

Aus der Klinik für Innere Medizin III  
Klinische und Experimentelle Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Prof. Dr. med. U. Laufs)

**Untersuchung der Effekte freiwilligen Ausdauertrainings auf das  
Wachstum von Kollateralarterien im Mausmodell**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

**der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2013

vorgelegt von: Lisa Schuh  
geboren am: 17.04.1987 in Völklingen

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
1.1. Untersuchung der Effekte freiwilligen Ausdauertrainings auf das Wachstum von Kollateralarterien im Mausmodell .....	3
1.2. Investigation of the effects of voluntary exercise training on collateral artery growth in mice .....	5
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1. Hintergrund .....	11
2.2. Grundlagen der Arteriogenese .....	13
2.3. Ziele der Arbeit .....	21
<b>3. Material.....</b>	<b>22</b>
3.1. Verwendete Substanzen .....	22
3.2. Verwendete Puffer und Lösungen .....	25
3.3. Verwendete Kits .....	28
3.4. Verwendete Geräte .....	28
3.5. Verbrauchsmaterial .....	30
3.6. Antikörper für Immunhistochemie .....	31
3.7. Primär AK für Western Blot .....	31
3.8. Sekundär AK für Western Blot .....	31
3.9. Primer für Real Time PCR .....	32
<b>4. Methoden .....</b>	<b>33</b>
4.1. Versuchstierbehandlung .....	33
4.2. Trainingsprotokoll der Sportler .....	34
4.3. Western Blot.....	35
4.4. Quantitative Real Time (qRT) – PCR .....	36
Probenaufbereitung Milz .....	36
Probenaufbereitung Adduktor .....	37
Probenaufbereitung humanes Blut .....	38
4.5. Perfusionsmessungen .....	40
Spezifische Behandlung der knochenmarkstransplantierten Mäuse .....	40
Ligatur der rechten A. femoralis .....	40
Perfusion mit Microsphären .....	41
Gewebeentnahme .....	42
FACS-Analyse.....	43

4.6. FACS Blutbild Maus .....	43
4.7. Immunhistochemie .....	43
Probengewinnung .....	43
$\alpha$ -smooth muscle actin-Färbung .....	44
4.8. Arginin Citrullin Assay .....	44
4.9. Statistische Auswertung .....	45
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
5.1. Laufdistanzen .....	46
5.2. Freiwilliges Ausdauertraining stimuliert das Kollateralarterienwachstum .....	48
5.3. Anzahl und Aktivierungsstatus von Monozyten in peripherem Blut werden durch körperliche Aktivität nicht beeinflusst .....	52
5.4. Ausdauertraining bewirkt Reduktion klassischer Inflammationsparameter in Adduktorgewebe und Milz .....	54
5.5. Ausdauertraining steigert die Bioverfügbarkeit von NO in Adduktorgewebe .....	56
5.6. eNOS-defiziente Mäuse weisen deutliche Einschränkungen der Perfusionswiederherstellung auf .....	58
5.7. Zirkulierende Zellen als Ursprung der iNOS? .....	59
5.8. Ausdauertraining vermindert TNF $\alpha$ und steigert iNOS in humanem mononukleären Zellen .....	61
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>63</b>
6.1. Präventives freiwilliges Ausdauertraining stimuliert das Kollateralarterienwachstum und steigert die vSMC Fläche in kollateralarterientragendem Adduktorgewebe .....	63
6.2. Freiwilliges Training führt zu einer gesteigerten iNOS Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen und stimuliert die eNOS Aktivierung .....	66
6.3. Körperliche Betätigung führt zur verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine in Adduktorgewebe und Milz .....	69
6.4. Anzahl und Aktivität zirkulierender Monozyten in peripherem Blut werden durch Ausdauertraining nicht beeinflusst .....	72
6.5. freiwilliges Ausdauertraining resultiert in verminderter TNF $\alpha$ - und gesteigerter iNOS Expression in humanen mononukleären Zellen .....	73
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>8. Publikationen .....</b>	<b>94</b>
8.1. Publikationen und Abstract .....	94

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Untersuchung der Effekte freiwilligen Ausdauertrainings auf das Wachstum von Kollateralarterien im Mausmodell

### Hintergrund

Sportliche Inaktivität stellt einen unabhängigen Risikofaktor kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Körperliches Training hingegen wird als effektive Maßnahme in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse angesehen. Nach Verschluss einer Konduktanzarterie resultiert Ausdauertraining in einer Steigerung des kollateralarterienabhängigen Blutflusses. Die Auswirkungen von präventivem Sport vor Gefäßokklusion auf das Kollateralarterienwachstum sind bisher erst teilweise bekannt.

### Methoden und Ergebnisse

In einem murinen Modell des freiwilligen Ausdauertrainings (Laufrad) absolvierten Versuchstiere ein dreiwöchiges Laufradtraining, bevor eine einseitige Femoralarterienligatur (FAL) erfolgte. Bis zur Ligatur legten die Mäuse durchschnittlich  $3,5 \pm 0,5$  km/Tag zurück. Die Perfusion des Hinterlaufs wurde durch druckkontrollierte Infusion fluoreszierender Microsphären in die abdominale Aorta unter maximaler Vasodilatation ermittelt, und als Prozentwert ligierte/unligierte Seite angegeben. Unmittelbar nach Ligatur wiesen inaktive Wildtypiere („Sedentary“) eine deutliche Perfusionsverminderung auf ( $3,5 \pm 0,7\%$ ;  $p < 0,05$ ), die eine Woche nach FAL auf  $34,8 \pm 3,6\%$ ;  $p < 0,05$  anstieg. Körperliche Betätigung bis zum terminalen Experiment („Run“) führte zu einer Stimulation der Perfusionswiederherstellung auf  $52,8 \pm 5,6\%$ ;  $p < 0,001$  im Vergleich zur inaktiven Kontrollgruppe. Wenn das Training am Tag der Femoralarterienligatur („Run and Rest“) unterbunden wurde, resultierte nach einer Woche ebenfalls eine signifikante Verbesserung der kollateralarterienabhängigen Durchblutung ( $57,4 \pm 4,4\%$ ;  $p < 0,001$  im Vergleich zu „Sedentary“). Die Perfusionsergebnisse wurden durch histomorphometrische Bestimmung der Anzahl und Wanddicke der Kollateralarterien bestätigt. In kollateralarterientragendem Adduktorgewebe führte körperliche Betätigung sowohl über die FAL hinaus („Run“), wie auch in der nur bis zur FAL trainierenden Gruppe („Run and Rest“) zu einer Reduktion der mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL6. (TNF $\alpha$  auf  $11,9 \pm 3,9\%$ ;  $p < 0,05$  bei „Run“ und

auf  $15,3 \pm 3,8\%$ ;  $p < 0,05$  bei „Run and Rest“; IL6 auf  $13,5 \pm 10,4\%$ ;  $p < 0,05$  bei „Run“ und auf  $10,4 \pm 2,4\%$ ;  $p < 0,05$  bei „Run and Rest“). Auch in aus Milzen isolierten und mit Lipopolysaccharid stimulierten mononukleären Zellen resultierte Ausdauertraining in einer signifikanten Abnahme der TNF $\alpha$  mRNA Expression in beiden Trainingsgruppen. Sowohl die Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), als auch die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (Quotient aus phosphorylierter- und Gesamt-eNOS) war in „Run“, sowie in „Run and Rest“ im Vergleich zu „Sedentary“ gesteigert, einhergehend mit einer vermehrten NO-Bioverfügbarkeit im radioaktiven Arginin-Citrullin-Assay.

Zudem wurde der Effekt von freiwilligem Training anhand von eNOS- und iNOS-defizienten Mäusen (-/-) untersucht. Inaktive eNOS -/- Mäuse zeigten eine Woche nach FAL eine stark eingeschränkte Perfusionswiederherstellung ( $4,0 \pm 0,9\%$ ), die sich durch präventives Ausdauertraining auf  $8,0 \pm 0,8\%$  ( $p < 0,05$ ) steigern ließ. Bei iNOS -/- Tiere, die unter Ruhebedingungen eine fast normale Perfusionswiederherstellung aufwiesen ( $31,24 \pm 4,52\%$ ), konnte durch sportliche Betätigung ( $30,80 \pm 6,24\%$ ) keine Steigerung des kollateralarterienabhängigen Blutflusses erzielt werden.

Wildtypmäuse, denen nach myeloablativer Bestrahlung Knochenmark (KM) von iNOS-defizienten Mäusen transplantiert wurde, zeigten nach Femoralarterienligatur schlechtere Perfusionsergebnisse ( $19,8 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,05$ ), als ihre Vergleichsgruppe (Wildtyp-KM transplantiert in Wildtypmäuse:  $34,3 \pm 5,1\%$ ). Die für das Kollateralarterienwachstum bedeutende iNOS scheint demnach zirkulierenden mononukleären Zellen zu entstammen.

Untersuchungen an humanen mononukleären Zellen zeigten ebenfalls, dass freiwilliges Ausdauertraining bei zuvor sportlich inaktiven Probanden in einer Reduktion von TNF $\alpha$  ( $9 \pm 2\%$ ;  $p < 0,05$ ) bzw. einer Steigerung der iNOS mRNA Expression ( $4651 \pm 1109\%$ ;  $p < 0,05$  im Vergleich zur nicht trainierenden Kontrollgruppe) resultiert.

### Zusammenfassung

Freiwilliges Ausdauertraining führt zu einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine und steigert das Kollateralarterienwachstum auf eine Stickstoffmonoxid-abhängige Art und Weise. Diese Studie betont das mit einem körperlich inaktiven Lebensstil verbundene vaskuläre Risiko und identifiziert präventives Ausdauertraining als effektive Maßnahme zur Stimulation der Arteriogenese.

## **1.2. Investigation of the effects of voluntary exercise training on collateral artery growth in mice**

### Background

Physical inactivity is an independent risk factor for the development of cardiovascular diseases. Physical training however is considered to be an effective measure in the primary as well as in the secondary prevention of cardiovascular events. After the occlusion of a conductance artery, exercise training results in an increase of the collateral artery dependent blood flow. The impact of physical activity on collateral artery growth, started before arterial occlusion in a preventive manner is incompletely understood.

### Methods and Results

Mice were subjected to three weeks of voluntary treadmill running before unilateral femoral artery ligation (FAL). On average animals ran  $3.5 \pm 0.5$  km/day until FAL. Hindlimb perfusion was assessed using pressure controlled infusion of fluorescent microspheres into the abdominal aorta under conditions of adenosine-induced maximal vasodilatation, and expressed as percentages ligated/unligated hindlimb. Directly after FAL, perfusion in sedentary wildtype mice (C57/Bl6) was diminished to  $3.5 \pm 0.7\%$ ;  $p < 0,05$ . One week after femoral artery ligation perfusion was restored to  $34.8 \pm 3.65\%$ ;  $p < 0,05$  in this group. Physical exercise until the final experiment („Run“) resulted in a stimulation of the perfusion restoration to  $52.8 \pm 5.6\%$ ;  $p < 0,001$  compared to the sedentary controls. When training was abandoned on the day of FAL („Run and Rest“), a remarkably increase of collateral artery dependent blood flow became apparently ( $57.4 \pm 4.4\%$ ,  $p < 0.001$  compared to „Sedentary“). These results were confirmed by histomorphological analysis of the number and wall thickness of collateral arteries. In collateral-depending hindlimbs, physical activity until the final experiment („Run“) as well as only until FAL, resulted in a reduction of the mRNA expression of the inflammatory cytokines TNF $\alpha$  and IL6 (TNF $\alpha$  to  $11.9 \pm 3.9 \%$ ;  $p < 0,05$  in „Run“ and to  $15.3 \pm 3.8\%$ ;  $p < 0,05$  in „Run and Rest“; IL6 to  $13.5 \pm 10.4\%$ ;  $p < 0,05$  in „Run“ and to  $10.4 \pm 2.4 \%$ ;  $p < 0,05$  in „Run and Rest“).

In mononuclear cells, isolated from spleens and stimulated by lipopolysaccharides, exercise resulted in a significant decrease of the TNF $\alpha$  mRNA expression in both training groups. Gene expression of the inducible NO-synthase (iNOS), as well as the activity of the endothelial nitric oxide synthase (phospho-eNOS/total eNOS protein) were significantly increased in „Run“ and in „Run and Rest“, compared to „Sedentary“, accompanied by an augmented NO-bioavailability assessed by Arginin-Citrullin-assays.

Moreover, the effect of voluntary training was studied, using eNOS- and iNOS-deficient mice (-/-). Sessile eNOS -/- showed a strongly limited perfusion restoration one week after FAL ( $4.0 \pm 0.9\%$ ), that was enhanced to  $8.0 \pm 0.8\%$  ( $p < 0.05$ ) by voluntary exercise. iNOS -/-, showing an almost regular perfusion restoration under resting conditions ( $31.2 \pm 4.5\%$ ), were not able to achieve an increase of the collateral dependent blood flow by physical activity ( $30.8 \pm 6.2\%$ ).

Wildtype mice which, after being radiated, received bone marrow transplantation from iNOS -/- ( $19.8 \pm 2.1\%$ ;  $p < 0.05$ ), showed significant worse perfusion results than their comparison group (bone marrow from wildtype mice transplanted to wildtype mice:  $34.3 \pm 5.1\%$ ) Hence, it seems that the iNOS, playing an important role for collateral artery growth, originates from mononuclear cells.

Investigations of human blood cells also confirmed that voluntary exercise, practised by formerly physical inactive people, leads to a reduction of TNF $\alpha$  ( $9 \pm 2\%$ ;  $p < 0.05$ ), and to an increase of the iNOS mRNA expression, respectively ( $4651 \pm 1109\%$ ;  $p < 0.05$  compared to sedentary controls).

## Conclusion

Voluntary exercise training results in a diminished expression of inflammatory cytokines and stimulates collateral artery growth in an NO-dependent manner. This study emphasizes the vascular risk profile associated with a sedentary lifestyle and identifies exercise as a prophylactic means to enhance vascular growth.

# Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm, nm	Mikrometer, Nanometer
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
Ach	Acetylcholin
ACS	akutes Koronarsyndrom
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
Akt = PKB	Proteinkinase B
Aqua ad inj.	aqua ad injectionem
Aqua dest.	Aqua destillata
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CARP	cardiac-restricted ankyrine repeat protein
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHF	congestive heart failure
cm	Zentimeter
CRP	C-reactive protein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS -/-	eNOS defizient (knockout)
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAL	Femoralarterienligatur
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMN	Flavinmononucleotid
FSS	fluid shear stress
g	Erdbeschleunigung
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HF	Herzfrequenz
HIF	hypoxia-inducible transcription factor
hsCRP	high-sensitivity C-reactive protein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFNβ	Interferon β
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS -/-	iNOS defizient (knockout)
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
klf	kruppel-like factor
km	Kilometer
KM	Knochenmark
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
L-Name	L-Nitro-Arginin Methyl Ester
LPS	Lipopolysaccharid

M.	Musculus
mA	Milliampere
Mac-1 Rezeptor	macrophage-1-antigen-receptor
MCP	monocyte chemotactic protein
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MNC	mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP
NK	natürliche Killerzellen
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
ns	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
p	p-Wert
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
peNOS	phosphoryliertes eNOS
PTCA	perkutane transluminale coronare Angioplastie
qRT – PCR	quantitative Echtzeit-PCR

RNA	Ribonukleinsäure
RNOS	reactive nitrogen oxide species
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfat
Sedentary	sportlich inaktive Kontrolltiere
SMCs	smooth muscle cells
SOD	Superoxiddismutase
STABW	Standardabweichung
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
V.	Vena
v.a.	vor allem
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vSMCs	vascular smooth muscle cells
z.B.	zum Beispiel

## 2. Einleitung

### 2.1. Hintergrund

Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen nicht nur in den Industrieländern sondern auch weltweit die häufigste Todesursache dar. Selbst in Schwellenländern belegen sie inzwischen Platz eins der Todesursachenstatistik. In Entwicklungsländern stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar, welche nur noch durch die Sterblichkeit in Folge von Atemwegsinfekten übertroffen wird<sup>133,6</sup>. Krankheitsbilder wie der akute Myokardinfarkt, der Apoplex oder die chronisch ischämische Herzkrankheit entstehen auf dem Boden von stenosierenden Gefäßprozessen im Rahmen der Atherosklerose und treten meist erst im höheren Lebensalter auf. Da nicht nur in Deutschland, sondern auch weltweit die Lebenserwartung ansteigt, wird mit einer weiteren Zunahme kardiovaskulär bedingter Todesfälle um mehr als 30% bis zum Jahr 2030 gerechnet<sup>6</sup>. Revaskularisationsmaßnahmen, wie die perkutane transluminale coronare Angioplastie (PTCA) bzw. Bypass-Operationen, kommen jedoch aufgrund von Begleiterkrankungen oder komplexen Veränderungen am Gefäßsystem für ca. 20% der Patienten nicht in Frage<sup>105</sup>.

