

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

# Einfluss der erythrozytären und endothelialen eNOS auf die trainingsinduzierten Veränderungen der kardialen und endothelialen Funktion sowie der Kardioprotektion

Dissertation

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

vorgelegt von

Jean-Luc Niederst

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Zweitgutachter: PD Dr. Dr. med. André Heinen

Für mich

# Zusammenfassung

**Hintergrund:** Regelmäßiges körperliches Training induziert eine verbesserte kardiale und vaskuläre Funktion und schützt vor Myokardinfarkten. Durch Dysfunktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sind die positiven kardiovaskulären Effekte des körperlichen Trainings deutlich reduziert. Die genaue Rolle der eNOS in Erythrozyten (RBC eNOS) im Vergleich zur Endothelzell-eNOS (EC eNOS) ist weiterhin unbekannt.

**Hypothese:** Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die RBC eNOS ebenso wie die EC eNOS einen signifikanten Beitrag zu trainingsinduzierten Veränderungen der kardiovaskulären Funktion leisten und das kardiale Outcome nach Ischämie/Reperfusion (I/R) verbessern.

**Methoden:** Um diese Effekte vom Einfluss der eNOS der Endothelzellen abzugrenzen, werden Mäuse verglichen, denen eNOS entweder in RBCs (RBC eNOS KO) oder ECs (EC eNOS KO) fehlt. Die verschiedenen Linien und ihre Kontrollen wurden getrennt in eine Gruppe, die vier Wochen Training im Laufrad absolvierte und eine, die singularisiert gehalten wurde (Kontrollgruppe). Änderungen der kardialen und endothelialen Funktion in trainierten und inaktiven Mäusen wurden mit transthorakaler Echokardiographie (TTE) und flussvermittelter Vasodilatation (FMD) untersucht. Als Maß für körperliche Aktivität und Effizienz der Bewegung wurde die Abweichung der Citratsynthase-Aktivität im *Musculus Soleus* bestimmt. Zudem wurden die Mäuse einer myokardialen Ischämie/Reperfusion (I/R)-Operation unterzogen und die kardiale Funktion nach 24 Stunden der Reperfusion erneut mittels TTE untersucht.

**Ergebnisse:** Körperliches Training bewirkte in Wildtypen (WT) eine Verbesserung der kardialen Funktion, ausgedrückt durch eine signifikante Erhöhung des Schlagvolumens (SV) und tendenziell des Herzzeitvolumens (HZV; n=11-9, p<0,05 für SV, p= 0,058 für HZV, ungepaarter t-test). In RBC eNOS KO Mäusen führte körperliches Training dazu, das enddiastolische (EDV) und endsystolische Volumen (ESV) zu erhöhen, erreichte aber keine statistische Signifikanz (n=5, p= 0,123 für EDV, p=0,153 für ESV, ungepaarter t-Test). Hingegen blieb in endothelialen eNOS KO Mäusen ein trainingsinduzierter Effekt aus (n=5, p>0,05, ungepaarter t-Test). Die FMD verbesserte sich nach körperlichem Training leicht in Wildtypen und der RBC eNOS KO Gruppe. Ein positiver Effekt auf die endotheliale Funktion durch körperliche Aktivität konnte in EC eNOS KO Mäusen nicht beobachtet werden. In der Post-Infarkt Echokardiographie konnten die Wildtypen eine signifikant verbesserte Kardioprotektion durch Training entwickeln, nachgewiesen durch ein signifikant erhöhtes EDV, SV und HZV (n=10-9, p<0,05, ungepaarter t-Test). RBC eNOS defiziente Mäuse zeigten eine signifikant verbesserte trainingsinduzierte Erholung nach Infarkt (n=5, p<0,05 für EF, ungepaarter t-Test), in der EC eNOS KO Gruppe gab es keinen Unterschied zwischen Trainings- und singularisierten inaktiven Mäusen (n=4-5, P=0,56 für SV, ungepaarter t-Test).

**Zusammenfassung und Schlussfolgerung:** Die Ergebnisse bestätigen, dass moderates körperliches Training zu einer verbesserten kardiovaskulären Funktion und zu einem besseren Outcome nach ischämischem Infarkt beiträgt. Ein Ausschalten der erythrozytären eNOS verringert diesen Effekt nur geringfügig, weshalb diese nur eine wesentlich untergeordnete Rolle in trainingsinduzierten kardiovaskulären Funktionsänderungen und der Kardioprotektion zu spielen scheint. Im Gegensatz dazu führt der Ausfall der endothelialen eNOS zu einem Verlust der positiven Effekte nach körperlicher Tätigkeit. Zusammenfassend deuten die Daten daraufhin, dass die eNOS in vaskulären Endothelzellen eine Schlüsselrolle bei der Verbesserung der kardiovaskulären Funktion sowie Kardioprotektion nach moderatem körperlichem Training spielt.

# Abstract

**Background:** Regular physical training induces improved cardiac and vascular function and protects against myocardial infarction. Dysfunction of endothelial NO synthase (eNOS) markedly reduces the beneficial cardiovascular effects of exercise training. The exact role of red blood cell eNOS (RBC eNOS) compared with endothelial cell eNOS (EC eNOS) remains unknown.

**Hypothesis:** The hypothesis of this work is that RBC eNOS, like EC eNOS, contribute significantly to exercise-induced changes in cardiovascular function and improve cardiac outcome after ischemia/reperfusion (I/R).

**Methods:** To delineate these effects from the influence of endothelial cell eNOS, mice lacking eNOS in either RBCs (RBC eNOS KO) or ECs (EC eNOS KO) were compared. The different lines and their controls were separated into a group that underwent four weeks of training in a running wheel and one that was kept singularized (controls). Changes in cardiac and endothelial function in trained mice and controls were assessed with transthoracic echocardiography (TTE) and flow-mediated vasodilation (FMD). As a measurement of physical activity and exercise efficiency, the deviation of citrate synthase activity in the soleus muscle was determined. In addition, mice underwent myocardial ischemia/reperfusion (I/R) surgery and cardiac function was reassessed by TTE after 24 hours of reperfusion.

**Results:** Physical training significantly improved cardiac function in wild-type (WT) subjects as expressed by increase in stroke volume (SV) and cardiac output (CO;  $n=11-9$ ,  $p<0.05$  for SV,  $p=0.058$  for CO, unpaired t-test). In RBC eNOS KO mice, physical training tended to increase end-diastolic volume (EDV) and end-systolic volume (ESV) but did not reach statistical significance ( $n=5$ ,  $p=0.123$  for EDV,  $p=0.153$  for ESV, unpaired t-test). In contrast, an exercise-induced effect was absent in endothelial eNOS KO mice ( $n=5$ ,  $p>0.05$ , unpaired t-test). FMD improved slightly after physical training in wild-type and RBC eNOS KO group. A positive effect on endothelial function by physical activity was not observed in EC eNOS KO mice. In post-infarction echocardiography, wild types were able to develop significantly improved cardioprotection by exercise, evidenced by significantly increased EDV, SV and CO ( $n=10-9$ ,  $p<0.05$ , unpaired t-test). RBC eNOS deficient mice showed improved exercise-induced recovery after infarction ( $n=5$ ,  $p<0.05$  for EF, unpaired t-test), in the EC eNOS KO group there was no difference between exercise and singularized inactive mice ( $n=4-5$ ,  $P=0.56$  for SV, unpaired t-test).

**Conclusion:** The results confirm that moderate physical training contributes to improved cardiovascular function and outcome after ischemic infarction. Knockout of erythrocytic eNOS only slightly reduces this effect, and therefore it seems to play only a small role in exercise-induced cardiovascular function changes and cardioprotection. In contrast, knockout of endothelial eNOS results in a loss of beneficial effects after exercise. In summary, the data suggest that eNOS in vascular endothelial cells plays a key role in improving cardiovascular function as well as cardioprotection after moderate exercise training.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen .....	1
1.2	Endothelfunktion und Dysfunktion .....	1
1.2.1	Rolle der eNOS in Endothelzellen.....	2
1.2.2	Rolle der eNOS in Erythrozyten.....	3
1.2.3	Endotheliale Dysfunktion.....	3
1.2.4	Myokardinfarkt .....	5
1.3	Physische Aktivität und ihr Effekt auf die kardiovaskuläre Funktion und Kardioprotektion.....	6
1.3.1	Allgemeiner präventiver und metabolischer Effekt chronischer physischer Aktivität auf den Menschen .....	6
1.3.2	Wirkung von physischer Aktivität auf die kardiale Funktion und die Kardioprotektion.....	7
1.3.3	Wirkung von physischer Aktivität auf die Endothelfunktion.....	8
1.3.4	Einfluss der eNOS in Endothelzellen und Erythrozyten auf trainingsinduzierte Effekte der kardiovaskulären Funktion und Kardioprotektion .....	9
1.4	Ziele der Arbeit .....	10
2	Material und Methoden .....	11
2.1	Verwendete Mauslinien .....	11
2.2	Trainingsprotokoll.....	12
2.3	Experimentelles Setup .....	12
2.4	Citratsynthase-Aktivität .....	13
2.5	Echokardiographie.....	15
2.6	Flussvermittelte Vasodilatation.....	21
2.7	Ischämie/Reperfusion .....	24
2.8	Auswertung und Statistik.....	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Citratsynthase-Aktivität und Effekt des körperlichen Trainings.....	25
3.2	Kardiale Funktion nach körperlichem Training .....	26
3.2.1	Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von Wildtypen (und Kontrollgruppen).....	26
3.2.2	Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von RBC eNOS KO28	

3.2.3	Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von EC eNOS KO...	29
3.3	Kardiale Funktion nach körperlichem Training und Ischämie/ Reperfusion .....	31
3.3.1	Effekt von körperlichem Training und I/R auf die kardiale Funktion auf Wildtypen und Kontrollgruppen .....	31
3.3.2	Effekt von körperlichem Training und I/R auf RBC eNOS KO.....	33
3.3.3	Effekt von körperlichem Training und I/R auf EC eNOS KO.....	35
3.4	Endothelfunktion nach körperlichem Training .....	36
3.4.1	Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in Wildtypen und anderen Kontrollgruppen.....	36
3.4.2	Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in RBC eNOS KO ...	37
3.4.3	Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in EC eNOS KO.....	38
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	39
4	Diskussion .....	40
4.1	Rolle der RBC eNOS bei trainingsinduzierten Veränderungen der kardiovaskulären Funktion .....	41
4.2	Rolle der EC eNOS bei trainingsinduzierten Veränderungen der kardiovaskulären Funktion .....	42
4.3	Protektiver Effekt der EC eNOS nach I/R im Vergleich zur RBC eNOS.....	43
4.4	Limitationen der Arbeit.....	44
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	45
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	46

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Translationale und posttranslationale Mechanismen als Antwort der Endothelzellen auf Scherstress .....	9
Abb. 2: Experimentelles Setup .....	13
Abb. 3: Reaktion der Citratsynthese .....	14
Abb. 4: Parasternale Langachse im B-Bild mit eingefügtem Tracking des murinen linken Ventrikels in der Systole .....	16
Abb. 5: Parasternale Langachse im B-Bild mit eingefügtem Tracking des murinen linken Ventrikels in der Diastole .....	16
Abb. 6: Parasternale Langachse des murinen linken Ventrikels der Maus im M-Mode mit eingefügten Messungen der Wanddicken.....	17
Abb. 7: Parasternale kurze Achse des linken murinen Ventrikels im M-Mode .....	18
Abb. 8: Apikaler Vierkammerblick mit Darstellung des Flusses über der murinen Mitralklappe .....	19
Abb. 9: Auswertung der Doppler-Ableitung der murinen Mitralklappe .....	19
Abb. 10: Modifizierte parasternale Langachse mit Darstellung des Flusses über dem murinen linksventrikulären Ausflusstraktes.....	20
Abb. 11: Darstellung der <i>A. Iliaca externa</i> in Ruhe mit farbkodierter Duplex-Sonographie.....	22
Abb. 12: Darstellung der <i>A. Iliaca externa</i> während der Okklusionsphase .....	22
Abb. 13: Darstellung der <i>A. Iliaca externa</i> während der Reperfusionsphase .....	23
Abb. 14: Citratsynthese-Aktivität nach körperlichem Training in WT, RBC und EC eNOS KO .....	25
Abb. 15: Linksventrikuläre Funktion in trainierten WT in der Echokardiographie.....	27
Abb. 16: Linksventrikuläre Funktion in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie .....	28
Abb. 17: Linksventrikuläre Funktion in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie .....	30
Abb. 18: Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten WT in der Echokardiographie .....	32
Abb. 19: Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie.....	34
Abb. 20: Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie.....	35
Abb. 21: FMD in trainierten WT.....	37
Abb. 23: FMD in trainierten RBC eNOS KO .....	38
Abb. 24: FMD in trainierten EC eNOS KO.....	39

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <b>Verwendete genetisch veränderte Mauslinien</b> .....	11
Tabelle 2: <b>Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten WT in der Echokardiographie</b> .....	27
Tabelle 3: <b>Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie</b> .....	29
Tabelle 4: <b>Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie</b> .....	30
Tabelle 5: <b>Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten WT in der Echokardiographie</b> .....	33
Tabelle 6: <b>Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie</b> .....	34
Tabelle 7: <b>Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie</b> .....	36

# Abkürzungsverzeichnis

<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BH4</b>	Tetrahydrobiopterin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ionisiertes Calcium
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat
<b>EC</b>	<i>endothelial cell</i>
<b>EDV</b>	enddiastolisches Volumen
<b>EF</b>	Ejektionsfraktion
<b>ESV</b>	endsystolisches Volumen
<b>eNOS</b>	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS3)
<b>FAD</b>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
<b>FMD</b>	flussvermittelte Vasodilatation
<b>GMP</b>	Guanosinmonophosphat
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>HR</b>	Herzrate
<b>Hsp90</b>	heat shock protein 90
<b>HZV</b>	Herzzeitvolumen
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>iNOS</b>	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
<b>IVS</b>	Interventrikularseptumsdicke
<b>I/R</b>	Myokardiale Ischämie/Reperfusion
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>KI</b>	knock-in
<b>KO</b>	knock-out
<b>LAD</b>	linksabsteigende Koronararterie
<b>LoxP</b>	mit LoxP-Sequenz flankiertes Gen
<b>LV</b>	linker Ventrikel
<b>LVID</b>	linksventrikulärer Durchmesser

<b>LVPW</b>	linksventrikulärer Hinterwanddurchmesser
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>NADPH</b>	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	Stickstoffmonoxidsynthase
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>pAVK</b>	periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKB</b>	Proteinkinase B
<b>PKG</b>	Proteinkinase G
<b>RBC</b>	Red blood cell
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>SERCA</b>	sarco/endoplasmatic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
<b>sGC</b>	lösliche Guanylatzyklase
<b>SMC</b>	glatte Muskulatur
<b>SV</b>	Schlagvolumen
<b>TAM</b>	Tamoxifen
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>WT</b>	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Eine der Herausforderungen der modernen Medizin ist die hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und mit 35,3 % ihr hoher Anteil an Todesursachen in Deutschland, gefolgt von Krebs mit 24,6 % [1]. Im Gesundheitsmonitoring des Robert-Koch-Institutes konnte nach Auswertung der Daten von 2008-2011 allein für die koronare Herzkrankheit (KHK) eine Prävalenz von 9,3% bei den Erwachsenen in Deutschland ermittelt werden [2]. Auch weltweit ist die KHK die häufigste Todesursache [3] und damit ein sehr hoher Kostenfaktor für Gesundheitssysteme [4]. Erfreulicherweise ist in den vergangenen Jahren die Mortalität durch davon ausgehende kardiovaskuläre Ereignisse wie Schlaganfälle und Myokardinfarkte zurückgegangen [5]. Ein wesentlicher Grund dafür ist die Modifikation von kardiometabolen Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Blutzucker und Fettstoffwechsel, aber auch des Gesundheitsverhaltens (Rauchen, Ernährung, körperliche Aktivität) [6]. Weiterer Hauptgrund ist die kontinuierlich verbesserte Versorgung des akuten Herzinfarktes [7]. Bei sinkender Mortalität und stabiler Inzidenz der KHK sieht sich die Gesellschaft mit einer steigenden Prävalenz konfrontiert [8], die die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Strategien erfordert.

## 1.2 Endothelfunktion und Dysfunktion

Die vaskuläre Funktion wird im menschlichen Körper im Wesentlichen vom Endothel bestimmt. Diese innere Gefäßschicht reguliert den Gefäßtonus und den daraus resultierenden lokalen Blutfluss [9, 10]. Dafür muss es diverse Faktoren produzieren, die die notwendigen Signaltransduktionswege ermöglichen. Solche Vasodilatoren bzw. -konstriktoren sind beispielsweise NO und Prostacyclin sowie Endothelin, Angiotensin-2, Superoxid und Thromboxan [11]. Das Endothel erfüllt auch weitere Aufgaben. So kann es mittels Oberflächenmolekülen mit inflammatorischen Zellen interagieren und diese rekrutieren. Damit hat es auch einen Einfluss auf sich bildende arteriosklerotische Plaques [12]. Die Inhibition von Plättchenaggregation ist ebenfalls eine Aufgabe von NO [13]. Im Falle von Verletzungen des Endothels kann auch die Gefäßmuskulzellproliferation als Reaktion darauf moduliert werden, sodass sich das Gefäß reorganisiert [12, 14].

Die Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) ist essenziell für die physiologische Funktion des Endothels. Eine basale, aber auch stimulierbare Aktivität wird über zahlreiche Faktoren wie Transkription, Substratverfügbarkeit, posttranslationale Modifikation und Interaktionen mit Co-Faktoren reguliert [13]. Ein wichtiger Signaltransduktionsweg zur Steigerung der Enzymaktivität kommt über die Wirkung der Schubspannung auf das Endothel

zustände. Dadurch formierte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Komplexe binden an eNOS, welches von Caveolin-1 dissoziiert und seine Aktivität steigert [15]. Ohne erhöhte Schubspannung kann die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wieder sinken und eNOS mit Caveolin reassoziieren. Verstärkt werden kann dies durch posttranslationale Palmitoylierung von eNOS [16]. Insulin, Acetylcholin und Östrogen sind Beispiele für Faktoren, die auch die Enzymaktivität steigern, während arterielle Hypertonie, Diabetes, das metabolische Syndrom, IL-6, TNF- $\alpha$  oder Resistin diese hemmen können. Als entscheidender Regulationsmechanismus wurde die Phosphorylierung an Serin-Rest S1177 identifiziert [17]. Dieser Signalweg kann auch  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig aktiviert werden und spielt die entscheidende Rolle bei der schubspannungsabhängigen Aktivierung der eNOS [17, 18]. Das produzierte NO ist nach Oxidation zu Nitrit oder Nitrat auch im Blut oder Gewebe speicherbar und steht nach erneuter Reduktion wieder zur Verfügung [19]. Die Rückgewinnung ist unter azidotischen oder hypoxischen Bedingungen verstärkt, welche beispielsweise durch körperliche Aktivität oder auch als Folge eines Herzinfarktes geschaffen werden [19]. Eine weitere Speichermöglichkeit ist die Reaktion von NO mit GSH zu S-Nitrosoglutathion. Mit Hilfe dieser endogenen Reserve kann zellulärer Stress durch Nitroso-Radikale positiv beeinflusst werden [20]. Die Reaktion der Thiolgruppen ist reversibel und sie können wieder in freie SH-Gruppen umgewandelt werden [20]. Die Thiolgruppen reaktiver Cysteine an Proteinen sind auch durch NO vor oxidativem Stress geschützt [21].

Um die Endothelfunktion zu ermitteln, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine etablierte Methode ist die Messung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) nach *in-vivo* oder *in-vitro* Stimulation durch Acetylcholin, welche durch NO-Freisetzung zu einer Vasodilatation führen [12]. In einem klinischen oder experimentellen Setting kann die NO-Freisetzung auch anders getriggert werden. Nach kurzweiliger Ischämie der entsprechenden Extremität führt der erhöhte Blutfluss in der anschließenden Reperfusionphase zu einer verstärkten NO-Freisetzung [22]. Diese Hyperämie erzeugt eine erhöhte Schubspannung am Endothel [23]. Wie bereits beschrieben wird der Akt/PKB-Signalweg aktiviert und durch Phosphorylierung die Enzymaktivität der eNOS gesteigert und die Vasodilatation ermöglicht [17, 24].

### 1.2.1 Rolle der eNOS in Endothelzellen

Die eNOS wird in zahlreichen Zellen exprimiert, hauptsächlich aber in Endothelzellen (EC) [25]. 1988 konnte nachgewiesen werden, dass vaskuläre Endothelzellen über eine Reaktion das Substrat Arginin zu NO umsetzen können [26]. Das produzierte NO diffundiert in die lokalen glatten Muskelzellen und aktiviert deren cGMP-Signalweg. Dieser Signaltransduktionsweg führt schlussendlich über ein Absinken der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Relaxation der Muskelzelle und zur Vasodilatation [27, 28]. Neben Scherstress und Gefäßwandausdehnungen, die als mechanische Stimuli gelten, gibt es weitere Wege, die die vaskuläre eNOS aktivieren können. Dazu zählen unter anderem interendotheliale Verbindungskomplexe, Ionenkanäle, Kanäle für das Substrat Arginin oder das Zytoskelett [29]. Diese befinden sich in weiteren Mikrodomänen [30].

Überexpression von eNOS kann zu einer Erniedrigung des Blutdrucks führen mit gesteigerter NO-Freisetzung [31]. Zudem ist in transgenen Mäusen mit zusätzlichem APO-E-KO auch ein verminderter Cholesterin-Level sowie eine signifikant reduzierte Bildung von arteriosklerotischen Läsionen nach sechswöchiger westlicher Diät zu beobachten gewesen [32]. Eine weitere Studie mit erhöhter Expression von vaskulärer eNOS in einer transgenen Mauslinie konnte den positiven Effekt auf das Kreislaufsystem durch eine Senkung des Blutdrucks bestätigen [33].

### 1.2.2 Rolle der eNOS in Erythrozyten

Die eNOS ist auch in weiteren Zell- und Gewebearten nachweisbar aktiv. So findet man das Enzym in Kardiomyozyten [34], Gehirn-, Plazenta-, und Nierenzellen [13, 35], sowie Erythrozyten (RBC) [36-39]. Forschungsergebnisse zeigten, dass auch die erythrozytäre eNOS (RBC eNOS) funktional aktiv ist und eine Beteiligung an der kardiovaskulären Funktion zeigt [40]. In humanem Blut ließ sich *ex-vivo* eine basale eNOS-Aktivität nachweisen [36, 38]. RBC können neben der Synthese NO binden und transportieren [38, 41] während man früher von einer Rolle der RBC als NO-Inaktivatoren ausgegangen ist [42]. RBC exprimieren auch andere Isoformen der eNOS wie die iNOS und das für den Signaltransduktionsweg wichtige Calmodulin [43]. Die RBC eNOS ist im Wesentlichen unter normoxischen Bedingungen aktiv [38]. Sehen sich die Zellen einer hypoxischen Situation entgegengestellt, sind sie in der Lage NO zur Verfügung zu stellen und sich an der hypoxischen Vasodilatation zu beteiligen [41]. Zudem kann in diesen Situationen auch die Nitritreduktion enzymatisch und nicht-enzymatisch von RBCs signifikant gesteigert werden [44]. Im Falle eines eNOS-KO in transgenen Mäusen ist die eNOS in RBC nicht mehr nachweisbar, während die funktionelle eNOS in RBC von Wildtypen vorhanden ist [40].

Im Maus-KO-Modell konnte der Einfluss der RBC eNOS auf die Blutdruckregulation und den zirkulierenden Nitrit-Pool nachgewiesen werden [40]. Sowohl humane als auch murine RBC besitzen eine aktive sGC, die auch bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion erhalten ist [45]. Die Signaltransduktionswege zur Steigerung der NO-Produktion sind mit dem PI3K/Akt-Signalweg und der Phosphorylierung an S1177 vergleichbar, analog zu den vaskulären Endothelzellen und können durch Erythropoetin aktiviert werden [46]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NO dazu beitragen kann, die Deformabilität von RBC unter oxidativem Stress zu erhalten [47]. Dies ist elementar für einen ausreichenden Blutfluss in Kapillaren mit geringerem luminalen Durchmesser als die RBC selbst, beispielsweise den Kapillaren der Koronararterien während eines Myokardinfarktes. Unter Ruhebedingungen scheint NO keinen Einfluss auf die Deformabilität der Erythrozyten zu haben, was bereits kontrovers diskutiert wurde [48].

