutig interpretierbar ist. In den globalen und endothelialen NOS3 KO Mäusen hingegen war die Infarktgröße in trainierten und sesshaften Mäusen identisch. Somit ist die endotheliale NO-Synthase der Keyplayer in der Trainings-induzierten Kardioprotektion. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Publikationen überein (Calvert et al., 2011; Farah et al., 2013). Diese Gruppen verwendeten jedoch globale NOS3 KO Mäuse, sodass keine eindeutige Zuordnung der gewebespezifischen NOS3 stattfinden konnte. In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine Endothel-spezifische NOS3 KO Maus verwendet. Ähnliche Ergebnisse zeigte (Farah et al., 2017) in einem Langendorff-Experiment, in dem die Endothelzellen mit Triton X 100 entfernt wurden und es zu einer Auslöschung der durch Training induzierten Kardioprotektion in trainierten Mäusen kam. Weiterhin konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass sich die Infarktgrößen der untrainierten Kontrolllinien mit denen der globalen NOS3 KO und EC NOS3 KO Mäusen nicht unterschieden (Abbildung 14, Abbildung 15). Frühere Studien zu der Rolle der NOS3 in I/R-induzierten Infarktgrößen zeigen hierzu kontroverse Ergebnisse, welche stark abhängig von der jeweils verwendeten Mauslinie sind. Die von Sheasley (Shesely et al., 1996) kreierte globale NOS3 KO Linie zeigte eine verkleinerte Infarktgröße aufgrund einer kompensatorischen iNOS Hochregulierung (Sharp et *al.*, 2002). Die von Huang kreierten Mäuse hingegen zeigten einen vergrößerten Infarkt im Vergleich zu den CTRL-Mäusen (Huang *et al.*, 1995). In dieser Studie wurde die Linie von Gödecke (Gödecke *et al.*, 1998) verwendet und die hier ermittelten Infarktgrößen stimmen überein mit denen anderer Veröffentlichungen, welche ebenfalls diese Linie verwendet haben (Erkens *et al.*, 2018). Vielmehr zeigte die Studie von Erkens *et al.*, dass selbst eine akute Inhibition der NOS3 mit ETU (S- Ethylisothiourea Hydrobromid) zu keinem Unterschied in der Infarktgröße führt.

Selbst nach einem Myokardinfarkt bewirkt physische Aktivität eine Verbesserung der kardialen und vaskulären Funktion. Dieser Prozess ist ebenfalls NOS3 abhängig (de Waard *et al.*, 2010). Körperliches Training führt zu einer erhöhten NOS3 Expression in den Gefäßen und im Herzen (Suvorava, Lauer and Kojda, 2004), welche zum Einen während eines Myokardinfarktes eine bessere Durchblutung aufgrund der vasodilatativen Funktion bewirkt und zum Anderen vor ROS schützt und somit die Folgeschäden reduziert.

Kardiale Parameter post I/R

Die Analyse der kardialen Funktion post I/R (Tabelle 6) stimmte mit den Ergebnissen der Infarktgrößen überein. Eine kleinere Infarktgröße hat einen besseren Erhalt der kardialen Funktion zur Folge (Mathey et al., 1974; Gao et al., 2000). Die Ischämie-/Reperfusions-Verletzung führt zu nekrotisierendem Gewebe, welches aufgrund von Vernarbungen versteift und funktionslos ist (Cai et al., 2018). Somit ist die Kontraktilität des Herzens und auch das Volumen stark eingeschränkt. Die unterschiedlichen NOS3 Mutationen der Mäuse scheinen den Myokardinfarkt allerdings auf verschiedene Arten zu kompensieren. Die Linie der RBC NOS3 KO zeigt in den trainierten Mäusen post I/R eine erhöhte Herzfrequenz, welche wiederum bei konstant bleibendem Schlagvolumen zu einem erhöhten Herzzeitvolumen führt. Ebenfalls ist das endsystolische Volumen kleiner im Vergleich zu den sesshaften Mäusen und die Ejektionsfraktion größer. Dies spricht führ eine besser konservierte Kontraktilität der trainierten Mäuse post I/R. Die normalen Wildtypmäuse zeigten im trainierten Zustand ein erhöhtes Schlagvolumen post I/R, welches zu einem vergrößerten Herzzeitvolumen führt. In trainierten globalen NOS3 KO Mäusen konnte ein vergrößertes enddiastolisches Volumen festgestellt werden, allerdings auch ein erhöhtes endsystolisches Volumen im Vergleich zu sesshaften Mäusen. Aufgrund der reinen Herzvolumenzunahme verbesserte sich jedoch nicht die kardiale Funktion der trainierten globalen NOS3 KO Mäuse post I/R. In den endothelialen

NOS3 KO Mäusen konnten hingegen keine Trainings-induzierten Unterschiede post I/R festgestellt werden. Ein induzierter vaskulärer NOS3 Verlust scheint gravierender zu sein, da möglicherweise nicht genug Zeit für Kompensationsmechanismen vorhanden war.

Hat Tamoxifen einen Einfluss auf die Kardioprotektion?

Zur Induktion des endothelialen NOS3 KO's, wurde in dieser Studie Tamoxifen (TAM) als ein Aktivator des cre-ERT2 Fusionsproteins verwendet. Das Fusionsprotein besteht hierbei aus der Cre-Rekombinase und der T2-Mutanten-Form des Östrogenrezeptors, welches unter der Kontrolle des VE-Cadherin-Promotors exprimiert wird (Metzger and Chambon, 2001; Felker *et al.*, 2016). Das cre-ERT2 Fusionsprotein ist unter Basalbedingungen im Cytoplasma lokalisiert. TAM führt zu einer Translokation des Fusionsproteins in den Nukleus und zum Ausschneiden der loxP-markierten Sequenzen durch die Cre-Rekombinase (Felker *et al.*, 2016). Eine Überprüfung der konditionellen Inaktivierung erfolgte gruppenintern mittels Western Blot Analysen der Aorta und demonstrierte die erfolgreiche Depletion des NOS3 Gens im Endothel und der damit verbundenen Proteinexpression (Abbildung 20).



Abbildung 20 Repräsentativer Western Blot des Aorta-Gewebes zum Nachweis der NOS3 (eNOS) in WT, globalen NOS3 KO und EC NOS3 KO Mäusen (Cre+), sowie deren Kontrollen (Cre-), jeweils mit und ohne Tamoxifeninduktion.

Tamoxifen ist ein nicht-steroidales Antiöstrogen und ein weit verbreitetes Medikament zur Brustkrebsbehandlung, da es den stimulatorischen Effekt von Estradiol auf Östrogen-sensitives Brustgewebe inhibiert (Jordan, 1993; Komm and Mirkin, 2014). Da Östrogenrezeptoren, unabhängig vom Geschlecht, in vielen Gewebearten, unter Anderem kardialem Gewebe vorkommen (Grohé *et al.*, 1997; Mendelsohn, 2002; Ropero *et al.*, 2006), könnte TAM unerwünschte Nebenwirkungen auf das Mausmodell haben, welche die Ergebnisse beeinflussen könnten. Zahlreiche humane und murine Studien zeigen die möglichen Effekte von Tamoxifen auf das kardiovaskuläre System.

In Langzeitstudien mit weiblichen Brustkrebspatienten konnten Tamoxifen kardioprotektive Eigenschaften zugeschrieben werden. Zahlreiche klinische Studien zeigten, dass Tamoxifen das

Risiko für Herzkrankheiten und Osteoporose reduziert (Wiseman, 1995; Zhao *et al.*, 2006) Mögliche Wirkmechanismen hierfür sind antioxidative Eigenschaften, welche LDL Partikel vor oxidativem Stress schützen und somit Osteoporose und das damit verbundene Risiko der kardialen Erkrankung senkt (Wiseman, 1995). Ein weiterer Ansatz wurde von Zhao et al. in Mitochondrien untersucht. Die Tamoxifenbehandlung soll zu einer signifikanten Verbesserung der mitochondrialen Atmung und der Superoxid-scavenging Aktivität führen und somit die kardialen Risiken minimieren (Zhao *et al.*, 2006).

Die kardioprotektiven Effekte wurden jedoch nur in weiblichen Lebewesen festgestellt. Eine Review über Nebenwirkungen bei männlichen mit Tamoxifen behandelten Patienten enthüllte allerdings diverse kardiovaskuläre Nebenwirkungen, welche zur Absetzung des Tamoxifens führten (Wibowo et al., 2016). In diesen humanen Studien handelt es sich jedoch um eine Langzeiteinnahme des Medikaments, wobei die in dieser Arbeit verwendete Tamoxifenindikation nur über einen Zeitraum von 5 Tagen verlief. Aufgrund der divergenten Publikationen zu Nebeneffekten des Tamoxifens wurde in dieser Studie TAM ebenfalls in die Kontrolllinie injiziert. Es konnten keine Abweichungen der kardialen (Tabelle 5) und vaskulären Funktion (Abbildung 13) zu WT festgestellt werden. Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls keinen Einfluss von TAM auf die vaskuläre Funktion der Mäuse (Vornholz, 2018).

Hämatologische Parameter post I/R

Ein Vergleich der Leukozytenverteilung vor und nach der I/R-OP zeigt eindeutig eine Entzündungsreaktion in allen verwendeten Mauslinien. Es konnten 24 h nach der I/R OP eine erhöhte Granulozyten-, erniedrigte Lymphozyten- und erhöhte Monozyten-Anzahl gemessen werden. Die Entzündungsreaktion wurde zum Einen durch den operativen Eingriff ausgelöst. Zum Anderen führen nekrotische Zellen des Infarktes durch die unkontrollierte Freisetzung des Zytosols zu einer Immunantwort (Frangogiannis, 2012). Gerade 24 h post I/R befindet sich der Organismus in der akuten Immunantwort mit bestehender Immunzellrecruitierung. Die Immunzellen infiltrieren in das beschädigte Gewebe, um nekrotische Zellen und auch beschädigte extrazelluläre Matrix zu entfernen (Prabhu and Frangogiannis, 2016). Somit besteht eine erhöhte ROS Produktion nicht nur während der Reperfusionsphase, sondern auch während der Inflammation verursacht durch Neutrophile (Prabhu and Frangogiannis, 2016).