Der Begriff Arteriogenese bezeichnet einen natürlichen Schutzmechanismus, der in der Lage ist, den Verschluss eines Hauptversorgungsgefäßes zu kompensieren. Dies gelingt durch Transformation präexistenter kollateralarteriöler Anastomosen hin zu funktionellen Konduktanzgefäßen und bewahrt somit das poststenotische Gewebe vor Ischämie und Nekrose<sup>125</sup>. Die Stimulation dieses Vorgangs würde daher eine vielversprechende Therapieoption bei der Behandlung stenosierender Gefäßprozesse darstellen.

Trotz positiver tierexperimenteller Daten, ist es bisher nicht gelungen sich die gewonnenen Erkenntnisse auch im klinischen Alltag zu Nutze zu machen. In einer klinisch kontrollierten Studie konnte durch die Gabe des granulocyte – macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) zwar eine Stimulation der Arteriogenese bei humanen Probanden erzielt werden, jedoch bleibt die Sicherheit dieser Vorgehensweise fraglich<sup>106,137</sup>. Die Applikation von GM-CSF scheint durch einen damit einhergehenden Anstieg der MCP-1 Konzentration eine Progression sowie Ruptur atherosklerotischer Plaque zu begünstigen und dadurch kardiovaskuläre Komplikationen, wie das akute Koronarsyndrom (ACS) zu verursachen<sup>137,124</sup>.

Zahlreiche andere bisher unternommene Bemühungen das Kollateralarterienwachstum bei Patienten zu stimulieren, wie z.B. durch die Applikation des fibroblast growth factor (FGF) oder des vascular endothelial growth factor (VEGF) lieferten bis dato ebenfalls enttäuschende Ergebnisse<sup>42,111,86</sup>. Hierfür können zahlreiche Gründe als ursächlich angesehen werden. Zum einen wären speziesspezifische Unterschiede zu nennen. Während bei Mäusen z.B. nur einige wenige Zellzyklen erforderlich sind, um eine präexistente Arteriole der Größe 30-50 µm in ein reifes Kollateralgefäß zu überführen, bedarf es beim Menschen einer weitaus höheren Anzahl an Zellzyklen sowie eines aufwändigen Umbauprozesses des umgebenden Gewebes<sup>102</sup>. Außerdem finden Komorbiditäten, wie z.B. Dyslipidämie oder Diabetes mellitus, die regelhaft bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorliegen, im Tiermodell keine Berücksichtigung. Es wird jedoch vermutet, dass gerade diese zu einer erheblichen Einschränkung des arteriogenen Potentials beitragen<sup>126</sup>.

Darüber hinaus wurde in zahlreichen klinischen Studien deutlich, dass eine lokale Behandlung mit bestimmten Zytokinen, wie beispielsweise mit GM-CSF oder MCP-1, neben einer Stimulation des Kollateralarterienwachstums auch eine Progression atherosklerotischer Plaques begünstigt<sup>124</sup>. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Vorgänge, die während der Arteriogenese stattfinden, denjenigen der Atherosklerose sehr ähnlich sind. Bei beiden kommt es zu einer Heraufregulation von Adhäsionsmolekülen, zur Monozyteninvasion, zur Generierung eines inflammatorischen Milieus sowie zur Migration und Proliferation von SMCs<sup>125</sup>.

Die Lösung dieses Problems könnte daher in der Identifikation pro-arteriogener Stimuli liegen, die jedoch zu keiner weiteren Progression der Atherosklerose beitragen<sup>44</sup>. Zudem sind die molekularen Mechanismen, die dem Kollateralarterienwachstum beim Menschen zugrunde liegen, noch nicht vollständig verstanden und bedürfen weitergehenden Nachforschungen<sup>102</sup>. Ein primär nichtpharmakologischer Versuch die Arteriogenese zu stimulieren scheint jedoch aus genannten Gründen vielversprechender und mit höheren Erfolgsaussichten verbunden zu sein, als die Applikation inflammatorischer Zytokine, da Letztere auch immer mit dem Risiko einer Aggravierung der Atherosklerose einhergeht.

## 2.2. Grundlagen der Arteriogenese

Der Begriff der Arteriogenese wurde etabliert, um eine Abgrenzung zu anderen Vorgängen des Gefäßwachstums wie Vaskulogenese und Angiogenese zu ermöglichen <sup>95</sup>.

### Vaskulogenese

Der Begriff Vaskulogenese beschreibt die „Gefäßbildung von Venen, Arterien und Kapillaren aus pluripotenten Angioblasten während der Embryogenese“ <sup>12</sup>. Bei diesem Prozess differenzieren Angioblasten zu Endothelzellen, welche nachfolgend ein Gefäßnetzwerk formen <sup>92</sup>.

### Angiogenese

Hierunter versteht man die Aussprossung endothelialer Zellen, die in der Ausbildung kapillärer Netzwerke resultiert <sup>91</sup>. Im Gegensatz zur Arteriogenese erfolgt dieser Prozess in von Ischämie und Hypoxie betroffenen Arealen.

Die verminderte Oxygenierung der betroffenen Zellen führt zu einer vermehrten Expression und Aktivierung des hypoxia-inducible transcription Faktors 1 (HIF-1), was wiederum eine gesteigerte Transkription zahlreicher Gene nach sich zieht. Hierzu zählen v.a. diejenigen, die für die Stickstoffmonoxidsynthasen 1-3 (NOS 1-3) sowie den vascular endothelial growth factor (VEGF) codieren <sup>55,107,80,21</sup>. Somit kommt es, aufgrund erhöhter NO Konzentrationen, zur Vasodilatation. Außerdem stimuliert VEGF die endotheliale Zellproliferation, was zum Knospen und Aussprossen der kapillären Netzwerke führt <sup>125</sup>. VEGF bewirkt darüber hinaus eine Steigerung der Gefäßpermeabilität, was mit einer konsekutiven Extravasation von Plasmaproteinen einhergeht, welche ein provisorisches Gerüst für die migrierenden Endothelzellen ausbilden <sup>20</sup>.

Gemäß dem Gesetz von Hagen-Poiseuille ist der Fluss in einem Gefäßabschnitt proportional zur vierten Potenz des Radius. Um eine große Konduktanzarterie ersetzen zu können, wäre folglich eine viel zu hohe Anzahl an Kapillaren erforderlich. Dies würde zum einen sehr viel Platz in Anspruch nehmen und wäre zudem mit einem hohen Energieverbrauch assoziiert, weshalb das Prinzip der Angiogenese keine therapeutische Option bei der Okklusion wichtiger Konduktanzarterien darstellt <sup>125</sup>.

## **Arteriogenese**

### Prinzip

Der Begriff Arteriogenese bezeichnet die Transformation präexistenter kollateralarteriöler Anastomosen zu funktionellen Konduktanzgefäßen. Hierbei handelt es sich um einen natürlichen Schutzmechanismus, der die Versorgung des poststenotischen Gewebes nach Okklusion eines Hauptversorgungsgefäßes gewährleistet<sup>125</sup>.

Wie bereits 1971 von Schaper et al gezeigt werden konnte, handelt es sich dabei nicht nur um eine schlichte Vasodilatation, sondern um einen aktiven Mechanismus, bei welchem v.a. die Proliferation des Endothels und der glatten Gefäßmuskelzellen eine wichtige Rolle spielen<sup>96</sup>. Arteriogenese findet, im Gegensatz zur Angiogenese, im nicht ischämischen Gewebe, auf Höhe der Gefäßokklusion statt und ist prinzipiell in der Lage den Funktionsverlust einer verschlossenen Arterie vollständig zu kompensieren<sup>102,15</sup>.

Mechanische Kräfte in Form von laminarer Scherkraft dienen als Hauptinitiator dieses Prozesses<sup>54</sup>. Daneben bilden eine erhaltene Endothelfunktion sowie die Chemotaxis mononukleärer Zellen, die Sekretion von Zytokinen und damit die Generierung eines entsprechenden inflammatorischen Milieus, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs) sowie die Produktion von NO und eine ausgeglichene Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies die Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Remodeling im Rahmen der Arteriogenese<sup>103,20,15,62</sup>.

### Mechanische Faktoren

Im Rahmen von Gefäßstenosen kommt es zum Abfall des arteriellen Drucks im Bereich hinter der Stenose. Das Blut fließt dann über die präexistenten arteriölen Anastomosen, welche nun eine Region hohen Drucks mit einer Region niedrigen Drucks verbinden<sup>98</sup>. Hierdurch kommt es zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit und damit einhergehend zu einer Erhöhung der laminaren Scherkräfte (fluid shear stress, FSS) in den Kollateralgefäßen<sup>41,89,110,109</sup>. Der FSS ist proportional zur Blutflussgeschwindigkeit und umgekehrt proportional zur dritten Potenz des Kollateralgefäßradius. Aus diesem Grund führt ein gesteigerter Blutfluss direkt zu einem Anstieg des FSS<sup>15</sup>.

Während des Wachstums nimmt der Radius des Kollateralgefäßes zu, dadurch fällt der FSS schnell wieder ab. Dies könnte als ursächlich dafür angesehen, dass der Prozess der Arteriogenese frühzeitig stoppt, und nur ca. 35-40% der maximalen Leitfähigkeit der zu ersetzenden Arterie kompensiert<sup>97,60</sup>.

Die erste Reaktion des Endothels auf gesteigerten FSS ist NO-vermittelt, durch Expression eines Proteinkomplexes bestehend aus E-Cadherin, dem vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) und dem platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) sowie zahlreichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. CARP (cardiac-restricted ankyrine repeat protein) und klf2 (kruppel-like factor 2). NO führt zur Bildung von VEGF, welches zusammen mit calciumaktivierten Ionenkanälen mit der osmotischen Regulation des Endothels interferiert. Dies veranlasst die Endothelzellen in ihren synthetischen Phänotyp überzugehen. Die SMCs der Media vollziehen ebenfalls eine Veränderung ihres Phänotyps und treten in den Zellzyklus ein<sup>15</sup>. Zudem kommt es zur Anlockung, Adhäsion und Invasion von Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen, welche nachfolgend den perivaskulären Raum invadieren<sup>15</sup>. Neben den mononukleären Zellen spielen vorallem CD4- und CD8-positive Zellen sowie natürliche Killerzellen (NK) eine wichtige Rolle im Rahmen der Arteriogenese, da diese eine Reihe von Zytokinen, wie z.B bFGF und VEGF produzieren und wahrscheinlich durch parakrine Mechanismen zum kollateralarteriolärer Remodeling beitragen<sup>60,127,114</sup>.

### Endothel, zirkulierender Zellen und Zytokine

Der hohe FSS bewirkt eine Aktivierung der Endothelzellen, die sich im Remodeling des Zytoskeletts sowie einer veränderten Genexpression äußert<sup>102</sup>. Auf der Endotheloberfläche kommt es zu einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen wie der interzellulären Adhäsionsmoleküle-1 und 2 (ICAM-1 und 2), die an der Adhärenz und Migration von Monozyten beteiligt sind<sup>102</sup>. Außerdem wird vermehrt Monocyte-Chemoattractant-Protein-1 (MCP-1) gebildet, was die Chemotaxis von Monozyten begünstigen soll<sup>41,89,110,109</sup>. Die Monozyten adhärieren mit Hilfe ihres Macrophage-1- antigen- Rezeptors (Mac-1 Rezeptor) an das endotheliale Oberflächenmolekül ICAM-1 und transmigrieren in das perivaskuläre Gewebe<sup>51</sup>. Hier angekommen differenzieren sie sich zu Makrophagen, welche nachfolgend Wachstumsfaktoren und Zytokine sezernieren, die wiederum weitere Monozyten anlocken und außerdem eine Stimulation der Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen bewirken<sup>102</sup>. Neben MCP-1, welches die Attraktion weiterer Monozyten induziert, spielen v.a. der

Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ), der zur Generierung eines entsprechenden inflammatorischen Milieus beiträgt, der basic fibroblast growth factor (b-FGF), welcher ein Mitogen für Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen darstellt sowie die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die den Umbau der alten Gefäßstruktur unterstützen und neuen Raum schaffen, der für die Expansion des Gefäßes benötigt wird, eine wichtige Rolle <sup>4,5</sup>.

### Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen

Die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen stellt den wichtigsten Schritt bei der Transformation einer Arteriole zu einem reifen Kollateralgefäß dar <sup>16</sup>. Während nur einige wenige zusätzliche Endothelzellen für die Entwicklung einer neuen Konduktanzarterie erforderlich sind, bedarf es hingegen zahlreicher Schichten an glatten Gefäßmuskelzellen <sup>102</sup>. Normalerweise liegen SMCs in einem differenzierten, kontraktilen Phänotyp vor. Sie enthalten zahlreiche kontraktile Filamente und Intermediärfilamente und sind von einer Basalmembran umgeben <sup>17</sup>. Dadurch werden sie davon abgehalten zu proliferieren und zu migrieren <sup>49,50,79,119</sup>.

Zu den von aktiviertem Endothel exprimierten Zytokinen gehören u.a. auch die Monocyte-Chemoattractant-Proteine 2 und 9 (MCP-2 und 9) sowie der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (u-PA), die eine Proteolyse der Basalmembran sowie der Membrana elastica interna und externa bewirken <sup>120,16,45,17</sup>. Dieser Vorgang ist notwendig, um die strukturellen Barrieren, die das Gefäßwachstum hemmen, zu überwinden und somit die Expansion und das nach außen gerichtete Wachstum der Kollateralen zu ermöglichen <sup>49,50,119,79,131</sup>.

Der Verlust der Basalmembran erlaubt zudem eine direkte Interaktion zwischen den SMCs und zahlreichen von Makrophagen bzw. eigens von SMCs produzierten Wachstumsfaktoren, was die Phänotypveränderung sowie Migration und Proliferation der SMCs begünstigt <sup>18,19</sup>. Die Modifikation der SMCs hin zu einem unreifen synthetischen Phänotyp erlaubt es ihnen schließlich in die Intima zu migrieren, zu proliferieren, extrazelluläre Matrixkomponenten zu sezernieren und an der Entwicklung und Formation der Intima teilzunehmen. Letztere führt zusammen mit zahlreichen anderen zellulären Mechanismen, wie Monozyteninvasion, Apoptose und extrazellulärer Proteolyse letztendlich zu einem 20-50 fachen Anstieg des Diameters und der Gewebsmasse <sup>17</sup>. Nach Abschluss der erforderlichen Zellteilungen nehmen sowohl die Endothel-, als auch die glatten Gefäßmuskelzellen wieder ihren ursprünglichen Phänotyp an <sup>102</sup>.