### 1.2.3 Endotheliale Dysfunktion

Endotheliale Dysfunktion ist ein Zustand des kardiovaskulären Systems mit einer verringerten NO-Produktion und -Bioverfügbarkeit. Zahlreiche Erkrankungen wie Hypertonie, Arteriosklerose, Diabetes, Dyslipidämie und Adipositas zeigen dies als gemeinsame Ursache und beeinträchtigen somit die Aufrechterhaltung der physiologischen und protektiven Funktion des Endothels und seines NO-Metabolismus [49]. Die FMD als Methode zur Ermittlung der endothelialen Funktion bzw. Dysfunktion wurde bereits in Kapitel 1.2 beschrieben. Die im physiologischen Fall erhöhte NO-Freisetzung durch reaktive Hyperämie nach vorheriger Ischämiephase führt zur messbaren Vasodilatation [12]. Nun wird die FMD aber auch durch diverse kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflusst [22, 50] und kann folglich Aussagen über die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkten und Schlaganfällen treffen [12, 50]. Die eNOS-Abhängigkeit der FMD wird bei Einsatz von NOS-Inhibitoren im Menschen verdeutlicht, da sie die FMD aufheben [51]. Des Weiteren lässt sich eine Steigerung des Gefäßtonus gefolgt von einer Senkung des lokalen Blutflusses nachweisen [52].

Es wurden verschiedene Ursachen für die reduzierte NO-Bioverfügbarkeit in der endothelialen Dysfunktion identifiziert. Dies kann eine verminderte Expression oder Inhibition des produzierenden Enzyms selbst sein, ein Mangel des Substrats L-Arginin oder von BH<sub>4</sub>, mechanische Defekte des Endothels, Intoxikation durch inflammatorische Zytokine oder freien Fettsäuren, sowie der erhöhte Verbrauch von verfügbarem NO durch Superoxidanionen unter oxidativem Stress und auch Hyperglykämien, die intrazelluläre Signalwege beeinflussen [12, 13, 53, 54]. Eine Entkopplung der eNOS ist ebenfalls möglich, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS), anstatt NO, produziert werden [13, 53, 55, 56]. Diese Entkopplung hat diverse bereits erforschte Ursachen. Ein Ansatz ist die vermehrte Oxidierung von BH<sub>4</sub> [54]. Bestätigt wurde diese Hypothese durch Gabe von BH<sub>4</sub> an Patienten mit Diabetes Mellitus, deren vorher inhibierte endothelvermittelte Vasodilatation wiederhergestellt werden konnte [57]. Klinisch relevant wird die eNOS-Entkopplung in Patienten mit Hypertonie, da sie dort häufiger beobachtet wird und zu selbiger beitragen kann, sowie möglicherweise die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques fördert [58].

Zusammengefasst ist oxidativer Stress eine hauptagierende Ursache, die den NO-Metabolismus negativ beeinflusst und zur endothelialen Dysfunktion führt. Hierbei ist zwar die eNOS-Expression erhöht, aber Produktion, Verfügbarkeit und Aktivierung von NO sind deutlich gemindert [54]. Besonders in Patienten mit Arteriosklerose und Hypertonie ist der verringerte NO-Spiegel im Plasma feststellbar [59]. Weitere Studien belegen den Zusammenhang von kardiovaskulären Erkrankungen, darunter hauptsächlich Arteriosklerose, und endothelialer Dysfunktion bei eingeschränktem NO-Metabolismus. Im Verlauf entstehen chronische Erkrankungen wie die KHK, Schlaganfälle und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) [60]. In häufiger klinischer Anwendung befinden sich mehrere Medikamente, die einen nachgewiesenen positiven Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit haben und somit die Endothelfunktion unterstützen können. Dies sind beispielsweise ACE-Hemmer, Angiotensin-1-Rezeptorblocker und Statine [54].

## 1.2.4 Myokardinfarkt

Dem Zustandekommen eines Myokardinfarktes liegen unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde. Meistens ist das akute Ereignis auf eine chronische arteriosklerotisch veränderte Gefäßversorgung des Herzens, den Koronargefäßen, zurückzuführen. Eine Okklusion dieser bereits verengten Gefäße führt zu einem ischämischen Infarkt [61]. Zunächst bricht im betroffenen Gebiet die Blutperfusion ein und eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff kann nicht mehr gewährleistet werden. Die nachfolgenden Areale, die vom Blutfluss des verschlossenen Gefäßes abhängig sind, werden ischämisch. Die entstehende Hypoxie beeinträchtigt die Elektronentransportkette der myokardialen Mitochondrien und sie wechseln in einen Zustand anaerober Respiration, die nur eine stark verminderte ATP-Produktion leisten kann [62]. Laktat akkumuliert intrazellulär mangels ausreichender Oxidierung von Pyruvat und die Zelle tritt in den Zustand einer metabolischen Azidose ein [63]. Bei gleichzeitigem Ausfall der Ionen-Transport-Kanäle geht die Zelle in einen hyperosmolaren Zustand über und das dem osmotischen Gradienten folgende Wasser lässt die Zelle anschwellen [63]. Sinkt nun der pH durch den akkumulierten Wasserstoff und das Laktat, werden Enzyme inaktiviert und die MPTP (mitochondrial permeability transition pore) geöffnet [64]. Schlussendlich schwellen auch die Mitochondrien an und ihre Membran kann reißen. Der nekrotische Zelltod steht unmittelbar bevor [65].

Klinisch wird nun eine Reperfusion als etablierte Therapiemethode angestrebt. Dabei wird der entstandene Thrombus mittels einer thrombolytischen Therapie entfernt oder eine perkutane Koronarangioplastie angewandt. Bei letzterer wird das verengte Gefäß mit einem Stent versorgt und dauerhaft offengehalten [64]. Die dadurch eingeleitete Reperfusionphase lässt wieder eine adäquate Sauerstoffversorgung der Zellen zu. Jedoch produziert die reaktivierte mitochondriale Atmungskette neben der Xanthin-Oxidase und NADPH-Oxidase jetzt vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [63]. ROS sind die Ursache für erhöhten oxidativen Stress, der über Folgeschäden am Endothel, der DNA, dem sarkoplasmatischen Retikulum, der Zellmembran und über eine Entzündungsreaktion zum Zelltod führen kann [64]. Gleichzeitig wird auch der Zellmetabolismus durch wiederhergestellte Funktion der Ionen-Transport-Kanäle stabilisiert und die Zelle kann nach Ausschleusen des akkumulierten Laktats wieder normale pH-Werte erreichen. Es kann auch beobachtet werden, dass die ROS zur Anlockung von Neutrophilen beitragen [64] und stattgefundenen Zelltode ebenfalls einige Stunden später zur Ausbreitung von Neutrophilen im Infarktareal führen. Diese setzen proteolytische Enzyme frei [66].

### 1.2.4.1 Einfluss der eNOS auf myokardiale Ischämie/Reperfusion

Ein funktionierender NO-Metabolismus spielt einer der Hauptrollen zum Schutz vor ischämischen Verletzungen des Myokards. Unter hypoxischen Bedingungen wird NO auch von einigen nicht-enzymatischen Quellen wie Hämoglobin und Myoglobin aus Nitrat mittels Reduktion freigesetzt [41, 67] und die Expression der eNOS gesteigert [54]. Neben dem vasodilatativen Effekt schützt

NO vor oxidativem Stress [20, 21] und es kann in Folge von Sauerstoffmangel, wie im Falle eines Myokardinfarktes, vermehrt zurückgewonnen werden [44]. Zahlreiche Tierexperimente zeigen, dass NO-Donoren sowie NO-haltige Infusionslösungen in der Lage sind, den koronaren Blutfluss zu steigern [68] und die Kardioprotektion bei I/R zu verbessern [9, 69, 70]. Andere Tierexperimente unter KO der eNOS belegen weiterhin die kardioprotektive Rolle des Enzyms. So zeigen transgene Mäuse ohne eNOS Expression größere Infarktareale als verglichene Wildtypen [71]. Des Weiteren konnte in eNOS KO Mäusen eine stärkere linksventrikuläre Dysfunktion und intensiveres kardiales *Remodeling* gegenüber Wildtypen mit gleicher I/R-Operation nachgewiesen werden [72]. Es konnten jedoch in anderen Studien die schlechtere kardiale Funktion oder das verstärkte Remodeling post-Infarkt bei eNOS KO widerlegt werden [73, 74]. Nach erfolgter Inhibition der eNOS sind im Langendorf-Modell häufiger mit I/R assoziierte kardiale Arrhythmien aufgetreten. Da diese mit Gabe vom Substrat L-Arginin zu verhindern sind, kann auch eine antiarrhythmogene Rolle von NO vermutet werden [68]. In einem experimentellen Ansatz wurden die eNOS in Kardiomyozyten auf ihre kardioprotektive Rolle untersucht. Bei kardialer eNOS-Überexpression in transgenen Mäusen zeigten die geschädigten Herzen signifikant kleinere Infarktgrößen, während die linksventrikuläre Funktion besser erhalten blieb und die resultierende Herzinsuffizienz sich weniger hypertrophisch ausbildete [75, 76]

Früh wurde auch schon für die RBC eNOS ein kardioprotektiver Effekt Einfluss postuliert. So konnte im isolierten Herzen, welches mit ausschließlich mit Blut reperfundiert wurde, ein solcher Effekt beobachtet werden [77]. Unter Arginase-Inhibition wurde in einem *ex-vivo* Modell ebenfalls eine Mitbeteiligung der RBC eNOS an der Kardioprotektion herausgearbeitet [37]. Nach Erzeugung von chimären Mäusen, die eNOS ausschließlich außerhalb von Erythrozyten exprimierten, wurde ein vergrößertes Infarktareal nach I/R und eine signifikant beeinträchtigte linksventrikuläre Funktion 24 Stunden nach der Intervention nachgewiesen [78]. Diese Ergebnisse sollte man jedoch vor dem Hintergrund interpretieren, dass die chimären Mäuse einer Knochenmarksdepletion durch Bestrahlung und anschließender Knochenmarkstransplantation unterlaufen sind. So fehlt die eNOS auch in anderen Blutzellen wie den Thrombozyten und Leukozyten. Eine folgende systemische Entzündung beeinflusst den NO-Metabolismus und 5-10% der ursprünglichen Zellen sind weiterhin mit ihrer RBC eNOS noch aktiv.

## 1.3 Physische Aktivität und ihr Effekt auf die kardiovaskuläre Funktion und Kardioprotektion

### 1.3.1 Allgemeiner präventiver und metabolischer Effekt chronischer physischer Aktivität auf den Menschen

Der positive Effekt von moderatem körperlichem Training ist schon lange Gegenstand aktueller und vergangener kardiovaskulärer Forschung. In einem 16-Jahre-Follow-Up der großen MRFIT-Studie konnten zahlreiche Modifikationen belegt werden. Darunter sind die Reduktion des Körpergewichts, eine überlegene Situation der Blutfette, Abnahme der Insulin-Resistenz,

Steigerung der eNOS-Expression und zahlreiche weitere kardiovaskuläre Vorteile [79]. Diese Effekte wurden mehrmals anerkannt [80] und der positive Einfluss von körperlicher Aktivität auch in weiteren Zellarten und Geweben außerhalb des Herzens nachgewiesen. Hier sind vor allem die Skelettmuskulatur und das Fettgewebe als Zielstruktur identifiziert worden, welche wiederum in ihrer Funktion und ihrem Metabolismus auf das kardiale System zurückwirken [81-84]. Zudem wird nach Erreichen von körperlicher Fitness auch eine Abnahme in der Prävalenz von diversen chronischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus, Hypertonie und anderen kardiovaskulären Pathologien beobachtet [85, 86]. Neben der Prävalenz senkt chronische physische Aktivität auch die Mortalität kardiovaskulärer Patienten. Zahlreiche Studien belegen den Überlebensvorteil aktiver Menschen gegenüber inaktiven [87-90]. Körperliches Training ist also in der Lage, einen hohen Anteil an primärer und sekundärer Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen zu leisten, insbesondere im Falle eines Myokardinfarktes. Untermauert wird die Wichtigkeit dieser Strategie durch die Beobachtung, dass unsere Gesellschaft tendenziell zu steigender physischer Inaktivität neigt [91].

### 1.3.2 Wirkung von physischer Aktivität auf die kardiale Funktion und die Kardioprotektion

Ist die Muskulatur physischer Anstrengung ausgesetzt, steigt ihr ATP- und damit auch ihr Sauerstoffverbrauch. Das sympathische Nervensystem schüttet als Reaktion darauf Katecholamine wie Adrenalin, Dopamin und Noradrenalin aus. Diese Hormone wirken kardial chronotrop und inotrop, sie steigern demnach die Herzfrequenz und das Schlagvolumen. Letztendlich wird der Organismus mit einem höheren Herzzeitvolumen bedient [84]. Zur besseren Versorgung der beanspruchten Muskulatur werden lokale Vasodilatoren wie NO ausgeschüttet. Gleichzeitig wird mittels einer peripheren Vasokonstriktion der ausreichende venöse Rückfluss zum Herzen gesichert und der Blutdruck konstant gehalten oder sogar erhöht. Der Frank-Starling-Mechanismus, der nach weiterer Dehnung der Vorhöfe greift, erhöht ebenfalls die Kontraktionsstärke. Sieht sich das Herz chronischer physischer Aktivität ausgesetzt, führt das zu physiologischen Adaptationen. Diese kardiale Hypertrophie äußert sich mit einer zugenommenen Herzmasse und teilweise verbesserter Herzfunktion. Scharf abzugrenzen von der pathologischen Hypertrophie, die zu fibrotischen Veränderungen, beeinträchtigter Herzfunktion und Nekrosen führen kann [92].

Auf mitochondrialer Ebene finden weitere Modifikationen nach physischer Aktivität statt. Sie sind essentiell für die adäquate ATP-Produktion als Energiequelle, die Elektrolyt-Homöostase, Schutz vor oxidativem Stress und Prävention von Zelltoden durch metabolische Überlastung [84]. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden in Studien mit durchgeführtem aerobem Intervalltraining in Ratten eine erhöhte Teilungsrate der Mitochondrien sowie eine verminderte mitochondriale Dysfunktion im Zustand des Myokardinfarktes nachgewiesen [93]. Ein weiterer kardioprotektiver Aspekt konnte in der gesteigerten Fettsäure- und Glukose-Oxidation nach Ausdauertraining beobachtet werden [94]. Diese Adaption spielt metabolisch auch eine protektive Rolle in kardialen Stresssituationen [84]. Eine andere Hauptursache der kardioprotektiven

Wirkung von chronischer physischer Aktivität ist die erhöhte Redoxkapazität. Es ist bereits etabliert, dass die Beanspruchung der Muskulatur im Rahmen von körperlichem Training zu ansteigender ROS-Produktion führt, die wiederum oxidativen Stress in den Zellen auslöst [95, 96]. Dieses Signal führt unter anderem zur erhöhten Kontraktionskraft der Muskeln [97] und ihrer Hypertrophie [98]. Wichtig ist dabei ebenfalls, dass der von physischer Aktivität ausgelöste oxidative Stress, die für die Antioxidation relevanten Enzyme hochreguliert [99-101]. In Folge ist eine erhöhte Redoxkapazität erreicht, welche die individuelle Leistungskapazität steigern kann und einen Beitrag zur später eintretenden Muskeler schöpfung leistet [102]. Oxidativer Stress ist ebenfalls Hauptakteur im myokardialen Zelltod als Folge eines Myokardinfarktes. Die dabei gesteigerte ROS-Bildung kann analog zum Skelettmuskel durch eine erhöhte Redoxkapazität nach chronischer physischer Aktivität besser neutralisiert werden [103].

### 1.3.3 Wirkung von physischer Aktivität auf die Endothelfunktion

Der erhöhte Scherstress in der Vaskulatur bei körperlicher Aktivität löst auch dort zahlreiche Adaptionsmechanismen aus. Abbildung 1 zeigt die zelluläre Antwort auf Scherstress. Geht man von häufiger Exposition der Gefäße gegenüber dem Scherstress aus, sind antiatherogene und anti-inflammatorische Effekte erzielbar [104]. Sportler zeigen größere luminale Durchmesser sowohl in peripheren Arterien [105] als auch in Koronargefäßen [106] im Vergleich zu inaktiven Personen. Eine weitere Studie zeigte, dass aerobes Training, neben dem Durchmesser, auch die Ausbildung koronarer Kollateralen fördert, die potenzielle Infarktgrößen reduzieren können [107]. Des Weiteren wurde auch eine Dosis-Wirkungsbeziehung von körperlichem Training zur verbessertem endothel-abhängigen vaskulären Funktion analysiert [108]. Voranzustellen ist erneut der erhöhte Scherstress, der Mechanismen auslöst, die die Expression und Aktivität der eNOS signifikant steigert und die Synthese von NO anhebt [29]. Das körperliche Training ist eine der Hauptursachen für erhöhte eNOS-Expression in Gefäßen und im Herzen und Inaktivität führt im Vergleich zur endothelialen Dysfunktion [109].

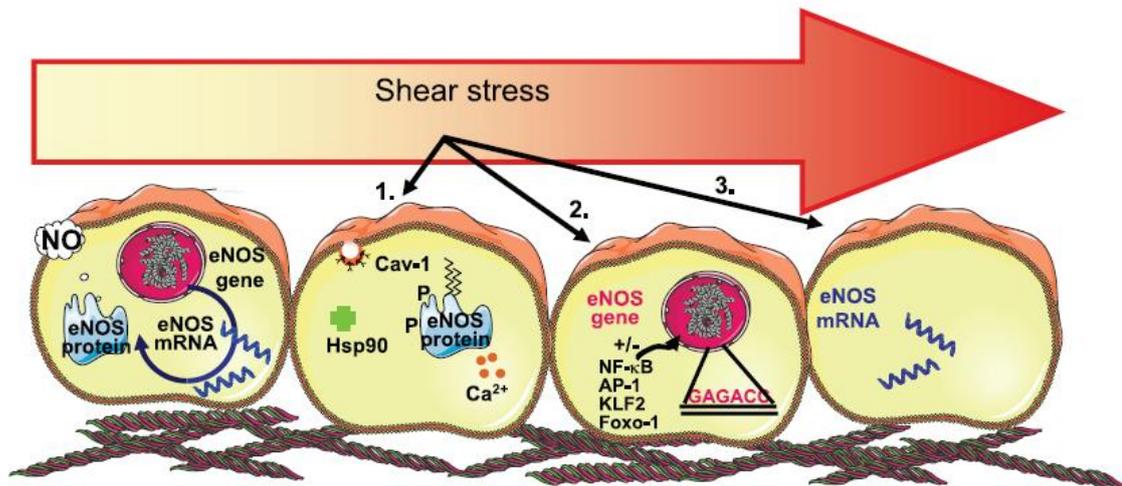


Abb. 1: Translationale und posttranslationale Mechanismen als Antwort der Endothelzellen auf Scherstress

Scherstress (*shear stress*) steigert die NO-Produktion. Ursachen dafür sind die erhöhte Aktivität der eNOS (1) innerhalb von Sekunden durch ansteigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Level im Zytosol und die Phosphorylierung der eNOS. Später kommt es zur vermehrten Transkription des Enzyms (2) und verbesserter eNOS mRNA-Stabilität (3). Diese Effekte sind vor allem relevant bei langanhaltendem Stimulus der Zelle durch den Scherstress. Abbildung nach [110].

### 1.3.4 Einfluss der eNOS in Endothelzellen und Erythrozyten auf trainingsinduzierte Effekte der kardiovaskulären Funktion und Kardioprotektion

Das Endothel reagiert auf durch körperliches Training erhöhten Scherstress mit einer gesteigerten Expression und Aktivität der eNOS [29]. Auch nach Eintreten des Myokardinfarktes kann Training die kardiovaskuläre Funktion unter Vermittlung der eNOS verbessern [111]. Dass körperliches Training die eNOS hochreguliert und die gesteigerte eNOS-Aktivität einen signifikanten Beitrag zur Kardioprotektion leistet, ist bereits fest etabliert. In zahlreichen Tierversuchen sollte der Zusammenhang von angewandten Trainingsprotokollen und einer induzierbaren Kardioprotektion entschlüsselt werden. Mäuse mit einem globalen eNOS KO oder nach NO-Inhibition zeigten in diesen Experimenten diverse negative Effekte auf. So ist mit reduziertem NO-Metabolismus mit einer geringeren Trainingskapazität bzw. Laufgeschwindigkeit zu rechnen [112-114]. Auch wird die sonst durch physische Aktivität steigerbare Redoxkapazität der Mitochondrien nach eNOS KO beeinträchtigt [113]. Die induzierte eNOS-vermittelte Kardioprotektion fiel ebenfalls aus [115, 116]. Die wichtigsten Signalwege zur Aktivierung der eNOS konnten auch in menschlichen Erythrozyten durch moderates Ausdauertraining in ihrer Aktivität gesteigert werden [117].

Die globale eNOS scheint einen wichtigen Einfluss auf die Verbesserung der kardiovaskulären Funktion und der Kardioprotektion nach chronischer physischer Aktivität zu haben. Eine genauere Differenzierung zur Rolle der endothelialen eNOS und erythrozytären eNOS in trainingsinduzierter Kardioprotektion und kardiovaskulärer Funktionssteigerung ist bisher noch nicht eindeutig gelungen. Eine gewebe- bzw. zellspezifische Analyse ist in diesem Falle

notwendig, die Aussagen bezüglich der unterschiedlichen Gewichtung der verschiedenen lokalisierten eNOS erlaubt.

## 1.4 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wird tierexperimentell die Hypothese untersucht, ob die eNOS in RBC eine Rolle für trainingsinduzierte Veränderungen der kardialen und endothelialen Funktion spielt und möglicherweise kardioprotektiv wirkt. Es werden Mäuse innerhalb ihrer Zuchtlinie verglichen, denen eNOS entweder in RBC oder EC fehlt, um diese Effekte voneinander abzugrenzen. Daraus lassen sich spezifische Fragestellungen ableiten. Die ausgewählten Methoden sollen einen wissenschaftlichen Beitrag zur Klärung dieser erbringen:

1. Welche Rolle spielen die RBC und EC eNOS bei trainingsinduzierten Veränderungen der kardialen und endothelialen Funktion?
2. Welche Rolle spielt die RBC und EC eNOS in der Kardioprotektion durch körperliches Training, insbesondere für die Wiederherstellung bzw. den Erhalt der Herzfunktion nach einem akuten Myokardinfarkt?



## 2.2 Trainingsprotokoll

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.