4.4 NO-Metabolite, Redoxmechanismen, Energiemetabolismus und physische Aktivität im Zusammenhang mit der endothelialen NOS3

4.4.1 Physische Aktivität kompensiert den erniedrigten NO-Pool in EC NOS3 KO Mäusen.

Da die Depletion der vaskulären NOS3 zum Verlust der Trainings-induzierten Kardioprotektion führte, war eine Hypothese, dass eventuell eine erniedrigte NO-Bioverfügbarkeit der Grund ist. Daher wurden sowohl die Konzentrationen der Nitrit- als auch Nitroso-Spezies in den Organen und im Blut der Mäuse gemessen.

Entgegen anderer Studien, welche die gleichen Trainingsprotokolle verwendeten mit Mäusen bzw. Ratten (Alessio *et al.*, 2005; Calvert *et al.*, 2011), konnte hier keine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit in trainierten Kontrollmäusen festgestellt werden. Weder im Plasma der Kontrollmäuse, noch in den Organen (Aorta, Skelettmuskel, Herz) und den Erythrozyten gab es Unterschiede zwischen physisch aktiven oder sesshaften Mäusen. Eine mögliche Ursache könnte die Probenentnahmezeit darstellen, welche 24 h post Protokoll erfolgte und nicht den akuten Aktivitätsstatus widerspiegelt. Des Weiteren können die NO-Metabolite weiter zu Nitrat oxidiert werden, welches in diesem Versuch nicht gemessen wurde.

Eine Depletion der vaskulären NOS3 führte zu einem erniedrigten NO-Pool in den Erythrozyten und tendenziell dem Plasma sowie der Aorta der sesshaften Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen. Dieses Resultat deckt sich mit NO-Messungen in globalen NOS3 KO Mäusen, welche ebenfalls verminderte zirkulierende NO-Metabolite zeigten (Bryan *et al.*, 2008). Auch in Patienten mit einer endothelialen Dysfunktion konnten verminderte NO-Metabolite im Plasma gemessen werden (Heiss *et al.*, 2006).

Interessanterweise konnte in den trainierten NOS3 KO Mäusen kein Unterschied zu den Kontrollmäusen festgestellt werden. Sowohl im Plasma als auch in der Aorta stieg die Nitritkonzentration nach chronischer physischer Aktivität auf das Level der Kontrollmäuse. Die freiwillige Bewegung führt zu einer Kompensation der erniedrigten NO-Metabolite in NOS3 KO Mäusen. Dieses Resultat konnte ebenfalls in humanen Metaanalysen mit Patienten mit endothelialer Dysfunktion bestätigt werden, welche zeigten, dass die endotheliale Funktion durch physisches Training widerhergestellt werden kann (Ashor *et al.*, 2015). Zudem ist der Grad der Verbesserung direkt proportional zur Trainings-Intensität (Ashor *et al.*, 2015). Daraus schlussfolgernd kann der verminderte NO-Pool keine Ursache des Fehlens der durch physische

Bewegung induzierten Kardioprotektion sein, da dieser durch physische Aktivität kompensiert wird.

Die Frage ist nun, was ist die mögliche NO-Quelle wenn die vaskuläre NOS3 depletiert wurde?

Nitrit kann unter hypoxischen Bedingungen durch Enzyme wie die Xanthinoxidase (XO), Deoxyhämoglobin, Deoxymyoglobin, Aldehyddehydrogenase sowie durch Komplexe der mitochondrialen Atmungskette zu NO reduziert werden (Lundberg, Weitzberg and Gladwin, 2008). Die XO ist insbesondere in der Leber vertreten, konnte jedoch auch in Muskelgewebe nachgewiesen werden (Li et al., 2008; Piknova et al., 2016). Globale NOS3 KO Mäuse zeigten hierbei eine erhöhte XOR Expression (Peleli et al., 2016). Dies könnte eine mögliche Quelle für den Kompensationsmechanismus in EC NOS3 KO Mäusen sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine Veränderungen der Xanthin- bzw. Hypoxanthinkonzentrationen, Reaktionsmetabolite der XOR, in den Organen der EC NOS3 KO Mäuse festgestellt werden. Eine Analyse der XOR-Aktivität der Leber sollte daher in zukünftigen Versuchen durchgeführt werden. Des Weiteren wird ebenfalls der Skelettmuskel als Nitrit/Nitratreservoir angesehen, welcher zum Einen die NO-Metabolite speichert, zum anderen aber auch durch die dort lokalisierte nNOS selbst NO produziert (Piknova et al., 2016). In den hier durchgeführten Versuchen konnten jedoch keine Unterschiede der Nitrit-Konzentration im Skelettmuskel festgestellt werden. Auch hier sollten zukünftige Analysen die Nitratkonzentration im Muskel ermitteln.

4.4.2 Das Fehlen der vaskulären NOS3 führt zu einem reduzierten GSH-Pool im Plasma und zu einer verminderten Redoxkapazität während physischer Aktivität.

Während Ischämie- Reperfusionsverletzungen des Herzens wird eine exzessive Menge an ROS freigesetzt, welche zu Zellschäden bis hin zum Zelltod führen kann (Neri *et al.*, 2017). Um die Balance des Redoxstatus aufrechtzuerhalten, gibt es zahlreiche Antioxidanssysteme in den Zellen, welche die ROS neutralisieren. Hierbei ist GSH das am häufigsten vorkommende nicht enzymatische nicht proteinogene Thiol in den Zellen (Steinbacher and Eckl, 2015).

Es ist sehr gut erforscht, dass sportliche Aktivität und die damit im Zusammenhang stehende muskuläre Kontraktion zu einer erhöhten ROS- und Stickstoffmonoxid-Bildung im Skelett- und Herzmuskel führt (He *et al.*, 2016; Mason *et al.*, 2016). Die Produktion von ROS ist notwendig für die Muskelkontraktionskraft, mitochondriale Biogenese und Muskelhypertrophy. Ein erhöhter ROS-Spiegel kann jedoch zu Muskelschwäche und sogar kontraktiler Dysfunktion

führen (Powers *et al.*, 2011). Chronische physische Bewegung führt somit aufgrund des immer wieder kehrenden Impulses der erhöhten ROS-Produktion zu einer Anpassung des Redox-Systems (Gore *et al.*, 1998; Hollander *et al.*, 1999). Die Zellen sind somit in der Lage, Veränderungen im Redox-Status schneller abzupuffern, welches im Falle eines Myokardinfarktes zu einer verringerten Infarktgröße führen könnte.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass chronische physische Aktivität in den Kontrollmäusen zu einer verminderten totalen GSH- Konzentration ausschließlich im Plasma führt. Das Verhältnis von GSH zu GSSG blieb jedoch unverändert. Während physischer Bewegung wird die Aufnahme von GSH aus dem Plasma in den Muskel gesteigert, um der erhöhten ROS-Produktion entgegenzuwirken (Lew, Pyke and Quintanilha, 1985). Das zu Glutathiondisulfid oxidierte GSH wird entweder in das Plasma ausgeschieden oder kann in der Zelle wieder zu GSH mit Hilfe der Glutathion-Reduktase reduziert werden. Sowohl humane als auch murine Studien zeigten ebenfalls eine signifikante Abnahme der Plasma-GSH-Konzentration nach akutem Training, jedoch mit einer parallelen Erhöhung der GSSG-Konzentration im Plasma (Kretzschmar et al., 1991; Zhou et al., 2019). Da weder erhöhte GSH-Werte in den Organen trainierter Mäuse noch erhöhte GSSG-Werte im Plasma detektiert wurden, könnte eine erhöhte Protein-S-Glutathionylierung in z.B. Muskelzellen vorliegen. Hierbei bindet das reduzierte oder oxidierte GSH reversibel an oxidierte Thiolgruppen von Proteinen mittels enzymatischer oder nicht-enzymatischer Reaktionen und schützt somit das Protein vor weiterer Oxidation (Grek et al., 2013). Eine Analyse des Redox-Proteoms nach Muskelkontraktion zeigte, dass die Protein-S-Glutathionylierung signifikant zunahm, vor allem an mitochondrialen Proteinen (Kramer et al., 2018). Dies könnte eine Erklärung für die Abnahme des GSH-Pools in trainierten Kontrollmäusen darstellen und müsste in weiteren Proteomanalysen untersucht werden.

Untrainierte EC NOS3 KO Mäuse zeigten im Vergleich zu den untrainierten Kontrollmäusen ebenfalls eine verminderte GSH-Konzentration im Plasma, was auch hier für eine erhöhte Protein-S-Glutathionylierung in den Zellen spricht oder aber für eine verminderte GSH-Synthese. Da in den Organen jedoch keine Unterschiede in dem Verhältnis zwischen GSH und GSSG festzustellen sind, ist der Redoxstatus konserviert. GSH und GSSG wird überwiegend in der Leber *de novo* synthetisiert und durch das Plasma als Distributor in die Organe verteilt (Meister and Anderson, 1983). Da die EC NOS3 KO Mäuse bereits im sesshaften Zustand einen verminderten GSH-Pool im Plasma aufweisen, ist davon auszugehen, dass vaskuläre NOS3 KO Mäuse eine verminderte Redoxkapazität während körperlicher Bewegung besitzen.

Weiterhin fördert NO die Synthese von GSH durch die Induktion der Expression einer katalytischen Untereinheit der Glutamat-Cystein-Ligase (Cortese-Krott *et al.*, 2009). Da die EC NOS3 KO Mäuse basal einen generell erniedrigten NO-Pool zeigten, könnte dies ebenfallt eine Erklärung für den verminderten GSH-Pool darstellen. Die eben genannten Argumente könnten auch die verminderte Leistungskapazität und fehlende Antioxidansadaptation erklären. Studien zeigten ebenfalls, dass Bluthochdruck, welcher in den EC NOS3 KO Mäusen präsent ist, zu einem gestörten Glutathion-Metabolismus führt (CHAVES *et al.*, 2007; Robaczewska *et al.*, 2016).