## Die Rolle von Stickstoffmonoxid

Die NO-Synthese wird durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) katalysiert. Die NOS konvertiert Arginin und molekularen Sauerstoff zu NO und Citrullin. Diese Reaktion erfordert Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADP), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin als Kofaktoren<sup>43</sup>. Bei den NO-Synthasen lassen sich 3 Subtypen unterscheiden, deren Namensgebung nach den Zellen erfolgte, in denen sie erstmals entdeckt wurden<sup>43</sup>.

Die neuronale NO-Synthase (nNOS bzw. NOS I) stellt, wie die eNOS, ein Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )/Calmodulin-abhängiges Enzym dar. Das von ihr produzierte NO agiert v.a. als Neurotransmitter und Neuromodulator im zentralen und peripheren Nervensystem<sup>43</sup>.

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS bzw. NOS II) wurde erstmals aus aktivierten Makrophagen isoliert und ist aufgrund der intrinsischen Calmodulin-Untereinheit unabhängig von erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$  Spiegel. Die Induktion der iNOS durch immunologische Stimuli, wie z.B. durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) oder durch Zytokine, kann in fast allen Zelltypen erfolgen<sup>43</sup>. Im menschlichen Organismus wird die iNOS jedoch v.a. durch immunkompetente Zellen, wie Monozyten/Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und T-Lymphozyten exprimiert<sup>8,69,128,130</sup>.

Die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS III) wird hauptsächlich von Endothelzellen exprimiert. Das von ihr gebildete NO stellt einen wichtigen Vasodilatator dar und hemmt zudem die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten<sup>43</sup>.

NO ist somit als endogener Mediator in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert: Regulation des Gefäßtonus, Hemmung der Thrombozytenfunktion, Abwehr des Organismus gegen eindringende Pathogene sowie den Schutz vor Tumorerkrankungen. Außerdem ist NO an Regulationsprozessen der glatten Muskulatur beteiligt und fungiert als neuronaler Transmitter<sup>43</sup>. NO ist als Radikal jedoch auch an der Entstehung von Gewebsschäden im Zusammenhang mit verschiedenen inflammatorischen Prozessen sowie Autoimmunerkrankungen beteiligt, indem es mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), bzw. von  $\text{O}_2$ -abgeleiteten Stoffen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RNOS) bildet, wie z.B. das Peroxynitritanion, welches die für die meisten durch NO-vermittelten toxischen Effekte verantwortlich ist<sup>43,58,78</sup>.

Im Rahmen der Arteriogenese sind v.a. die eNOS und die iNOS von Bedeutung. Die eNOS spielt eine wichtige Rolle beim Erhalt der Dichte nativer Kollateralgefäße bis ins Erwachsenenalter und ist außerdem an der Vermittlung des kollateralarteriolen Remodelings im Rahmen obstruktiver Gefäßerkrankungen beteiligt <sup>26</sup>. Durch erhöhten FSS im Zusammenhang mit sportlicher Aktivität kommt es zu einer Steigerung der eNOS-Expression- und Aktivierung <sup>26</sup>. Letztere erfolgt durch einen Akt-Phosphorylierungs-abhängigen Signalweg, welcher wiederum vom Ausmaß des oxidativen Stresses abhängt. Während milder oxidativer Stress den Akt/eNOS Signalweg aktiviert, führt starker oxidativer Stress zu einer Hemmung der eNOS Phosphorylierung und damit der Aktivierung <sup>118</sup>. Die eNOS Phosphorylierung findet an Serin 1177 statt und stellt eine posttranskriptionelle Modifikation dar <sup>30</sup>.

Eine erfolgreiche Transformation präexistenter Kollateralen hin zu funktionellen Konduktanzgefäßen scheint erheblich von der Funktion der iNOS abhängig zu sein. Experimentellen Studien zufolge führt eine Hemmung der iNOS durch Gabe von L-Nitro-Arginin Methyl Ester (L-Name) zu einer Inaktivierung der für das Kollateralarterienwachstum essentiellen Monozyten bzw. Makrophagen, die als Hauptproduzenten der iNOS fungieren und deren Funktion entscheidend von der Aktivität der iNOS abhängig ist <sup>15</sup>.

### **Exercise und endotheliale Dysfunktion**

Körperliche Inaktivität stellt einen unabhängigen Risikofaktor bei der Entstehung kardiovaskulärer Ereignisse dar <sup>67</sup>. Das Risiko im Verlauf des Lebens eine KHK zu entwickeln, wird durch fehlende sportliche Aktivität verdoppelt <sup>71,46</sup>. Tägliches aerobes Training hingegen wird als effektive Maßnahme, sowohl in der Primär-, als auch in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse angesehen <sup>7,82</sup>.

So wirkt sich sportliche Aktivität günstig auf mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen assoziierte Risikofaktoren, wie das Körpergewicht, die Serumlipidkonzentration, psychosozialen Stress, Bluthochdruck, Insulinresistenz und Diabetes mellitus aus <sup>138</sup>. Die Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen besteht im Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion, die mit einer eingeschränkten Aktivität der eNOS und somit einer verminderten NO Bioverfügbarkeit einhergeht <sup>26</sup>. Dies ist als ursächlich für die eingeschränkte Entwicklung der Kollateralgefäße im Rahmen der Arteriogenese anzusehen <sup>83</sup>. Normalerweise ist das vaskuläre Endothel, durch Freisetzung endothelabhängiger vasoaktiver Mediatoren, entscheidend an der Modulation des

lokalen Gefäßtonus beteiligt<sup>37</sup>. Die vaskulären Anpassungen im Rahmen von körperlicher Betätigung umfassen zum einen die Veränderung der neurohumoralen Kontrolle<sup>65,66,76</sup>. Hierbei kommt es durch die Exercise-induzierte Steigerung der NO Produktion zu einer Modifikation der endothelabhängigen vaskulären Reaktion zu Gunsten der Vasodilatation<sup>22,23,24,29,81</sup>. Darüber hinaus werden durch Exercise auch strukturelle Veränderungen (Arteriogenese und Angiogenese) induziert<sup>65,66,76</sup>. Bei Patienten mit KHK, chronischer Herzinsuffizienz und pAVK lässt sich durch regelmäßige körperliche Aktivität eine Verbesserung der Endothelfunktion erzielen<sup>48,10,47,53,13,115</sup>.

Dem präventiven sowie rehabilitativen Effekt des Ausdauertrainings im Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion und konsekutivem Auftreten atherosklerotischer Prozesse liegt eine gesteigerte Expression der eNOS zugrunde. Das von ihr gebildete NO inhibiert zahlreiche Schritte, die an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind, wie z.B. Leukozytenadhäsion an das Endothel, Migration der vSMCs in den subendothelialen Raum sowie Thrombozytenaggregation im Gefäßlumen<sup>74</sup>.

Körperliche Aktivität greift zudem in die Regulationsmechanismen des vaskulären oxidativen Stresses ein. Ausdauertraining führt über gesteigerten FSS zu einer Aktivierung der endothelialen NADPH Oxidase und bewirkt dadurch eine gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, wie Superoxid und Hydrogenperoxid<sup>27,56</sup>. Dieser Anstieg des vaskulären oxidativen Stresses scheint jedoch nur transient zu sein, da hierbei nur wenig Zeit für zelluläre Anpassungsreaktionen bleibt, die auf einem veränderten Genexpressionsmuster basieren<sup>62</sup>. Das durch die NADPH Oxidase gebildete Superoxid ist kaum in der Lage Zellmembranen zu durchdringen und wird schnell durch Superoxiddismutasen (SOD) zu Hydrogenperoxid konvertiert, welches viel stabiler ist und durch die Gefäßwand diffundieren kann<sup>63</sup>. Hydrogenperoxid wiederum steigert die Expression und Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung mit Hilfe der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II/Januskinase II<sup>31,14</sup>. Die Superoxiddismutasen, deren Bildung wiederum durch NO stimuliert wird, bewirken ihrerseits als Radikalfänger eine verminderte Inaktivierung von NO durch Superoxid und andere ROS<sup>62,90</sup>. Dieser Anstieg der eNOS Expression und Aktivierung in Verbindung mit einer erhöhten NO Bioverfügbarkeit scheint jedoch ebenfalls nur von vorübergehender Dauer zu sein. Denn sowohl mittelfristig, als auch langfristig durchgeführtes Ausdauertraining moderater Intensität führt zu einer Beeinflussung der vaskulären Genexpression, die sich durch verminderte Bildung von ROS, in Kombination mit einer gesteigerten antioxidativen Kapazität, in einer Reduktion des vaskulären oxidativen Stresses äußert<sup>62</sup>. Die Zunahme des

Gefäßdurchmessers während der Umbauvorgänge im Rahmen der Arteriogenese resultiert schließlich in einem Abfall des FSS und folglich in einer verminderten Aktivierung der NADPH Oxidase und geringerem vaskulärem oxidativem Stress. Langzeittraining scheint demnach durch ein anderes Genexpressionsmuster charakterisiert zu sein, als kurz- oder mittelfristig durchgeführtes Ausdauertraining<sup>62</sup>.

### **Die Rolle inflammatorischer Zytokine**

Entzündungsvorgänge spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen<sup>68</sup>. So stellt die Atherosklerose einen inflammatorischen Prozess dar, welcher durch Monozyten/ Makrophagen vermittelt wird. Diese sind an der Plaqueformation sowie der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen beteiligt<sup>94</sup>. Nach Aktivierung in der arteriellen Gefäßwand produzieren sie Zytokine, welche nachfolgend Schaden verursachen. So führt beispielsweise eine Überexpression von TNF $\alpha$  zu endothelialer Dysfunktion, Plaqueinstabilität und Gewebsschäden in der arteriellen Gefäßwand<sup>87,123</sup>.

Die endotheliale Dysfunktion ist ihrerseits mit verminderten NO Spiegeln und gesteigertem oxidativem Stress assoziiert. Letzterer ist wiederum entscheidend an der Initiierung und Progression der Atherosklerose beteiligt und trägt zur Instabilität atherosklerotischer Plaques bei, was wiederum zu erheblichen Komplikationen, wie dem akuten Koronarsyndrom (ACS) und plötzlichem Tod führt<sup>40,57,38</sup>.

Freiwilliges Training scheint durch seine antiinflammatorischen Effekte kardioprotektiv zu wirken, wobei diese Effekte vermutlich dosisabhängig (Art, Intensität, Dauer des Sports) sind<sup>35,59,88,35,64</sup>. Es scheint zudem ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Ausmaß körperlicher Aktivität und der Höhe der inflammatorischen Marker zu bestehen<sup>68</sup>.

Während nur vorübergehende/kurzzeitige körperliche Aktivität in einer proinflammatorischen Reaktion resultiert, bewirkt Ausdauertraining eine Reduktion inflammatorischer Zytokine, wie z.B. von Interleukin 6 (IL6), TNF $\alpha$ , dem hochsensitiven C-reaktiven Protein (hsCRP) und Interleukin 18 (IL-18)<sup>57</sup>. Dies scheint durch einen gesteigerten Parasympathikotonus vermittelt zu sein, welcher mit einer erhöhten Acetylcholinbildung einhergeht. Letzteres bewirkt über einen cholinergen antiinflammatorischen Signalweg eine Hemmung der Synthese von TNF $\alpha$  und anderen Zytokinen<sup>129</sup>.

### **2.3. Ziele der Arbeit**

Körperliche Aktivität gilt als effektive Maßnahme in der Primär- und Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen.

Bisher existiert nur wenig Literatur über die Effekte von präventivem Ausdauertraining auf das Wachstum von Kollateralgefäßen im Rahmen von stenosierenden Gefäßprozessen.

Ein genaueres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und biochemischen sowie physiologischen Prozesse ist jedoch mit Hoffnungen für zukünftige Therapieansätze verbunden.

Ein primär nichtpharmakologischer Therapieansatz würde, gerade auch aus volkswirtschaftlicher Sicht, eine kostengünstige Alternative im Vergleich zu operativen Interventionen bzw. teuren Medikamenten darstellen. Zudem könnten auf diese Weise zusätzliche, durch die Applikation weiterer Pharmaka induzierte, unerwünschte Arzneimittelwirkungen sowie Arzneimittelinteraktionen vermieden werden.

Diese Arbeit untersucht daher folgende Punkte:

- 1) Den Einfluss freiwilligen Ausdauertrainings auf das Wachstum von Kollateralgefäßen und die Perfusionswiederherstellung im Mäusehinterlauf nach Femoralarterienligatur
- 2) Die Effekte präventiver körperlicher Aktivität auf die lokale Zytokinexpression in Skelettmuskulatur und Milz
- 3) Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die trainingsinduzierte Arteriogenese anhand von Wildtyp- und Knockoutmäusen
- 4) Die Auswirkungen von Ausdauertraining auf inflammatorische Parameter und die NO-Synthase Expression in humanem Blut

## 3. Material

### 3.1. Verwendete Substanzen

<b>0,9% NaCl – Lösung</b> , B. Braun AG, Melsungen
<b>2-Propanol (Isopropanol)</b> , Merck, Darmstadt, DE
<b>3fach-Antikörper</b> , Ly6C-Alexa Fluor 488, CD115-PE, CD11b-PE-Alexa Fluor 647, AbD Serotec
<b>Acrylamide 30%</b> , Bio Rad, München, DE
<b>Adenosin</b> , 6mg/2ml, Sanofi aventis, Frankfurt, Deutschland
<b>Ammonium Persulfate (APS)</b> , Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
<b>Ampuwa</b> , Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
<b>Aprotinin</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Aqua ad injectabilia</b> (Ampuwa), B. Braun AG, Melsungen
<b>Aqua dest.</b> , B. Braun AG, Melsungen
<b>Biocoll Separating Solution</b> , Biochrom AG, Berlin
<b>Bromphenol BlueIndicator</b> , E. Merck, Darmstadt, DE
<b>BSA</b> , Albumin bovine Fraction V, pH 7.0, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
<b>Chloroform</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Citronensäure-Monohydrat</b> , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>D-(+)-Glukose</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Developer A</b> (for medical x-ray film processing), AGFA- Healthcare, Mortsels, Belgien
<b>Developer B</b> (for medical x-ray film processing), AGFA- Healthcare, Mortsels, Belgien
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b> , E. Merck, Darmstadt, DE

<b>Dithiothreitol (DTT)</b> , Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Erythrozyten-Lyse</b> (BD FACS Lysing Solution), BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Ethanol (absolut)</b> , Merck KGaA, Darmstadt, DE
<b>Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)</b> , Sigma
<b>FACS Clean</b> , BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>FACS Flow</b> , BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Fetal Bovine Serum (FBS)</b> , Invitrogen, South America
<b>Fluorescent Mounting Medium</b> , Dako Cytomation, Glostrup, Denmark
<b>Glukose</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Glycerol</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Glycin</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Goat-Serum</b> , Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA
<b>HCL (conc.)</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Heparin</b> – Na Braun, 10000 IE/ml, B.Braun AG, Melsungen
<b>High Range Marker</b> , Precision Plus Protein, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
<b>Kaliumchlorid</b> , Merck, Darmstadt, DE
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b> , Merck, Darmstadt, DE
<b>Ketavet</b> , Ketaminhydrochlorid, 100mg/ml, Pfizer, Berlin, Deutschland
<b>Leupeptin</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>LPS</b> , Lipopolysaccharides Escherichia coli 055:B5, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Methanol</b> , Merck KGaA, Darmstadt, DE
<b>Methylbutan</b> , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<b>Milchpulver</b> , Sucofin, TSI GmbH, Zeven, DE
<b>Mounting medium for Fluorescence with DAPI</b> , Vector Laboratories, Burlingame, USA
<b>N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b> , Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Natriumazid</b> , Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
<b>Natriumchlorid</b> , Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b> , Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Natriumhydrogencarbonat</b> , VWR, Haasrode, Belgien
<b>PenStrep</b> , Penicillin/Streptomycin, Invitrogen, Auckland, Neuseeland
<b>peqGOLD RNA-Pure</b> , peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
<b>Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)</b> , Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
<b>Proteinase K</b> , recombinant, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
<b>Rapid Fixer (for medical x-ray film processing)</b> , AGFA-Gevaert AG, Mortsel, Belgien
<b>Rompun</b> , 23.32mg Xylazinhydrochlorid/ml, Bayer, Leverkusen, Deutschland
<b>RPMI Medium</b> , Invitrogen, Auckland, Neuseeland
<b>Sodium Citrate</b> , Dihydrate, Calbiochem, La Jolla, CA, USA
<b>Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)</b> , Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
<b>SYBR Green PCR Master Mix</b> , Applied Biosystems, Warrington/ UK
<b>Taqman Gene Expression Mastermix</b> , Applied Biosystems, manufactured by Roche, New Jersey, USA
<b>Tissue freezing medium</b> , Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
<b>Tris[hydroxymethyl]aminomethan (TRIS, TRIZMA-Base)</b> , VWR, Leuven, Belgien
<b>Tris-HCl</b> , Carl Roth, Karlsruhe, DE
<b>Tween 20 und 80</b> , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Saint Louis, MO, USA

### 3.2. Verwendete Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben der Pufferbestandteile auf ein Endvolumen von 1000 ml.