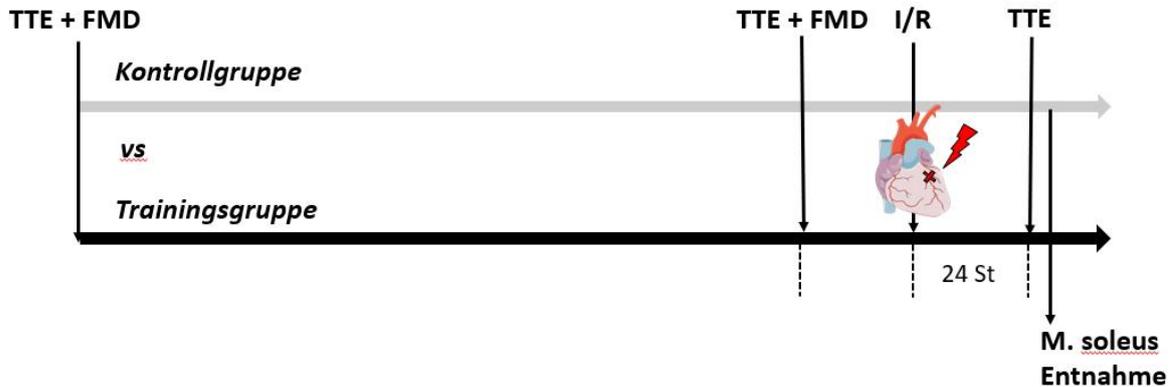
In dem ausgewählten Trainingsprotokoll wurden männliche, 7-8 Wochen alte Mäuse verwendet. Ihnen stand Futter und Wasser zu jeder Zeit *ad libitum* zur Verfügung. Des Weiteren wurde auf eine konstante Nitrit-/Nitratzufuhr geachtet, weshalb die Mäuse kommerziell erwerbbares stilles Trinkwasser (Aqua Culinaris, Refresco Deutschland GmbH, Erfstadt) erhielten. Nach Singularisierung der Mäuse wurde die Kohorte, die dem körperlichen Training randomisiert zugeordnet war, in speziellen Käfigen mit Laufrädern gehalten. Dort konnte sich die einzelne Maus eine Woche an ihre neue Umgebung adaptieren und es folgte für die nächsten drei Wochen eine Dokumentation der Laufradumdrehung/24 h. Die Mäuse der Kontrollgruppen wurden in einem ähnlichen Käfig ohne Laufrad unter ansonsten gleichen Bedingungen für ebenfalls sechs Wochen gehalten.

## 2.3 Experimentelles Setup

Sowohl vor Beginn als auch nach Abschluss der Trainings- und Singularisierungsperiode wurde die kardiale Funktion mittels transthorakaler Echokardiographie und die vaskuläre Funktion mittels sonographischer Untersuchung der FMD (Flow-mediated dilation bzw. flussvermittelte Vasodilatation) der *Arteria iliaca externa* erfasst. Am Folgetag unterzogen sich alle Mäuse einer offenen Thorakotomie (Ischämie/Reperfusion-OP, I/R). Dabei wird mittels einer medianen Thorakotomie und Fadenknotung der proximale Anteil des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA, engl.: left anterior descending, LAD), der vorne zwischen linker und rechter Herzkammer zur Herzspitze zieht, für 45 Minuten abgeklemmt. Nach 24 Stunden Reperfusion erfolgte eine Wiederholung der Echokardiographie und nach Finalnarkose beidseits die Entnahme des *Musculus soleus*.



Suvorava et al. JACC 2004; Lauer N, Suvorava et al. Cardiovasc. Res. 2005; Suvorava et al. Free Rad. Res. 2010



### Abb. 2: Experimentelles Setup

Vor Singularisierung und Beginn des Trainingsprotokolls wurde eine kardiovaskuläre Baseline-Untersuchung durchgeführt. Nach Abschluss des jeweiligen Trainingsprotokolls erfolgten die erneuten kardiovaskulären Analysen der Mäuse. Im Anschluss erhielten die Tiere eine I/R-OP mit 45-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusion. Final erfolgten post I/R eine dritte transthorakale Echokardiographie und die Entnahme des *Musculus Soleus* zur biochemischen Analyse.

## 2.4 Citratsynthase-Aktivität

Zunächst ist die Finalnarkose der Maus zur Entnahme des *Musculus Soleus* notwendig. Dafür wird dem Tier Ketamin (100mg/kg, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin Deutschland) und Xylazin (10 mg/kg, Indivior, Virginia, USA) *intrapitoneal* injiziert. Nach geprüftem Ausfall aller Reflexe wird eine zervikale Dislokation fachgerecht ausgeführt. Anschließend kann die Maus auf dem vorbereiteten Operationstisch fixiert und mit der Präparation der Haut der unteren Extremitäten begonnen werden. Es wird der *Musculus Gastrocnemius* identifiziert, seine craniale Sehne durchtrennt und durch Umklappen des Muskels der darunterliegende *Musculus Soleus* freigelegt. Nun kann dieser an beiden Sehnenenden gelöst und für eine sofortige Einfrierung entnommen werden.

Zur Erstellung eines Organlysats wird eine Pufferlösung vorbereitet. Diese besteht aus 0,1 M TRIS-Hydrochlorid (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und 0,1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in Millipore-Wasser aus einer hausinternen Anlage (Millipore, Darmstadt, Deutschland). Der in flüssigem Stickstoff zwischengelagerte Muskel kann im nächsten Schritt mit Mörser und Stößel pulverisiert und zusammen mit der Pufferlösung in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt werden. Mit einem TissueRuptor (Qiagen, Venlo, Niederlande) wird die Probe gemischt und homogenisiert. Es folgt eine Zentrifugation aller Proben bei 4°C und 500 rpm für 5 Minuten. Nach Überführen des Überstands werden die Proben zur weiteren Verarbeitung in 5 µl

Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zur Proteinbestimmung erneut eingefroren oder direkt weiterverarbeitet. Die Proteinbestimmung nach Lowry erfolgt für jede Probe mit einer Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in einem Konzentrationsbereich von 0,2-2 mg/mL. Die Messung fand in Duplikaten bei 740 nm mittels eines UV/VIS Platereader (FluoStar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Baden-Württemberg) statt.

Bei erhöhtem Sauerstoffverbrauch im Rahmen körperlicher Aktivität ist auch die mitochondriale Energiegewinnung vermehrt beansprucht. Der Citratzyklus sorgt für die Versorgung der mitochondrialen Atmungskette mit den Reduktionsmitteln NADH und FADH<sub>2</sub>. Die Citratsynthase (Abbildung 3) ist der erste Schritt in diesem Zyklus. Zur Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität als biochemischer Parameter des durchgeführten Trainingsprotokolls wurde das Mitocheck Citrate Synthase Activity Assay Kit (701040, Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA) verwendet.

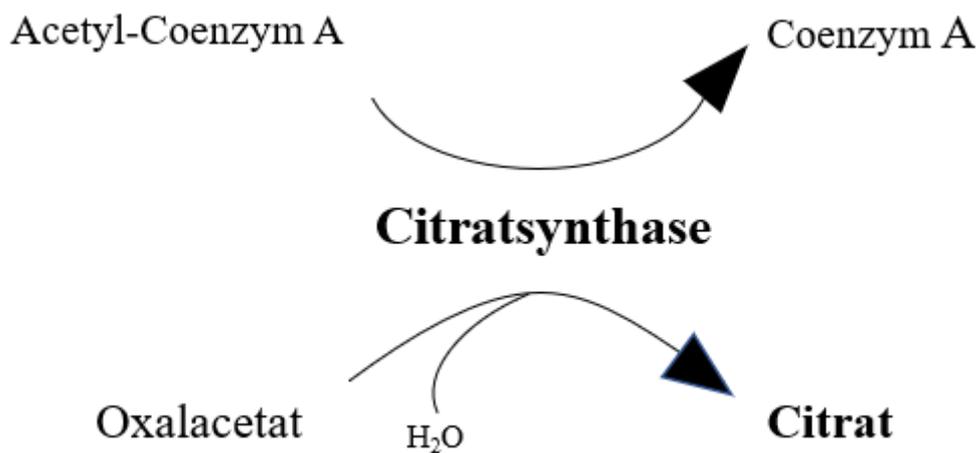


Abb. 3: **Reaktion der Citratsynthase**

Dabei wurde nach Herstellerangaben die Probe mit dem bereitgestellten Oxalacetat, Acetyl-CoA, Developer Reagent und Assay Buffer in Duplikaten auf einer 96-Well-Platte verteilt. Die Messung der Reaktionsaktivität der Citratsynthase gelang anschließend für 20 Minuten in 30-Sekunden-Intervallen bei 412 nm. Dafür wurde derselbe UV/VIS Platereader wie für die Proteinkonzentrationsbestimmung genutzt. Mit der im Set bereitgestellten Formel war nun nach Berücksichtigung der vorangegangenen Verdünnungen eine Berechnung der Citratsynthase-Aktivität in Form der Steigung der Reaktionsrate jeder Probe möglich.

## 2.5 Echokardiographie

Die Echokardiographie als nicht-invasive kardiologische Untersuchungsmethode erfolgte mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät mit 18-38 MHz Schallkopf (Vevo 2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada). Zu drei Zeitpunkten wurde die Bildgebung durchgeführt. Zuerst vor Beginn des Trainingsprotokolls bzw. mit Abschluss der KO-Induktion in den jeweiligen Mauslinien. Der zweite Zeitpunkt dokumentierte das Ende des Trainingsprotokolls. Die letzte Untersuchung fand 24 Stunden nach Induktion der Ischämie/Reperfusion statt. Für eine tiergerechte Durchführung der Methode ist eine Sedierung mittels Isofluran (Piramal Critical Care, West Drayton, England) notwendig. Dafür wird die Maus in eine Induktionskammer mit einem Gasgemisch aus  $O_2$  und 3 Vol. % Isofluran gesetzt. Nach erfolgter Anästhesie wird das Tier auf dem Untersuchungstisch in Rückenlage mit ausgestreckten Extremitäten fixiert und die Narkose muss mit einer Gesichtsmaske (2 Vol. % Isofluran) aufrechterhalten werden. Zur zusätzlichen Stabilität diente eine Rolle an der rechten Körperseite der Maus. Ein rektal eingeführtes Thermometer misst die Kernkörpertemperatur, die durch den beheizbaren Tisch konstant bei 36-38 °C gehalten wird. Zusätzlich wird ein EKG und die Atemfrequenz über die unter den Extremitäten befindlichen Elektroden abgeleitet. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zwischen den Untersuchungen zu schaffen, sollte die Herzfrequenz zwischen 400-450 bpm und die Atemfrequenz zwischen 60-80 pro Minute liegen.

Ist der Versuchsaufbau abgeschlossen, konnte der Thorax nun mit einer Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser, Slough, Vereinigtes Königreich) vom schalldichten Fell befreit werden. Das erwärmte Schallgel (Aquasonic 100 gel, Parker Laboratories, New Jersey, USA) wird für eine verbesserte Bildgebung aufgetragen. Als erste Standardebene wird unter Verschieben des Schallkopfes auf einer X- und Y-Achse und Kippung des Untersuchungstisches die parasternale Langachse (PSLA) aufgesucht. Der Schallkopf wird sagittal mit einer leichten Drehung um die Kabelachse gegen den Uhrzeigersinn – also der Längsausrichtung des Herzens folgend – aufgesetzt. Hier kann der linke Ventrikel analysiert werden. Eine gute Bildeinstellung ermöglicht die Darstellung der Herzspitze und des linksventrikulären Ausflusstraktes (Abbildung 4,5). Nach Auffinden der korrekten Ebene wurden kurze Videosequenzen zur anschließenden Auswertung aufgezeichnet.

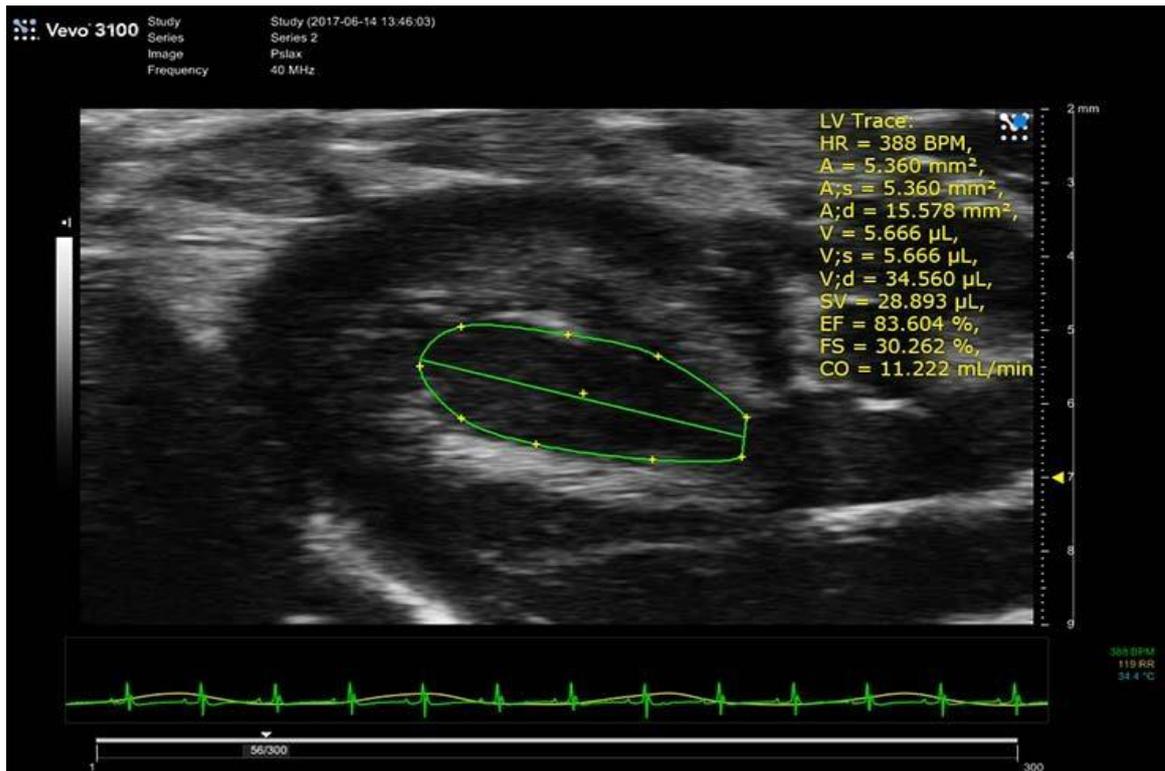


Abb. 4: Parasternale Langachse im B-Bild mit eingefügtem Tracking des murinen linken Ventrikels in der Systole  
 Abb. von [119].

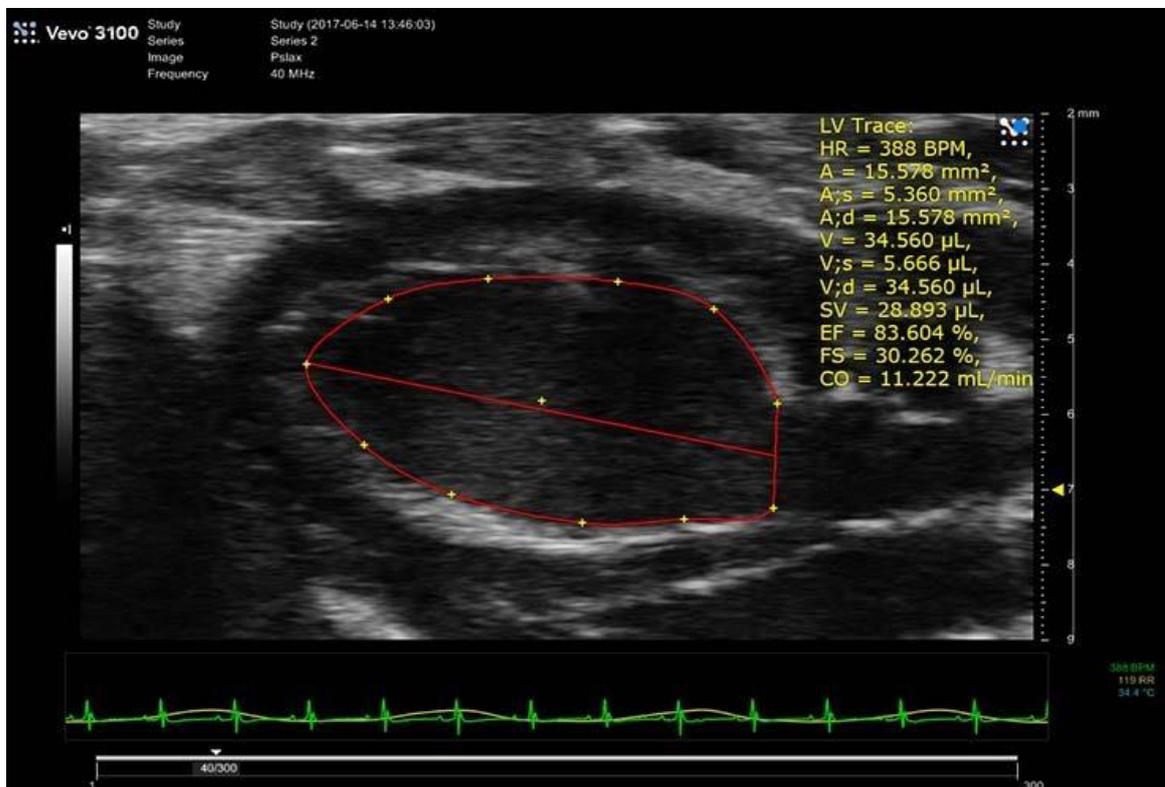


Abb. 5: Parasternale Langachse im B-Bild mit eingefügtem Tracking des murinen linken Ventrikels in der Diastole  
 Abb. von [119].

Neben dem B-Bild wurde auch der M-Mode, eine vertikale Schnittbild-Ableitung der eingestellten Ebene über die Zeit, aufgezeichnet. Diese ermöglichte das Ausmessen des Interventrikulärseptums und der Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels (Abbildung 6).

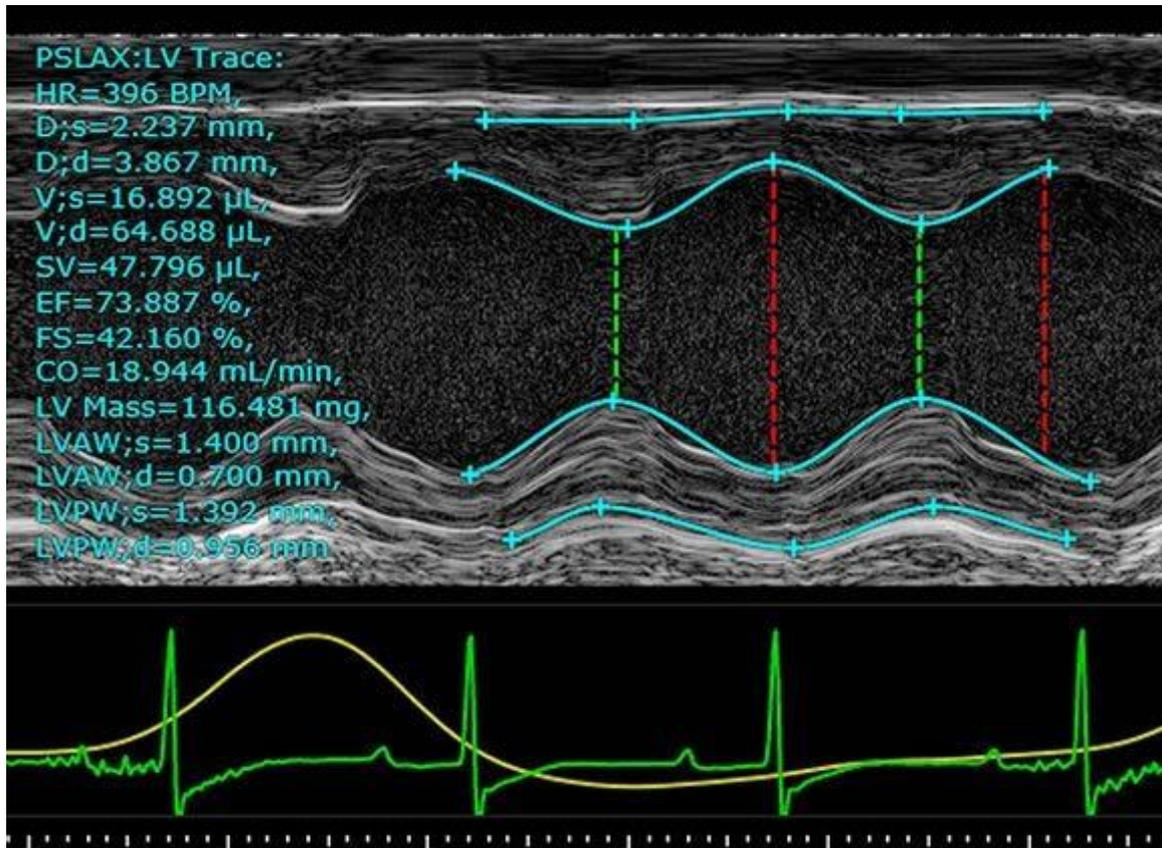


Abb. 6: Parasternale Langachse des murinen linken Ventrikels der Maus im M-Mode mit eingefügten Messungen der Wanddicken  
Abb. von [119].

Es folgte die Einstellung der parasternalen kurzen Achse (SAX), indem der Schallkopf  $90^\circ$  gegen den Uhrzeigersinn gedreht wird. Auch die SAX wurde im B-Bild und M-Mode aufgezeichnet (Abbildung 7).

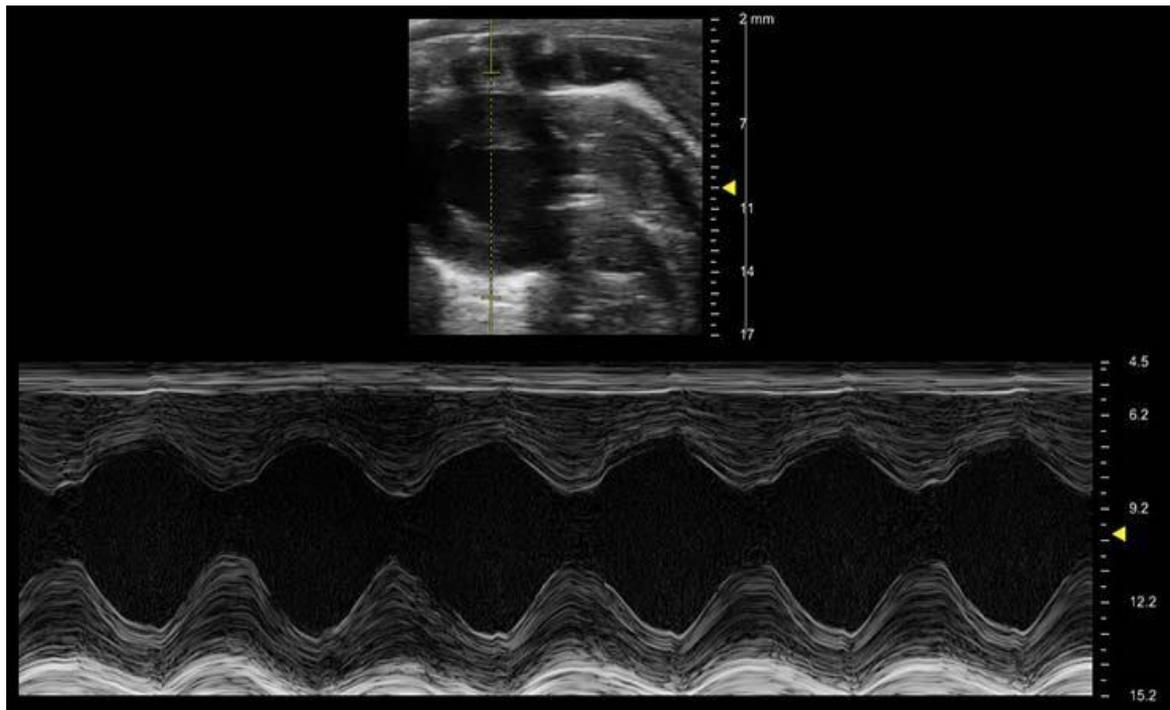


Abb. 7: **Parasternale kurze Achse des linken murinen Ventrikels im M-Mode**  
Abb. von [119].

Die dritte genutzte Standardebene war der apikale Vierkammerblick. Dafür wurde der Untersuchungstisch maximal cranial abgekippt und der Schallkopf flach subxiphoidal in transversaler Ausrichtung angelotet. In dieser Ebene war eine optimale Einstellung der Mitralklappe möglich und ihr Fluss mit Hilfe der Doppler-Funktion ableitbar. Hat der Untersucher die richtige Ebene gefunden, ist die Mitralklappe mit ihrem typischen Flussprofil zweifelsfrei identifizierbar und es kann eine Videosequenz aufgenommen werden (Abbildung 8,9).