Im Herzen der EC NOS3 KO Mäuse wurde eine erniedrigte totale GSH-Konzentration in untrainierten KO Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt. Dies spricht für eine ebenfalls verminderte GSH-Synthese. In trainierten KO-Mäusen blieb das GSH-Level unverändert.

Im Falle einer exzessiven ROS-Produktion, wie bei physischer Aktivität oder einem Myokardinfarkt kann nicht mehr genügend GSH bereitgestellt werden, um die Muskelkontraktion aufrechtzuerhalten, bzw. Zellschäden zu vermindern.

Ein Keyregulator des Antioxidanssystems ist der nukleare Transkriptionsfaktor Nrf2, welcher durch oxidativen Stress und ebenfalls durch NO aktiviert wird (Buckley, Marshall and Whorton, 2003; Um *et al.*, 2011). Aufgrund der erniedrigten GSH-Synthese in EC NOS3 KO sollte der Nrf2-Faktor in weiteren Versuchen analysiert werden.

In dieser Studie wurden ausschließlich die GSH/GSSG-Konzentrationen gemessen. Das Antioxidanssystem ist jedoch weitaus komplexer und enthält zahlreiche weitere Enzyme (Glutathion Peroxidase, Katalase, Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase, Mangan-Superoxid Dismutase, Thioredoxin Reduktase 2) (Steinbacher and Eckl, 2015), welche hier nicht untersucht worden sind. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Redoxsignale kompartmentalisiert sind in den Zellen, d.h. der globale Redoxstatus einer Zelle spiegelt nicht unbedingt wichtige subzelluläre Veränderungen des Redoxsystems wider (Mason *et al.*, 2016).

4.4.3 Eine Depletion der EC NOS3 führt zu einer limitierten Adenosin-Produktion im Herzen während physischer Aktivität sowie zu einer Akkumulation von AMP im Plasma.

Physische Bewegung führt zu einem erhöhten Energiebedarf der beanspruchten Zellen in Form von ATP. Da die endothelialen NOS3 KO Mäuse eine Limitierung der Leistungskapazität zeigten, wurden Nukleotidphosphate sowie deren Abbauprodukte in den verschiedenen Kompartimenten der Mäuse gemessen, um eventuell energetische Limitierungen der KO Mäuse zu analysieren.

Physische Aktivität führt zu einer Akkumulation von ATP, ADP, AMP und Adenosin im Interstitium des Herz- und Skelett-Muskels (Hellsten *et al.*, 1998; Lo, Mo and Ballard, 2001; Mo and Ballard, 2001).

Im Herzen der trainierten Kontrollmäuse steigt Xanthin im Vergleich zu den sesshaften Mäusen. Xanthin ist ein Abbauprodukt des Purinmetabolismus, welcher unter Anderem Adenosin zu Harnsäure verstoffwechselt. Hierbei wird Adenosin zu Inosin, anschließend Hypoxanthin und mit Hilfe der Xanthinoxidase zu Xanthin und Harnsäure abgebaut (Gröbner, 2001).

Ebenfalls zeigten die trainierten CTRL einen erhöhten Adenosinspiegel im Herzen. Adenosin wird gebildet, wenn den Muskelzellen nicht mehr genug Sauerstoff zur Verfügung steht um ATP zu regenerieren (Marshall, 2007). Die Akkumulation von ADP und AMP führt zur Adenosin-Generierung, welches vasodilatatorisch wirkt (Marshall, 2007). Somit wird bei einem erhöhten Energiebedarf aber zu geringer Sauerstoffversorgung, wie es bei physischer Aktivität vorkommt, Adenosin produziert, um die Sauerstoffversorgung wiederherzustellen und ATP zu regenerieren. Das aus ATP von Ektonukleotidasen metabolisierte Adenosin bindet an A1 und A_{2A} Rezeptoren an den Endothelzellen, welches die Synthese von cAMP durch die Adenylatcyclase stimuliert und über die Proteinkinase A zu einer NO-unabhängigen Vasodilatation führt (Marshall and Ray, 2012). Der Sekundärbotenstoff cAMP konnte in diesen Versuchen jedoch nicht analysiert werden im Herzen, da die Konzentrationen unterhalb der Detektionsgrenze des UPLC-QToF Verfahrens lagen. Die sesshaften EC NOS3 KO Mäuse zeigten eine höhere Adenosin-Konzentration im Herz im Vergleich zu den sesshaften Kontrollmäusen. Dies lässt darauf schließen, dass aufgrund des Fehlens der vaskulären NOS3 die generelle Sauerstoffversorgung aufgrund der nicht dilatierenden Gefäße eingeschränkt ist im Herzen und kompensatorisch Adenosin produziert wird, welches dem entgegenwirkt.

Adenosin wird als ein Marker der Hypoxie angesehen (Edmunds, Moncada and Marshall, 2003). Zahlreiche Gruppen zeigten, dass der Plasma-Adenosin-Spiegel unter Hypoxie ansteigt (Phillis, O'Regan and Perkins, 1992; Saito *et al.*, 1999). In den trainierten EC NOS3 KO Mäusen konnte kein weiterer Anstieg des Adenosinspiegels beobachtet werden. Dies könnte ein Faktor der Limitierung der Leistungskapazität darstellen. Die Zellen können den erhöhten Sauerstoffbedarf während physischer Bewegung nicht durch eine weitere vermehrte Adenosinbildung kompensieren. Allerdings konnten keine kardialen Konzentrationsänderungen der ATP, ADP und AMP-Metabolite analysiert werden, sodass diese Hypothese in weiteren Versuchen untersucht werden muss.

Die Trainingsprotokolle zeigten weiterhin Auswirkungen auf die AMP-Konzentration der Mäuse im Plasma. In den Kontrollmäusen führte physische Aktivität zu einem erniedrigten AMP-Spiegel gegenüber den sesshaften Mäusen. Die endothelialen NOS3 KO Mäuse zeigten das konträre Ergebnis, einen erhöhten AMP-Spiegel in trainierten Mäusen. Da AMP, wie bereits erwähnt ein Abbauprodukt von ATP ist, ist davon auszugehen, dass die AMP-Konzentration mit der Intensität der physischen Belastung korreliert (Sahlin and Broberg, 1990). Dies trifft im Falle der EC NOS3 KO Mäuse zu. In den trainierten Kontrollmäusen sinkt die Plasma-AMP-Konzentration allerdings. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die Muskeln sich an die physische Bewegung adaptiert haben, folglich mehr Mitochondrien und eine bessere Sauerstoffversorgung (Rivera-Brown and Frontera, 2012) aufweisen und somit eine effizientere ATP-Regeneration. Die Adaption der mitochondrialen Biogenese ist NOS3-abhängig (Vettor *et al.*, 2014). Eine Depletion der vaskulären NOS3 könnte die mitochondriale Adaption vermindern, welches die Ergebnisse der AMP-Messung bestätigen.

Des Weiteren konnte ein erhöhter cGMP-Wert im Plasma der trainierten KO Mäusen gegenüber den trainierten CTRL Mäusen festgestellt werden. cGMP ist ein sekundärer Botenstoff, welcher über den NO-abhängigen Weg zur Vasodilatation führt. Weiterhin kann die cGMP-Produktion auch über die Hormone ANP (atriales natriuretisches Peptid) und BNP (B-typisches natriuretisches Peptid) durch die Bindung und Aktivierung der membranständigen Guanylatzyklase A aktiviert werden, welche in der Niere, den Nebennieren, den Blutgefäßen und dem zentralen Nervensystem exprimiert wird und den systemischen Blutdruck reguliert (Tsai and Kass, 2009; Kuhn, 2015). Die natriuretischen Peptide werden insbesondere bei einer Überlastung des Herzens, ausgelöst durch arterielle Hypertension, ausgeschüttet (Kuhn, 2015). Die in diesem Versuch verwendeten EC NOS3 KO Mäuse zeigten ebenfalls eine Hypertonie, welche durch gruppeninterne Messungen des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP

CTRL:67,8±2,72 mmHg/ KO:80,37±2,13 mmHg) gezeigt werden konnte. Durch die zusätzliche Trainingsbelastung des kardiovaskulären Systems könnte es zu einer vermehrten Ausschüttung von ANP und BNP kommen und somit zu einer erhöhten Plasma-cGMP-Konzentration. Klinische Studien zeigten ebenfalls erhöhte cGMP-Werte im Plasma kardiovaskulär Erkrankter (Osajima *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2003). Allerdings konnten im Herzen oder in den Blutgefäßen der Mäuse keine bzw. keine signifikant erhöhten cGMP-Spiegel detektiert werden, jedoch ist tendenziell eine Erhöhung in der Aorta der EC NOS3 KO Mäuse erkennbar. In weiteren Versuchen sollten die ANP- und BNP-Konzentrationen im Plasma sowie weitere cGMP-Werte der Mäuse analysiert werden, um die Ursachen des erhöhten cGMP-Spiegels im Plasma zu untersuchen.

4.4.4 Limitierungen der vorliegenden Arbeit

Zur Berechnung einer adäquaten Gruppengröße, welche eine ausreichende statistische Aussage liefert, wurde eine Poweranalyse (nach Ryan, 2013) durchgeführt. Für die Infarktgrößen diente als Beispielstudie die Wildtyp-Gruppe. Bei einer Effektstärke von d = 1.167 und einer Power von .8 würde man 13 Versuchstiere pro Gruppe (insgesamt 26) benötigen, um ein signifikantes Ergebnis mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test ($\alpha = .05$) zu erzielen.

Die Verfügbarkeit der Mäuse führte jedoch zu Limitierungen der Gruppengröße, sodass nicht immer die ideale n-Zahl erreicht werden konnte.