<b>1 M Tris</b>	<b>500ml enthalten:</b> 60,6 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan 500 ml Ampuwa pH 6,8
<b>1,5 M Tris</b>	<b>500ml enthalten:</b> 90,9 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan 500 ml Ampuwa pH 8,8
<b>10% SDS</b>	<b>500ml enthalten:</b> 50 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 500 ml Aqua dest
<b>10% SDS</b>	<b>500ml enthalten:</b> 50 g Natriumdodecylsulfat (SDS) 500 ml Aqua dest.
<b>10x PBS</b>	80 g NaCl 2 g KCl 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
<b>10x PBS Tween</b>	1 l 10x PBS + 10 ml Tween
<b>ACD-A Stabilisator</b>	22g Natriumcitrat H <sub>2</sub> O 7,3g Zitronensäure 24,5g Glucose H <sub>2</sub> O
<b>Elektrophoresepuffer</b>	720 g Glycin 51,5g Tris 50 g SDS ad 5000 ml Ampuwa
<b>Entwickler-Lösung</b>	(2.5l) Aqua dest.: 1.25l Developer A: 1l, Developer B: 0.25l

<b>FACS Puffer</b>	<b>500 ml enthalten:</b> 500ml 1xPBS 25ml FBS 2,5g BSA 0,35g Na-Azid
<b>Fixierer-Lösung</b>	(2.5l) Aqua dest.: 2l, Rapid Fixer: 0.5l
<b>Hanks balancierte Salzlösung</b>	<b>500 ml enthalten:</b> 0,4g KCl 0,06g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,35g NaHCO <sub>3</sub> 8g NaCl 0,04788g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1g D-Glucose
<b>Ladepuffer</b>	2,0 ml Glycerol 2,0 ml SDS (10%) 0,25 mg Bromphenolblau 2,5 ml Stacking Gel Puffer ad 9,5 ml Ampuwa und frisch 25µl DTT/ 475µl Ladepuffer
<b>Lysepuffer</b>	<b>100 ml enthalten:</b> 10ml 10% SDS 0,5g Natriumazid 800µg Tween 80 5ml 1M Tris, pH 8,0 85ml Aqua dest. 33 mg Proteinase K
<b>Lysepuffer (Gesamtprotein)</b>	5 ml Tris (1M) 20 ml SDS (10%) 10 ml Glycerol ad 15 ml Ampuwa und frisch: 1µl PMSF und 1µl Leupeptin/ ml LyP sowie 1µg Aprotinin/ ml LyP

<b>Milz EDTA Puffer</b>	<b>500ml enthalten:</b> 50ml 10xPBS 5ml FBS 20 µl EDTA 0,5M mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen steril filtrieren
<b>Perfusionspuffer</b>	994ml 0,9% NaCl 1ml Tween 20 5ml Adenosin (3mg/ml)
<b>RPMI Medium</b>	<b>500ml enthalten:</b> 500ml RPMI Medium 50ml FBS 5ml PenStrep
<b>Sammelgel- Puffer</b>	TRIS: 12g, mit HCl [conc.] pH 6.8 mit Aqua dest. ad 200ml
<b>Stacking Gel Puffer</b>	6,06 g Tris 4 ml SDS (10%) ad 100 ml Ampuwa, pH 6,8
<b>Transferpuffer</b>	2,9 g Tris 14,5 g Glycin 200 ml Methanol
<b>Trenngel- Puffer</b>	TRIS: 90.75g mit HCl[conc] pH 8.8 mit Aqua dest. ad 500ml
<b>WB- Gel 8%</b>	<u>Sammel- Gel:</u> 30% Acrylamid/Bis-Solution: 1,7 ml, Sammelgel- Puffer: 1,25 ml, 10% SDS: 100µl, 10% APS: 100µl, TEMED: 10µl, Aqua dest: 6,8 ml  <u>Trenn- Gel:</u> 30% Acrylamid/Bis-Solution: 5,3 ml, Trenngel- Puffer: 5,0 ml, 10% SDS: 200µl,

	Aqua dest. : 9,3 ml, 10% APS: 200µl, TEMED: 12µl
--	---

### 3.3. Verwendete Kits

<b>Absolutely RNA Microprep Kit</b> , Stratagene, La Jolla, CA, USA
<b>ADMA-Elisa</b> , DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbH, Hamburg, Deutschland
<b>DC Protein Assay Reagent A</b> , Cat.No. 500-0113, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
<b>DC Protein Assay Reagent B</b> , Cat.No. 500-0114, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
<b>ECL- Kit</b> ,RPN2106, GE Healthcare, Amersham™, Buckinghamshire, UK
<b>FluoSpheres®</b> Blood Flow Determination, Fluorescent Color Kit #2, polystyrene microspheres, 15µm, Invitrogen, Eugene, OR, USA
<b>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</b> , Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>NOS detect Assay Kit</b> , Agilent Technologies, CA, United States
<b>Sensiscript Kit</b> , Qiagen GmbH, Hilden

### 3.4. Verwendete Geräte

<b>Autoklaviergerät</b> Tuttnauer 3850 EL, Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
<b>Druckgeregeltes Perfusionssystem</b> mit Rollerpumpe und SCP Modul für Perfusion mit Mikrosphären – Perfusionlösungen, Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March – Hugstetten
<b>Eismaschine</b> Scotsman Frimont MF 22, Scotsman Frimont, Milano, Italien
<b>Elektrophoresekammer Mini- PROTEAN® 3 Cell</b> , Bio- Rad, Hercules, CA, USA

<b>Elisa Reader</b> , Model 550, BIO-RAD, Hercules, CA, USA
<b>Entwicklermaschine</b> Curix 60, AgfaPhoto GmbH, Leverkusen
<b>FACSCalibur</b> , BD Biosciences, San Jose, CA, USA
<b>Glasplatte</b> , Glas Plates, Bio- Rad, USA
<b>Hamiltonpipette</b> , 1710 RNR, Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
<b>Heizblock</b> , HLC, HLC- Haep Labor Consult, Bovenden, DE
<b>Heizblock</b> , HLC, HLC- Haep Labor Consult, Bovenden, DE
<b>Inkubationsschrank</b> , Hera cell 150, Heraeus, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
<b>Kamm</b> , Comb, 10 well, 1.5, Bio- Rad, USA
<b>Kryostat</b> , Leica CM 1900, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
<b>Kühlraum- Schüttler</b> , Reax 2, Heidolf, Schwabach, DE
<b>Nikon DXM1200F</b> , Nikon GmbH, Düsseldorf
<b>Nikon Eclipse E600</b> , Nikon GmbH, Düsseldorf
<b>Nikon SMZ800</b> , Nikon GmbH, Düsseldorf <b>mit KL 1500 LCD Kaltlichtquelle</b> , Schott AG, Mainz
<b>Potter/ Homogenisator</b> , B. Braun, Melsungen AG, Deutschland
<b>Powerbox</b> , Power Pac 200, Bio- Rad, USA
<b>Px2 Thermocycler</b> , Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA
<b>Röntgenkassette</b> 24 x 30cm, Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
<b>Schüttelwasserbad</b> Typ 1086, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
<b>Schüttler</b> , Heidolph Polymax 1040, Schwabach, Deutschland
<b>Spectrophotometer</b> , DU 730, Bio-Rad, Hercules, CA, USA

<b>StepOne Plus Real Time PCR System</b> , Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<b>Trans- Blot® Transfer Medium</b> , Bio- Rad, Hercules, CA, USA
<b>Ultraschallreiniger Sonorex RK 31</b> 0,9l, Bandelin electronics, Berlin
<b>Vortex VV3</b> , VWR International, Darmstadt
<b>Waage</b> , ALC-Series 0.0001g Analytical Balances, Acculab UK, Edgewood, NY, USA
<b>Waage</b> , VIC-Series 0.01g Precision Balances, Acculab UK, Edgewood, NY, USA
<b>Zentrifuge</b> , Biofuge pico, Thermo Electron Corporation, Osterode, Deutschland

### 3.5. Verbrauchsmaterial

<b>Bio Rad Extra Thick Filter Paper</b> , Bio- Rad, München, DE
<b>Cell Scraper</b> , 25 cm, Sarstedt, Newton, USA
<b>Dako Pen</b> , Dako Cytomation, Glostrup, DK
<b>Deckgläser</b> 24 x 60 mm, VWR International GmbH, Darmstadt
<b>FACS-Röhrchen</b> , 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Biosciences, Bedford, USA
<b>Film</b> , Amersham Hyperfilm™ MP, GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
<b>Konische Polypropylenröhrchen</b> (15ml, 50ml), BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>MicroAmp 96 well plates</b> , Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<b>Nadel</b> , 18Gx1.5'', 1.2x40mm, BD Microlance, Ireland
<b>Nadel</b> , 24Gx1'', 0.55x25mm, BD Microlance, Ireland
<b>Nitrocellulosemembran</b> , 0.2µm, BIO-RAD, Germany
<b>Optical Adhesive Covers</b> , Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

<b>Pipettenspitzen</b> (weiß, gelb, blau), Sarstedt AG & Co., Nürnberg
<b>Polysine slides</b> , Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
<b>Seide 6.0</b> (geflochten), Feuerstein GmbH, Berlin
<b>S-Monovette</b> , 10ml 9NC, Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
<b>Zellfilter</b> , 70µm, BD Biosciences, Bedford, USA
<b>Zellkulturschale</b> , Durchmesser 100 mm/60.1mm <sup>2</sup> , RNA-/DNA-frei, RNase-/DNase-frei, TPP, Schweiz

### 3.6. Antikörper für Immunhistochemie

<b>Monoclonal anti – <math>\alpha</math> – smooth muscle actin – FITC antibody</b> , Clone 1A4, Sigma – Aldrich Co. St. Louis, MO, USA
--

### 3.7. Primär AK für Western Blot

<b>eNOS / NOS– III rabbit – anti – mouse</b> , Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
<b>GAPDH mouse – anti – mouse</b> , Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
<b>p–eNOS (Ser1177) mouse – anti – mouse</b> , Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen

### 3.8. Sekundär AK für Western Blot

<b>Anti–rabbit IgG</b> (whole molecule) peroxidase conjugate, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA
<b>Goat anti – mouse IgG (H+L) HRP conjugate</b> , Bio – Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

### 3.9. Primer für Real Time PCR (von Eurofins MWG Operon, Ebersberg)

<u>mRNA</u>	<u>Primer</u>
<b>mm18S</b>	fwd: 5' TCA ACA CGG GAA ACC TCA C 3' rev: 5' ACC AGA CAA ATC GCT CCA C 3'
<b>mmeNOS</b>	fwd: 5' CAC CTA CGA CAC CCT CAG TG 3' rev: 5' CTT GAC CCA ATA GCT GCT CAG 3'
<b>mmIL6</b>	fwd: 5' TCC TAC CCC AAT TTC CAA TG 3' rev: 5' ACC ACA GTG AGG AAT GTC CA 3'
<b>mmiNOS</b>	fwd: 5' CAA GCA CCT TGG AAG AGG AG 3' rev: 5' AAG GCC AAA CAC AGC ATA CC 3'
<b>mmTNF<math>\alpha</math></b>	fwd: 5' GAT TAT GGC TCA GGG TCC AA 3' rev: 5' CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG 3'

## 4. Methoden

### 4.1. Versuchstierbehandlung

Männliche, zwischen 8 und 12 Wochen alte C57Bl/6 Wildtypmäuse wurden in 3 Behandlungsgruppen unterteilt. Die Versuchstiere der Gruppen „Run“ und „Run and Rest“ erhielten je ein Laufrad in ihrem Käfig, welches an einen Kilometerzähler gekoppelt war. Somit konnten die Laufdistanzen der einzelnen Mäuse erfasst werden. Die Kontrollgruppe erhielt kein Laufrad.

Nach einem Zeitraum von 3 Wochen wurde bei allen Tieren eine Ligatur der rechten A. femoralis vorgenommen. Am selben Tag wurden bei den Mäusen der Gruppe „Run and Rest“ die Laufräder entfernt.

Die Gruppe „Run“ behielt die Laufräder, je nach Versuchsziel, noch für einen weiteren Zeitraum. Sollte Gewebe für Untersuchungen mittels Western Blot, Real Time PCR oder Immunhistochemie gewonnen werden, wurde das freiwillige Ausdauertraining dieser Gruppe noch 3 Tage über die Ligatur hinaus fortgeführt. War eine Perfusion mit Microsphären geplant, verlängerte sich dieser Zeitraum auf 7 Tage. Für die Perfusionsmessungen mit Microsphären wurden neben den Wildtypmäusen ebenfalls eNOS- und iNOS- Knockoutmäuse verwendet, welche demselben Behandlungsschema unterlagen (**siehe Abbildung 1A**).

Bei einer Versuchstierreihe erfolgte die Transplantation von Knochenmark (KM). Hierfür wurden Wildtypmäuse myeloablativ bestrahlt. Anschließend wurde ihnen KM transplantiert, welches entweder anderen Wildtypmäusen entstammte (Kontrollgruppe) oder sie erhielten KM, welches aus iNOS -/- Mäusen isoliert wurde. Nach einem Erholungszeitraum von 6 Wochen erfolgte die Weiterbehandlung entsprechend derjenigen, der übrigen Tiere. (**siehe auch Abschnitt 4.5. „spezifische Behandlung der KM-transplantierten Mäuse“**)

Zur Narkotisierung der Versuchstiere wurde für alle durchgeführten Eingriffe ein Gemisch aus 1ml Xylazin (1ml  $\cong$  20mg) und 2 ml Ketamin (1ml  $\cong$  100mg) hergestellt, welches mit Hilfe von NaCl 1:10 verdünnt wurde. Davon wurden je 300 $\mu$ l/20g Maus appliziert. Getötet wurden die Tiere schließlich durch Applikation einer erhöhten Dosis unverdünnter Injektionsnarkose (300 $\mu$ l/20g Maus). Danach wurden jeweils Adduktorgewebe und Blut für die später durchgeführten Untersuchungen isoliert.