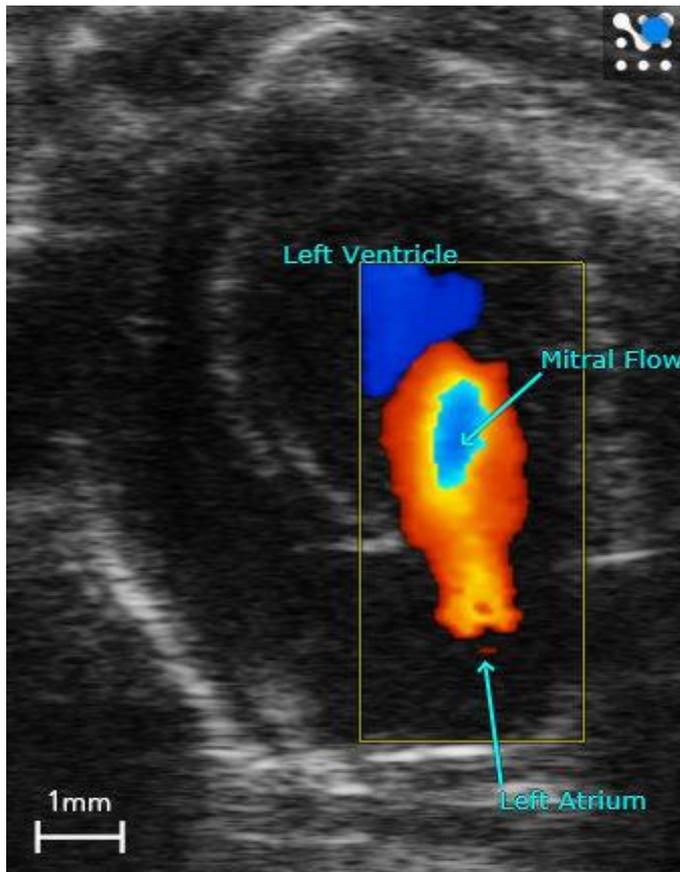


Abb. 8: Apikaler Vierkammerblick mit Darstellung des Flusses über der murinen Mitralklappe  
Abb. von [119].

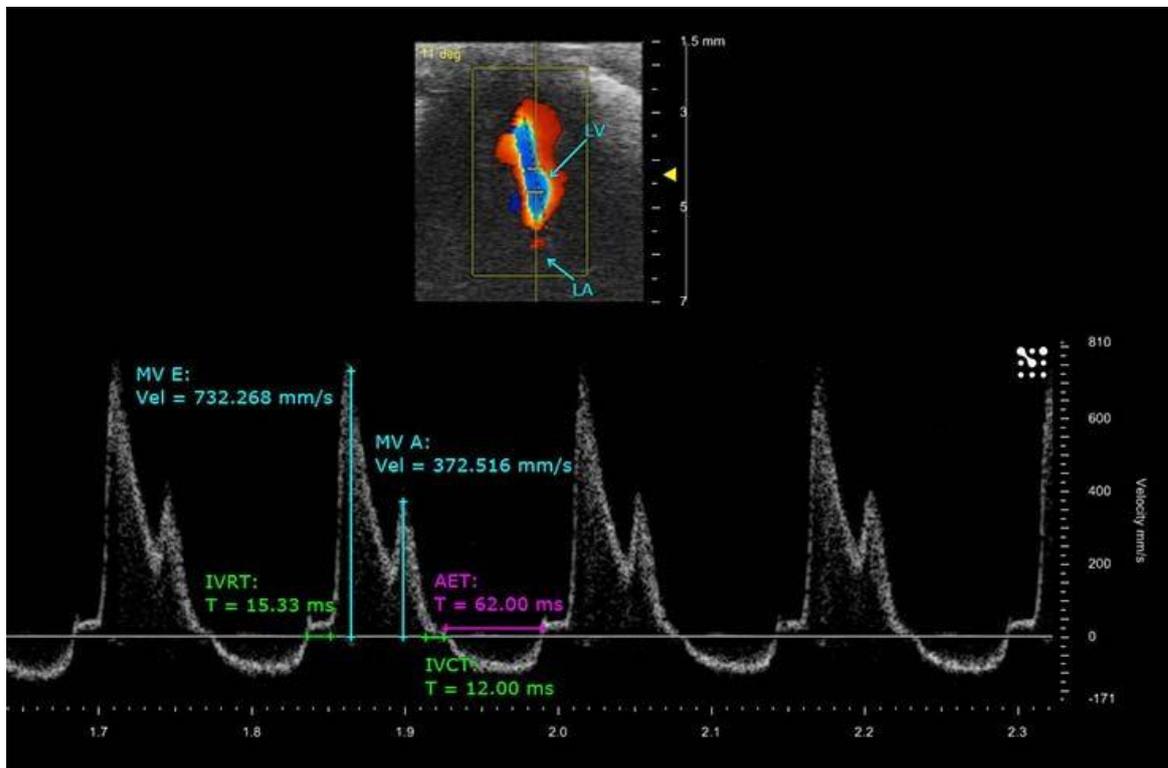


Abb. 9: Auswertung der Doppler-Ableitung der murinen Mitralklappe  
Abb. von [119]

Als letztes wurde der Tisch maximal caudal gekippt und der Schallkopf sagittal aufgesetzt, um die Aortenklappen-Ebene einzustellen. Durch optimale Schallkopfausrichtung konnte bis in die Aorta Ascendens eingesehen werden und dort mit einem möglichst geringen Winkel das Flussprofil der Aortenklappe im proximalen Anteil der *Aorta ascendens* abgeleitet werden. Analog zur Mitralklappe bietet sich dem Untersucher mit dem charakteristischen Flussprofil eine sichere Identifikationsmöglichkeit (Abbildung 10). Mit angepasstem Sample Volume und Pulsrepetitionsfrequenz wurde eine Sequenz aufgenommen.

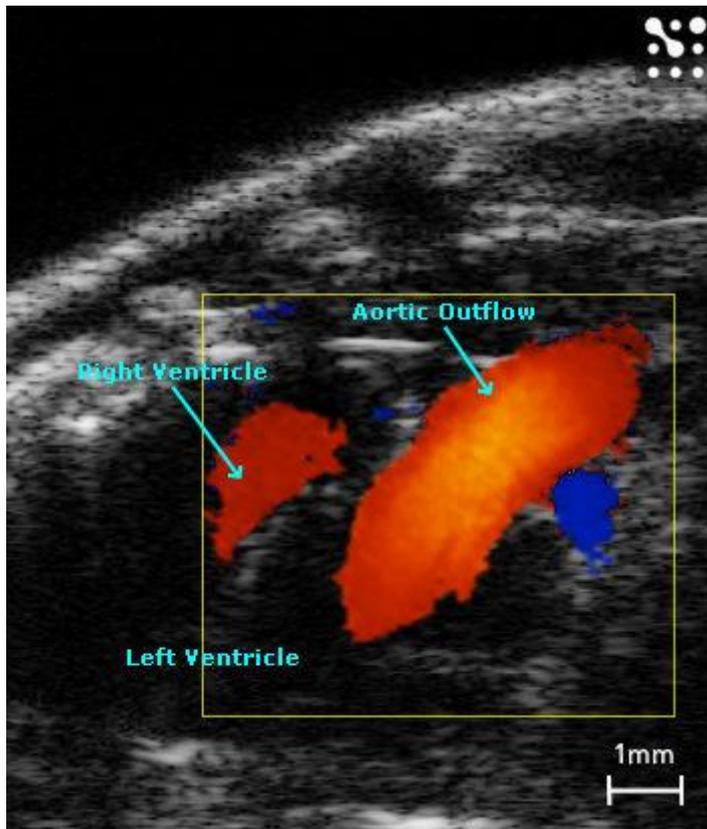


Abb. 10: **Modifizierte parasternale Langachse mit Darstellung des Flusses über dem murinen linksventrikulären Ausflusstraktes**  
Abb. von [119].

Waren die Aufzeichnungen der Standardebenen erfolgreich, konnte die Untersuchung beendet werden. Das Isofluran wird abgedreht und nach kurzer Zeit setzt die suffiziente Spontanatmung der Maus wieder ein. Nach Entfernen der Schallgelreste konnte sie nun in ihren Käfig zurückgesetzt werden.

Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die Vevo 2100 Software (VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada) genutzt. Die systolische Funktion wurde aus den Sequenzen der PSLA analysiert. Die ausgemessenen und errechneten Parameter waren das enddiastolische Volumen (EDV), endsystolische Volumen (ESV), Schlagvolumen (SV), Ejektionsfraktion (EF) und Herzzeitvolumen (HZV). Der M-Mode ermöglichte die Analyse der Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels mit den Parametern der diastolischen und systolischen Interventrikularseptumdicke (IVS;d und IVS;s), dem linksventrikulären Durchmesser (LVID;d und LVID;s) und dem linksventrikulären Hinterwanddurchmesser (LVPW;d und LVPW;s). Eine

Auswertung der dopplersonographischen Aufnahme der Mitralklappe aus dem apikalen Vierkammerblick eröffnete die Parameter der diastolischen Funktion. Die relevanten Parameter sind die isovolumetrische Relaxationszeit, die isovolumetrische Kontraktionszeit, die Dezelerationszeit der E-Welle und weitere. Die Dopplerauswertung der Aortenklappe ließ eine Berechnung der maximalen und durchschnittlichen Flussgeschwindigkeit sowie der Druckverhältnisse der Klappenebene zu. Die Echokardiographie wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Tatsiana Suvorava durchgeführt und ausschließlich durch mich ausgewertet.

## 2.6 Flussvermittelte Vasodilatation

Die Flussvermittelte Vasodilatation (FMD) als vaskuläre Analyse der Versuchstiere ist ebenfalls eine nicht-invasive Ultraschallmethode. Genutzt wurde auch hier ein hochauflösendes Ultraschallgerät mit einem 30-70 MHz Schallkopf (Vevo 2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Canada). Die Untersuchung wurde vor Beginn der Singularisierung bzw. des Trainingsprotokolls und ein zweites Mal nach Abschluss des Protokolls durchgeführt. Die Vorbereitung der Maus auf dem Untersuchungstisch erfolgt analog zur Echokardiographie im vorangegangenen Kapitel 2.5 mit den dazugehörigen überwachten Vitalparametern. Der linke Hinterlauf wurde nicht auf eines der Elektrodenfelder fixiert, sondern der Mausschwanz. Der linke Hinterlauf wurde auf einem zusätzlichen Kissen abduziert vom Körper befestigt. Schließlich wurde der linke Hinterlauf mit der Enthaarungscreme enthaart und eine steuerbare Blutdruckmanschette (Vascular Occluder 10 mm, OC10, Kent scientific, Torrington, USA) auf Höhe des proximalen Oberschenkels angelegt. Der Schallkopf mit Schallgel wurde distal von der Manschette aufgesetzt. Nun wurde mit B-Bild und Doppler-Sonographie die *A. Iliaca externa* aufgesucht. Die Doppler-Ableitung ermöglichte die zweifelsfreie Bestätigung (Abbildung 11).

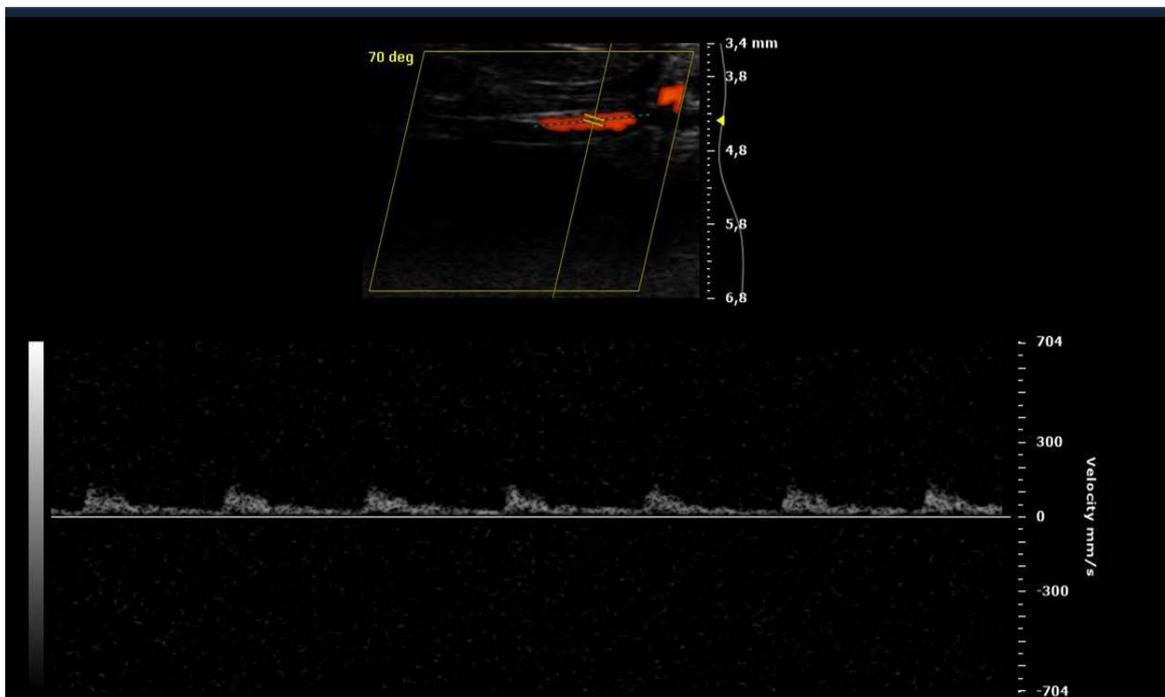


Abb. 11: **Darstellung der *A. Iliaca externa* in Ruhe mit farbkodierter Duplex-Sonographie**  
Eigene Darstellung

Das B-Bild und der Doppler müssen für adäquate Aufnahmen optimal eingestellt werden. Dabei sind eine korrekte Pulsrepetitionsfrequenz, der B-Bild-Gain und ein ausreichender Schallkopf von entscheidender Bedeutung. Das Lumen und die Gefäßwand, sowie die Abgrenzung zur begleitenden Vene sollten jetzt optimal erkennbar sein. Mithilfe eines Druckkalibriergerätes (KAL 84, Halstrup Walcher, Kirchzarten, Deutschland) wurde im nächsten Schritt die Beinmanschette auf 300 mmHg aufgepumpt und somit die Arterie okkludiert. Die Okklusionsphase beträgt fünf Minuten. Kurz vor der Okklusion und in 30-sekündigen Abständen nach Eintritt der Ischämie werden Bilder vom Gefäß und seinem Fluss aufgenommen (Abbildung 12).

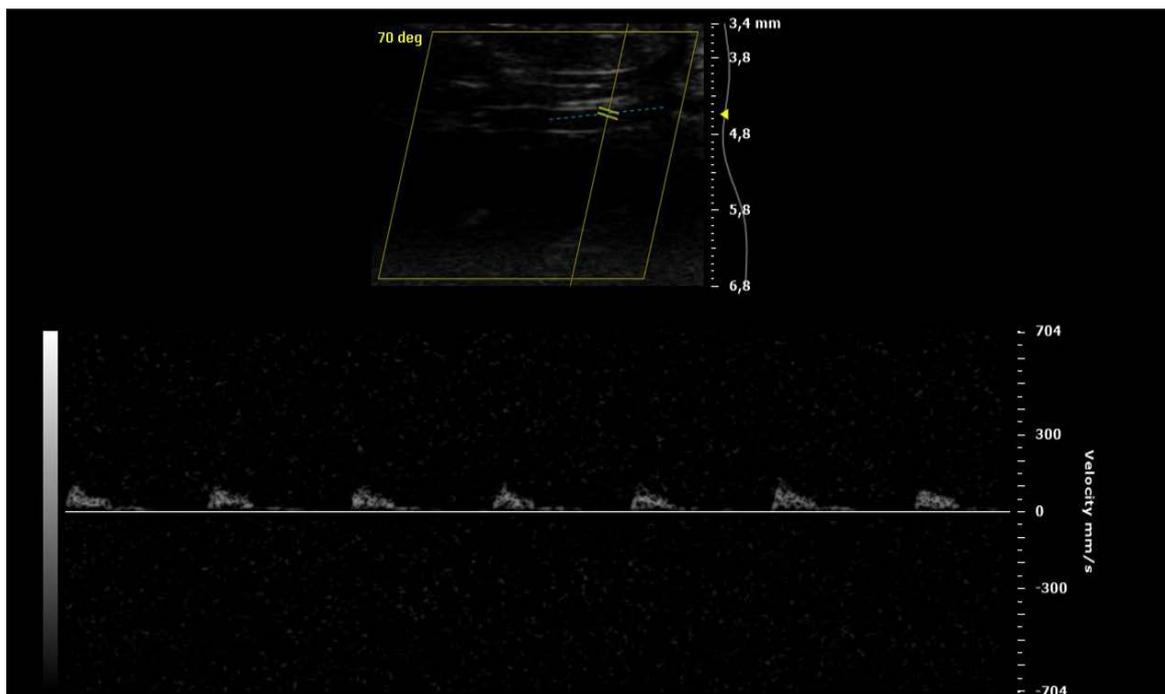


Abb. 12: **Darstellung der *A. Iliaca externa* während der Okklusionsphase**  
Während der Diastole herrscht ein Nullfluss. Eigene Darstellung.

Nach Ablauf der fünf Minuten wurde der Druck auf der Beinmanschette vollständig abgelassen und die Reperfusion-Phase begann. In den ersten zwei Minuten dieser Phase wurden alle 20 Sekunden Bilder von der zu erwartenden Hyperperfusion und Vasodilatation im B-Bild und Doppler-Modus aufgenommen (Abbildung 13). In weiteren drei Minuten erfolgte die Aufzeichnung alle 30 Sekunden.

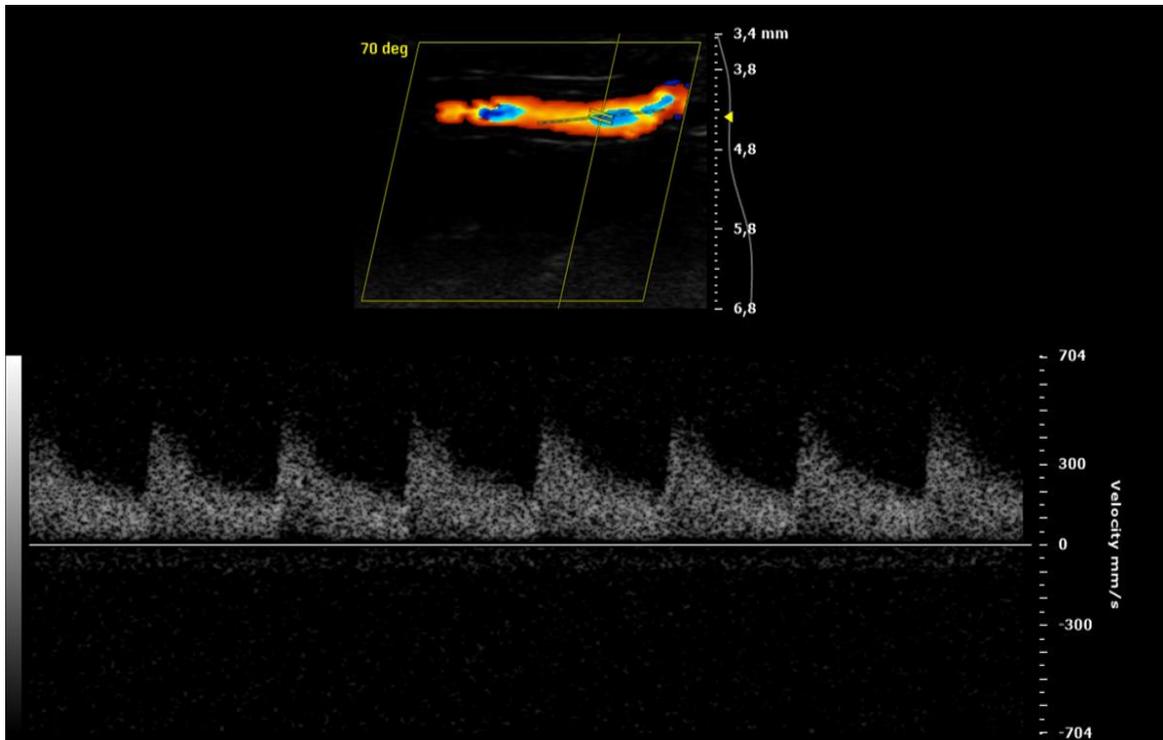


Abb. 13: **Darstellung der *A. Iliaca externa* während der Reperfusionsphase**

Die Hyperperfusion mit erhöhter Flussgeschwindigkeit und Scherstress in Systole und Diastole führte zu einem erweiterten Lumendurchmesser. Eigene Darstellung.

Die Narkose durch Abdrehen des Isofluran beendet werden. Die Manschette wurde von der Maus entfernt und nach Einsetzen einer suffizienten Spontanatmung konnte sie in den Käfig zurückgesetzt werden. Es folgte eine Auswahl vergleichbarer Einzelbilder von allen dokumentierten Zeitpunkten. Als Kriterium dafür wurden eine Atempause und ein Zeitpunkt der Aufnahme zwischen P-Welle und QRS-Komplex festgelegt. Die weitere Auswertung erfolgte per *Brachial Analyzer Software* (Medical Imaging Applications, USA). Hierfür wurde in jedem akquirierten Zeitpunkt der Gefäßdurchmesser bestimmt und in Relation zum Ausgangswert vor der Okklusion gesetzt. Somit konnte eine auftretende Vasodilatation in der Reperfusionsphase über den zeitlichen Verlauf detektiert werden. Die FMD-Messung wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. Tatsiana Suvorava und Julia Hocks durchgeführt und ausschließlich durch mich ausgewertet.

## 2.7 Ischämie/Reperfusion

Als erstes erfolgte eine Inhalationsnarkose mit 3 Vol. % Isofluran in einer Induktionskammer (Piramal Critical Care, West Drayton, England). Die anschließende Aufrechterhaltung der Narkose übernahm ein muriner Respirator (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland) mit 40 Vol. %  $O_2$  und 2 Vol. % Isofluran. Eine rektale Temperatursonde (Testo AG, Deutschland, Lenzkirch) gewährleistete die Überwachung einer optimalen Körpertemperatur der Maus. Um Schwankungen dieser zu vermeiden, wurde die Kerntemperatur mithilfe eines beheizbaren OP-Tisch (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, March, Deutschland) konstant auf 37°C gehalten. Dazu diente ebenfalls eine zusätzliche Infrarotlampe IL21 (Beurer GmbH, Ulm, Deutschland). Auf demselben Tisch wurde zudem ein EKG über die Gliedmaßen der frontal fixierten Maus abgeleitet, welches die Sicherstellung der Narkosetiefe und der erfolgreichen Ischämieinduktion ermöglichte. Es folgte die Thorax- und Perikarderöffnung über einen interkostalen Zugang. Nun wurde mit einem Operationsmikroskop der *Ramus interventricularis anterior* aufgesucht und mit einem 7-0 Prolenefaden (Ethicon, USA, New Jersey) unterstochen. Eine leichte entgegengesetzte Spannung der beiden Fadenenden, gehalten durch einen PE10 Schlauchring, löste die Ischämie aus. Bei korrekter Durchführung konnten anschließend für eine koronare Minderperfusion typische ST-Streckenhebungen dokumentiert werden. Die Ischämiephase wurde 45 Minuten aufrechterhalten, während die regelmäßige Kontrolle der Körpertemperatur und Narkosetiefe stattfand. Nach Ablauf dieses Zeitintervalls wurden die Fäden gelöst und eine vollständige Reperfusion eingeleitet. Sobald die Lunge wieder voll ventiliert ist, konnte der Thorax und die ventral davon liegenden Muskeln mit 4-0 Seide (Ethicon, USA, New Jersey) und die Haut in Einzelknopfnahntechnik verschlossen werden. Die Extubation erfolgte nach Einsetzen der eigenen Spontanatmung nach Abdrehen des Isoflurans. Für die adäquate postoperative Analgesie wurde Temgesic (0,05 mg/kg, Indivior, Mannheim, Deutschland) *subkutan* alle 6-8h injiziert. Nach 24 h Reperfusion wurde erneut die transthorakale Echokardiographie und darauffolgend eine Finalnarkose zur Organentnahme durchgeführt. Die I/R-Operationen wurden von Beate Hutzler durchgeführt.