4.4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Abbildung 21 Graphische Darstellung der zusammengefassten Ergebnisse dieser Arbeit. (1) Sowohl freiwilliges als auch gezwungenes Laufradtraining erzielte kardioprotektive Effekte. (2) Eine globale Depletion der NOS3 oder eine Depletion der EC NOS3 führte zu einer Leistungslimitierung der physischen Aktivität. Die RBC NOS3 zeigte keinen Einfluss auf die Leistung. (3) Des Weiteren blieb die durch physische Aktivität induzierte Kardioprotektion in den globalen und EC NOS3 KO Mäusen aus, jedoch nicht in den RBC NOS3 KO Mäusen. (4) Die erniedrigten NO-Metabolite in EC NOS3 KO Mäusen gegenüber den CTRL wurden durch das physische Training kompensiert. Inwieweit die RBC NOS3 einen Einfluss auf die NO-Metabolite hat, wurde nicht untersucht. (5) EC NOS3 KO Mäuse zeigten einen verminderten GSH-Pool, welcher nach physischer Aktivität nicht kompensiert werden konnte. (6) Ebenfalls führte die Depletion der EC NOS3 zur Akkumulation von AMP sowie zu einem erhöhten Adenosin-Spiegel in untrainierten Mäusen.

Bis jetzt konnte die Gewichtung des Einflussfaktors der gewebespezifischen NOS3 in der durch physische Aktivität induzierten Kardioprotektion nicht eindeutig aufgeklärt werden. Durch die in dieser Arbeit verwendeten spezifischen NOS3 KO Mäuse in den Erythrozyten und Endothelzellen konnte erstmalig gezeigt werden, dass die vaskuläre NOS3 der Keyplayer in der durch körperliches Training induzierten Kardioprotektion ist. Eine Depletion des Enzyms führt

zu Limitierungen in verschiedenen Stoffwechselsystemen, welche letztendlich eine Adaption an physische Aktivität und die daraus resultierende Kardioprotektion verhindern.

Vaskuläre NOS3 KO Mäuse sind im Phänotyp hyperton und zeigen keine Fluss-mediierte Vasodilatation. Dies führt zu einer verminderten Sauerstoffzufuhr während physischer Aktivität und limitiert somit die Leistungskapazität. Die aufgrund der fehlenden NO-Synthase verminderte NO-Bioverfügbarkeit wird durch physische Aktivität kompensiert, dennoch konnten keine verbesserten vasodilatatorischen Eigenschaften gemessen werden. Eine Depletion der vaskulären NOS3 führt zu einem verminderten GSH-Pool. Dies hat zur Folge, dass ein erhöhter GSH-Verbrauch, welcher bei physischer Aktivität auftritt, nicht mehr gedeckt werden kann. NO fördert ebenfalls die GSH-Synthese, welches basal in den EC NOS3 KO Mäusen erniedrigt ist. Aufgrund der verringerten Redoxkapazität kommt es zur Leistungsabnahme des Muskels und somit ebenfalls zur verminderten Leistungskapazität. Es kommt zu keiner Adaptation der Redoxkapazität und somit ebenfalls zu keiner verminderten Infarktgröße. Während Ischämie-Reperfusionsverletzungen kann eine exzessiven ROS Produktion nicht von den trainierten EC NOS3 KO Mäusen neutralisiert werden.

Aufgrund der verminderten Sauerstoffzufuhr im Herzmuskel wird kompensatorisch mehr Adenosin produziert, welches vasodilatatorisch wirkt in einem NO-unabhängigen Signalweg. Bei physischer Aktivität kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf des Herzmuskels, welcher nicht mehr gedeckt werden kann. Dies führt ebenfalls zur Leistungslimitierung der endothelialen NOS3 KO Mäuse. Aufgrund der physischen Leistungslimitierung kam es zu keinen Trainings-induzierten Adaptationen der Mäuse und somit zu keiner durch physische Aktivität induzierten Kardioprotektion.

Eine weitere wichtige Analyse könnte in der mitochondrialen Biogenese erfolgen. Es wurde in Momken et al. 's Studie gezeigt, dass ein Fehlen der NOS3 zu keiner Veränderung des kardialen Metabolismus führt, vielmehr ist die mitochondriale oxidative Kapazität in den Skelettmuskeln, wie dem Soleus vermindert (Momken *et al.*, 2004).

Zukünftige Studien könnten die hier untersuchten Stoffwechselwege, welche durch die Depletion der vaskulären NOS3 limitiert sind weiter untersuchen, um Patienten mit vaskulärer Dysfunktion alternative sowie präventive Therapiestrategien zu gewährleisten.

5 Literaturverzeichnis

Adams, V., Doring, C. and Schuler, G. (2008) 'Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure.', *Frontiers in bioscience*, 13, pp. 302–11. doi: 10.2741/2680.

Alessio, H. M. and Goldfarb, A. H. (1988) 'Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training', *Journal of Applied Physiology*, 64(4), pp. 1333–1336. doi: 10.1152/jappl.1988.64.4.1333.

Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Nagy, S., Philip, B., Byrnes, R. N., Woodward, J. L., Callahan, P. and Wiley, R. L. (2005) 'Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum', *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc., 84(1), pp. 65–72. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.10.010.

Ashor, A. W., Lara, J., Siervo, M., Celis-Morales, C., Oggioni, C., Jakovljevic, D. G. and Mathers, J. C. (2015) 'Exercise Modalities and Endothelial Function: A Systematic Review and Dose–Response Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials', *Sports Medicine*. Springer International Publishing, pp. 279–296. doi: 10.1007/s40279-014-0272-9.

Baldelli, S., Ciccarone, F., Limongi, D., Checconi, P., Palamara, A. T. and Ciriolo, M. R. (2019) 'Glutathione and nitric oxide: Key team players in use and disuse of skeletal muscle', *Nutrients*. MDPI AG, 11(10), pp. 1–18. doi: 10.3390/nu11102318.

Balligand, J. L., Kelly, R. A., Marsden, P. A., Smith, T. W. and Michel, T. (1993) 'Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 90(1), pp. 347–351. doi: 10.1073/pnas.90.1.347.

Balligand, J. L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D. M., Belhassen, L., O'Hara, D. S., Kelly, R. A., Smith, T. W. and Michel, T. (1995) 'Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), pp. 14582–14586. doi: 10.1074/jbc.270.24.14582.

Barr, L. A., Lambert, J., Shimizu, Y., Barouch, L., Naqvi, N. and Calvert, J. (2017) 'Exercise training provides cardioprotection by activating and coupling endothelial nitric oxide synthase via a β 3-adrenergic receptor-AMP-activated protein kinase signaling pathway', *Medical Gas Research*, 7(1), pp. 1–8. doi: 10.4103/2045-9912.202904.

Baskurt, O. K. and Meiselman, H. J. (2013) 'Data reduction methods for ektacytometry in clinical hemorheology', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 54(1), pp. 99–107. doi: 10.3233/CH-2012-1616.

Benschop, R. J., Oostveen, F. G., Heijnen, C. J. and Ballieux, R. E. (1993) 'β2-Adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium', *European Journal of Immunology*, 23(12), pp. 3242–3247. doi: 10.1002/eji.1830231230.

Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. and McMullen, J. R. (2010) 'Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies', *Pharmacology and Therapeutics*, 128(1), pp. 191–227. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.005.

Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L., Patterson, N. L. and McMullen, J. R. (2017) 'Understanding Key Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Protection to Mitigate Disease: Current Knowledge and Emerging Concepts', *Physiological Reviews*, 98, pp. 419–475. doi: 10.1152/physrev.00043.2016.

Blair, S. N., Kohl, H. W., Paffenbarger, R. S., Clark, D. G., Cooper, K. H. and Gibbons, L. W.
(1989) 'Physical Fitness and All-Cause Mortality: A Prospective Study of Healthy Men and Women', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 262(17), pp. 2395–2401. doi: 10.1001/jama.1989.03430170057028.

De Bono, J. P., Adlam, D., Paterson, D. J. and Channon, K. M. (2006) 'Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290(4), pp. R926-34. doi: 10.1152/ajpregu.00694.2005.

Breitenstein, S., Roessig, L., Sandner, P. and Lewis, K. S. (2017) 'Novel sGC stimulators and sGC activators for the treatment of heart failure', in *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC, pp. 225–247. doi: 10.1007/164_2016_100.

Brun, J.-F. F., Varlet-Marie, E., Connes, P. and Aloulou, I. (2010) 'Hemorheological alterations related to training and overtraining', *Biorheology*. IOS Press, 47(2), pp. 95–115. doi: 10.3233/BIR-2010-0563.

Brun, J. F., Khaled, S., Raynaud, E., Bouix, D., Micallef, J. P. and Orsetti, A. (1998) 'The triphasic effects of exercise on blood rheology: Which relevance to physiology and pathophysiology?', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 19(2), pp. 89–104.

Bryan, N. S., Calvert, J. W., Gundewar, S. and Lefer, D. J. (2008) 'Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice', *Free Radical Biology and Medicine*, 45(4), pp. 468–474. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.040.

Buckley, B. J., Marshall, Z. M. and Whorton, A. R. (2003) 'Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4), pp. 973–979. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01308-1.

Cai, M., Wang, Q., Liu, Z., Jia, D., Feng, R. and Tian, Z. (2018) *Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction, Life Sciences.* Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.015.

Calvert, J. W., Gundewar, S., Jha, S., Greer, J. J. M., Bestermann, W. H., Tian, R. and Lefer, D. J. (2008) 'Acute Metformin Therapy Confers Cardioprotection Against Myocardial Infarction Via AMPK-eNOS-Mediated Signaling'. doi: 10.2337/db07-1098.

Calvert, J. W., Condit, M. E., Aragón, J. P., Nicholson, C. K., Moody, B. F., Hood, R. L., Sindler, A. L., Gundewar, S., Seals, D. R., Barouch, L. A. and Lefer, D. J. (2011) 'Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of β 3-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: Role of nitrite and nitrosothiols', *Circulation Research*, 108(12), pp. 1448–1458. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.241117.

Carneiro-Júnior, M. A., Prímola-Gomes, T. N., Quintão-Júnior, J. F., Drummond, L. R., Lavorato, V. N., Drummond, F. R., Felix, L. B., Oliveira, E. M., Cruz, J. S., Natali, A. J. and Mill, J. G. (2013) 'Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes', *Journal of Applied Physiology*, 115(1), pp. 107–115. doi: 10.1152/japplphysiol.00041.2013.