## 4.2. Trainingsprotokoll der Sportler

Name	Geschlecht	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
B.M.	♂	46	179	80	25
H.S.	♀	46	174	61	20,3
K.F.	♂	47	196	102	26,6
K.H.	♀	45	166	56	20,4
K.M.	♀	29	172	70	24,2
L.G.	♀	57	160	55	21,6
L.S.	♀	38	176	82	26,5
L.B.	♂	54	168	77	27,1
P.L.	♂	35	189	73	20,6
W.B.	♀	43	165	72	26,6
<b>MW</b>		44	174,5	72,8	23,89
<b>STABW</b>		8,37	11,14	13,96	2,87

10 junge gesunde männliche und weibliche nicht sportlich aktive Probanden, im Alter von 29 bis 57 Jahren wurden in eine Trainingsstudie eingeschlossen. Diese sah vor, dass über einen Zeitraum von 3 Monaten 3 Mal pro Woche im Freien (Waldweg, Sportplatz) trainiert werden sollte, wobei eine dieser wöchentlichen Einheiten am Institut für Sportmedizin zu absolvieren war. Der Trainingsablauf gestaltete sich wie folgt:

- 1) 5 min Aufwärmen durch Laufen/ Gehen bei 65-75% der maximalen HF
- 2) 4 Intervallläufe (Dauer je 4 min): Laufen bei 80-90% der maximalen HF
- 3) Zwischen den Intervallläufen: 3 min Laufen bei 65-75% der maximalen HF
- 4) 3 min Auslaufen bei 65-75% der maximalen HF

Blut wurde jeweils zu Beginn der Studie, vor und nach Absolvieren der ersten Trainingseinheit, abgenommen sowie am Ende der Studie, vor und nach Absolvieren der letzten Sporteinheit.

Außerdem waren alle Teilnehmer dazu angehalten ein Trainingstagebuch zu führen, in welchem sie Datum und Uhrzeit der einzelnen Sporteinheiten sowie sonstige Besonderheiten vermerkten.

### 4.3. Western Blot

Als Ausgangsmaterial wurde Adduktorgewebe, welches seit der Organentnahme bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurde, verwendet. Ein ca.  $150\ \mu\text{g}$  schweres Gewebstück wurde in  $500\ \mu\text{l}$  Lysepuffer gepottert und anschließend für 5 min bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben. Hieraus erfolgte die Proteinbestimmung nach dem Verfahren von Lowry et al (1951) <sup>70</sup>. Zu diesem Zweck wurde das Lysat mit Aqua dest zunächst 1:10 verdünnt und mit  $100\ \mu\text{l}$  Biorad D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent A versehen. Dadurch entstand ein Kupfer-Protein-Komplex in alkalischer Lösung. Anschließend wurden  $800\ \mu\text{l}$  Biorad D<sub>c</sub> Protein Assay Reagent B hinzugefügt. Der zuvor gebildete Kupfer-Protein-Komplex reduzierte das nun zugegebene Phosphomolybdat-Phosphowolframat- Reagens unter Bildung einer blauen Färbung, deren Intensität proportional zur Proteinkonzentration der Lösung war. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte schließlich mit Hilfe des Photometers bei einer Wellenlänge von 540 nm. Als Leerwert diente ein Gemisch aus  $20\ \mu\text{l}$  Aqua dest,  $100\ \mu\text{l}$  Reagenz A und  $800\ \mu\text{l}$  Reagenz B. Zur Fehlerminimierung wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteingemische, entsprechend ihres Molekulargewichts, erfolgte mit Hilfe eines 8%igen SDS-Polyacrylamid-Gels. Vor Beladung des Gels, wurden jeweils  $50\ \mu\text{g}$  der zu untersuchenden Proben mit einer identischen Menge an Ladepuffer vermischt und für 7 Minuten auf  $70^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Dieses Gemisch wurde anschließend in die im Sammelgel befindlichen Gelslots pipettiert. Als Mitlaufkontrolle wurde ein High Range Marker verwendet.

Nach Befüllen der Kammer mit Elektrophoresepuffer, wurde eine Spannung von 30 mA angelegt. In den folgenden 2-3 Stunden wanderten die Proteine durch das Sammel- und das darunter befindliche Trenngel, in welchem die eigentliche Auftrennung der Proteine erfolgte. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die aufgetrennten Proteine durch einen Abklatsch (Blot) des Gels auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde anschließend für 30 Minuten in 5%iger PBS-Tween-Milch langsam geschüttelt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Anschließend wurde die Membran bei  $4^{\circ}\text{C}$  über Nacht in 5 ml 1%ige PBS-Tween Milch, die den Primärantikörper der entsprechenden Konzentration enthielt, inkubiert. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

Am darauf folgenden Tag wurden überschüssige Reste des Primärantikörpers durch mehrere Waschschrte (2x5 Minuten in 1x PBS-Tween, 2x10 Minuten in 1x PBS-Tween, 2x2 Minuten in 1x PBS-Tween) entfernt. Anschließend wurden 50ml 1x PBS, welches den Sekundärantikörper der entsprechenden Konzentration enthielt, auf die Membran gegeben

und bei RT inkubiert, wobei der Schüttler langsam rotierte. Für Anti-Rabbit wurde eine Inkubationszeit von 30 Minuten eingehalten, wohingegen für Anti-Mouse nur 20 Minuten erforderlich waren. Auf diesen Schritt folgte ein erneuter, dem Vorherigen identischer, Waschzyklus.

Die Banden wurden schließlich durch Zugabe von ECL sichtbar gemacht. Dieses wird durch die Peroxidaseaktivität des Sekundärantikörpers bei 428 nm zum Leuchten gebracht, wobei  $H_2O_2$  reduziert und Luminol oxidiert wird. Die Schwärzung des Röntgenfilms erfolgt direkt proportional zur detektierten Proteinmenge. Der in der Dunkelkammer entwickelte Film wurde schließlich eingescannt und am Computer mit Hilfe des Programmes Labworks densitometrisch ausgewertet, wobei die Ergebnisse auf die Ladekontrolle (GAPDH) bezogen wurden.

#### **4.4. Quantitative Real Time (qRT) – PCR**

##### **Probenaufbereitung Milz**

In einem ersten Schritt erfolgte die Zerkleinerung der Milzen in je 15 ml EDTA Puffer. Dieses Gemisch wurde auf einen 70  $\mu$ m Filter gegeben, welcher anschließend mit 20 ml 1xPBS durchgespült wurde. Die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Zwischenzeitlich wurden 15 ml Ficoll in ein anderes Gefäß vorgelegt, worauf das Filtrat vorsichtig geschichtet wurde. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (20 Minuten bei 2200 Umdrehungen/Minute und 15°C; Bremse ausgeschaltet). Danach wurde die schleierförmige Interphase mit Hilfe einer Pipette gewonnen und zum Waschen mit 1xPBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (10 min bei 2200 Umdrehungen/Minute bei 4°C; Bremse eingeschaltet). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das verbleibende Pellet in 1 ml RPMI Medium resuspendiert.

Die Zellzählung der auf diese Weise isolierten mononukleären Zellen erfolgte in der Neubauerkammer. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnte die Konzentrationen der einzelnen Proben so aneinander angeglichen werden, dass nach Zugabe einer entsprechenden Menge an RPMI Medium jeweils 2 Millionen Zellen/ml Medium vorlagen. Nach dem Transfer in Petrischalen erfolgte eine Stimulation der MNCs mittels LPS. Dieses wurde zuvor 1:100 mit RPMI Medium verdünnt. Davon wurde dann pro zugegebenem ml Medium je 1  $\mu$ l zu jeder

Probe hinzugefügt. Es folgte eine dreistündige Inkubation im Inkubationsschrank. Zwischenzeitlich wurde der Lysepuffer vorbereitet (pro ml Lysepuffer Zugabe von 7 µl β-Mercaptoethanol), dessen Verwendung den ersten Schritt der RNA Isolation darstellte.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und zu jeder Petrischale 350 µl des Lysepuffergemisches hinzugefügt. Die am Boden haftenden MNCs wurden danach mit Hilfe von Cellscrapern gelöst und mittels einer Pipette im Lysepuffer resuspendiert, bevor das Gemisch schließlich in ein Eppendorfgefäß überführt wurde. Die weiteren Schritte der RNA Isolation folgten den Herstellerangaben. Pro Probe wurde je 350 µl 70%igen Ethanol zugegeben und durch gründliches Vortexen vermischt. Es folgte der Transfer in einen leeren RNA – binding spin cup und ein Zentrifugationsschritt in der Tischzentrifuge (60 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit). Das Filtrat wurde verworfen. Die Membran der spin cups wurde durch Zugabe von je 600 µl Low Salt Wash Buffer und mehrfaches Zentrifugieren gereinigt und getrocknet. Auf die nun trockenen Membranen wurden je 30 µl DNase – Lösung (25 µl DNase Digestion Buffer + 5 µl RNase – free DNase I) gegeben, bevor eine 15 minütige Inkubation bei 37°C erfolgte. Nach Ablauf dieser Zeit wurden, unter Verwendung des High- und Low-Salt Wash Buffers, wiederum mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte (jeweils 1-2 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit) vorgenommen, wobei das Filtrat jeweils verworfen wurde.

Vor Zugabe des Elution Buffers wurde der spin cup mit der gebundenen RNA auf ein frisches, Nukleinsäure – und RNase – freies Eppendorfgefäß gesteckt. Dann wurden je 30 µl Elution Buffer, welcher zuvor mit Hilfe eines Heizblockes auf 60°C erwärmt wurde, direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei RT folgte ein letzter Zentrifugationsschritt. Das daraus resultierende Filtrat enthielt die RNA der mononukleären Zellen und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### **Probenaufbereitung Adduktor**

Ein Viertel des *M. adductor magnus* wurde in 1 ml RNA Pure gepottert. Das Homogenat wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und gründlich gemischt, bis die Probe milchig wurde. Auf eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt (5 Minuten bei 12000 Umdrehungen/Minute und 4°C), wodurch sich das Gemisch in 3 Phasen auftrennte. Die obere wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Gefäß überführt, in welches bereits 500 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4°C, bevor erneut zentrifugiert wurde (10 Minuten

bei 12000 Umdrehungen/ Minute und 4°C). Anschließend wurde der isopropanolhaltige Überstand angehoben und die Proben mit 1ml 75%igem Ethanol versetzt. Auch hiernach wurde, unter den gleichen Bedingungen wie zuvor, zentrifugiert. Das am Boden des Eppendorfgefäßes haftende Pellet wurde nach Abheben des Überstandes kurz an der Luft trocknen gelassen, bevor es schließlich in 20 µl Injektionswasser resuspendiert wurde. Durch Erhitzen auf 60°C wurde die Löslichkeit verbessert. Die Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### **Probenaufbereitung humanes Blut**

Von jedem Probanden wurden zu Beginn und am Ende der Studie jeweils vor und nach dem Training 20 ml Citratblut entnommen, welches durch Zugabe von 1xPBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt wurde. Dieses Gemisch wurde vorsichtig auf je 15 ml Ficoll geschichtet, welches zuvor in ein anderes Gefäß vorgelegt wurde. Der weitere Ablauf war mit dem unter „Probenaufbereitung Milz“ beschriebenen Vorgehen identisch. Das nach dem letzten Zentrifugationsschritt und Abheben des Überstandes entstandene Pellet wurde allerdings in 7 ml 1xPBS resuspendiert. Danach wurde erneut für 10 min bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem entstandenen MNC-haltigen Pellet wurde jeweils 1 ml RNA Pure gegeben. Dies stellte den ersten Schritt der RNA Isolation dar. Der weitere Ablauf folgte dem unter „Probenaufbereitung Adduktor“ beschriebenen Vorgehen.

### RNA- Bestimmung

Mit Hilfe von Injektionswasser wurde eine 1:50 Verdünnung einer jeden Probe hergestellt, die bei 260 und 280nm photometrisch gegen einen Leerwert (50 µl Injektionswasser) gemessen wurde.

### Reverse Transkriptase

Die RNA der MNCs, welche aus Milzen isoliert wurden, wurde mit Hilfe der Sensiscript Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Somit ließ sich bei nur geringen RNA Mengen eine höhere Ausbeute erzielen. Von jeder der zu untersuchenden Proben wurden 2 µg eingesetzt und mit Injektionswasser auf ein Volumen von 12 µl angeglichen. Anschließend wurden je 8 µl Mastermix hinzugegeben, welcher pro Probe 2 µl 10x Buffer RT, 2 µl dNTP

Mix (5 mM), 2 µl Random Primer, 1 µl RNase Inhibitor (RNAsin 10 U/µl) und 1 µl Sensiscript RT enthielt. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 93°C auf dem Heizblock erwärmt, bevor sie wieder auf Eis gelagert wurden.

Zur reversen Transkription der RNA, welche aus Adduktorgewebe bzw. MNCs aus humanem Blut isoliert wurde, wurde das „High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ verwendet. Auch hierfür wurden je 2 µg der zu untersuchenden Proben eingesetzt und das Volumen aller Proben mit Hilfe von Injektionswasser auf 12 µl angeglichen. Anschließend wurden je 8 µl Mastermix hinzugefügt, welcher pro Probe 2 µl 10x RT Buffer, 0,8 µl 25x dNTP Mix (100 mM), 2 µl 10x RT Random Primer, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl RNase Inhibitor und 1,2 µl Aqua ad inj. enthielt. Der eigentliche Reaktionsablauf erfolgte schließlich im Thermocycler: 10 Min 25°C, 120 Minuten 37°C, 5 Minuten 85°C, Abkühlung auf 4°C. Endresultat beider Verfahren waren 20 µl jeweils gleich konzentrierter cDNA, die nun für Real-Time-PCR-Untersuchungen zur Verfügung stand.

Für die qRT – PCR wurden je 3 µl cDNA der zu untersuchenden Proben in eine 96-well-plate pipettiert. Für die Anfertigung einer 18s-PCR als Housekeeper wurden jeweils 1:10000 Verdünnungen der cDNA erstellt, wohingegen für alle übrigen Targets 1:10 Verdünnungen verwendet wurden. Um die PCR anschließend über eine relative Standardkurve auswerten zu können, wurde ein Mix aller 1:10 bzw aller 1: 1000 Verdünnungen hergestellt. Der 1:10er Mix wurde dann jeweils 1:2 weiterverdünnt, sodass schließlich die Verdünnungsstufen 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 vorlagen. Der 1:1000er Mix hingegen wurde jeweils 1:10 weiterverdünnt, woraus eine 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000, 1:100.000 Verdünnungsreihe resultierte. Als Leerwert wurden 3 µl Injektionswasser verwendet. Anschließend wurden in jedes Feld zusätzlich 22 µl Mastermix hinzugefügt. Dieser setzte sich pro Probe aus 7,5 µl PowerSybrGreen, 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse und 13,5 µl Injektionswasser zusammen. Wurden statt Primern Taqman-Sonden verwendet, bestand der Mastermix pro Probe aus je 10 µl Taqman- Mastermix- Reagenz, 1 µl Sonde und 6 µl Injektionswasser. Zur Fehlerminimierung wurden jeweils Doppelbestimmungen aller zu untersuchenden Proben auf die 96-well-plate pipettiert. Vor Beginn der RT-PCR erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 300 U/min. In Excel wurden die Target-Quantities in Bezug auf die jeweilige 18s gesetzt und somit ausgewertet.