## 2.8 Auswertung und Statistik

Alle statistischen Auswertungen und Darstellungen wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 6* (USA, La Jolla) durchgeführt. Um Ausreißer zu identifizieren und auszuschließen, wurden die Daten dem Rout Test unterzogen und auf eine Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. Sollten drei oder mehr Gruppen verglichen werden, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse mittels 1way ANOVA angewandt und mögliche Signifikanzen mit dem Sidak's multiple comparison test identifiziert. Bei der FMD fand die zweifaktorische Varianzanalyse mittels 2way ANOVA Anwendung. Sind nur zwei Gruppen verglichen worden, diente der zweiseitige Student's T-Test der statistischen Berechnung. 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 +/- Min/Max für die Echokardiographie und +/- SEM für die FMD dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Citratsynthase-Aktivität und Effekt des körperlichen Trainings

Die Aktivität des Enzyms Citratsynthase wurde im *Musculus Soleus* nach Abschluss der Trainingsperiode und der operativ induzierten Ischämie nach Finalnarkose bestimmt. Sie diente einer Kontrolle und Wirksamkeitsdarstellung der tatsächlichen körperlichen Aktivität der Interventionsgruppe über den vierwöchigen Zeitraum. Abbildung 14 zeigt, dass Wildtypen in einer vorläufigen Auswertung eine tendenzielle Zunahme der Citratsynthase-Aktivität zeigen.

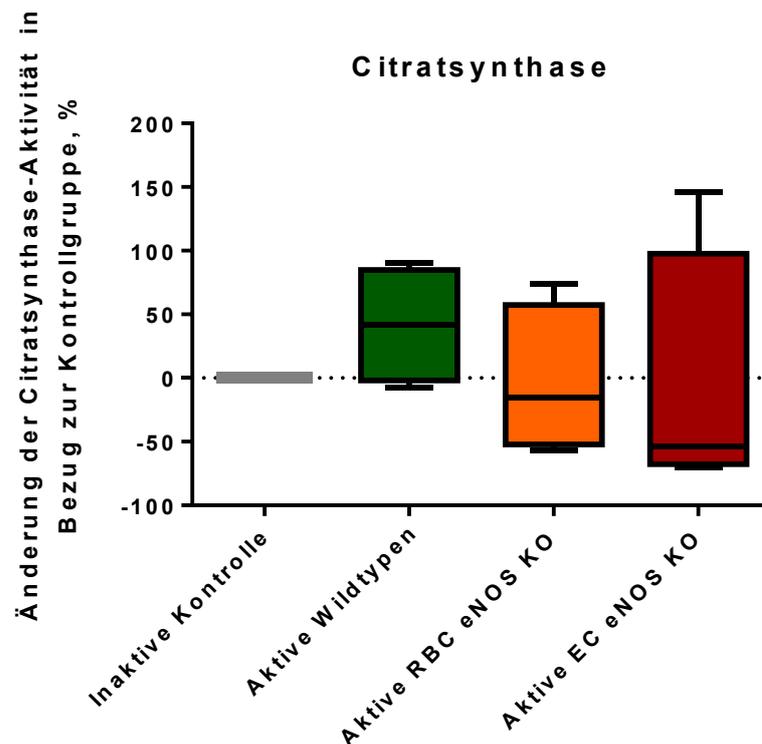


Abb. 14: Citratsynthase-Aktivität nach körperlichem Training in WT, RBC und EC eNOS KO

Darstellung der Citratsynthase-Aktivität im *Musculus Soleus* als prozentuale Abweichung zur inaktiven Kontrollgruppe (grau, n=4) in Wildtypen (grün, n=6, 1way ANOVA p= 0,6581), EC eNOS KO (rot, n=4, 1way ANOVA p=0,9970) und RBC eNOS KO (orange, n=4, 1way ANOVA p=0,9998).

In unserer Arbeitsgruppe wurden weitere Parameter erhoben, die die Laufleistung und körperliche Aktivität validieren sollten. Dabei zeigte sich, dass Wildtypen nach einer Eingewöhnungsphase bis zu 8 km am Tag laufen [120]. Des Weiteren konnte ermittelt werden, dass sie mit einer starken Hypertrophie des Herzens reagieren, erkennbar an einem erhöhten

Herz-/Körpergewichtverhältnis. Ebenso hat repräsentativ der *Musculus Soleus* an Masse zugenommen, ausgedrückt in einem signifikant erhöhten *M. Soleus*-/Körpergewichtverhältnis. In der Gruppe der RBC eNOS KO war die Laufleistung ähnlich den Wildtypen. Im Gegensatz dazu zeigten globale eNOS KO und EC eNOS KO-Mäuse eine geringere Laufleistung von ca. 5km pro Tag.

## 3.2 Kardiale Funktion nach körperlichem Training

Die kardiale Funktion wurde bei allen Gruppen mittels Echokardiographie direkt nach Abschluss des vierwöchigen Trainingsprotokolls durchgeführt, um Unterschiede in der kardialen Adaption an körperliche Aktivität zu ermitteln. Die Kontrollen saßen vereinzelt in einem Käfig, während der ebenfalls vereinzelt aktiven Gruppe ein individuelles Laufrad zur Verfügung stand. Dargestellt ist jeweils die linksventrikuläre Funktion unter Narkose mit Isofluran.

### 3.2.1 Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von Wildtypen (und Kontrollgruppen)

In Wildtypen kam es nach absolvierter Trainingsperiode zu einem signifikant erhöhten Schlagvolumen ( $p=0,0366$ ) und hoch signifikant erhöhtem Herzzeitvolumen ( $p=0,0058$ ) in der echokardiographischen Untersuchung. Die weiteren Parameter waren nicht signifikant verändert (Abb. 15, Tabelle 2). Andere Kontrollen zeigten vergleichbare Ergebnisse in der Auswertung und kommen hier nicht weiter zur Darstellung.

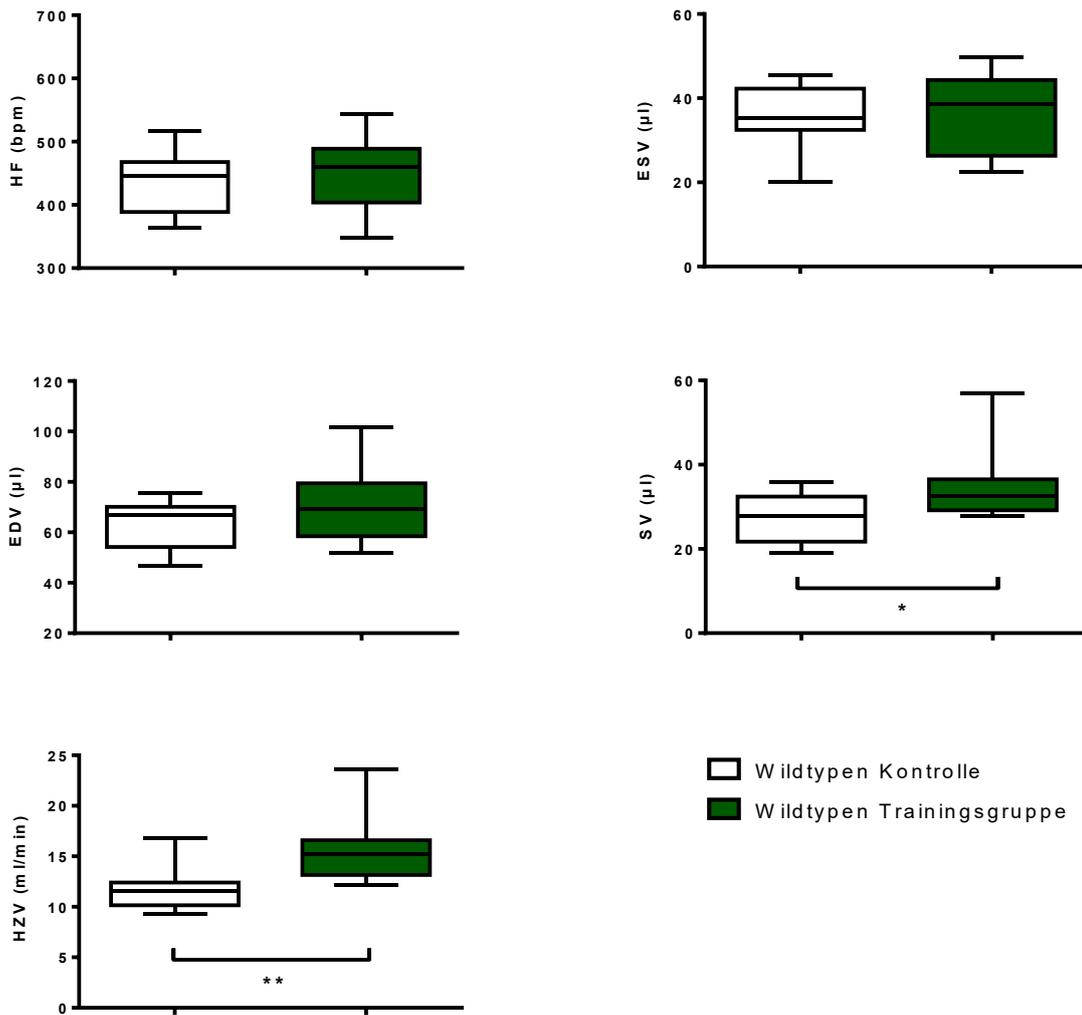


Abb. 15: **Linksventrikuläre Funktion in trainierten WT in der Echokardiographie**

Vergleich von Kontrollgruppe Wildtypen (weiß, n=11) und Trainingsgruppe Wildtypen (grün, n=9) nach Abschluss des Trainingsprotokolls durch die Echokardiographie. Ungepaarter t-Test, p=0,0366 für das Schlagvolumen, p=0,0058 für das Herzzeitvolumen. Die restlichen Parameter sind nicht signifikant.

Mittelwert $\pm$ SEM

	WT Kontrolle	WT Trainingsgruppe	p-Wert
n	11	9	
HF, Schläge/min	433,3 $\pm$ 15,54	448,0 $\pm$ 19,88	0,5631
ESV, $\mu$ l	36,08 $\pm$ 2,141	36,51 $\pm$ 3,278	0,9121
EDV, $\mu$ l	63,56 $\pm$ 2,649	71,30 $\pm$ 5,040	0,1690
SV, $\mu$ l	27,47 $\pm$ 1,615	34,79 $\pm$ 3,003	0,0366
EF, %	43,42 $\pm$ 2,226	49,10 $\pm$ 2,584	0,1111
HZV, ml/min	11,78 $\pm$ 0,6434	15,66 $\pm$ 1,129	0,0058

Tabelle 2: **Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten WT in der Echokardiographie**

### 3.2.2 Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von RBC eNOS KO

Die ebenfalls in RBC eNOS KO durchgeführte Echokardiographie in Kontrollen und Trainingsgruppe zeigte keine signifikant unterschiedliche kardiale Funktion. Jedoch wurden Tendenzen zu einem erhöhten enddiastolischen ( $p=0,1226$ ) und endsystolischen Volumen ( $p=0,1527$ ) sowie Schlagvolumen ( $p=0,3928$ ) deutlich (Abb. 16, Tabelle 3).

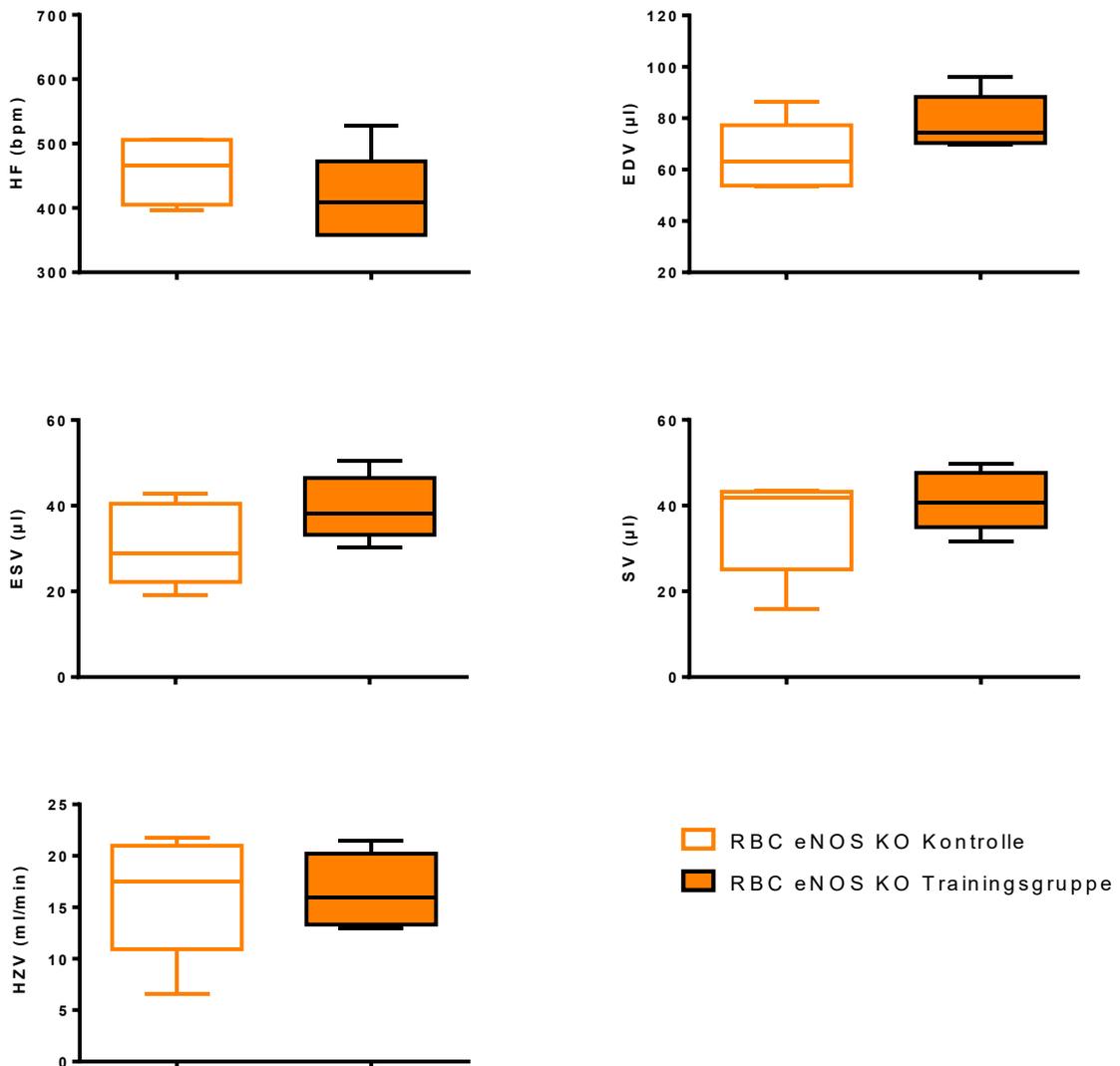


Abb. 16: **Linksventrikuläre Funktion in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie**  
Vergleich von Kontrollgruppe RBC eNOS KO (orange umrandet,  $n=5$ ) und Trainingsgruppe RBC eNOS KO (orange ausgefüllt,  $n=5$ ) nach Abschluss des Trainingsprotokolls durch die Echokardiographie. Ungepaarter t-Test, kein signifikanter Parameter.

Mittelwert +/- SEM

	<b>RBC eNOS KO Kontrolle</b>	<b>RBC eNOS KO Trainingsgruppe</b>	p-Wert
n	5	5	
HF, Schläge/min	457,5 ± 22,72	414,2 ± 30,97	0,2916
ESV, µl	30,88 ± 4,290	39,52 ± 3,385	0,1527
EDV, µl	65,12 ± 5,992	78,37 ± 4,793	0,1226
SV, µl	35,69 ± 5,229	41,17 ± 3,092	0,3928
EF, %	54,95 ± 7,955	52,65 ± 3,075	0,7940
HZV, ml/min	16,27 ± 2,669	16,61 ± 1,605	0,9150

Tabelle 3: Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie

### 3.2.3 Effekt von körperlichem Training auf die kardiale Funktion von EC eNOS KO

Auch in EC eNOS KO wurde nach Abschluss des körperlichen Trainings die Echokardiographie für den Effekt auf die kardiale Funktion durchgeführt. Hier konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden zwischen Tieren aus der Kontrollgruppe und Trainingsgruppe (Abb. 17, Tabelle 4).

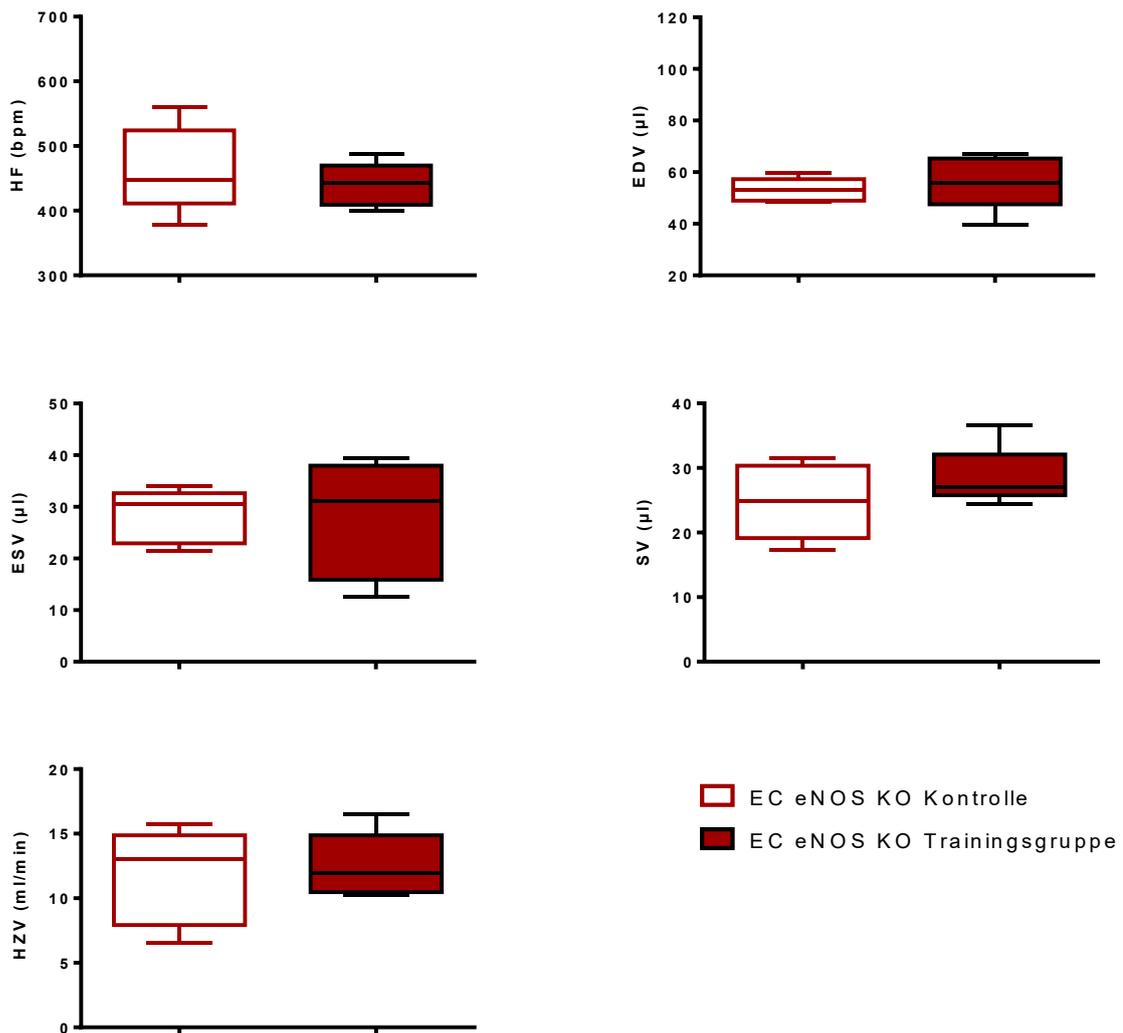


Abb. 17: **Linksventrikuläre Funktion in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie**

Vergleich von Kontrollgruppe EC eNOS KO (rot umrandet, n=5) und Trainingsgruppe EC eNOS KO (rot ausgefüllt, n=5) nach Abschluss des Trainingsprotokolls durch die Echokardiographie. Ungepaarter t-Test, kein signifikanter Parameter.

Mittelwert +/- SEM

	EC eNOS KO Kontrolle	EC eNOS KO Trainingsgruppe	p-Wert
n	5	5	
HF, Schläge/min	463,8 ± 29,80	440,3 ± 15,00	0,5005
ESV, µl	28,33 ± 2,326	27,76 ± 5,136	0,9214
EDV, µl	53,10 ± 2,018	56,33 ± 4,738	0,5483
SV, µl	24,77 ± 2,596	28,57 ± 2,068	0,2851
EF, %	46,53 ± 4,346	52,35 ± 5,983	0,4536
HZV, ml/min	11,73 ± 1,669	12,53 ± 1,126	0,7031

Tabelle 4: **Statistik der linksventrikulären Funktion in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie**

### 3.3 Kardiale Funktion nach körperlichem Training und Ischämie/Reperfusion

Nach Abschluss der Untersuchungsmethoden nach der Singularisierungs- und Trainingsphase, wurden alle Gruppen der I/R-Operation unterzogen. Hier konnte ein Myokardinfarkt induziert werden und den Versuchstieren anschließend 24 Stunden Zeit zur Reperfusion gegeben. Es folgte eine weitere Ultraschalluntersuchung des Herzens, die die Unterschiede in der trainingsinduzierten Kardioprotektion ermitteln sollte. Die Untersuchung wurde identisch zu dieser in Kapitel 3.2 durchgeführt.

#### 3.3.1 Effekt von körperlichem Training und I/R auf die kardiale Funktion auf Wildtypen und Kontrollgruppen

Die trainierten Wildtypen konnten ihre, der Kontrollgruppe überlegene, Herzfunktion in der Echokardiographie nach Ischämie erhalten. Das enddiastolische Volumen ( $p= 0,0222$ ) sowie das Schlagvolumen ( $p= 0,0429$ ) und das Herzzeitvolumen ( $p= 0,0476$ ) waren in der Trainingsgruppe signifikant erhöht (Abb. 18, Tabelle 5). Die weiteren Kontrollgruppen zeigten vergleichbare Ergebnisse und sind nicht weiter dargestellt.