CHAVES, F., MANSEGO, M., BLESA, S., GONZALEZALBERT, V., JIMENEZ, J., TORMOS, M., ESPINOSA, O., GINER, V., IRADI, A. and SAEZ, G. (2007) 'Inadequate Cytoplasmic Antioxidant Enzymes Response Contributes to the Oxidative Stress in Human Hypertension', *American Journal of Hypertension*, 20(1), pp. 62–69. doi: 10.1016/j.amjhyper.2006.06.006.

Chen, K., Pittman, R. N. and Popel, A. S. (2008) 'Nitric oxide in the vasculature: Where does it come from and where does it go? A quantitative perspective', *Antioxidants and Redox Signaling*, 10(7), pp. 1185–1198. doi: 10.1089/ars.2007.1959.

Chen, T. and Vunjak-Novakovic, G. (2018) 'In Vitro Models of Ischemia-Reperfusion Injury', *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. Springer International Publishing, 4(3), pp. 142–153. doi: 10.1007/s40883-018-0056-0.

Chomistek, A. K., Henschel, B., Eliassen, A. H., Mukamal, K. J. and Rimm, E. B. (2016) 'Frequency, Type, and Volume of Leisure-Time Physical Activity and Risk of Coronary Heart Disease in Young Women', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 134(4), pp. 290–299. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021516.

Cortese-Krott, M. M., Rodriguez-Mateos, A., Sansone, R., Kuhnle, G. G. C. C., Thasian-Sivarajah, S., Krenz, T., Horn, P., Krisp, C., Wolters, D., Heiß, C., Kröncke, K.-D. D., Hogg, N., Feelisch, M. and Kelm, M. (2012) 'Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease', *Blood*, 120(20), pp. 4229–4237. doi: 10.1182/blood-2012-07-442277.

Cortese-Krott, M. M., Suschek, C. V., Wetzel, W., Kröncke, K.-D. and Kolb-Bachofen, V. (2009) 'Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione', *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 296(4), pp. C811–C820. doi: 10.1152/ajpcell.00643.2008.

Cosby, K., Partovi, K. S., Crawford, J. H., Patel, R. P., Reiter, C. D., Martyr, S., Yang, B. K., Waclawiw, M. A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K. T., Shields, H., Kim-Shapiro, D. B., Schechter, A. N., Cannon, R. O. and Gladwin, M. T. (2003) 'Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation', *Nature Medicine*, 9(12), pp. 1498–1505. doi: 10.1038/nm954.

Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. and Packer, L. (1982) 'Free radicals and tissue damage produced by exercise', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), pp. 1198–1205. doi: 10.1016/S0006-291X(82)80124-1.

Delp, M. D. and Laughlin, M. H. (1997) 'Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats.', *Medicine and science in sports and exercise*, 29(11), pp. 1454–61. doi: 10.1097/00005768-199711000-00011.

Die 10 häufigsten Todesfälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen - Statistisches Bundesamt (no date). Available at: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html) (Accessed: 24 October 2019).

Diederich, L., Suvorava, T., Sansone, R., Keller, T. C. S., Barbarino, F., Sutton, T. R., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Isakson, B. E., Gohlke, H., Feelisch, M., Kelm, M. and Cortese-Krott, M. M. (2018) 'On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability.', *Frontiers in physiology*, 9, p. 332. doi: 10.3389/fphys.2018.00332.

Done, A. J. and Traustadóttir, T. (2016) 'Nrf2 mediates redox adaptations to exercise', *Redox Biology*. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.003.

Edmunds, N. J., Moncada, S. and Marshall, J. M. (2003) 'Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and vitro studies', *Journal of Physiology*. Wiley-Blackwell, 546(2), pp. 521–527. doi: 10.1113/jphysiol.2002.023663.

Eisenberg, E. and Hill, T. L. (1979) 'A cross-bridge model of muscle contraction', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, pp. 55–82. doi: 10.1016/0079-6107(79)90025-7.

Elrod, J. W., Greer, J. J. M., Bryan, N. S., Langston, W., Szot, J. F., Gebregzlabher, H., Janssens, S., Feelisch, M. and Lefer, D. J. (2006) 'Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(7), pp. 1517–1523. doi:

10.1161/01.ATV.0000224324.52466.e6.

Erkens, R., Kramer, C. M., Lückstädt, W., Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., Dirzka, J., Krenz, T., Mergia, E., Suvorava, T., Kelm, M. and Cortese-Krott, M. M. (2015) 'Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 89, pp. 906–917. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.409.

Erkens, R., Suvorava, T., Kramer, C. M., Diederich, L. D., Kelm, M. and Cortese-Krott, M. M. (2016) 'Modulation of Local and Systemic Heterocellular Communication by Mechanical Forces: A Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase', *Antioxidants & Redox Signaling*, 26(16), pp. 917–935. doi: 10.1089/ars.2016.6904.

Erkens, R., Suvorava, T., Sutton, T. R., Fernandez, B. O., Mikus-Lelinska, M., Barbarino, F., Flögel, U., Kelm, M., Feelisch, M. and Cortese-Krott, M. M. (2018) 'Nrf2 Deficiency Unmasks the Significance of Nitric Oxide Synthase Activity for Cardioprotection', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, pp. 1–15. doi: 10.1155/2018/8309698.

Farah, C., Kleindienst, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Geny, B., Obert, P., Cazorla, O., Tanguy, S. and Reboul, C. (2013) 'Exercise-induced cardioprotection: A role for eNOS uncoupling and NO metabolites', *Basic Research in Cardiology*, 108(6), pp. 1–13. doi: 10.1007/s00395-013-0389-2.

Farah, C., Nascimento, A., Bolea, G., Meyer, G., Gayrard, S., Lacampagne, A., Cazorla, O. and Reboul, C. (2017) 'Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 102, pp. 26–30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.11.008.

Felker, A., Nieuwenhuize, S., Dolbois, A., Blazkova, K., Hess, C., Low, L. W. L., Burger, S., Samson, N., Carney, T. J., Bartunek, P., Nevado, C. and Mosimann, C. (2016) 'In vivo performance and properties of Tamoxifen metabolites for CreERT2 control', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 11(4), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0152989.

Finkel, T. (2011) 'Signal transduction by reactive oxygen species', *Journal of Cell Biology*, pp. 7–15. doi: 10.1083/jcb.201102095.

Fiuza-Luces, C., Santos-Lozano, A., Joyner, M., Carrera-Bastos, P., Picazo, O., Zugaza, J. L., Izquierdo, M., Ruilope, L. M. and Lucia, A. (2018) 'Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors', *Nature Reviews Cardiology*, 15, pp. 731–743. doi: 10.1038/s41569-018-0065-1.

Förstermann, U. and Sessa, W. C. (2012) 'Nitric oxide synthases: Regulation and function', *European Heart Journal*, 33(7), pp. 829–837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.

Foster, M. W., Hess, D. T. and Stamler, J. S. (2009) 'Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective', *Trends in Molecular Medicine*, pp. 391–404. doi: 10.1016/j.molmed.2009.06.007.

Frangogiannis, N. G. (2012) 'Regulation of the inflammatory response in cardiac repair', *Circulation Research*, 110(1), pp. 159–173. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162.

Gao, X. M., Dart, A. M., Dewar, E., Jennings, G. and Du, X. J. (2000) 'Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice', *Cardiovascular Research*, 45(2), pp. 330–338. doi: 10.1016/S0008-6363(99)00274-6.

Garai, B., Chatterjee, S., Mondal, S. and Mondal, T. (2017) 'Effect of exercise on platelet variables : An overview', *International Journal of Physical Education, Sports and Health*, 4(3), pp. 506–510.

Gielen, S., Schuler, G. and Adams, V. (2010) 'Cardiovascular effects of exercise training: Molecular mechanisms', *Circulation*, 122(12), pp. 1221–1238. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.939959.

Godber, B. L. J., Doel, J. J., Sapkota, G. P., Blake, D. R., Stevens, C. R., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000) 'Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase', *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), pp. 7757–7763. doi: 10.1074/jbc.275.11.7757.

Gödecke, A., Decking, U. K. M., Ding, Z., Hirchenhain, J., Bidmon, H. J., Gödecke, S. and Schrader, J. (1998) 'Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 82(2), pp. 186–194. doi: 10.1161/01.RES.82.2.186.

Gomez-Cabrera, M. C., Salvador-Pascual, A., Cabo, H., Ferrando, B. and Vina, J. (2015) 'Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training?', *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., pp. 37–46. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.006.

Gore, M., Fiebig, R., Hollander, J., Leeuwenburgh, C., Ohno, H. and Ji, L. L. (1998) 'Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle.', *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 76(12), pp. 1139–45. doi: 10.1139/cjpp-76-12-1139.

Green, D. J., Hopman, M. T. E., Padilla, J., Laughlin, M. H. and Thijssen, D. H. J. (2017) 'Vascular adaptation to exercise in humans: Role of hemodynamic stimuli', *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 97(2), pp. 495–528. doi: 10.1152/physrev.00014.2016.

Grek, C. L., Zhang, J., Manevich, Y., Townsend, D. M. and Tew, K. D. (2013) 'Causes and consequences of cysteine s-glutathionylation', *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(37), pp. 26497–26504. doi: 10.1074/jbc.R113.461368.

Gröbner, W. (2001) 'Purinstoffwechsel', in *Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 841–858. doi: 10.1007/978-3-642-56784-1_18.

Grohé, C., Kahlert, S., Löbbert, K., Stimpel, M., Karas, R. H., Vetter, H. and Neyses, L. (1997) 'Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors', *FEBS Letters*, 416(1), pp. 107–112. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01179-4.

Hallal, P. C. ... Wells, J. C. (2012) 'Global physical activity levels: Surveillance progress, pitfalls, and prospects', *The Lancet*. Lancet Publishing Group, 380(9838), pp. 247–257. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60646-1.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2015) *Free Radicals in Biology and Medicine, Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press. doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.

Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Kränkel, N., Shu, Y., Baither, Y., Gielen, S., Thiele, H., Gummert, J. F., Mohr, F. W. and Schuler, G. (2003) 'Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase', *Circulation*, 107(25), pp. 3152–3158. doi: 10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C.

Haram, P. M., Kemi, O. J. and Wisloff, U. (2008) 'Adaptation of endothelium to exercise training: Insights from experimental studies', *Frontiers in Bioscience*, 13(1), pp. 336–346. doi: 10.2741/2683.