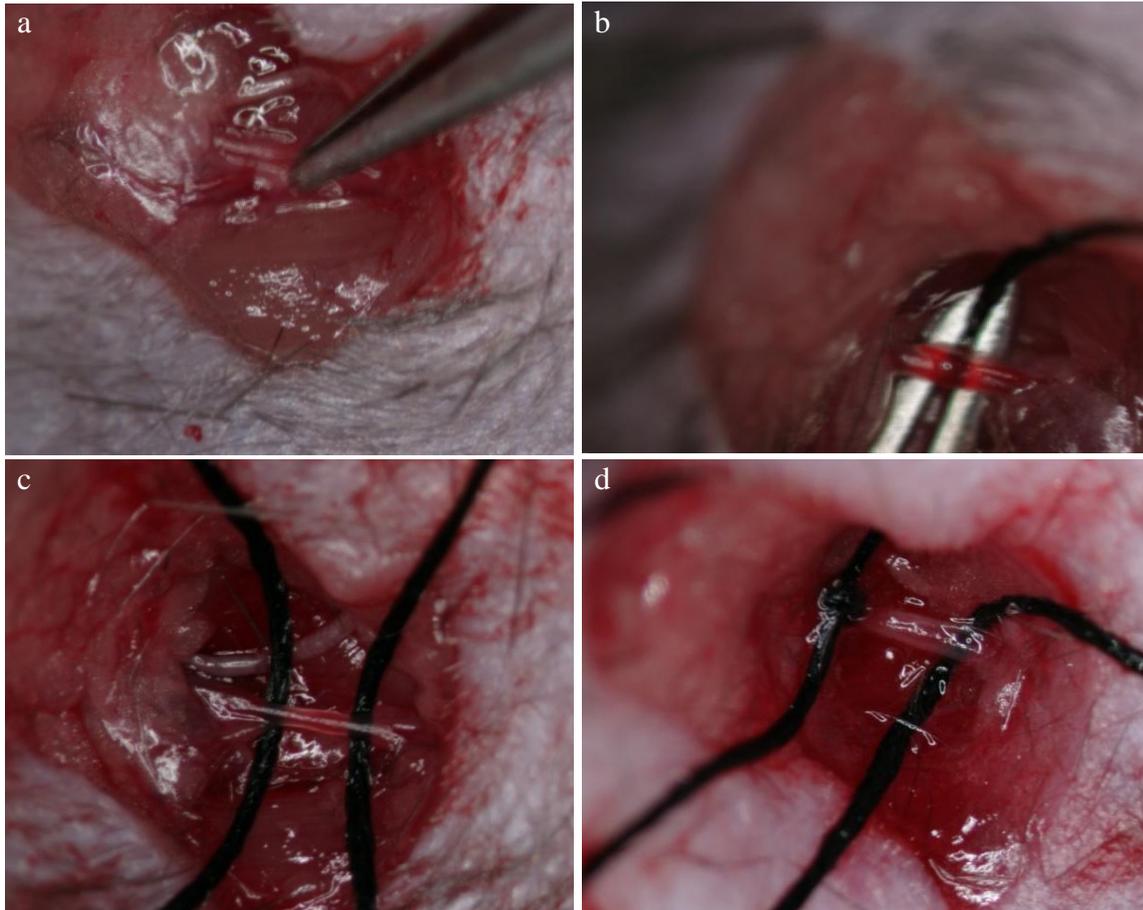
## **4.5. Perfusionsmessungen**

### **Spezifische Behandlung der Knochenmarkstransplantierten Mäuse**

Die Wildtypmäuse wurden zunächst mit einer Strahlendosis von 0,32 Gray/g KG bestrahlt (Bestrahlungszeit 10,6 Sekunden/g KG). Das zu transplantierende Knochenmark der B16 Wildtypmäusen und iNOS<sup>-/-</sup> Mäusen wurde jeweils beidseits aus Femur und Tibia isoliert. Die Knochen wurden dafür mit Hilfe einer Spritze mit einem Gemisch aus Hanks stabilisierter Lösung und ACD-A Stabilisator durchgespült. Das gewonnene Material wurde durch mehrfaches Aufziehen mit der Spritze resuspendiert und auf einen Zellfilter gegeben. Das Lysat wurde anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und nach Zugabe von 5 ml NaCl Lösung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wie zuvor. Das entstandene Pellet wurde schließlich in 0,7 ml NaCl resuspendiert. Das auf diese Weise gewonnene Knochenmark einer Spendermaus wurde jeweils hälftig auf 2 Empfängermause aufgeteilt, in dem es 3 Stunden nach Ablauf der Bestrahlung in die Schwanzvene der Empfängermause appliziert wurde.

### **Ligatur der rechten A. femoralis**

Nach Narkotisierung der Tiere erfolgte ein Hautschnitt an der rechten Oberschenkelinnenseite. Nachfolgend wurde die A. femoralis freipräpariert und vorsichtig von der zugehörigen Vene abgelöst. Distal des Abgangs der A. profunda femoris wurde mit Hilfe einer Pinzette ein Faden (6.0 geflochtene Seide) unter der Arterie hindurchgeführt, der durch Zuziehen einer Schlinge den Verschluss des Gefäßes gewährleistete. Um sicherzustellen, dass das Gefäß vollständig verschlossen wurde, erfolgte knapp distal des ersten Knotens eine zweite Ligatur. Die Op-Wunde wurde durch eine Hautnaht verschlossen. Zur Behandlung postoperativer Schmerzen erfolgte eine intraperitoneale Verabreichung von 10mg Carprofen, entsprechend 0,2 ml Injektionslösung.



Aufsuchen der A. femoralis in der Leistenregion (a). Nach Abpräparieren von der zugehörigen Vene, wurden zwei Fäden unter der Arterie hindurchgeführt (b). Die Okklusion der A. femoralis erfolgte durch Zuziehen einer Schlinge, ohne dabei die Vene zu unterbinden (c). Zur Sicherung der Ligatur wurde ein zweiter Knoten distal des Ersten platziert (d).

### **Perfusion mit Microsphären**

Nach tiefer Narkotisierung der Tiere erfolgte eine mediane Laparotomie. Die Baucheingeweide wurden mit Wattestäbchen zur Seite geschoben, bis die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior zu sehen waren. Diese wurden vorsichtig voneinander abgelöst. Anschließend wurden die großen Gefäße mit Hilfe einer Klemme oberhalb der Nierenarterien abgeklemmt. Die Aorta wurde durch einen Schnitt mit einer kleinen Gefäßschere eröffnet und der Silikonkatheter langsam in das Lumen vorgeschoben. Mit Hilfe eines unter der Aorta hindurchgeführten Fadens (6.0 geflochtene Seide) wurde der Katheter durch Zuziehen einer Schlinge fixiert. Dabei war darauf zu achten, dass der Katheter proximal der Aortenbifurkation zu liegen kam, um eine beidseitige Perfusion der Hinterläufe zu gewährleisten. Danach wurde die Vena cava eröffnet. Nach Anschließen des Perfusionsschlauches und des Druckabnehmers wurde zunächst 30 Sekunden lang mit

Perfusionspuffer, welcher mit Hilfe eines Durchlauferhitzers auf 38°C vorgewärmt wurde, perfundiert.

Die eigentliche Perfusion erfolgte bei unterschiedlichen Drücken, wobei für jede Druckstufe verschiedenfarbig fluoreszierende Mikrosphären verwendet wurden. Diese wurden zuvor mit Perfusionspuffer verdünnt (Zugabe von je 250 µl pro 50 ml Puffer).

Die Dauer der einzelnen Perfusionsschritte betrug jeweils 2 Minuten. Um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, wurde die Mikrosphärensuspension kontinuierlich mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Begonnen wurde die Perfusion bei 60 mmHg mit purpurfarbenen Mikrosphären (crimson; Absorptionsmaximum 612 nm / Emissionsmaximum 638 nm), gefolgt von Roten (red; Absorptionsmaximum 570 nm / Emissionsmaximum 598 nm) bei einem Druck von 70 mmHg, Orangefarbenen (orange; Absorptionsmaximum 534 nm / Emissionsmaximum 554 nm) bei 80 mmHg und schließlich blaugrünen Mikrosphären (blue – green; Absorptionsmaximum 427 nm / Emissionsmaximum 468 nm) bei einem Perfusionsdruck von 90 mmHg. Zwischen den einzelnen Druckstufen wurde jeweils für 30 Sekunden mit reinem Perfusionspuffer perfundiert.

Da die maximale Förderleistung der verwendeten Pumpe von 20 ml/Minute bei verschiedenen Versuchstieren bereits bei orange oder blue – green erreicht wurde, wurde teilweise nicht mit dem gewünschten Druck, sondern mit einem konstantem Fluss von 20 ml/ Minute perfundiert.

### **Gewebeentnahme**

Nach Abschluss der Perfusion wurde die Maus getötet. Das Muskelgewebe beider Unterschenkel wurde vom Kochen gelöst, gewogen und mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert. Dem Lysepuffer wurden Proteinkinase K (10 mg/30 ml Puffer) sowie scharlachrote Mikrosphären (scarlet; Absorptionsmaximum 651 nm/Emissionsmaximum 680 nm) in einer Konzentration von 5000/ml als Referenz beigefügt. Das zerkleinerte Gewebe der beiden Hinterläufe einer Maus wurde jeweils separat in 5 ml FACS-Röhrchen gegeben und mit je 3 ml Lysepuffer vermischt. Anschließend folgte eine 7 tägige Inkubation bei 50°C im Wasserbad. Während dieser Zeit wurden die FACS-Röhrchen in regelmäßigen Abständen geschüttelt, um eine vollständige Lyse des Gewebes zu erzielen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die FACS-Röhrchen zentrifugiert (30 Minuten bei 1000g). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das am Boden befindliche mikrosphärenhaltige Pellet in je 500 µl 1xPBS resuspendiert.

## **FACS-Analyse**

Mit Hilfe des Durchflusszytometers konnten die in der Suspension enthaltenen Microsphären gemessen werden. Im Vorfeld wurden dazu die Thresholds und Gates so gewählt, dass es zu einer möglichst vollständigen Detektion kam. Zur Auswertung wurden die ermittelten Daten in Bezug zur Referenz gesetzt und jeweils die linke unligierte Seite mit der rechten ligierten Seite verglichen.

## **4.6. FACS Blutbild Maus**

Nach Tötung der Tiere wurde die V. cava punktiert und das Blut in eine mit 50 µl Heparin befüllte Spritze aufgezogen. Das Blut wurde anschließend mit 2 ml FACS Puffer versetzt, gründlich durchmischt und dann für 3 Minuten bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 50 µl FACS Puffer und 5 µl Ak-Mix hinzugegeben. Nach erneutem Mischen folgte eine Inkubationszeit von 45 Minuten (Proben auf Eis, dunkel). Nach Ablauf dieser Zeit wurden 3 ml 1:10 verdünnte Lysereagenz zugefügt, bevor eine erneute 10-minütige Inkubation, unter gleichen Bedingungen wie zuvor, folgte.

Danach wurden die Proben durch mehrfache Zugabe von FACS Puffer und mehrfaches Zentrifugieren gereinigt, bevor das entstandene Pellet schließlich in 300 µl FACS Puffer resuspendiert wurde und für die Messung am FACS Gerät zur Verfügung stand.

## **4.7. Immunhistochemie**

### **Probengewinnung**

Als Ausgangsmaterial diente der M. adductor magnus beider Hinterläufe. Dieser wurde in vorgefertigten und mit TissueTek befüllten Förmchen aus Alufolie eingebettet und mit Hilfe von Methylbutan und flüssigem Stickstoff darin eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur histologischen Beurteilung wurden am Kryostat (Leica, Bensheim) 8 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Polysin-beschichtete Objektträger aufgebracht; jeweils 3 Schnitte nebeneinander. Um sicherzustellen, dass die einzelnen Schnitte eines Objektträgers jeweils unterschiedliche Zellen des Gewebstückes darstellten, wurde beim Schneiden ein Abstand von 20 µm zwischen den einzelnen Schnitten belassen.

### **$\alpha$ -smooth muscle actin-Färbung**

Hierfür wurden die Objektträger zunächst in die Färbeküvetten gestellt und für 10 Minuten in 1x PBS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, bevor 0,5%iges Goat-Serum direkt auf die Schnitte gegeben wurde. Dieses wurde nach 10 Minuten durch leichtes Abklopfen der Objektträger auf Zellstoff wieder entfernt. Nun wurde der FITC – gelabelte anti –  $\alpha$  – smooth muscle actin – Antikörper 1:250 in 0,5% Goat – Serum verdünnt und wiederum direkt auf die Schnitte pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Objektträger erneut in 1xPBS gewaschen (2x5 Minuten).

Abschließend wurde DAPI (zur Anfärbung der Zellkerne) und Mounting Medium auf die Schnitte gegeben, bevor diese schließlich mit einem Deckglas versehen wurden.

### **4.8. Arginin Citrullin Assay**

Diese Methode dient der Quantifizierung der NO-Synthase Aktivität und damit der NO Produktion. Sie basiert auf der enzymatischen Umwandlung von radioaktiv markiertem L-Arginin in L-Citrullin und NO, welche durch die NOS katalysiert wird.

Als Ausgangsmaterial diente Adduktorgewebe, welches zunächst gewichtsabhängig in einer entsprechenden Menge 1:10 verdünntem Homogenisationspuffer gepottet wurde. Es folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt. 1  $\mu$ l dieses Überstandes wurde dann mit 40  $\mu$ l Reaction Mixture vermischt, in welcher unter anderem das radioaktivmarkierte Arginin enthalten war. Als Positivkontrolle wurden 5  $\mu$ l Gewebeextrakt aus Rattencerebellum verwendet, zu denen ebenfalls 40  $\mu$ l Reaction Mixture hinzugefügt wurden. Als Negativkontrolle diente Homogenisationspuffer.

Die Proben wurden anschließend für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA-haltigem Stop Puffer angehalten, da das für die Enzymaktivität erforderliche Calcium durch EDTA gebunden wurde.

Anschließend wurden jeweils 100  $\mu$ l Resin zu den Proben hinzugefügt, bevor diese in Spin Cups überführt wurden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit). Dem Eluat, in welchem das durch die enzymatische Umwandlung der

NOS entstandene Citrullin enthalten war, wurde Szintillationsflüssigkeit zugefügt. Die Messung der Radioaktivität (Counts/Minute) erfolgte mit Hilfe eines Szintillationszählers.

Um eine Aussage über das Verhältnis des noch vorhandenen Arginins und des entstandenen Citrullins treffen zu können, wurden die Spin Cups in neue Eppendorfgefäße überführt und mit je 400 µl Elution Buffer überschichtet. Es wurde wiederum für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Eluat, welches nun Arginin enthielt, wurde ebenfalls mit Szintillationsflüssigkeit vermischt und danach die Radioaktivität ermittelt.

#### **4.9. Statistische Auswertung**

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Innerhalb einer Gruppe erfolgte der Vergleich mit Hilfe des gepaarten T-Tests. Der Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mittels ungepaartem T-Test vorgenommen. Die Varianzanalyse (ANOVA= analysis of variance) mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur erlaubte eine Gegenüberstellung der Daten von drei oder mehr Gruppen.