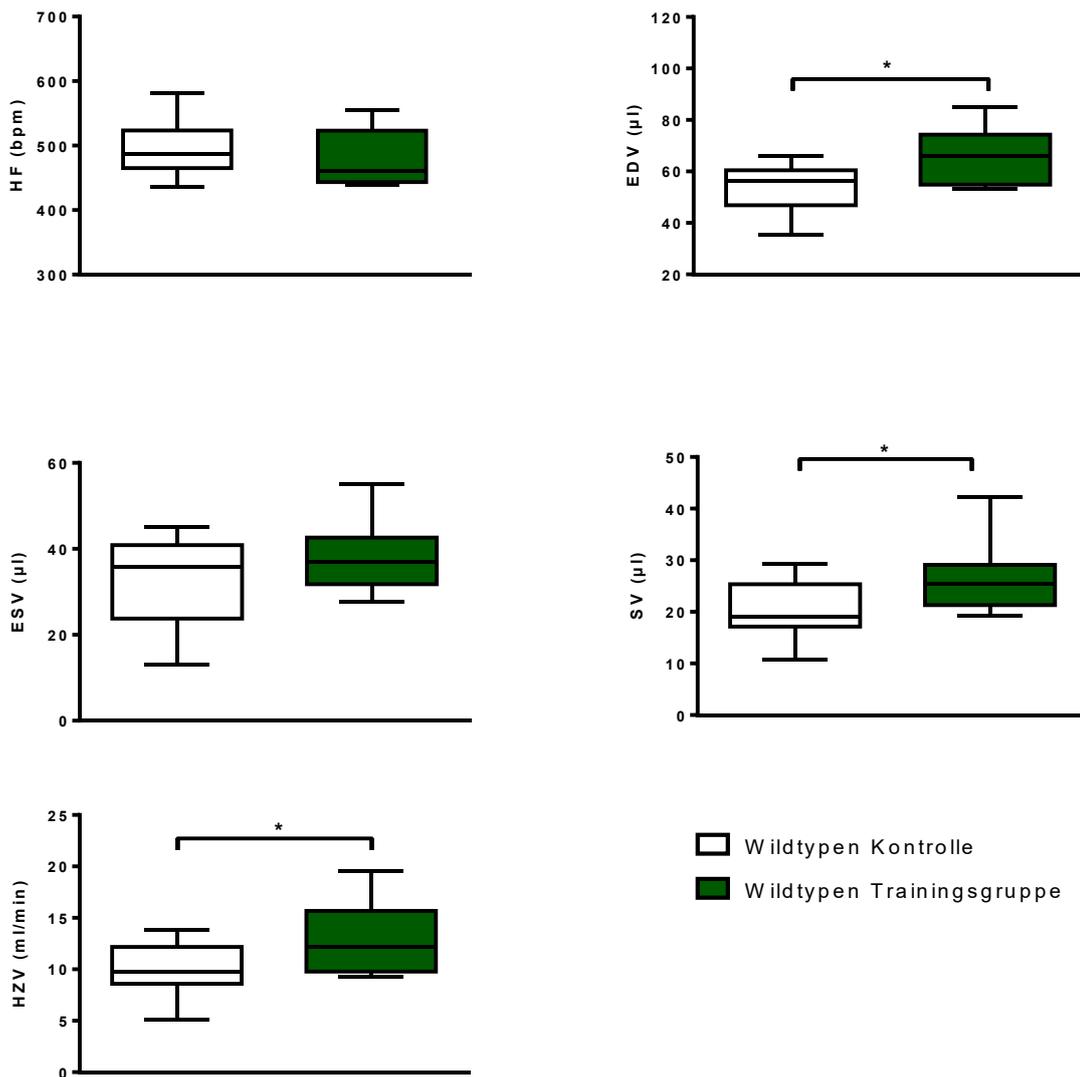


Abb. 18: **Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten WT in der Echokardiographie**

Vergleich von Kontrollgruppe Wildtypen (weiß, n=10) und Trainingsgruppe Wildtypen (grün, n=9) nach Abschluss des Trainingsprotokolls und durchgeführter Ischämie/Reperfusion-Operation in beiden Gruppen. Die Echokardiographie erfolgte 24 Stunden nach der Intervention. Ungepaarter t-Test,  $p=0,0222$  für das enddiastolische Volumen,  $p=0,0429$  für das Schlagvolumen,  $p=0,0476$  für das Herzzeitvolumen. Die restlichen Parameter sind nicht signifikant.

Mittelwert +/- SEM

	WT Kontrolle	WT Trainingsgruppe	p-Wert
n	10	9	
HF, Schläge/min	496,1 ± 15,15	484,9 ± 14,80	0,6056
ESV, µl	32,99 ± 3,270	37,90 ± 2,818	0,2767
EDV, µl	53,29 ± 3,180	65,65 ± 3,781	0,0222
SV, µl	20,30 ± 1,838	26,66 ± 2,283	0,0429
EF, %	38,99 ± 4,147	40,85 ± 2,848	0,7216
HZV, ml/min	9,985 ± 0,8072	12,92 ± 1,141	0,0476

Tabelle 5: Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten WT in der Echokardiographie

### 3.3.2 Effekt von körperlichem Training und I/R auf RBC eNOS KO

Nach Induktion der Ischämie konnten die trainierten RBC eNOS KO eine signifikant überlegene Ejektionsfraktion ( $p=0,0287$ ) gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen. Das Schlagvolumen ( $p=0,1051$ ) und das Herzzeitvolumen ( $p=0,1064$ ) waren nach I/R ebenfalls weiterhin im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell verbessert und gaben Hinweis auf einen trainingsinduzierten kardioprotektiven Effekt in dieser Gruppe (Abb. 19, Tabelle 6).

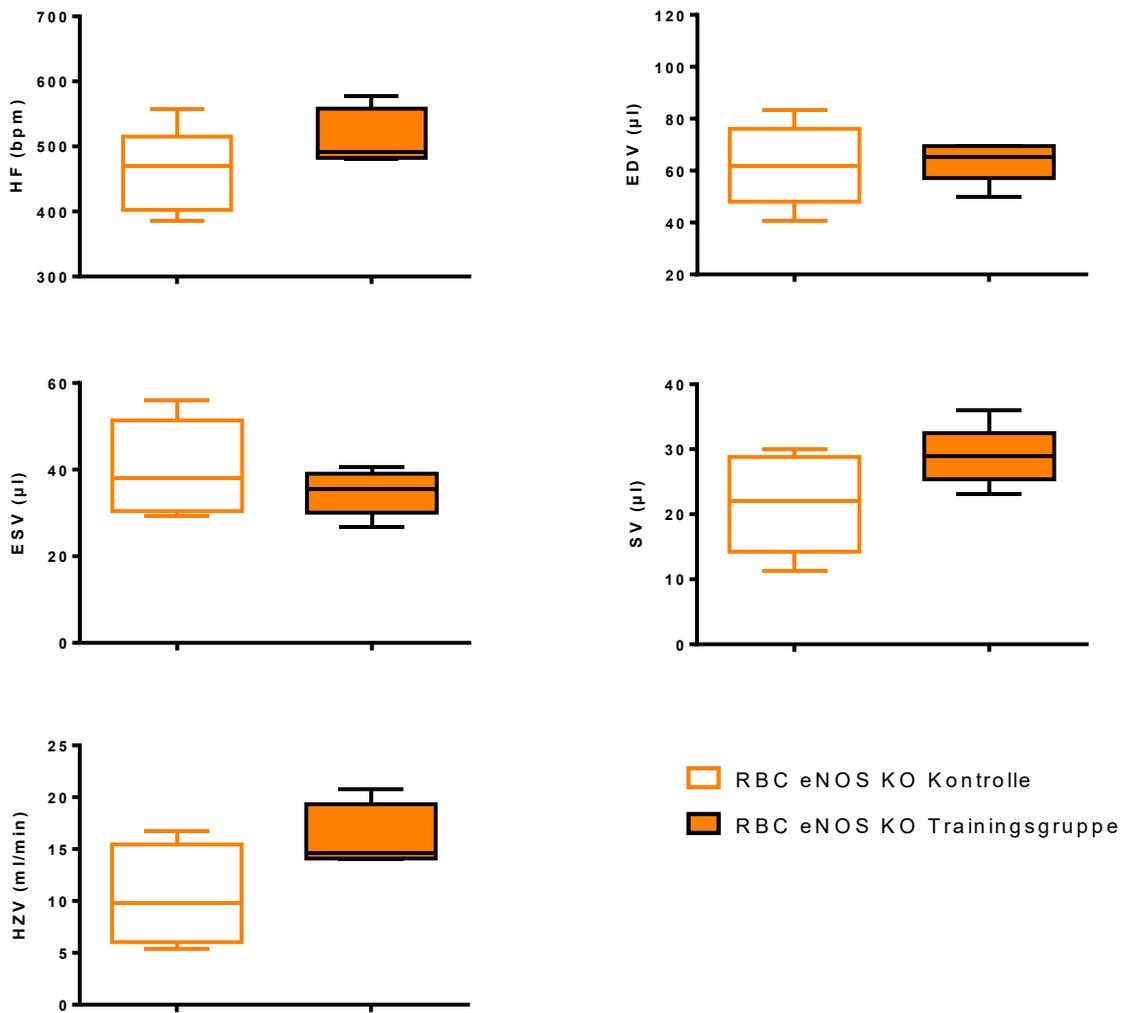


Abb. 19: **Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie**

Vergleich von Kontrollgruppe RBC eNOS KO (orange umrandet, n=5) und Trainingsgruppe RBC eNOS KO (orange ausgefüllt, n=5) nach Abschluss des Trainingsprotokolls und durchgeführter Ischämie/Reperfusion-Operation in beiden Gruppen. Die Echokardiographie erfolgte 24 Stunden nach der Intervention. Ungepaarter t-Test, kein signifikanter Parameter.

Mittelwert +/- SEM

	RBC eNOS KO Kontrolle	RBC eNOS KO Trainingsgruppe	p-Wert
n	5	5	
HF, Schläge/min	461,0 ± 29,03	514,7 ± 18,81	0,1592
ESV, µl	40,36 ± 4,941	34,75 ± 2,313	0,3333
EDV, µl	61,99 ± 7,100	63,70 ± 3,602	0,8358
SV, µl	21,65 ± 3,412	28,94 ± 2,072	0,1051
EF, %	34,56 ± 3,663	45,45 ± 1,814	0,0287
HZV, ml/min	10,43 ± 2,460	16,01 ± 1,602	0,1064

Tabelle 6: **Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten RBC eNOS KO in der Echokardiographie**

### 3.3.3 Effekt von körperlichem Training und I/R auf EC eNOS KO

Ebenso wurden die EC eNOS-defizienten Mäuse einer Ischämieinduktion unterzogen und am Folgetag echokardiographisch reevaluiert. Es war in dieser Gruppe keine trainingsinduzierte Kardioprotektion zu erkennen. Kein Parameter unterschied sich zwischen Kontrollgruppe und Trainingsgruppe signifikant (Abb. 20, Tabelle 7).

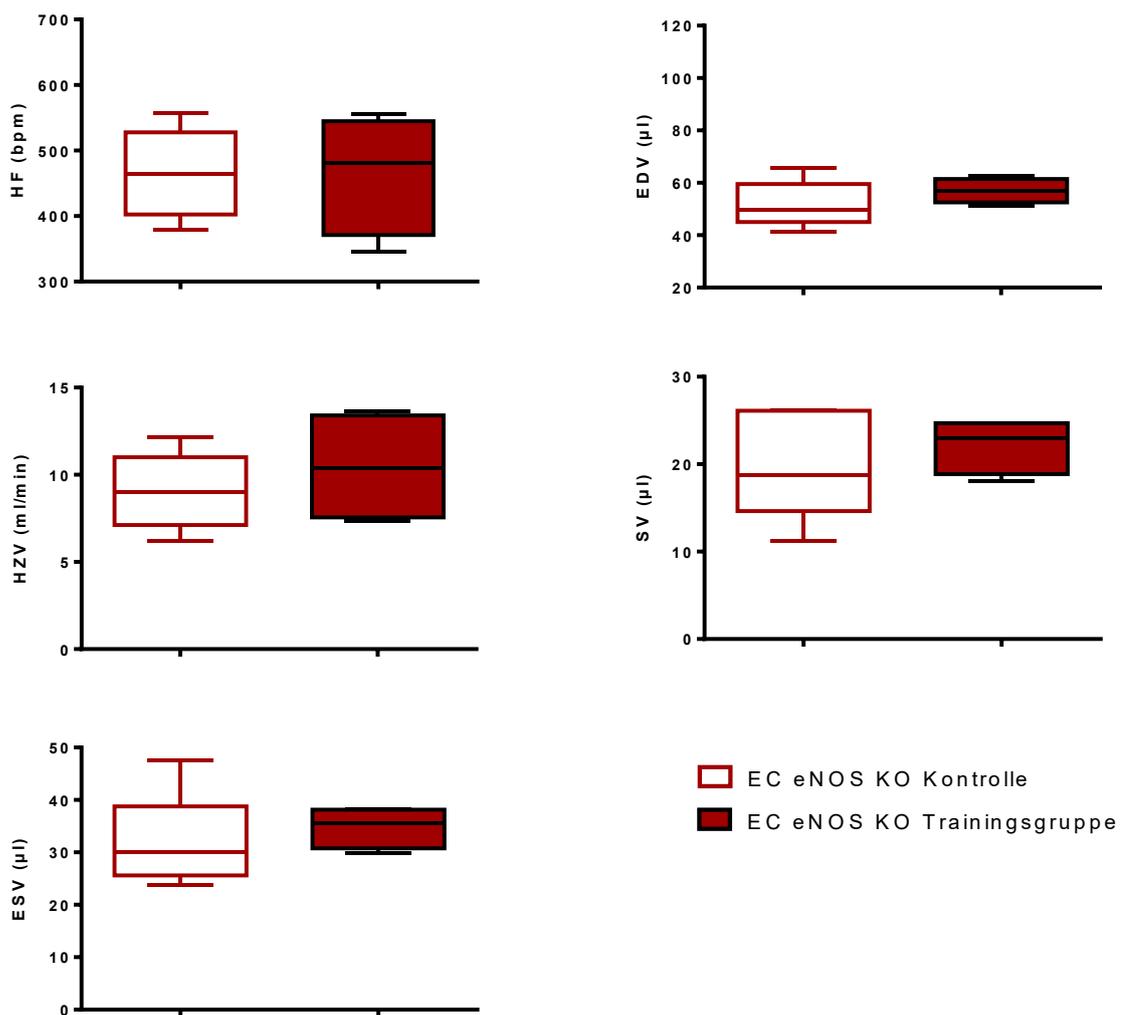


Abb. 20: **Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie**

Vergleich von physisch inaktiven EC eNOS KO (rot umrandet, n=5) und aktiven EC eNOS KO (rot ausgefüllt, n=4) nach Abschluss des Trainingsprotokolls und durchgeführter Ischämie/Reperfusion-Operation in beiden Gruppen. Die Echokardiographie erfolgte 24 Stunden nach der Intervention. Ungepaarter t-Test, kein signifikanter Parameter.

Mittelwert +/- SEM

	EC eNOS KO Kontrolle	EC eNOS KO Trainingsgruppe	p-Wert
n	5	4	
HF, Schläge/min	465,0 ± 30,47	465,8 ± 45,77	0,9890
ESV, µl	31,75 ± 4,096	34,84 ± 1,981	0,5529
EDV, µl	51,80 ± 3,982	57,01 ± 2,333	0,3280
SV, µl	20,05 ± 2,804	22,17 ± 1,580	0,5600
EF, %	38,86 ± 5,217	38,91 ± 2,363	0,9938
HZV, ml/min	9,053 ± 0,9810	10,46 ± 1,590	0,4581

Tabelle 7: Linksventrikuläre Funktion nach induzierter Ischämie in trainierten EC eNOS KO in der Echokardiographie

### 3.4 Endothelfunktion nach körperlichem Training

Ein möglicher trainingsinduzierter Einfluss der eNOS in RBC und EC auf die Endothelfunktion wurde mit der Methode der flussvermittelten Vasodilatation untersucht. Dabei wurde die *Arteria iliaca externa* fünf Minuten lang okkludiert und in einer anschließenden fünfminütigen Reperfusionphase die Veränderung der Gefäßweite unter Einfluss von erhöhtem Scherstress sonographisch erfasst. Alle Gruppen wurden direkt nach Ende des Trainingsprotokolls untersucht.

#### 3.4.1 Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in Wildtypen und anderen Kontrollgruppen

Die trainierten Wildtypen zeigten eine sehr diskrete Verbesserung ihrer Endothelfunktion. In den späteren Zeitpunkten der Messung ließ sich eine geringfügig länger anhaltende Vasodilatation darstellen, diese war aber nicht signifikant unterschiedlich zwischen Trainingsgruppe und Kontrollgruppe (Abb. 21). Die weiteren Kontrollen erzielten vergleichbare Ergebnisse und sind nicht weiter dargestellt.

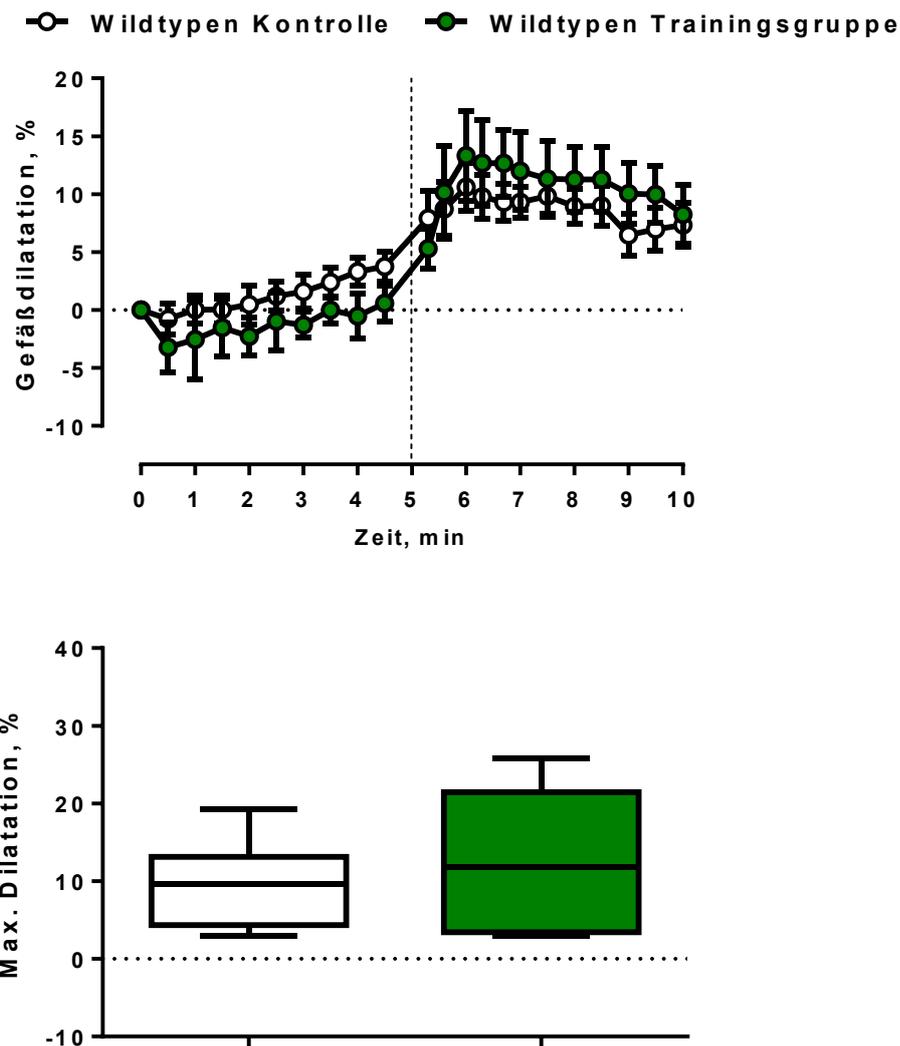


Abb. 21: FMD in trainierten WT

Der erste Graph zeigt die Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit zwischen der Kontrollgruppe Wildtypen (weiß, n=8) und der Trainingsgruppe Wildtypen (grün, n=6) nach Abschluss des Trainingsprotokolls. Two-way-ANOVA: Interaction:  $p=0,3796$ . Row factor:  $p<0,0001$ . Column factor:  $p=0,9909$ . Die zweite Abbildung zeigt die maximal beobachtete Gefäßdilatation der beiden Gruppen in der Reperfusionphase. Ungepaarter t-test:  $p=0,4631$ .

### 3.4.2 Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in RBC eNOS KO

Die trainierten RBC eNOS KO konnten ebenfalls zum Zeitpunkt der Messung keine signifikante FMD nachweisen, wobei die Gefäßantwort auf Scherstress als maximale Dilatation gut zu erkennen ist. Es lassen sich, ähnlich wie bei den Wildtypen, Tendenzen zur trainingsinduzierten verbesserten Gefäßfunktion ableiten (Abb. 23).

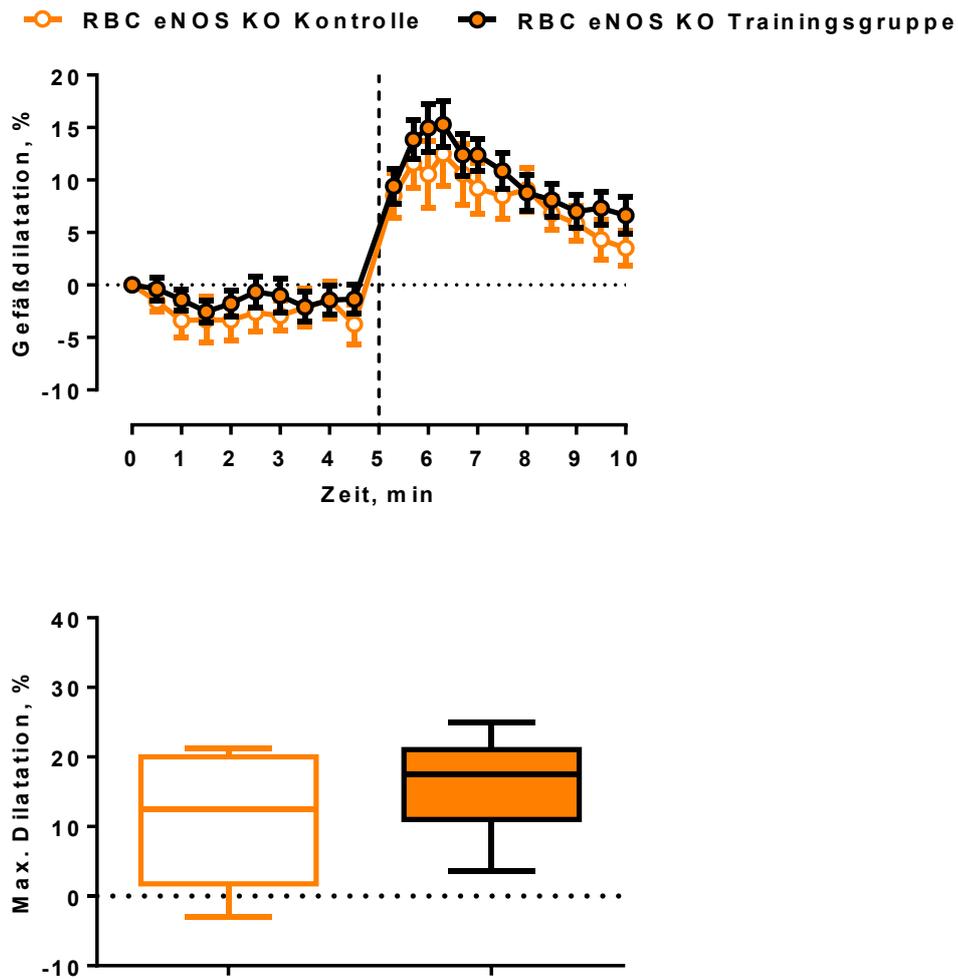


Abb. 22: FMD in trainierten RBC eNOS KO

Der erste Graph zeigt die Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit zwischen der Kontrollgruppe RBC eNOS KO (orange umrandet, n=9) und der Trainingsgruppe RBC eNOS KO (orange ausgefüllt, n=10) nach Abschluss des Trainingsprotokolls. Two-way-ANOVA: Interaction:  $p=0,9950$ . Row factor:  $p<0,0001$ . Column factor:  $p=0,3179$ . Die zweite Abbildung zeigt die maximal beobachtete Gefäßdilatation der beiden Gruppen in der Reperfusionphase. Ungepaarter t-test:  $p=0,1830$ .

### 3.4.3 Effekt von körperlichem Training auf die Endothelfunktion in EC eNOS KO

Ein Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Trainingsgruppe der EC eNOS KO zeigte keine gesteigerte FMD. Hier sind keine positiven trainingsinduzierten Effekte aufgetreten. Zum Zeitpunkt der maximalen Gefäßdilatation war die Kontrollgruppe entgegen der Erwartung sogar signifikant ( $p=0,0424$ ) der Trainingsgruppe überlegen (Abb. 24).