Haskell, W. L., Sims, C., Myll, J., Bortz, W. M., St. Goar, F. G. and Alderman, E. L. (1993) 'Coronary artery size and dilating capacity in ultradistance runners', *Circulation*, 87(4), pp. 1076–1082. doi: 10.1161/01.CIR.87.4.1076.

Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2013) 'Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target', *Journal of Clinical Investigation*, 123(1), pp. 92–100. doi: 10.1172/JCI62874.

He, F., Li, J., Liu, Z., Chuang, C. C., Yang, W. and Zuo, L. (2016) 'Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise', *Frontiers in Physiology*, 7(NOV16), pp. 1–10. doi: 10.3389/fphys.2016.00486.

Heaps, C. L., Robles, J. C., Sarin, V., Mattox, M. L. and Parker, J. L. (2014) 'Exercise traininginduced adaptations in mediators of sustained endothelium-dependent coronary artery relaxation in a porcine model of ischemic heart disease', *Microcirculation*. Blackwell Publishing Ltd, 21(5), pp. 388–400. doi: 10.1111/micc.12116.

Heiss, C., Lauer, T., Dejam, A., Kleinbongard, P., Hamada, S., Rassaf, T., Matern, S., Feelisch, M. and Kelm, M. (2006) 'Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction', *Journal of the American College of Cardiology*, 47(3), pp. 573–579. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.089.

Hellsten, Y., Maclean, D., Rådegran, G., Saltin, B. and Bangsbo, J. (1998) 'Adenosine concentrations in the interstitium of resting and contracting human skeletal muscle.', *Circulation*, 98(1), pp. 6–8. doi: 10.1161/01.cir.98.1.6.

Hilgemann, D. W. (1997) 'CYTOPLASMIC ATP-DEPENDENT REGULATION OF ION TRANSPORTERS AND CHANNELS: Mechanisms and Messengers', *Annual Review of Physiology*, 59(1), pp. 193–220. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.193.

Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H. and Ji, L. L. (1999) 'Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training.', *The American journal of physiology*, 277(3), pp. R856-62. doi: 10.1152/ajpregu.1999.277.3.R856.

Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. and Fishman, M. C. (1995) 'Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase', *Nature*, 377(6546), pp. 239–242. doi: 10.1038/377239a0.

Janssen-Heininger, Y. M. W., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., Stamler, J. S., Rhee, S. G. and van der Vliet, A. (2008) 'Redox-based regulation of signal transduction: Principles, pitfalls, and promises', *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1–17. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.011.

Jiang, H.-K., Wang, Y.-H., Sun, L., He, X., Zhao, M., Feng, Z.-H., Yu, X.-J. and Zang, W.-J. (2014) 'Aerobic Interval Training Attenuates Mitochondrial Dysfunction in Rats Post-Myocardial Infarction: Roles of Mitochondrial Network Dynamics', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), pp. 5304–5322. doi: 10.3390/ijms15045304.

Johnson, L. R., Rush, J. W. E., Turk, J. R., Price, E. M. and Laughlin, M. H. (2001) 'Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries', *Journal of Applied Physiology*, 90(3), pp. 1102–1110. doi: 10.1152/jappl.2001.90.3.1102.

Johnson, T. A., Jinnah, H. A. and Kamatani, N. (2019) 'Shortage of cellular ATP as a cause of diseases and strategies to enhance ATP', *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., 10(FEB). doi: 10.3389/fphar.2019.00098.

Jordan, V. C. (1993) 'A current view of tamoxifen for the treatment and prevention of breast

cancer', in *British Journal of Pharmacology*, pp. 507–517. doi: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13840.x.

Kappel, M., Tvede, N., Galbo, H., Haahr, P. M., Kjaer, M., Linstow, M., Klarlund, K., Pedersen, B. K. and Haahr, M. (1991) *Evidence that the effect of physical exercise on NK cell activity is mediated by epinephrine*, *J. Appl. Physiol*.

Kemi, O. J. and Wisløff, U. (2010) 'Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium', *Acta Physiologica*. Blackwell Publishing Ltd, 199(4), pp. 425–439. doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02132.x.

Kilic-Toprak, E., Ardic, F., Erken, G., Unver-Kocak, F., Kucukatay, V. and Bor-Kucukatay, M. (2012) 'Hemorheological responses to progressive resistance exercise training in healthy young males', *Medical Science Monitor*. International Scientific Literature Inc., 18(6). doi: 10.12659/MSM.882878.

Kim, J., Wende, A. R., Sena, S., Theobald, H. A., Soto, J., Sloan, C., Wayment, B. E., Litwin, S. E., Holzenberger, M., LeRoith, D. and Abel, E. D. (2008) 'Insulin-Like Growth Factor I Receptor Signaling Is Required for Exercise-Induced Cardiac Hypertrophy', *Molecular Endocrinology*, 22(11), pp. 2531–2543. doi: 10.1210/me.2008-0265.

Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Özüyaman, B., Schnürch, H.-G. G., Gödecke, A., Weber, A.-A. A., Robenek, M., Robenek, H., Bloch, W., Rösen, P. and Kelm, M. (2006) 'Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase', *Blood*. American Society of Hematology. doi: 10.1182/blood-2005-10-3992.

Kodama, S., Saito, K., Tanaka, S., Maki, M., Yachi, Y., Asumi, M., Sugawara, A., Totsuka, K., Shimano, H., Ohashi, Y., Yamada, N. and Sone, H. (2009) 'Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: A meta-analysis', *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 301(19), pp. 2024–2035. doi: 10.1001/jama.2009.681.

Komm, B. S. and Mirkin, S. (2014) 'An overview of current and emerging SERMs', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 143(November), pp. 207–222. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.03.003.

Konhilas, J. P., Maass, A. H., Luckey, S. W., Stauffer, B. L., Olson, E. N. and Leinwand, L. A. (2004) 'Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 287(6), pp. H2768-76. doi: 10.1152/ajpheart.00292.2004.

Konhilas, J. P., Widegren, U., Allen, D. L., Paul, A. C., Cleary, A. and Leinwand, L. A. (2005) 'Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(1 58-1). doi: 10.1152/ajpheart.00085.2005.

Kramer, P. A., Duan, J., Gaffrey, M. J., Shukla, A. K., Wang, L., Bammler, T. K., Qian, W. J. and Marcinek, D. J. (2018) 'Fatiguing contractions increase protein S-glutathionylation occupancy in mouse skeletal muscle', *Redox Biology*. Elsevier B.V., 17, pp. 367–376. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.011.

Kretzschmar, M., Muller, D., Hubscher, J., Marin, E. and Klinger, W. (1991) 'Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man', *International Journal of Sports Medicine*, 12(2), pp. 218–222. doi: 10.1055/s-2007-1024671.

Kuhn, M. (2015) 'Cardiac actions of atrial natriuretic peptide: new visions of an old friend.', *Circulation research*. Lippincott Williams and Wilkins, 116(8), pp. 1278–80. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306325.

Kwong, J. Q. and Molkentin, J. D. (2015) 'Physiological and Pathological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in the Heart', *Cell Metabolism*. Cell Press, pp. 206–214. doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.001.

LaBarge, S. A., Migdal, C. W., Buckner, E. H., Okuno, H., Gertsman, I., Stocks, B., Barshop, B. A., Nalbandian, S. R., Philp, A., McCurdy, C. E. and Schenk, S. (2016) 'p300 is not required for metabolic adaptation to endurance exercise training.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(4), pp. 1623–33. doi: 10.1096/fj.15-281741.

Lancaster, G. I., Halson, S. L., Khan, Q., Drysdale, P., Wallace, F., Jeukendrup, A. E., Drayson, M. T. and Gleeson, M. (2004) 'Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes.', *Exercise immunology review*, 10, pp. 91–106.

Leo, F., Hutzler, B., Ruddiman, C. A., Isakson, B. E. and Cortese-Krott, M. M. (2020) 'Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells', *Nitric Oxide*, 96, pp. 44–53. doi: 10.1016/j.niox.2020.01.002.

Lesnefsky, E. J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J. and Hoppel, C. L. (2001) 'Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia - reperfusion, aging, and heart failure', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 33(6), pp. 1065–1089. doi: 10.1006/jmcc.2001.1378.

Lew, H., Pyke, S. and Quintanilha, A. (1985) 'Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats', *FEBS Letters*, 185(2), pp. 262–266. doi: 10.1016/0014-5793(85)80919-4.

Li, H., Cui, H., Kundu, T. K., Alzawahra, W. and Zweier, J. L. (2008) 'Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: Critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase', *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), pp. 17855–17863. doi: 10.1074/jbc.M801785200.

Li Li Ji, Fu, R. and Mitchell, E. W. (1992) 'Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: Effects of fiber type and exercise intensity', *Journal of Applied Physiology*, 73(5), pp. 1854–1859. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.1854.

Lo, S. M., Mo, F. M. and Ballard, H. J. (2001) 'Interstitial adenosine concentration in rat red or white skeletal muscle during systemic hypoxia or contractions', *Experimental Physiology*. Cambridge University Press, 86(5), pp. 593–598. doi: 10.1113/eph8602226.

Lundberg, J. O., Weitzberg, E. and Gladwin, M. T. (2008) 'The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics', *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), pp. 156–167. doi: 10.1038/nrd2466.

Makanae, Y., Kawada, S., Sasaki, K., Nakazato, K. and Ishii, N. (2013) 'Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats', *Acta Physiologica*, 208(1), pp. 57–65. doi: 10.1111/apha.12042.

Manzanares, G., Brito-da-Silva, G. and Gandra, P. G. (2018) 'Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 52(1), pp. 1–9. doi: 10.1590/1414-431x20187830.

Marshall, J. M. (2007) 'The roles of adenosine and related substances in exercise hyperaemia', *Journal of Physiology*, 583(3), pp. 835–845. doi: 10.1113/jphysiol.2007.136416.

Marshall, J. M. and Ray, C. J. (2012) 'Contribution of non-endothelium-dependent substances to exercise hyperaemia: Are they O2 dependent?', *Journal of Physiology*, 590(24), pp. 6307–6320. doi: 10.1113/jphysiol.2012.240721.