## 5. Ergebnisse

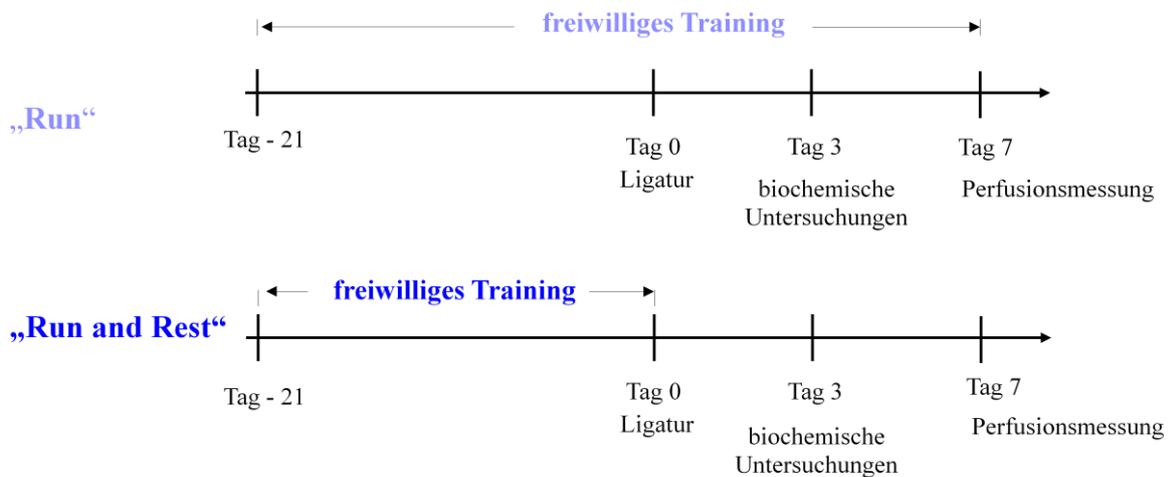
### 5.1. Laufdistanzen

Die am Laufradtraining teilnehmenden Wildtypmäuse („Run“) legten vor Femoralarterienligatur eine Wegstrecke von  $3,04 \pm 1,34$  Kilometern (km) pro 24 Stunden zurück (n=24). Diese verringerte sich nach Verschluss der rechten A. femoralis auf  $0,60 \pm 0,33$  km pro Tag.

Die Versuchstiere der Gruppe „Run and Rest“ bewältigten bis zur Ligatur der Arteria femoralis eine tägliche Laufdistanz von  $3,52 \pm 1,22$  km (n=24) (p=ns im Vergleich zu „Run“). Am selben Tag wurden ihnen die Laufräder entfernt, um weiteres Training zu unterbinden.

Den untersuchten Knockouttieren (-/-) wurden ebenfalls am Tag der Femoralarterienligatur die Laufräder entfernt. Bei eNOS -/- Mäusen ließ sich bis zu diesem Zeitpunkt eine Wegstrecke von  $4,05 \pm 1,45$  km/Tag registrieren (n=7). iNOS -/- Tiere wiesen mit  $4,02 \pm 1,64$  km/Tag ähnliche Reichweiten auf (n=15). (*Abb. 1B*)

## 1 A



**Abb. 1 A:** Versuchstiereinteilung in die Gruppen „Kontrolle“, „Run“ und „Run and Rest“. Die Tiere der beiden letztgenannten Gruppen erhielten je ein Laufrad. Nach 21 Tagen erfolgte bei den Tieren aller Gruppen die Ligatur der rechten A. femoralis. Der Gruppe „Run and Rest“ wurden außerdem an diesem Tag die Laufräder entfernt, wohingegen die Gruppe „Run“ das freiwillige Ausdauertraining, je nach Versuchsziel, noch 3 bzw. 7 weitere Tage fortführte.

## 1 B

	vor Ligatur (km/Tag)	nach Ligatur (km/Tag)
<b>C57Bl6</b>		
Run	3,04	0,6
Run and Rest	3,52	/
<b>eNOS-knockout</b>		
Run and Rest	4,05	/
<b>iNOS-knockout</b>		
Run and Rest	4,02	/

**Abb. 1 B: Laufdistanzen in km/Tag.** Wildtypmäuse legen durchschnittlich eine Wegstrecke von ca. 3 („Run“) bzw. 3,5 km („Run and Rest“) pro Tag zurück. Nach Femoralarterienligatur reduziert sich diese Strecke auf 0,6 km/Tag. eNOS- und iNOS-Knockoutmäuse bewältigen eine Tagesdistanz von ca. 4 km.

## 5.2. Freiwilliges Ausdauertraining stimuliert das Kollateralarterienwachstum

Um zu untersuchen, inwieweit freiwilliges Training das Wachstum präexistenter kollateralarteriöler Anastomosen und damit die Durchblutung des distalen Hinterlaufs nach Femoralarterienligatur beeinflusst, wurden Perfusionmessungen mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrosphären in maximaler Vasodilation durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch. Dabei wurden jeweils die für den rechten ligierten Hinterlauf erhobenen Daten mit denjenigen der unligierten Gegenseite verglichen.

Die Akutperfusion, unmittelbar nach Ligatur der Femoralarterie, resultierte bei den inaktiven Wildtymäusen in einer Perfusionsverminderung auf  $3,5 \pm 0,7\%$  ( $n=8$ ;  $p<0,05$ ).

Präventives Ausdauertraining bis zum Zeitpunkt der Akutperfusion führte im Vergleich dazu zu keiner signifikanten Verbesserung der Perfusion ( $4,0 \pm 0,8\%$ ,  $n=6$ ;  $p=ns$  im Vergleich zu nicht trainierenden Tieren). (*Abb.2A*)

Betrachtet man hingegen die Daten der Mikrosphärenperfusion 7 Tage nach Femoralarterienligatur, so zeigte sich für die nicht am Ausdauertraining teilnehmenden Kontrolltiere eine signifikante Verbesserung der Perfusionswerte ( $34,8 \pm 3,6$ ,  $n=5$ ;  $p<0,05$ ) (*Abb.2B*), verglichen mit denjenigen der akutperfundierte Kontrollen ( $3,5 \pm 0,7\%$ ,  $n=8$ ). (*Abb.2A*)

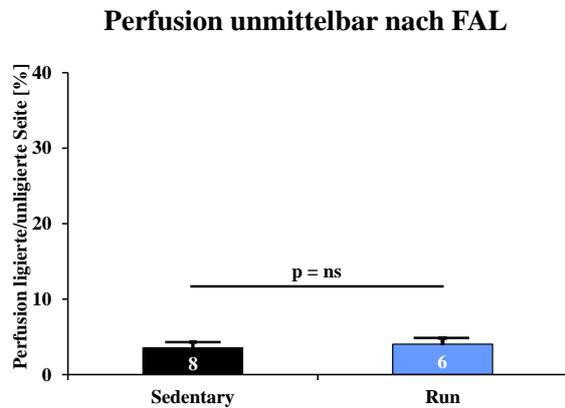
Körperliche Aktivität resultierte in einer signifikanten Stimulation der Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur. Interessanterweise zeigte die Gruppe, die lediglich einer präventiven Intervention im Sinne von Ausdauertraining bis zum Zeitpunkt der Femoralarterienligatur (aber nicht mehr darüber hinaus) unterzogen wurde, eine ähnlich gesteigerte Perfusionswiederherstellung im Sinne einer Stimulation der Arteriogenese („Run and Rest“  $57,4 \pm 4,4\%$ ,  $n=7$ ;  $p<0,001$ ), wie die Gruppe „Run“, welche bis zum Ende des Experiments sportlich aktiv war. ( $52,8 \pm 5,6\%$ ,  $n=5$ ;  $p<0,001$ ) (*Abb.2B*)

Um neben den funktionellen Flussmessungen die Veränderung der Kollateralialisierung im Hinterlauf auch morphologisch quantifizieren zu können, wurden immunhistochemische Färbungen vaskulärer glatter Muskelzellen ( $\alpha$ -smooth muscle-actin) angefertigt. Dieser Zelltyp ist der wichtigste proliferierende Zelltyp im Kollateralarterienwachstum. Anhand dieser ließ sich erkennen, dass freiwilliges Ausdauertraining bei beiden Läufergruppen („Run“  $4325 \pm 517 \mu\text{m}^2$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$ ; „Run and Rest“  $4123 \pm 668 \mu\text{m}^2$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$ ), im

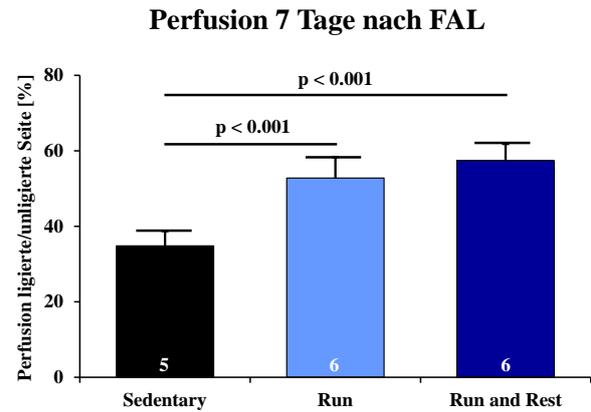
Vergleich zu den ruhenden Kontrollen ( $2615 \pm 394 \mu\text{m}^2$ , n=5), zu einer Flächenzunahme der glatten Gefäßmuskelzellen führt. (*Abb.2D*)

Außerdem resultierte sportliche Aktivität in einer statistisch relevanten Zunahme der Kollateralartiendichte. Die am Ausdauertraining teilnehmenden Versuchstiere („Run“  $16,7 \pm 0,9 \text{ SMC}^+$  - Gefäße pro Schnitt, n=6;  $p < 0,001$ ; „Run and Rest“  $18,3 \pm 1,7 \text{ SMC}^+$  - Gefäße pro Schnitt, n=6;  $p < 0,001$ ) wiesen im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe ( $9,1 \pm 0,9 \text{ SMC}^+$  - Gefäße pro Schnitt, n=5) deutlich mehr Gefäße pro Gewebsschnitt auf. (*Abb. 2E*)

2 A



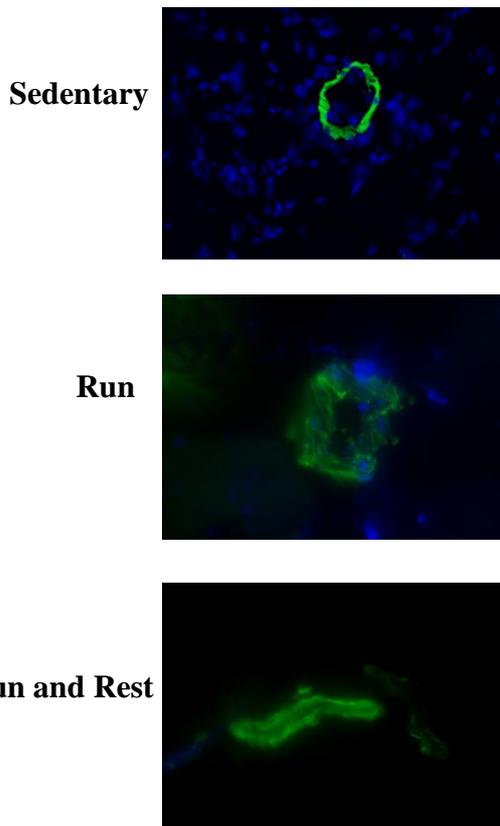
2 B



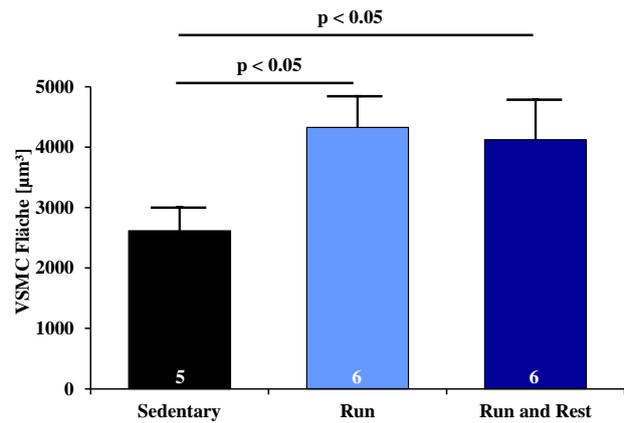
**Abb. 2 A und B: freiwilliges Ausdauertraining stimuliert das Kollateralarterienwachstum.**

A) Präventives 3-wöchiges Ausdauertraining zeigte keinen Effekt auf die Perfusion nach Akutligatur der Femoralarterie (angegeben als Perfusion des ligierten in % des nicht-ligierten Hinterlaufs). Jedoch bewirkte freiwillige körperliche Aktivität eine Stimulation der Perfusionswiederherstellung 7 Tage nach Femoralarterienligatur (B).

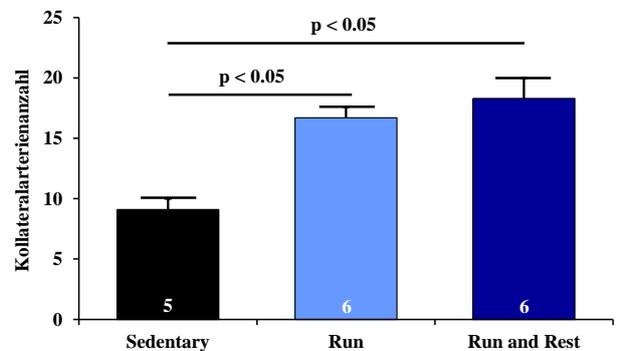
2 C



2 D



2 E



**Abb. 2 C-E: Effekte körperlicher Aktivität auf die Dichte und den Ausprägungsgrad von Kollateralgefäßen in Adduktorgewebe.**

Die Fläche der glatten Gefäßmuskelzellen in Adduktorgewebe ließ sich durch körperliche Aktivität steigern (D). Dies wurde anhand der Aufnahmen immunhistochemisch gefärbter Schnitte (Antikörper gegen glattmuskuläres Actin) von Adduktorgewebe deutlich; die glatte Gefäßmuskulatur stellte sich hierbei grün dar, Zellkerne erschienen blau (C). Die Versuchstiere beider Läufergruppen wiesen zudem eine höhere Kollateralarteriendichte im Adduktorgewebe auf, als die Kontrolltiere (E).

### **5.3. Anzahl und Aktivierungsstatus von Monozyten in peripherem Blut werden durch körperliche Aktivität nicht beeinflusst**

Monozyten spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Arteriogenese, da sie durch Sezernierung bestimmter Zytokine zur Generierung eines entsprechenden inflammatorischen Milieus beitragen. Um beurteilen zu können, inwieweit freiwilliges Ausdauertraining sich sowohl auf die Konzentration sowie die Aktivität der Monozyten- ersichtlich anhand der Modifikationen ihrer Oberflächenmarker- in peripherem Blut auswirkt, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen vorgenommen.