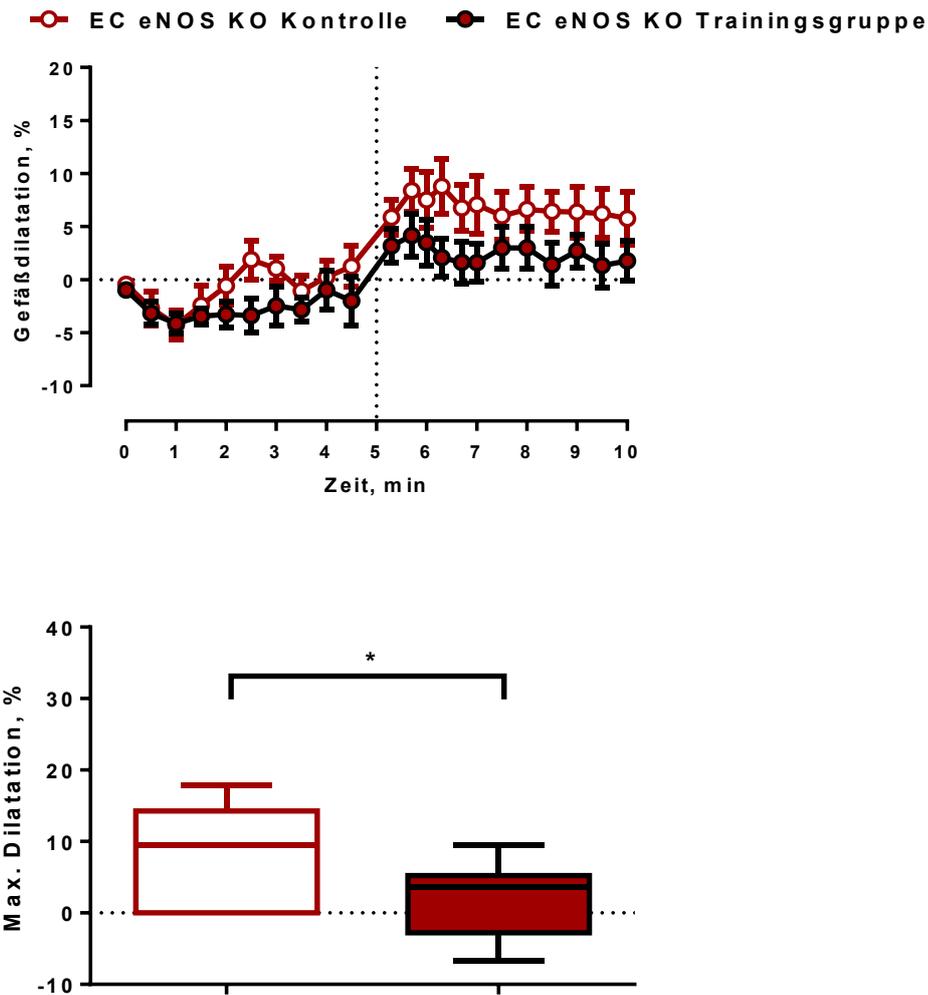


Abb. 23: FMD in trainierten EC eNOS KO

Der erste Graph zeigt die Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit zwischen der Gruppe der Kontrollgruppe EC eNOS KO (rot umrandet, n=7) und der Trainingsgruppe EC eNOS KO (rot ausgefüllt, n=9) nach Abschluss des Trainingsprotokolls. Two-way-ANOVA: Interaction:  $p=0,5629$ . Row factor:  $p<0,0001$ . Column factor:  $p=0,0925$ . Die zweite Abbildung zeigt die maximal beobachtete Gefäßdilatation der beiden Gruppen in der Reperfusionsphase. Ungepaarter t-test:  $p=0,0424$ .

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Körperliches Training führte in Wildtypen zu einer signifikant verbesserten linksventrikulären Funktion in der Echokardiographie. Dies spiegelte sich in einem erhöhten Schlagvolumen und Herzzeitvolumen wider. Das körperliche Training bewirkte ebenfalls eine der Kontrollgruppe überlegene Kardioprotektion. Das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen und auch das enddiastolische Volumen zeigten sich weiterhin verbessert. In der FMD war eine Tendenz zur verbesserten Endothelfunktion in der Trainingsgruppe von Wildtypen erkennbar. Eine nachhaltigere Vasodilatation in den späteren Messzeitpunkten ließ sich interpretieren. Ähnlich dazu verhielten sich die RBC eNOS KO. Nach Abschluss des Trainingsprotokolls zeigte die Trainingsgruppe dort eine tendenziell verbesserte kardiale Funktion und nach Myokardinfarkt

sogar eine signifikant überlegene trainingsinduzierte Kardioprotektion in Form einer erhöhten Ejektionsfraktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen waren tendenziell verbessert. Die FMD in trainierten RBC eNOS KO war der Kontrollgruppe nicht signifikant überlegen, deutete aber eine diskret verbesserte Endothelfunktion an. In EC eNOS KO war hingegen kein trainingsinduzierter Effekt zur gesteigerten kardialen Funktion messbar. Die Echokardiographie nach der Trainingsperiode war bei keinem Parameter in der Trainingsgruppe überlegen. Ebenso fiel ein trainingsinduzierter kardioprotektiver Effekt in diesen transgenen Mäusen aus. Die linksventrikuläre Funktion war nach I/R-Operation in Trainings- und Kontrollgruppe gleichwertig. Es gab zudem keine verbesserte Endothelfunktion durch körperliche Aktivität. Die FMD zeigte, dass in den durchgeführten Messungen in EC eNOS KO sogar die Exemplare der Kontrollgruppe eine überlegene maximale Vasodilatation aufwiesen.

## 4 Diskussion

Schlüsselfrage dieser Arbeit ist die Einordnung der Rolle der erythrozytären und endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase in trainingsinduzierten Effekten auf die kardiovaskuläre Funktion. Ebenfalls sollte der Einfluss der gewebespezifischen eNOS auf die Kardioprotektion nach körperlichem Training untersucht werden. Besonders die Rolle der in Erythrozyten gefundenen eNOS [36, 38] ist bislang wenig erforscht. Dafür wurden transgene Mäuse genutzt, denen entweder die eNOS in RBC oder EC fehlte, um den Effekt der beiden voneinander abzugrenzen. Zum Vergleich wurden Wildtypen demselben Trainingsprotokoll und Untersuchungsmethoden unterzogen. Nach 6 Wochen der Singularisierung und körperlicher Aktivität im Laufrad der Trainingsgruppe bzw. Singularisierung und Inaktivität ohne Laufrad der Kontrollen wurden die Ultraschallmethoden Echokardiographie und flussvermittelte Vasodilatation genutzt, um Veränderungen der kardialen und der vaskulären Funktion in den Interventions- und Kontrollgruppen zu messen. Dieses Trainingsprotokoll, welches auf freiwilliger Laufaktivität beruht, wurde bereits in diversen Studien etabliert [109, 115, 121]. Nach Induktion eines Myokardinfarkts und 24-stündiger Reperfusion wurde die Echokardiographie wiederholt, um kardioprotektive Effekte zwischen trainierten und untrainierten Mäusen getrennt nach transgener Veränderung zu ermitteln. Zusätzlich wurde die Aktivität der Citratsynthase im *Musculus Soleus* als Parameter für erfolgte körperliche Aktivität laborchemisch gemessen. Trainierte Wildtypmäuse konnten eine tendenziell erhöhte Enzymaktivität nachweisen, erreichten aber keine signifikante Steigerung, wie sie im Vergleich zur Literatur zu erwarten wäre [122]. Die nicht erreichte Signifikanz ist am ehesten durch die geringe Fallzahl zu erklären. Die im Vergleich zu den EC eNOS KO Mäusen deutlich erhöhte Laufleistung und Veränderung der anatomischen Parameter muss mitbetrachtet werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse in Bezug auf die eingangs erwähnten Fragestellungen diskutiert.

## 4.1 Rolle der RBC eNOS bei trainingsinduzierten Veränderungen der kardiovaskulären Funktion

Das körperliche Training in RBC eNOS KO zeigte in der Echokardiographie eine tendenziell verbesserte kardiale Funktion in den Parametern des enddiastolischen und endsystolischen Volumens sowie des Schlagvolumens. In anderen Studien mit vergleichbarem Laufradtraining in Wildtypen konnte dies auf eine Hypertrophie des Herzens zurückgeführt werden [123-126]. Mäuse mit einem globalen KO der eNOS zeigten bereits ohne Training eine solche Hypertrophie [9], die vermutlich eine weitere Adaption an körperliches Training reduziert. Grundsätzlich sollte nach chronischer physischer Aktivität die Skelettmuskelmasse zunehmen [113] und der Körper kardiovaskulär, respiratorisch und metabolisch adaptieren [104, 127, 128]. Hingegen führt globales Fehlen von eNOS zu Defiziten in der physischen Leistungskapazität [113, 114]. Unsere Arbeitsgruppe konnte genau dies in der Laufleistung der RBC eNOS KO widerlegen [120]. Daraus lässt sich schließen, dass die RBC eNOS einen eher geringen Einfluss auf die physische Leistungskapazität hat. Die Laufleistung blieb auf einem ähnlichen Niveau wie das der Wildtypen. Ebenso verhielten sich die RBC eNOS KO in der Analyse des Körpergewichts nach körperlichem Training ähnlich zu den Wildtypen. Bei ihnen fand eine signifikante Reduktion statt, die in den EC eNOS KO ausblieb [120]. Ein absolviertes Laufradtraining führte auch in anderen Studien zu einer Gewichtsreduktion [123, 129]. Des Weiteren ließ sich in RBC eNOS KO und Wildtypen auch von unserer Arbeitsgruppe eine tendenzielle Zunahme des Gewichts des *Musculus Soleus* beobachten [120]. Die FMD zeigte sich in den aktiven RBC eNOS KO gegenüber ihrer inaktiven Kontrollgruppe tendenziell verbessert. Auch hier lag das Ergebnis nah an dem der aktiven Wildtypen. Als Mittel zur Erfassung der endothelialen Funktion und Dysfunktion ist die FMD schon lange etabliert [22, 23, 60]. Globale eNOS KO zeigen keine FMD, da diese eNOS-abhängig ist [130]. Dieselbe Gruppe bestätigte auch, dass dieser Effekt vor allem in den ersten Minuten Hauptakteur ist und danach andere Mechanismen greifen. Andere Versuche wiesen auf einen Einfluss der RBC eNOS auf die Blutdruckregulation und den zirkulierenden Nitrit-Pool hin [40, 118]. Ist der Organismus chronischer körperlicher Aktivität ausgesetzt, kommt es zu einer gesteigerten Vasodilatation und auch Neovaskularisierung [105]. Als adaptiver Mechanismus wurde eine, durch den erhöhten Blutfluss und damit einhergehenden Scherstress, erhöhte eNOS- Expression und Enzymaktivität identifiziert [131]. Ein nur vierwöchiges Trainingsprotokoll könnte in unserem Fall die nicht signifikant gesteigerte FMD erklären. Andere Gruppen bestätigten bereits *in vitro* die entscheidende Rolle der eNOS in der adaptiv gesteigerten Vasodilatation [132-135]. Betrachtet man nun die tendenziell gesteigerte linksventrikuläre Funktion und diskret verbesserte FMD in den Mäusen mit RBC KO, lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass die erythrozytäre eNOS nicht die ausschlaggebende Rolle in der Adaption an das körperliche Training spielt. Ihre Ergebnisse sind denen der Wildtypen kaum unterlegen. Es darf dabei auch nicht außer Acht gelassen werden, dass beide angewandten Ultraschallmethoden in ihrer Ausführung und auch der Bildauswertung am Computer einer intra- und interindividuellen Untersucherabhängigkeit unterworfen sind. Des Weiteren könnte ein längeres Trainingsintervall möglicherweise für zuverlässigere Ergebnisse sorgen.

## 4.2 Rolle der EC eNOS bei trainingsinduzierten Veränderungen der kardiovaskulären Funktion

Eine trainingsinduzierte Adaption der kardialen Funktion blieb bei den EC eNOS KO aus. Kein Parameter in der Echokardiographie der Trainingsgruppe dieser transgenen Mäuse war dem der Kontrollgruppe nach Abschluss des vierwöchigen freiwilligen Lauftrainings signifikant überlegen oder zeigte eine Tendenz dahin. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich eine Hypertrophie des Herzens bei ihnen nicht entwickelte [120]. Eine physiologische trainingsadaptierte kardiale Hypertrophie geht einher mit einer Zunahme der kardialen Masse [136-138], welche hier ausblieb. Des Weiteren fiel bei den EC eNOS KO eine verminderte Leistungskapazität in der Laufstrecke, eine fehlende Gewichtsreduktion nach körperlicher Aktivität, aber dennoch eine Zunahme des *Musculus Soleus*-Gewichts auf [120]. In globalen eNOS-KO Mäusen konnte eine andere Studie die fehlende Zunahme von Muskelmasse darstellen [113]. Diese Studie wies auch darauf hin, dass die mitochondriale oxidative Kapazität in den Skelettmuskeln durch den Ausfall der eNOS eine metabolische Limitierung in diesen bedingt und eine reduzierte Laufkapazität zur Folge haben kann. Die EC eNOS KO zeigten in der FMD keine trainingsinduzierte Verbesserung. Im Gegenteil war die Kontrollgruppe der Trainingsgruppe in ihrer maximalen Vasodilatation nach Entfernen der Blutdruckmanschette überlegen. Hierbei muss beachtet werden, dass bei der gewählten Methode intra- und interindividuelle Untersuchervariabilität auftreten kann und eventuell ein nur vierwöchiges Trainingsprotokoll nicht ausreicht, um trainingsinduzierte Effekte zu erzielen. Möglich ist auch die inadäquate Reaktion auf die Tamoxifen-Induktion des KO, die eine ausreichende Restaktivität der EC eNOS in den Kontrollmäusen zugelassen hat. Die Betrachtung einer größeren Fallzahl könnte in diesem Fall von Vorteil sein. Eine prolongierte Vasodilatation ist auch durch andere Mechanismen, welche eNOS unabhängig sind, auslösbar [139]. Die reaktive Hyperämie in der FMD und dadurch erzeugte Schubspannung lösen eine NO-Freisetzung aus, die lokal eine Vasodilatation bewirkt [23]. Außerdem kann das Endothel mittels  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanälen diese erhöhte Schubspannung detektieren und im Folgenden durch Hyperpolarisation der Endothelzelle und  $Ca^{2+}$ -Einstrom die eNOS aktivieren und schlussendlich die NO-Produktion erhöhen [24]. Globale eNOS KO reagieren nicht mit einer erhöhten NO-Aktivität auf Stimuli wie Acetylcholin [73] oder andere endothelabhängige Vasodilatoren [10, 12]. Die eNOS-Abhängigkeit der FMD wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [130, 140]. Bei gleichzeitiger Betrachtung der ausbleibenden trainingsinduzierten Adaption der kardialen Funktion in der Echokardiographie und der unterlegenen Vasodilatation bzw. vaskulären Funktion der trainierten EC eNOS KO in der FMD, wird deutlich, dass die EC eNOS ein wichtiger Hauptakteur in der Entwicklung von verbesserter kardiovaskulärer Funktion aufgrund chronischer physischer Aktivität ist. Ihre Ergebnisse in den Untersuchungen legen nahe, dass ein Ausfall dieser zellspezifischen eNOS sehr nah an einem globalen Enzymverlust ist und eine Adaption an körperliches Training signifikant vermindert wird.

### 4.3 Protektiver Effekt der EC eNOS nach I/R im Vergleich zur RBC eNOS

Zur Abgrenzung der kardioprotektiven Effekte des körperlichen Trainings wurde eine I/R-Operation durchgeführt. Dabei wurde unter Narkose jeder Maus einzeln mittels Abklemmung des *Ramus interventricularis anterior* ein Myokardinfarkt für 45 Minuten induziert. Anschließend konnten die Tiere 24 Stunden unter Ruhebedingungen in ihren Käfigen verbringen und die ischämischen Areale reperfundieren lassen. Dann wurde die kardiale Funktion mit der Echokardiographie erneut evaluiert. Die untersuchten Wildtypen der Trainingsgruppe zeigten eine signifikant bessere Herzfunktion nach Infarkt als ihre Kontrollgruppe. Ein kardioprotektiver Effekt des Trainings konnte demnach nachgewiesen werden. Die RBC eNOS KO Mäuse zeigten nach Auswertung eine signifikante Überlegenheit der linksventrikulären Funktion in Form einer erhöhten Ejektionsfraktion. Des Weiteren war hier das Schlagvolumen und das Herzzeitvolumen in der Trainingsgruppe tendenziell überlegen. Es kann von einer, trotz RBC eNOS KO, erhaltenen trainingsinduzierten Kardioprotektion ausgegangen werden. Anders verhielten sich die EC eNOS KO Mäuse. Hier gab es keinen Unterschied in der Trainingsgruppe und den Kontrollen. Das Trainingsprotokoll führte zu keiner messbaren Kardioprotektion in den Mäusen mit diesem zellspezifischen eNOS KO. In unserer Arbeitsgruppe wurden weitere Parameter wie beispielsweise die Infarktgröße analysiert. Wildtypen und RBC eNOS KO Exemplare wiesen hierbei nach physischer Aktivität eine signifikant geringere Infarktgröße auf [120]. Weiterhin stellte sich heraus, dass es in den EC eNOS keinen Unterschied in der Infarktgröße zwischen Trainingsgruppe und Kontrollgruppe gab und der kardioprotektive Effekt in untrainierten Kontrollgruppen generell ausblieb [120]. Andere Studien kamen bei Nutzung von Mäusen mit globalem eNOS KO zu demselben Ergebnis [115, 116]. Insgesamt gibt es widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle der eNOS in I/R-induzierten Infarktgrößen. In eNOS KO Mäusen konnten teilweise größere Infarktareale beobachtet werden als in Kontrollmäusen und Wildtypen [10, 71]. Andererseits ergaben einige Studien auch, dass kleinere Infarktgrößen in den transgenen Mäusen möglich sind [141]. Dies ist zu erklären durch eine kompensatorische Hochregulierung der iNOS, die aber auch gezielt inhibiert werden kann, um wiederum vergrößerte Infarkte zu generieren [73]. Andere Ansätze der Untersuchung wie das Langendorff-Modell bestätigten den Verlust der trainingsinduzierten Kardioprotektion nach gezielter Zellyse der Endothelzellen [142]. Im Umkehrschluss kann eine kardiomyozyten-spezifische Überexpression von eNOS zu einer verringerten Infarktgröße und mäßig verminderter Ejektionsfraktion beitragen [75]. Andere Studien untersuchten ebenfalls diese Überexpression und ihr Effekt auf die Herzfunktion nach erlittener Ischämie. Trotz geringerer Infarktgröße verblieb eine kontraktile Dysfunktion [143]. Wie bereits im Kapitel zur Diskussion des trainingsadaptiven Effektes erwähnt, ist die deutlich reduzierte physische Leistungskapazität, ausgedrückt in der fast halbierten Laufleistung (WT 8 km/24h vs. EC eNOS KO 5 km/24h), als mögliche Ursache der mangelnden Kardioprotektion zu sehen. Weitere Arbeiten konnten den zugrundeliegenden unterlegenen mitochondrialen Metabolismus und die Akkumulation von ROS identifizieren, der ein schlechteres kardiovaskuläres Outcome bedingt [144].

Chronische körperliche Aktivität hat auch nach stattgehabtem Myokardinfarkt einen eNOS-abhängigen positiven Effekt auf die kardiale und vaskuläre Funktion zur Folge [111]. Dabei führt das Training zu einer erhöhten Expression der eNOS nicht nur in Gefäßen, sondern auch im Herzen und kann seine vasodilatativen Effekte nutzen, um die ischämischen Areale einer besseren Durchblutung zukommen zu lassen und den beim Myokardinfarkt entstehenden oxidativen Stress zu reduzieren [109]. Schon lange ist ebenso bekannt, dass die geringeren Infarktgrößen zu einem besseren Erhalt der kardialen Funktion führen [145, 146]. Das untergegangene nekrotische Gewebe ist nicht mehr funktionsfähig und neigt zur Vernarbung. Dies ergibt eine kontraktile Dysfunktion je nach Größe des Infarktes [147]. In den in unserer Studie genutzten Wildtypen wurde ein erhöhtes enddiastolisches Volumen, Schlagvolumen und Herzzeitvolumen nach I/R-Induktion festgestellt. Die trainingsinduzierte Hypertrophie ihrer Herzen führte zu der besser erhaltenen Kontraktilität. Dieselben Parameter und auch die Herzfrequenz waren in trainierten RBC eNOS KO mit einer deutlichen Tendenz im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Bei gleichzeitig verbesserter Ejektionsfraktion der Trainingsgruppe und dem im Einklang stehenden geringeren Infarktareal, ist bewiesen worden, dass die kardiale Funktion besser konserviert werden konnte. Die RBC eNOS hat also einen sehr geringen bis gar keinen Einfluss auf die trainingsinduzierte Kardioprotektion nach I/R, da ihr KO die Kardioprotektion nicht auslöscht. Die Literatur sieht auch die globale eNOS bzw. die Endothelzellen und ihre eNOS als Keyplayer im Erhalt der kardialen Funktion nach physischer Aktivität und akuter Ischämie. Dies stimmt mit den echokardiographisch ermittelten Daten dieser Studie überein. Aktive EC eNOS KO Mäuse hatten keine überlegene linksventrikuläre Funktion im Vergleich zu den Kontrollen derselben KO Linie.

#### 4.4 Limitationen der Arbeit

Die komplexe Herstellung der transgenen Tiere über mehrere Generationen und ihr großer Bedarf in aktueller kardiovaskulärer Forschung führen zu einer Konkurrenz ihrer Bestellung unter den zahlreichen Arbeitsgruppen. Dies spiegelt sich in den teilweise niedrigen Fallzahlen wider, die die statistische Aussagekraft limitieren. Des Weiteren ist zu beachten, dass im gewählten Trainingsprotokoll von vier Wochen und gleichzeitiger Isolation der Mäuse möglicherweise nicht alle gewünschten Adaptionen an das körperliche Training auftreten. Genauso ist der Effekt auf die Kardioprotektion und Reperfusion zeitabhängig und kann hier abweichen. Bei der Arbeit mit hochauflösendem Ultraschall ist der Untersucher den Atemexkursionen des Thorax und der sehr hohen Herzfrequenz der Maus ausgesetzt, welche eine große Herausforderung an die Bildaufnahmen stellte. Dies und auch die anschließende Auswertung am Computer führten zu intra- und interindividuellen Unterschieden in der Auswertung, welche durch ausführliches Training und Einarbeitung minimiert wurden.

## 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit soll den Einfluss der erythrozytären und endothelialen eNOS auf ihre kardiovaskuläre Adaption an körperliches Training und ihre Kardioprotektion weiter entschlüsseln. Bisher konnte die genaue Gewichtung der zellspezifischen Enzyme nicht genau geklärt werden. Es wurden dabei transgene Mauslinien mit einem jeweiligen KO in der Zellart erzeugt und nach Abschluss eines Trainingsprotokolls, getrennt in aktive Trainingsgruppe und inaktive Kontrollgruppe, untersucht. Als Methoden wurden die Echokardiographie und die FMD genutzt. Nach induziertem Myokardinfarkt mittels I/R-Operation wurde die Echokardiographie wiederholt und eine mögliche Kardioprotektion herausgestellt. Die Ergebnisse legen nahe, dass die vaskuläre eNOS in den Endothelzellen der Hauptakteur in der Vermittlung von trainingsinduzierter verbesserter kardialer und vaskulärer Funktion ist. Ihr KO führte zu einem Verlust dieser Effekte. Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe eine Leistungslimitierung, ein vergrößertes Infarktareal und eine verringerte Redoxkapazität herausarbeiten [120]. Gleichzeitig zeigten trainierte Wildtypen eine überlegene kardiovaskuläre Funktion und einen verbesserten Erhalt der Herzfunktion nach Myokardinfarkt. Ähnlich zu den Wildtypen verhielt sich die transgene Mauslinie mit KO der eNOS in Erythrozyten. Zwar konnte nur die Ejektionsfraktion ein statistisch signifikantes Ergebnis in Richtung einer positiven Adaption an körperliches Training und Kardioprotektion erzielen, dennoch wiesen auch andere Parameter eine große Tendenz zu einem sehr geringen Einfluss der RBC eNOS auf die beobachteten Effekte auf. Die erythrozytäre eNOS hat kaum einen Einfluss auf die FMD und die linksventrikuläre Funktion nach physischer Aktivität. Auch ihre Rolle in der trainingsinduzierten Kardioprotektion scheint vernachlässigbar zu sein.