Mason, S. A., Morrison, D., McConell, G. K. and Wadley, G. D. (2016) 'Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants', *Free Radical Biology and Medicine*. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.022.

Mathey, D., Bleifeld, W., Hanrath, P. and Effert, S. (1974) 'Attempt to quantitate relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction', *British Heart Journal*, 36(3), pp. 271–279. doi: 10.1136/hrt.36.3.271.

McAllister, R. M. and Laughlin, M. H. (1997) 'Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries', *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society, 82(5), pp. 1438–1444. doi: 10.1152/jappl.1997.82.5.1438.

McMullen, J. R., Shioi, T., Zhang, L., Tarnavski, O., Sherwood, M. C., Kang, P. M. and Izumo, S. (2003) 'Phosphoinositide 3-kinase(p110α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), pp. 12355–12360. doi: 10.1073/pnas.1934654100.

Meister, A. and Anderson, M. E. (1983) 'Glutathione', *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), pp. 711–760. doi: 10.1146/annurev.bi.52.070183.003431.

Mendelsohn, M. E. (2002) 'Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature', *American Journal of Cardiology*, 90(1), pp. F3–F4. doi: 10.1016/S0002-9149(02)02418-9.

Merx, M. W., Gorressen, S., Van De Sandt, A. M., Cortese-Krott, M. M., Ohlig, J., Stern, M., Rassaf, T., Gödecke, A., Gladwin, M. T. and Kelm, M. (2014) 'Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction', *Basic Research in Cardiology*, 109(1), pp. 1–10. doi: 10.1007/s00395-013-0398-1.

Metzger, D. and Chambon, P. (2001) 'Site- and time-specific gene targeting in the mouse', *Methods*. Academic Press Inc., 24(1), pp. 71–80. doi: 10.1006/meth.2001.1159.

Mo, F. M. and Ballard, H. J. (2001) 'The effect of systemic hypoxia on interstitial and blood adenosine, AMP, ADP and ATP in dog skeletal muscle', *Journal of Physiology*, 536(2), pp. 593–603. doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.0593c.xd.

Momken, I., Lechêne, P., Ventura-Clapier, R. and Veksler, V. (2004) 'Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287(2 56-2), pp. H914–H920. doi: 10.1152/ajpheart.00651.2003.-One.

Neri, M., Riezzo, I., Pascale, N., Pomara, C. and Turillazzi, E. (2017) 'Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: A critical issue for clinicians and forensic pathologists', *Mediators of Inflammation*, 2017, pp. 1–14. doi: 10.1155/2017/7018393.

Ojaimi, C., Li, W., Kinugawa, S., Post, H., Csiszar, A., Pacher, P., Kaley, G. and Hintze, T. H. (2005) 'Transcriptional basis for exercise limitation in male eNOS-knockout mice with age: heart failure and the fetal phenotype', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 289(4), pp. H1399–H1407. doi: 10.1152/ajpheart.00170.2005.

Osajima, A., Okazaki, M., Kato, H., Anai, H., Tsuda, Y., Segawa, K., Tanaka, H., Tamura, M., Takasugi, M. and Nakashima, Y. (2001) 'Clinical Significance of Natriuretic Peptides and Cyclic GMP in Hemodialysis Patients with Coronary Artery Disease', *American Journal of Nephrology*. Karger Publishers, 21(2), pp. 112–119. doi: 10.1159/000046233.

Ottaviani, E. and Franceschi, C. (1996) 'The neuroimmunology of stress from invertebrates to man', *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 48(4–5), pp. 421–440. doi: 10.1016/0301-0082(95)00049-6.

Paulsen, G. ... Raastad, T. (2014) 'Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial', *The Journal of Physiology*, 592(8), pp. 1887–1901. doi: 10.1113/jphysiol.2013.267419.

Pedersen, B. K. and Saltin, B. (2006) 'Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease', *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*. Blackwell Munksgaard, 16(SUPPL. 1), pp. 3–63. doi: 10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x.

Peleli, M., Zollbrecht, C., Montenegro, M. F., Hezel, M., Zhong, J., Persson, E. G., Holmdahl, R., Weitzberg, E., Lundberg, J. O. and Carlström, M. (2016) 'Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis', *Free Radical Biology and Medicine*, 99, pp. 472–484. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.004.

Personius, K. E., Jayaram, A., Krull, D., Brown, R., Xu, T., Han, B., Burgess, K., Storey, C., Shah, B., Tawil, R. and Welle, S. (2010) 'Grip force, EDL contractile properties, and voluntary wheel running after postdevelopmental myostatin depletion in mice', *Journal of Applied Physiology*, 109(3), pp. 886–894. doi: 10.1152/japplphysiol.00300.2010.

Phillis, J. W., O'Regan, M. H. and Perkins, L. M. (1992) 'Measurement of rat plasma adenosine levels during normoxia and hypoxia', *Life Sciences*, 51(15), pp. 149–152. doi: 10.1016/0024-3205(92)90363-T.

Piknova, B., Park, J. W., Kwan Lam, K. and Schechter, A. N. (2016) 'Nitrate as a source of nitrite and nitric oxide during exercise hyperemia in rat skeletal muscle', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 55–56, pp. 54–61. doi: 10.1016/j.niox.2016.03.005.

Powers, S. K., Ji, L. L., Kavazis, A. N. and Jackson, M. J. (2011) 'Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle.', *Comprehensive Physiology*. NIH Public Access, 1(2), pp. 941–69. doi: 10.1002/cphy.c100054.

Prabhu, S. D. and Frangogiannis, N. G. (2016) 'The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction', *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 119(1), pp. 91–112. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577.

Reid, M. B., Stokić, D. S., Koch, S. M., Khawli, F. A. and Leis, A. A. (1994) 'N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans', *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 94(6), pp. 2468–2474. doi: 10.1172/JCI117615.

Reid, M. B., Haack, K. E., Franchek, K. M., Valberg, P. A., Kobzik, L. and West, M. S. (1992) 'Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro', *Journal of Applied Physiology*, 73(5), pp. 1797–1804. doi: 10.1152/jappl.1992.73.5.1797.

Reiling, N., Kröncke, R., Ulmer, A. J., Gerdes, J., Flad, H. D. and Hauschildt, S. (1996) 'Nitric oxide synthese: Expression of the endothelial, Ca2+/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes', *European Journal of Immunology*. Wiley-VCH Verlag, 26(3), pp. 511–516. doi: 10.1002/eji.1830260302.

Rhee, S. G., Bae, Y. S., Lee, S. R. and Kwon, J. (2000) 'Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation.', *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. doi: 10.1126/stke.2000.53.pe1.

Rivera-Brown, A. M. and Frontera, W. R. (2012) 'Principles of exercise physiology: Responses to acute exercise and long-term adaptations to training', *PM and R*. Elsevier Inc., 4(11), pp. 797–804. doi: 10.1016/j.pmrj.2012.10.007.

Robaczewska, J., Kedziora-Kornatowska, K., Kozakiewicz, M., Zary-Sikorska, E., Pawluk, H., Pawliszak, W. and Kedziora, J. (2016) 'Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension', *Journal of Physiology and Pharmacology*. Polish Physiological Society, 67(3), pp. 331–337.

Romain, A. J., Brun, J. F., Varlet-Marie, E. and Raynaud De Mauverger, E. (2011) 'Effects of exercise training on blood rheology: A meta-analysis', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 49(1–4), pp. 199–205. doi: 10.3233/CH-2011-1469.

Ropero, A. B., Eghbali, M., Minosyan, T. Y., Tang, G., Toro, L. and Stefani, E. (2006) 'Heart estrogen receptor alpha: distinct membrane and nuclear distribution patterns and regulation by estrogen.', *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(3), pp. 496–510. doi: 10.1016/j.yjmcc.2006.05.022.

Rubio, R., Berne, R. M. and Dobson, J. G. (1973) 'Sites of adenosine production in cardiac and skeletal muscle', *American Journal of Physiology*, 225(4), pp. 938–953. doi: 10.1152/ajplegacy.1973.225.4.938.

Russell-Puleri, S., dela Paz, N. G., Adams, D., Chattopadhyay, M., Cancel, L., Ebong, E., Orr, A. W., Frangos, J. A. and Tarbell, J. M. (2017) 'Fluid shear stress induces upregulation of COX-2 and PGI2 release in endothelial cells via a pathway involving PECAM-1, PI3K, FAK, and p38', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. American Physiological Society, 312(3), pp. H485–H500. doi: 10.1152/ajpheart.00035.2016.

Ryan, T. P. (2013) Sample Size Determination and Power, Sample Size Determination and Power. John Wiley & Sons. doi: 10.1002/9781118439241.

Sahlin, K. and Broberg, S. (1990) 'Adenine nucleotide depletion in human muscle during exercise: Causality and significance of AMP deamination', in *International Journal of Sports Medicine*, pp. S62–S67. doi: 10.1055/s-2007-1024856.

Saito, H., Nishimura, M., Shinano, H., Makita, H., Tsujino, I., Shibuya, E., Sato, F., Miyamoto, K. and Kawakami, Y. (1999) 'Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. American Lung Association, 159(3), pp. 1014–1018. doi: 10.1164/ajrccm.159.3.9803100.

Sakellariou, G. K., Vasilaki, A., Palomero, J., Kayani, A., Zibrik, L., McArdle, A. and Jackson, M. J. (2013) 'Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity', *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(6), pp. 603–621. doi: 10.1089/ars.2012.4623.

Schaper, J., Meiser, E. and Stammler (1985) 'Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice, and from human hearts', *Circulation Research*, 56(3), pp. 377–391. doi: 10.1161/01.RES.56.3.377.

Schuler, D., Sansone, R., Freudenberger, T., Rodriguez-Mateos, A., Weber, G., Momma, T. Y., Goy, C., Altschmied, J., Haendeler, J., Fischer, J. W., Kelm, M. and Heiss, C. (2014) 'Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice-brief report', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. Lippincott Williams and Wilkins, 34(12), pp. 2651–2657. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304699.

Sharp, B. R., Jones, S. P., Rimmer, D. M. and Lefer, D. J. (2002) 'Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice.', *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(6), pp. H2422-6. doi: 10.1152/ajpheart.00855.2001.

Shesely, E. G., Maeda, N., Kim, H. S., Desai, K. M., Krege, J. H., Laubach, V. E., Sherman, P. A., Sessa, W. C. and Smithies, O. (1996) 'Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 93(23), pp. 13176–13181. doi: 10.1073/pnas.93.23.13176.

Shiva, S., Huang, Z., Grubina, R., Sun, J., Ringwood, L. A., MacArthur, P. H., Xu, X., Murphy,

E., Darley-Usmar, V. M. and Gladwin, M. T. (2007) 'Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration', *Circulation Research*, 100(5), pp. 654–661. doi: 10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b.

Sies, H. (2015) 'Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine', *Redox Biology*. Elsevier B.V., pp. 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

Smith, J. A., Martin, D. T., Telford, R. D. and Ballas, S. K. (1999) 'Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 276(6 45-6), pp. H2188–H2193. doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.h2188.

Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland 2008 (2015). Available at: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-

Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html (Accessed: 24 October 2019).

Steinbacher, P. and Eckl, P. (2015) 'Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle', *Biomolecules*. MDPI AG, 5(2), pp. 356–377. doi: 10.3390/biom5020356.

Suhr, F., Brenig, J., Müller, R., Behrens, H., Bloch, W. and Grau, M. (2012) 'Moderate Exercise Promotes Human RBC-NOS Activity, NO Production and Deformability through Akt Kinase Pathway', *PLoS ONE*. Edited by C. Gaetano, 7(9), p. e45982. doi: 10.1371/journal.pone.0045982.

Sun, D., Huang, A., Koller, A. and Kaley, G. (1994) 'Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats', *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society, 76(5), pp. 2241–2247. doi: 10.1152/jappl.1994.76.5.2241.

Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K. and Finkel, T. (1995) 'Requirement for generation of H2O2 for platelet-derived growth factor signal transduction', *Science*, 270(5234), pp. 296–299. doi: 10.1126/science.270.5234.296.

Suvorava, T., Lauer, N. and Kojda, G. (2004) 'Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice', *Journal of the American College of Cardiology*, 44(6), pp. 1321–1327. doi: 10.1016/j.jacc.2004.06.030.

Svensson, M., Rosvall, P., Boza-Serrano, A., Andersson, E., Lexell, J. and Deierborg, T. (2016) 'Forced treadmill exercise can induce stress and increase neuronal damage in a mouse model of global cerebral ischemia', *Neurobiology of Stress*. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.09.002.

Takahashi, M., Takeda, S., Kurokawa, S., Kubo, T., Fukuda, N. and Izumi, T. (2003) 'Cyclic GMP production by ANP, BNP, and NO during worsening and improvement of chronic heart failure', *Japanese Heart Journal*, 44(5), pp. 713–724. doi: 10.1536/jhj.44.713.

Tharp, G. D. and Preuss, T. L. (1991) 'Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress', *J. Appl. Physiol*, 70(6), pp. 2535–2538.

Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A. and White, H. D. (2018) 'Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)', *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA, 72(18), pp. 2231–2264. doi: 10.1016/j.jacc.2018.08.1038.

Tomschi, F., Bizjak, D., Bloch, W., Latsch, J., Predel, H. G. and Grau, M. (2018) 'Deformability of different red blood cell populations and viscosity of differently trained young men in response to intensive and moderate running.', *Clinical hemorheology and microcirculation*, 69(4), pp. 503–514. doi: 10.3233/CH-189202.

Tsai, E. J. and Kass, D. A. (2009) 'Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics', *Pharmacology and Therapeutics*. NIH Public Access, 122(3), pp. 216–238.

doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.009.

Um, H. C., Jang, J. H., Kim, D. H., Lee, C. and Surh, Y. J. (2011) 'Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 25(2), pp. 161–168. doi: 10.1016/j.niox.2011.06.001.

Vega, R. B., Konhilas, J. P., Kelly, D. P. and Leinwand, L. A. (2017) 'Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise', *Cell Metabolism*. doi: 10.1016/j.cmet.2017.04.025.

Ventura-Clapier, R., Mettauer, B. and Bigard, X. (2007) 'Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure', *Cardiovascular Research*. Elsevier, pp. 10–18. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.003.

Vettor, R., Valerio, A., Ragni, M., Trevellin, E., Granzotto, M., Olivieri, M., Tedesco, L., Ruocco, C., Fossati, A., Fabris, R., Serra, R., Carruba, M. O. and Nisoli, E. (2014) 'Exercise training boosts eNOS-dependent mitochondrial biogenesis in mouse heart: role in adaptation of glucose metabolism', *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 306, pp. E519–E528. doi: 10.1152/ajpendo.00617.2013.

Vincent, H. K., Powers, S. K., Stewart, D. J., Demirel, H. A., Shanely, R. A. and Naito, H. (2000) 'Short-term exercise training improves diaphragm antioxidant capacity and endurance', *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. Springer Verlag, 81(1–2), pp. 67–74. doi: 10.1007/PL00013799.

Vornholz, L. (2018) On the Role of Red Blood Cells in Regulation of Vascular Tone.

de Waard, M. C., van Haperen, R., Soullié, T., Tempel, D., de Crom, R. and Duncker, D. J. (2010) 'Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48, pp. 1041–1049. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.02.005.

Walker, M. and Mason, G. (2018) 'A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare.', *Physiology & behavior*, 191, pp. 82–90. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.04.006.

Wang, M. X., Murrell, D. F., Szabo, C., Warren, R. F., Sarris, M. and Murrell, G. A. C. (2001) 'Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats', *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*. Academic Press Inc., 5(3), pp. 219–232. doi: 10.1006/niox.2001.0348.

Wei, X., Liu, X. and Rosenzweig, A. (2015) 'What do we know about the cardiac benefits of exercise?', *Trends in Cardiovascular Medicine*. Elsevier Inc., 25(6), pp. 529–536. doi: 10.1016/j.tcm.2014.12.014.

Wibowo, E., Pollock, P. A., Hollis, N. and Wassersug, R. J. (2016) 'Tamoxifen in men: a review of adverse events', *Andrology*, 4(5), pp. 776–788. doi: 10.1111/andr.12197.

Wiseman, H. (1995) 'Tamoxifen as an antioxidant and cardioprotectant.', *Biochemical Society symposium*, 61, pp. 209–19.

Wisløff, U. (2002) 'Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca2+ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction', *Cardiovascular Research*, 54(1), pp. 162–174. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00565-X.

Wood, K. C., Cortese-Krott, M. M., Kovacic, J. C., Noguchi, A., Liu, V. B., Wang, X., Raghavachari, N., Boehm, M., Kato, G. J., Kelm, M. and Gladwin, M. T. (2013) 'Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(8), pp. 1861–

1871. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301068.

Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R. and Turner, N. D. (2004) 'Glutathione Metabolism and Its Implications for Health', *The Journal of Nutrition*. Narnia, 134(3), pp. 489–492. doi: 10.1093/jn/134.3.489.

Wu, M. Y., Yiang, G. T., Liao, W. T., Tsai, A. P. Y., Cheng, Y. L., Cheng, P. W., Li, C. Y. and Li, C. J. (2018) 'Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury', *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG, 46(4), pp. 1650–1667. doi: 10.1159/000489241.

Yang, X.-P., Liu, Y.-H., Shesely, E. G., Bulagannawar, M., Liu, F. and Carretero, O. A. (1999) 'Endothelial Nitric Oxide Gene Knockout Mice Cardiac Phenotypes and the Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor on Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury', *Hypertension*, 34, pp. 24–30.

Zanardo, R. C. O., Costa, E., Ferreira, H. H. A., Antunes, E., Martins, A. R., Murad, F. and De Nucci, G. (1997) 'Pharmacological and immunohistochemical evidence for a functional nitric oxide synthase system in rat peritoneal eosinophils', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), pp. 14111–14114. doi: 10.1073/pnas.94.25.14111.

Zhao, Y., Wang, L., Chaiswing, L., Yen, H., Oberley, T. D., Lien, Y., Lin, S., Mattson, M. P. and St. Clair, D. (2006) 'Tamoxifen protects against acute tumor necrosis factor α-induced cardiac injury via improving mitochondrial functions', *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 40(7), pp. 1234–1241. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2005.11.009.

Zhou, W., Zeng, G., Lyu, C., Kou, F., Zhang, S. and Wei, H. (2019) 'The Effect of Exhaustive Exercise on Plasma Metabolic Profiles of Male and Female Rats.', *Journal of sports science & medicine*. Dept. of Sports Medicine, Medical Faculty of Uludag University, 18(2), pp. 253–263.

6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr.Dr. Miriam M. Cortese-Krott bedanken, welche mir während der 3-jährigen Promotion immer zur Seite stand, mir die Möglichkeit gegeben hat internationale Kongresse zu besuchen und mich in allem unterstützt hat. Auch meinem Zweitgutachter Herrn Prof. Dr. Axel Gödecke möchte ich für die Betreuung danken.

Einen besonderen Dank richte ich auch an Frau Dr. Tatsiana Suvorava. Dank ihr wurde ich in alle Methoden und theoretischen Grundlagen eingearbeitet, sodass ich selbstständig in diesem Themengebiet weiterforschen konnte. Sie stand mir während meiner gesamten Promotion mit Rat und Tat zur Seite und richtete immer motivierende Worte an mich.

Ein weiteres Dankeschön richte ich an Herrn Dr. Frederik Barbarino, welcher mich in der Analyse der Thiole und Nukleotidphosphate unterstützt hat. Ebenso danke ich Julia Hocks und Jean-Luc Niederst für die Unterstützung in den Echokardiographien sowie Stephanie Becher für die Einarbeitung in die I/R-OPs.

Diese Arbeit wurde unterstützt aus Mitteln der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Projekt: "Role of red blood cells signaling in exercise-dependent cardiovascular protection" 9772646, (Dr. Tatsiana Suvorava), sowie durch den SPP1710 (CO1305/3-1) DFG.

Weiterhin möchte ich allen meinen lieben Kollegen danken, die immer für mich da waren und gute Freunde geworden sind.

Abschließend danke ich meinen Eltern und Freunden, welche mich immer unterstützt und motiviert haben.