Patienten mit endothelialer Dysfunktion, welche beeinflusst ist von der verminderten NO-Verfügbarkeit [52], kann die weitere Erforschung dieser Stoffwechselmechanismen zugutekommen. Leiden sie an einer koronaren Herzkrankheit, ist die Expression und Aktivität der erythrozytären eNOS verringert [38, 45]. Positive Effekte von NO auf die linksventrikuläre Funktion sind auch beim Menschen bekannt [148]. Ausgehend von der Identifizierung der gewebespezifischen eNOS in ihrem Nutzen für die kardiovaskuläre Funktion können neue Therapiestrategien entstehen, die diesen Metabolismus als Target haben.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt. *Todesursachenstatistik Deutschland 2019*. 2021 [30.08.2021]; Available from: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?sequenz=tabelleErgebnis&selectionname=23211-0002#abreadcrumb>.
2. Gosswald, A., et al., [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2013. **56**(5-6): p. 650-5.
3. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, *Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. *Lancet*, 2016. **388**(10053): p. 1459-1544.
4. Robert Koch-Institut. *GBE-Themenheft 48 - Krankheitskosten. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2009 [cited 2021 30.08.2021]; Available from: [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/Krankheitskosten.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/Krankheitskosten.pdf?__blob=publicationFile).
5. Muller-Riemenschneider, F., F. Andersohn, and S.N. Willich, *Trends in age-standardised and age-specific mortality from ischaemic heart disease in Germany*. *Clin Res Cardiol*, 2010. **99**(9): p. 545-51.
6. Finger JD, B.M., Du Y et al., *Zeitliche Trends kardiometaboler Risikofaktoren bei Erwachsenen*. *Dtsch Arztebl International*, 2016. **113**(42): p. 712-719.
7. e.V, D.H., *Deutscher Herzbericht 2015*. 2015: Frankfurt am Main.
8. S Bansilal, J.M.C., V Fuster, *Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease*. *International Journal of Cardiology*, 2015.
9. X-P Yang, Y.-H.L., E G Shesely, M Bulagannawar, F Liu, O A Carretero, *Endothelial Nitric Oxide Gene Knockout Mice*. *Hypertension*, 1999.
10. P L Huang, Z.H., H Mashimo, K D Bloch, M A Moskowitz, J A Bevan, M C Fishman, *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. *Nature*, 1995.
11. P Rajendran, T.R., J Thangavel, Y Nishigaki, D Sakthisekaran, G Sethi, I Nishigaki, *The Vascular Endothelium and Human Diseases*. *International Journal of Biological Sciences*, 2013.
12. D N Atochin, P.L.H., *Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction*. *Pflügers Arch.*, 2010.
13. U Förstermann, W.C.S., *Nitric oxide synthases: regulation and function*. *European Heart Journal*, 2011.
14. R D Rudic, E.G.S., N Maeda, O Smithies, S S Segal, W C Sessa, *Direct Evidence for the Importance of Endothelium-derived Nitric Oxide in Vascular Remodeling*. *Journal of Clinical Investigations*, 1998.
15. Busse, R. and A. Mulsch, *Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin*. *FEBS Lett*, 1990. **265**(1-2): p. 133-6.
16. O Feron, F.S., J B Michel, T Michel, *The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997.
17. S Dimmeler, I.F., B Fisslthaler, C Hermann, R Busse, A M Zeiher, *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. *Letters to Nature*, 1999.
18. B Fisslthaler, S.D., C Hermann, R Busse, I Fleming, *Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress*. *Acta Physiologica*, 1999.
19. Lundberg, J.O., E. Weitzberg, and M.T. Gladwin, *The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(2): p. 156-67.
20. Foster, M.W., D.T. Hess, and J.S. Stamler, *Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(9): p. 391-404.

21. Baldelli, S., et al., *Glutathione and Nitric Oxide: Key Team Players in Use and Disuse of Skeletal Muscle*. *Nutrients*, 2019. **11**(10).
22. D S Celermajer, K.E.S., V M Gooch, D J Spiegelhalter, O I Miller, I D Sullivan, J K Lloyd, J E Deanfield, *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. *The Lancet*, 1992.
23. M L Bots, J.W., T J Rabelink, E J P de Koning, *Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response*. *European Heart Journal*, 2004.
24. A L Moens, I.G., M J Claeys, C J Vrints, *Flow-Mediated Vasodilation - A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool?* *Chest*, 2005.
25. Palmer, R.M. and S. Moncada, *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989. **158**(1): p. 348-52.
26. R M J Palmer, D.S.A., S Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. *Nature*, 1988.
27. Breitenstein, S., et al., *Novel sGC Stimulators and sGC Activators for the Treatment of Heart Failure*. *Handb Exp Pharmacol*, 2017. **243**: p. 225-247.
28. Davies, P.F., *Flow-mediated endothelial mechanotransduction*. *Physiol Rev*, 1995. **75**(3): p. 519-60.
29. R Erkens, T.S., C M Kramer, L Diederich, M Kelm, M M Cortese-Krott, *Modulation of Local and Systemic Heterocellular Communication by Mechanical Forces: A Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017.
30. Leo, F., et al., *Cellular microdomains for nitric oxide signaling in endothelium and red blood cells*. *Nitric Oxide*, 2020. **96**: p. 44-53.
31. Y Ohashi, S.K., K-i Hirata, T Yamashita, T Ishida, N Inoue, T Sakoda, H Kurihara, Y Yazaki, M Yokoyama, *Hypotension and Reduced Nitric Oxide-elicited Vasorelaxation in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase*. *Journal of Clinical Investigations*, 1998.
32. R van Haperen, M.d.W., E van Deel, B Mees, M Kutryk, T van Aken, J Hamming, F Grosveld, D J Duncker, R de Crom, *Reduction of Blood Pressure, Plasma Cholesterol and Atherosclerosis by Elevated Endothelial Nitric Oxide*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002.
33. T Suvorava, G.K., *Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: Lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009.
34. Balligand, J.L., et al., *Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(1): p. 347-51.
35. L H Lin, O.T., W T Talman, *Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii*. *Brain Research*, 2007.
36. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. *Blood*, 2006. **107**(7): p. 2943-2951.
37. J Yang, A.T.G., P-O Sjöquist, J O Lundberg, J Pernow, *Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity*. *PNAS*, 2013.
38. Cortese-Krott, M.M., et al., *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease*. *Blood*, 2012. **120**(20): p. 4229-37.
39. A J Webb, A.B.M., K S Rathod, W L Chu, S Qureshi, M J Lovell, F M J Lecomte, D Perrett, C Raimondo, E Khoshbin, Z Ahmed, R Uppal, N Benjamin, A J Hobbs, A Ahluwalia, *Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: role for Xanthine Oxidoreductase and eNOS*. *Circulation Research*, 2010.
40. K C Wood, M.M.C.-K., J C Kovacic, A Noguchi, V B Liu, X Wang, N Raghavachari, M Boehm, G J Kato, M Kelm, M T Gladwin, *Circulating Blood eNOS Contributes to the Regulation of Systemic Blood Pressure and Nitrite Homeostasis*. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2013.

41. K Cosby, K.S.P., J H Crawford, R P Patel, C D Reiter, S Martyr, B K Yang, M A Waclawiw, G Zalos, X Xu, K T Huang, H Shields, D B Kim-Shapiro, A N Schechter, R O Cannon III, M T Gladwin, *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates human circulation*. Nature Medicine, 2003.
42. J M May, Z.-C.Q., L Xia, C E Cobb, *Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes*. American Journal of Physiology, 2000.
43. B C Jubelin, J.L.G., *Erythrocytes May Synthesize Own Nitric Oxide*. American Journal of Hypertension, 1996.
44. J O Lundberg, E.W., *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics*. Nature chemical biology, 2014.
45. M M Cortese-Krott, E.M., C M Kramer, W Lückstädt, J Yang, G Wolff, C Panknin, T Bracht, B Sitek, J Pernow, J-P Stasch, M Feelisch, D Koesling, M Kelm, *Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease*. Redox Biology, 2017.
46. D Mihov, J.V., M Gassmann, A Bogdanova, *Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes*. American Journal of Cell Physiology, 2009.
47. L Diederich, T.S., R Sansone, T C Stevenson Keller IV, F Barbarino, T. R. Sutton, C. M. Kramer, W. Lückstädt, B. E. Isakson, H. Gohlke, M. Feelisch, M. Kelm, M. M. Cortese-Krott, *On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability*. Frontiers in Physiology, 2018.
48. A Belanger, C.K., T Kaniyas, M T Gladwin, D B Kim-Shapiro, *Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability*. Transfusion, 2016.
49. Chen, K., R.N. Pittman, and A.S. Popel, *Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(7): p. 1185-98.
50. J Yeboah, J.R.C., F-C Hsu, G L Burke, D M Herrington, *Brachial Flow-Mediated Dilation Predicts Incident Cardiovascular Events in Older Adults - The Cardiovascular Health Study*. Circulation, 2007.
51. R Joannides, W.E.H., L Linder, V Richard, B El Hassan, C Thuillez, T F Luscher *Nitric Oxide is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo*. Circulation, 1995.
52. J A Panza, P.R.C., C M Kilcoyne, A A Quyyumi, *Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation of Patients With Essential Hypertension*. Circulation.
53. H Lin, S.H., U Förstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014.
54. H Li, U.F., *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. Current Opinion in Pharmacology, 2013.
55. R Carnicer, M.J.C., V Sivakumaran, B Casadei, D A Kass, *Nitric Oxide Synthases in Heart Failure*. Antioxidants & Redox Signaling, 2013.
56. J Vásquez-Vivar, B.K., P Martíásek, N Hogg, B S Siler Masters, H Karoui, P Tordo, K A Pritchard, *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998.
57. T Heitzer, K.K., S Albers, T Meinertz, *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus*. Diabetologia, 2000.
58. U Landmesser, S.D., S Russ Price, L McCann, T Fukai, S M Holland, W E Mitch, and D G Harrison, *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. The Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**.
59. F J Larsen, B.E., K Sahlin, J O Lundberg, E Weitzberg, *Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers*. New England Journal of Medicine, 2006.
60. C Heiss, T.L., A Dejam, P Kleinbongard, S Hamada, T Rassaf, S Matern, M Feelisch, M Kelm, *Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction*. Journal of the American College of Cardiology, 2006.
61. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.

62. Lesnefsky, E.J., et al., *Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure*. J Mol Cell Cardiol, 2001. **33**(6): p. 1065-89.
63. Wu, M.Y., et al., *Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury*. Cell Physiol Biochem, 2018. **46**(4): p. 1650-1667.
64. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 92-100.
65. Kwong, J.Q. and J.D. Molkenin, *Physiological and pathological roles of the mitochondrial permeability transition pore in the heart*. Cell Metab, 2015. **21**(2): p. 206-214.
66. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
67. Shiva, S., et al., *Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration*. Circ Res, 2007. **100**(5): p. 654-61.
68. R Pabla, M.J.C., *Effects of NO Modulation on Cardiac Arrhythmias in the Rat Isolated Heart*. Circulation Research, 1995.
69. G Johnson III, P.S.T., A M Lefer, *Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion*. Critical Care Medicine, 1991.
70. R Pabla, A.J.B., D M Flynn, D B Salzberg, D J Lefer, *Intracoronary nitric oxide improves postischemic coronary blood flow and myocardial contractile function*. American Journal of Physiology, 1995.
71. S P Jones, W.G.G., A J Palazzo, D N Granger, M B Grisham, D Jourd'Heuil, P L Huang, D J Leffer, *Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase*. American Journal of Physiology, 1999.
72. M Scherrer-Crosbie, R.U., K D Bloch, H Nakajima, B Nasser, H T Aretz, M L Lindsey, A-C Vançon, P L Huang, R T Lee, W M Zapol, M H Picard, *Endothelial Nitric Oxide Synthase Limits Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice*. Circulation 2001.
73. B R Sharp, S.P.J., D M Rimmer, D J Lefer, *Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice*. American Journal of Physiology, 2002.
74. Y-H Liu, J.X., X-P Yang, F Yang, E Shesely, O A Carretero, *Effect of ACE Inhibitors and Angiotensin II Type I Receptor Antagonists on Endothelial NO Synthase Knockout Mice With Heart Failure*. Hypertension, 2002.
75. J W Elrod, J.J.M.G., N S Bryan, W Langston, J F Szot, and S.J. H Gebregzlabher, M Feelisch, D J Lefer, *Cardiomyocyte-Specific Overexpression of NO Synthase-3 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. arteriosclerosis thrombosis and vascular biology, 2006.
76. S Janssens, P.P., L Schoonjans, M Pellens, P Vermeersch, M Tjwa, P Jans, M Scherrer-Crosbie, M H Picard, Z Szelid, H Gillijns, F Van de Werf, D Collen, K D Bloch, *Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Nitric Oxide Synthase 3 Improves Left Ventricular Performance and Reduces Compensatory Hypertrophy After Myocardial Infarction*. Circulation Research, 2003.
77. B C Yang, W.W.N., J L Mehta, *Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 1996.
78. M W Merx, S.G., A M van de Sandt, M M Cortese-Krott, J Ohlig, M Stern, T Rassaf, A Gödecke, M T Gladwin, M Kelm, *Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction*. Basic Research in Cardiology, 2013.
79. Leon, A.S., M.J. Myers, and J. Connett, *Leisure time physical activity and the 16-year risks of mortality from coronary heart disease and all-causes in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)*. Int J Sports Med, 1997. **18 Suppl 3**: p. S208-15.
80. Pedersen, B.K. and B. Saltin, *Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease*. Scand J Med Sci Sports, 2006. **16 Suppl 1**: p. 3-63.
81. Adams, V., C. Doring, and G. Schuler, *Impact of physical exercise on alterations in the skeletal muscle in patients with chronic heart failure*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 302-11.

82. Haram, P.M., O.J. Kemi, and U. Wisloff, *Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 336-46.
83. Kemi, O.J. and U. Wisloff, *Mechanisms of exercise-induced improvements in the contractile apparatus of the mammalian myocardium*. Acta Physiol (Oxf), 2010. **199**(4): p. 425-39.
84. Bernardo, B.C., et al., *Understanding Key Mechanisms of Exercise-Induced Cardiac Protection to Mitigate Disease: Current Knowledge and Emerging Concepts*. Physiol Rev, 2018. **98**(1): p. 419-475.
85. Rivera-Brown, A.M. and W.R. Frontera, *Principles of exercise physiology: responses to acute exercise and long-term adaptations to training*. PM R, 2012. **4**(11): p. 797-804.
86. Frodermann, V., et al., *Exercise reduces inflammatory cell production and cardiovascular inflammation via instruction of hematopoietic progenitor cells*. Nat Med, 2019. **25**(11): p. 1761-1771.
87. Blair, S.N., et al., *Physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy men and women*. JAMA, 1989. **262**(17): p. 2395-401.
88. Kodama, S., et al., *Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis*. JAMA, 2009. **301**(19): p. 2024-35.
89. Wei, X., X. Liu, and A. Rosenzweig, *What do we know about the cardiac benefits of exercise?* Trends Cardiovasc Med, 2015. **25**(6): p. 529-36.
90. Chomistek, A.K., et al., *Frequency, Type, and Volume of Leisure-Time Physical Activity and Risk of Coronary Heart Disease in Young Women*. Circulation, 2016. **134**(4): p. 290-9.
91. Hallal, P.C., et al., *Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects*. Lancet, 2012. **380**(9838): p. 247-57.
92. Bernardo, B.C., et al., *Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies*. Pharmacol Ther, 2010. **128**(1): p. 191-227.
93. Jiang, H.K., et al., *Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(4): p. 5304-22.
94. Ventura-Clapier, R., B. Mettauer, and X. Bigard, *Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure*. Cardiovasc Res, 2007. **73**(1): p. 10-8.
95. Davies, K.J., et al., *Free radicals and tissue damage produced by exercise*. Biochem Biophys Res Commun, 1982. **107**(4): p. 1198-205.
96. Reid, M.B., et al., *Reactive oxygen in skeletal muscle. I. Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro*. J Appl Physiol (1985), 1992. **73**(5): p. 1797-804.
97. Paulsen, G., et al., *Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial*. J Physiol, 2014. **592**(8): p. 1887-901.
98. Makanae, Y., et al., *Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats*. Acta Physiol (Oxf), 2013. **208**(1): p. 57-65.
99. Alessio, H.M. and A.H. Goldfarb, *Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training*. J Appl Physiol (1985), 1988. **64**(4): p. 1333-6.
100. Gore, M., et al., *Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle*. Can J Physiol Pharmacol, 1998. **76**(12): p. 1139-45.
101. Vincent, H.K., et al., *Short-term exercise training improves diaphragm antioxidant capacity and endurance*. Eur J Appl Physiol, 2000. **81**(1-2): p. 67-74.
102. Reid, M.B., et al., *N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2468-74.
103. Gielen, S., G. Schuler, and V. Adams, *Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms*. Circulation, 2010. **122**(12): p. 1221-38.
104. Fiuza-Luces, C., et al., *Exercise benefits in cardiovascular disease: beyond attenuation of traditional risk factors*. Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(12): p. 731-743.

105. Green, D.J., et al., *Vascular Adaptation to Exercise in Humans: Role of Hemodynamic Stimuli*. *Physiol Rev*, 2017. **97**(2): p. 495-528.
106. Haskell, W.L., et al., *Coronary artery size and dilating capacity in ultradistance runners*. *Circulation*, 1993. **87**(4): p. 1076-82.
107. Heaps, C.L., et al., *Exercise training-induced adaptations in mediators of sustained endothelium-dependent coronary artery relaxation in a porcine model of ischemic heart disease*. *Microcirculation*, 2014. **21**(5): p. 388-400.
108. Ashor, A.W., et al., *Exercise modalities and endothelial function: a systematic review and dose-response meta-analysis of randomized controlled trials*. *Sports Med*, 2015. **45**(2): p. 279-96.
109. Suvorava, T., N. Lauer, and G. Kojda, *Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(6): p. 1320-7.
110. Balligand, J.L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues*. *Physiol Rev*, 2009. **89**(2): p. 481-534.
111. de Waard, M.C., et al., *Beneficial effects of exercise training after myocardial infarction require full eNOS expression*. *J Mol Cell Cardiol*, 2010. **48**(6): p. 1041-9.
112. Wang, M.X., et al., *Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats*. *Nitric Oxide*, 2001. **5**(3): p. 219-32.
113. Momken, I., et al., *Voluntary physical activity alterations in endothelial nitric oxide synthase knockout mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(2): p. H914-20.
114. Ojaimi, C., et al., *Transcriptional basis for exercise limitation in male eNOS-knockout mice with age: heart failure and the fetal phenotype*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(4): p. H1399-407.
115. Calvert, J.W., et al., *Exercise protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via stimulation of beta(3)-adrenergic receptors and increased nitric oxide signaling: role of nitrite and nitrosothiols*. *Circ Res*, 2011. **108**(12): p. 1448-58.
116. Farah, C., et al., *Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites*. *Basic Res Cardiol*, 2013. **108**(6): p. 389.
117. Suhr, F., et al., *Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45982.
118. Leo, F., et al., *Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure*. *Circulation*, 2021. **144**(11): p. 870-889.
119. VisualSonics. 29.09.2021]; Available from: <https://www.visualsonics.com/application/preclinical/cardiology>.
120. Hutzler, B., *Die gewebespezifische endotheliale NO-Synthase ist der Keyplayer in durch Scherkräfte vermittelter kardiovaskulärer Protektion durch körperliches Training*. 2020.
121. Barr, L.A., et al., *Exercise training provides cardioprotection by activating and coupling endothelial nitric oxide synthase via a beta3-adrenergic receptor-AMP-activated protein kinase signaling pathway*. *Med Gas Res*, 2017. **7**(1): p. 1-8.
122. Siu, P.M., et al., *Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles*. *J Appl Physiol (1985)*, 2003. **94**(2): p. 555-60.
123. De Bono, J.P., et al., *Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **290**(4): p. R926-34.
124. Konhilas, J.P., et al., *Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **287**(6): p. H2768-76.
125. LaBarge, S.A., et al., *p300 is not required for metabolic adaptation to endurance exercise training*. *FASEB J*, 2016. **30**(4): p. 1623-33.
126. Walker, M. and G. Mason, *A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare*. *Physiol Behav*, 2018. **191**: p. 82-90.
127. Romain, A.J., et al., *Effects of exercise training on blood rheology: a meta-analysis*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2011. **49**(1-4): p. 199-205.
128. Vega, R.B., et al., *Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Adaptation to Exercise*. *Cell Metab*, 2017. **25**(5): p. 1012-1026.

129. Personius, K.E., et al., *Grip force, EDL contractile properties, and voluntary wheel running after postdevelopmental myostatin depletion in mice*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(3): p. 886-94.
130. Schuler, D., et al., *Measurement of endothelium-dependent vasodilation in mice--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(12): p. 2651-7.
131. Hambrecht, R., et al., *Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 2003. **107**(25): p. 3152-8.
132. Delp, M.D. and M.H. Laughlin, *Time course of enhanced endothelium-mediated dilation in aorta of trained rats*. Med Sci Sports Exerc, 1997. **29**(11): p. 1454-61.
133. Johnson, L.R., et al., *Short-term exercise training increases ACh-induced relaxation and eNOS protein in porcine pulmonary arteries*. J Appl Physiol (1985), 2001. **90**(3): p. 1102-10.
134. McAllister, R.M. and M.H. Laughlin, *Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries*. J Appl Physiol (1985), 1997. **82**(5): p. 1438-44.
135. Sun, D., et al., *Short-term daily exercise activity enhances endothelial NO synthesis in skeletal muscle arterioles of rats*. J Appl Physiol (1985), 1994. **76**(5): p. 2241-7.
136. Carneiro-Junior, M.A., et al., *Regional effects of low-intensity endurance training on structural and mechanical properties of rat ventricular myocytes*. J Appl Physiol (1985), 2013. **115**(1): p. 107-15.
137. McMullen, J.R., et al., *Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12355-60.
138. Wisloff, U., et al., *Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca<sup>2+</sup> sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **54**(1): p. 162-74.
139. Russell-Puleri, S., et al., *Fluid shear stress induces upregulation of COX-2 and PGI<sub>2</sub> release in endothelial cells via a pathway involving PECAM-1, PI3K, FAK, and p38*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017. **312**(3): p. H485-H500.
140. Erkens, R., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 906-17.
141. E G Shesely, N.M., H-S Kim, K M Desai, J H Krege, V E Laubach, P A Sherman, W C Sessa, O Smithies, *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996.
142. Farah, C., et al., *Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training*. J Mol Cell Cardiol, 2017. **102**: p. 26-30.
143. S P Jones, J.J.M.G., A K Kakkar, P D Ware, R H Turnage, M Hicks, R van Haperen, R de Crom, S Kawashima, M Yokoyama, D J Lefer, *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2003.
144. King, A.L., et al., *Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(8): p. 3182-7.
145. Gao, X.M., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 330-8.
146. Mathey, D., et al., *Attempt to quantitate relation between cardiac function and infarct size in acute myocardial infarction*. Br Heart J, 1974. **36**(3): p. 271-9.
147. Cai, M., et al., *Effects of different types of exercise on skeletal muscle atrophy, antioxidant capacity and growth factors expression following myocardial infarction*. Life Sci, 2018. **213**: p. 40-49.
148. T Rassaf, L.W.P., P Brouzos, T Lauer, M Totzeck, P Kleinbongard, P Gharini, K Andersen, R Schulz, G Heusch, U Mödder, M Kelm, *Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans*. European Heart Journal, 2006.

# Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe und seinen Räumlichkeiten. Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. Dr. med. André Heinen für seine Unterstützung als Zweitbetreuung danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Tanya Suvorava, die mich als Projektleiterin aufgenommen hat und in alle Methoden sowie die Thematik ausführlichst eingearbeitet hat. Unsere enge und wertschätzende Zusammenarbeit hat dieses Ergebnis erst möglich gemacht. Beate Hutzler möchte ich danken für die Betreuung der Versuchstiere, die Durchführung aller I/R-Operationen und der guten Absprache der Organisation unserer Arbeitsschritte. Frau Dr. Tanya Suvorava und Frau Julia Hocks bin ich ebenfalls dankbar für die Übernahme einiger Ultraschallaufnahmen, die ich weiter auswerten konnte.

Zum Schluss möchte ich auch meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums finanziell und moralisch unterstützt haben.