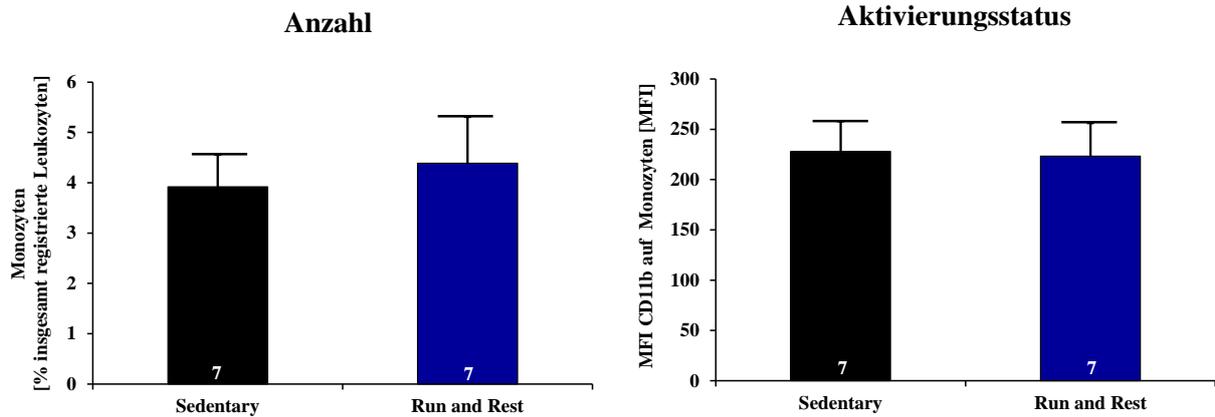
Bezüglich der Anzahl der Monozyten, welche in Prozent der insgesamt registrierten Leukozyten angegeben wird, ließ sich kein Unterschied zwischen den sportlich aktiven Versuchstieren ( $4,39 \pm 0,92\%$ ,  $n=8$ ) und den inaktiven Kontrollen ( $3,92 \pm 0,64\%$ ,  $n=8$ ;  $p=ns$ ) feststellen. (*Abb. 3A*)

Der Aktivierungsstatus der Monozyten wurde durch Zugabe eines gegen den CD11b-Oberflächenrezeptor gerichteten Antikörpers untersucht, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt wurde. CD11b wird als Teil des Mac1 Rezeptors, der bei der monozytären Endotheladhäsion an endotheliales ICAM1 bindet, intrazellulär in Vesikeln vorgehalten und bei Zellaktivierung rasch auf die Membran der Zelle transportiert.

Auch bezüglich der Monozytenaktivität ließ sich keine signifikante Differenz zwischen den Tieren der Gruppe „Run and Rest“ ( $223,26 \pm 33,00 \%$ ,  $n=7$ ) sowie denjenigen der Kontrollgruppe erkennen ( $228,01 \pm 29,97$ ,  $n=7$ ;  $p=ns$ ). (*Abb. 3 B*)

3 A

3 B



**Abb. 3: Durchflusszytometrie zirkulierender Monozyten in peripherem Blut.**

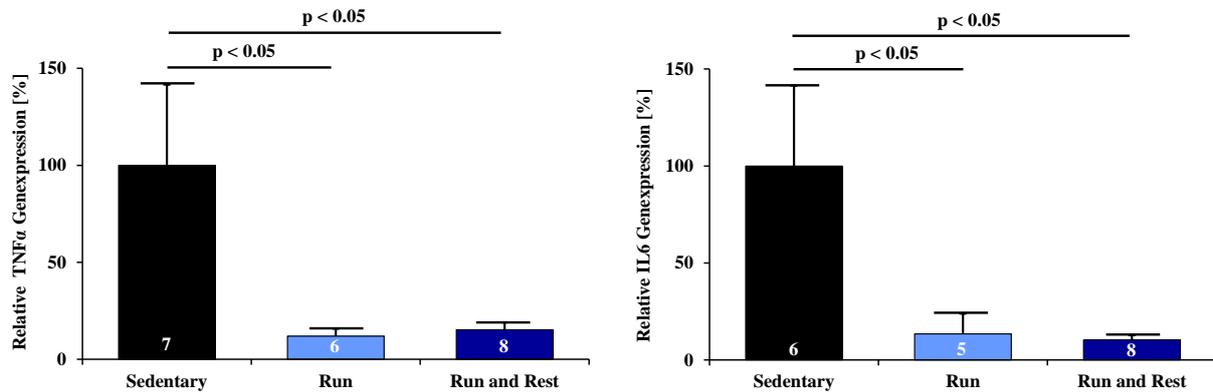
Die Anzahl der Monozyten in peripherem Blut, angegeben in % der insgesamt registrierten Leukozyten, wurde durch freiwilliges Ausdauertraining nicht beeinflusst (A). Die Monozytenaktivität, ermittelt anhand der mittleren Fluoreszenzintensität nach Zugabe eines gegen den CD11b-Oberflächenrezeptor gerichteten Antikörpers, wurde durch körperliche Betätigung ebenfalls nicht verändert (B).

#### **5.4. Ausdauertraining bewirkt Reduktion klassischer Inflammationsparameter in Adduktorgewebe und Milz**

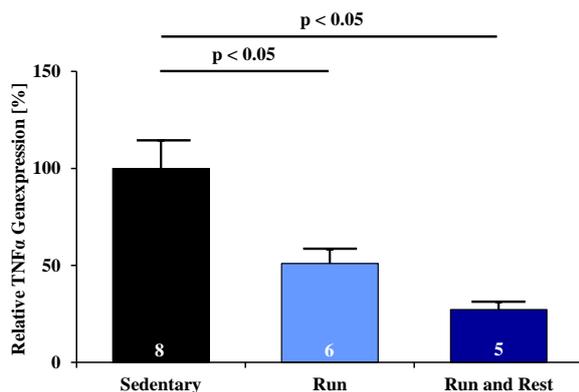
Körperliche Aktivität resultierte in einer signifikanten Reduktion von TNF $\alpha$  in kollateralarterientragendem Adduktorgewebe. Die beiden sportlich aktiven Gruppen („Run“  $11,9 \pm 3,9$  %, n=6; p<0,05; „Run and Rest“  $15,3 \pm 3,8$  %, n=8; p<0,05) wiesen im Vergleich zu den inaktiven Kontrolltieren ( $100 \pm 41,7$  %, n=7) eine deutlich geringere TNF $\alpha$  mRNA-Expression auf. Dieser Befund bestätigte sich auch im Bezug auf das IL6-mRNA Expressionsverhalten in Adduktorgewebe. Die beiden Läufergruppen („Run“  $13,5 \pm 10,4$  %, n=5; p<0,05; „Run and Rest“  $10,4 \pm 2,4$  %, n=8; p<0,05) zeigten auch hier, im Vergleich zu den nicht am Ausdauertraining teilnehmenden Versuchstieren ( $100 \pm 41,5$  %, n=6), eine statistisch relevant verminderte IL6-Expression. (Abb. 4)

Das TNF $\alpha$  Expressionsverhalten wurde ebenfalls anhand von aus Milzen isolierten mononukleären Zellen, welche zusätzlich mit Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden, untersucht. Auch in stimulierten mononukleären Zellen resultierte Ausdauertraining in einer deutlichen Abnahme der TNF $\alpha$  Expression („Run“  $50,9 \pm 11,6$  %, n=6; p<0,05; „Run and Rest“  $27,2 \pm 13,0$  %, n=5; p<0,05), verglichen mit derjenigen der Kontrollgruppe ( $100 \pm 14,3$  %, n=8), was auf eine verminderte inflammatorische Antwort dieser Zellen hinweist.

## 4 A Adduktorgewebe



## 4 B Milz



**Abb. 4: Sportinduzierte Reduktion klassischer Inflammationsparameter in Adduktorgewebe und Milz.**

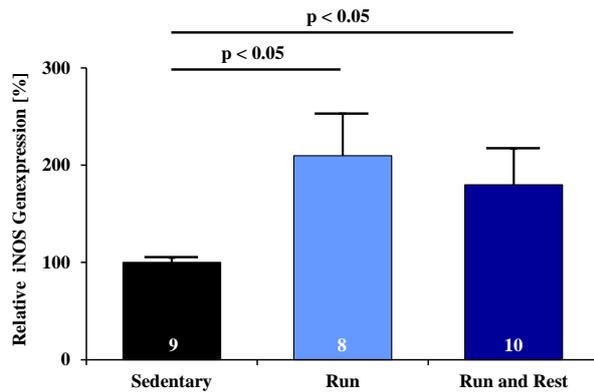
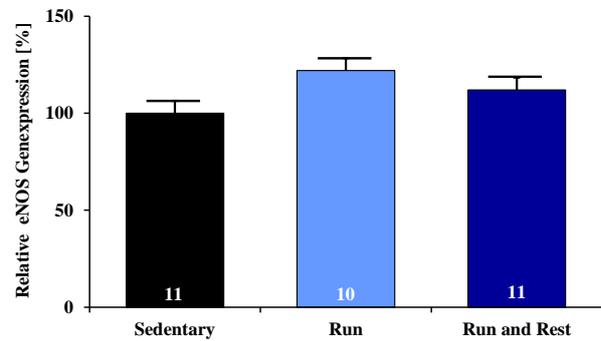
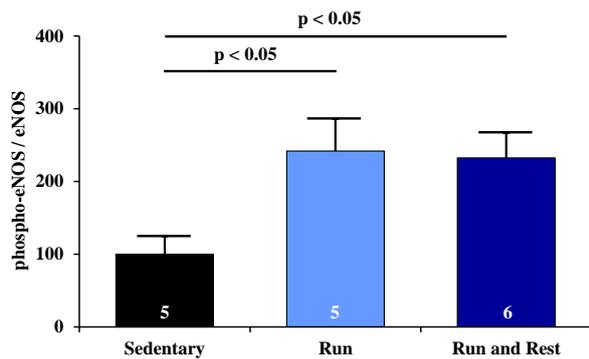
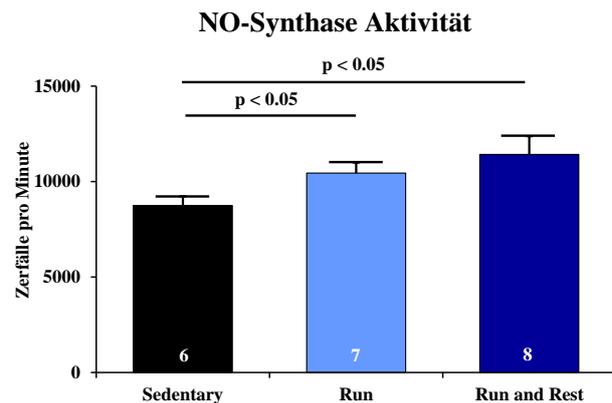
Real-Time-PCR-Untersuchungen des Hinterlaufs zeigten eine verminderte mRNA-Expression von TNF alpha und IL6 durch freiwilliges Ausdauertraining vor Femoralarterienligatur (A). In aus Milzen isolierten und mit Lipopolysacchariden stimulierten mononukleären Zellen resultierte präventives Training ebenfalls in einer Reduktion der TNF alpha RNA-Expression (B).

## **5.5. Ausdauertraining steigert die Bioverfügbarkeit von NO in Adduktorgewebe**

Ausdauertraining steigert durch strukturelle Veränderungen präexistenter Kollateralgefäße die Blutflusskapazität im Skelettmuskelgewebe<sup>65</sup>. Obwohl die zugrunde liegenden Mechanismen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) entscheidend an diesen Vorgängen beteiligt zu sein scheint<sup>121,122</sup>. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe von Real-time-PCR,- und Western-Blot-Untersuchungen überprüft, inwieweit sich die Expression der NO-Synthasen in Adduktorgewebe durch freiwilliges Ausdauertraining modulieren lässt und ob daraus auch eine Konzentrationsveränderung von NO in Muskelgewebe resultiert.

Während sich bei der Gruppe „Run and Rest“ ( $179,9 \pm 36,9\%$ ,  $n=10$ ;  $p=ns$ ), im Vergleich zu den inaktiven Kontrollen ( $100 \pm 4,8\%$ ,  $n=9$ ), ein Trend zur vermehrten iNOS Expression feststellen ließ, zeigten die Tiere der Gruppe „Run“ ( $209,8 \pm 43,1\%$ ,  $n=8$ ;  $p<0,05$ ) einen signifikanten Anstieg der iNOS Genexpression. Im Gegensatz dazu wurde die Genexpression der eNOS durch Ausdauertraining nicht beeinflusst.

Anhand von Western Blot Untersuchungen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass aktive körperliche Betätigung zu einer vermehrten Phosphorylierung und damit Aktivierung des eNOS Proteins in Adduktorgewebe führt. Hierfür wurde der relative Anteil der aktiven Form (peNOS) zur nicht aktivierten Form (eNOS) berechnet („Run“  $241,8 \pm 44,2\%$ ,  $n=5$ ;  $p<0,05$ ; „Run and Rest“  $232,4 \pm 34,2\%$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$  vs. Kontrolle  $100 \pm 24,5\%$ ,  $n=5$ ). Arginin-Citrullin Assays basieren auf der enzymatischen Umwandlung von radioaktiv markiertem L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Diese Reaktion wird durch die NOS katalysiert. Diese Methode ermöglicht eine Quantifizierung der NO-Synthase Aktivität und damit der NO Produktion. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte demonstriert werden, dass freiwilliges Ausdauertraining nicht nur zu einer gesteigerten Expression bzw. Aktivierung der NO-Synthasen führt, sondern, dass hieraus auch eine tatsächliche NO-Konzentrationserhöhung in Adduktorgewebe resultiert. Sowohl die Gruppe „Run“ ( $10445 \pm 554$  counts per minute L-Citrullin,  $n=7$ ;  $p<0,05$ ), als auch die Gruppe „Run and Rest“ ( $11427 \pm 960$  counts per minute L-Citrullin,  $n=8$ ;  $p<0,05$ ) wies im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe ( $8747 \pm 486$  counts per minute L-Citrullin,  $n=6$ ) erhöhte Stickstoffmonoxidwerte auf. (Abb. 5)

**5 A****5 B****5 C****5 D**

**Abb. 5: Ausdauertraining steigert die Bioverfügbarkeit von NO in Adduktorgewebe.**

Freiwilliges Ausdauertraining führte zu einer signifikanten Steigerung der iNOS-Genexpression (A). Die endotheliale NO-Synthase wurde auf mRNA-Ebene nicht vermehrt exprimiert (B), jedoch bewirkte Ausdauertraining eine gesteigerte Phosphorylierung und damit Aktivierung des eNOS-Proteins (C). Sowohl in der Gruppe „Run“, als auch in der Gruppe „Run and Rest“, konnte mit Hilfe des Arginin-Citrullin-Assays eine gesteigerte Aktivität der Stickstoffmonoxid-Synthase nachgewiesen werden, die sich im Vergleich zur Kontrollgruppe in einer signifikant erhöhten NO-Produktion äußerte.

## 5.6. eNOS-defiziente Mäuse weisen deutliche Einschränkungen der Perfusionswiederherstellung auf

Knockoutmäuse stellen durch die Möglichkeit ein oder mehrere Gene gezielt ausschalten zu können, ein ideales Modell dar, um die Funktion der betreffenden Gene im Organismus zu ermitteln und daraus neue Behandlungsansätze abzuleiten. Um die Bedeutung der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase im Rahmen der Arteriogenese zu eruieren, wurden Untersuchungen an eNOS- bzw. iNOS-defizienten Mäusen (eNOS  $-/-$ , iNOS  $-/-$ ) vorgenommen.

Nach Akutligatur der rechten Femoralarterie wiesen inaktive eNOS  $-/-$  Mäuse ( $3,5 \pm 0,7\%$ ,  $n=6$ ) ähnlich schlechte Perfusionsergebnisse auf, wie die ebenfalls inaktiven Wildtypiere ( $3,5 \pm 0,7\%$ ,  $n=8$ ). (Abb. 6A) Auch eine Woche nach Verschluss der Femoralarterie ließ sich anhand von Perfusionsuntersuchungen nicht trainierender eNOS  $-/-$  Mäuse ( $4,0 \pm 0,9\%$ ,  $n=6$ ;  $p=ns$ ) keine Verbesserung der Durchblutungsverhältnisse erkennen.

Präventives Ausdauertraining bewirkte bei eNOS  $-/-$  Tieren („Run and Rest“  $8,0 \pm 0,8\%$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$ ), im Gegensatz zu den sportlich inaktiven eNOS  $-/-$  Kontrollen ( $4,0 \pm 0,9\%$ ,  $n=6$ ), jedoch eine signifikante Stimulation der Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur. Diese erfolgte allerdings in sehr viel geringerem Ausmaß als in der Vergleichsgruppe der Wildtypmäuse. (Abb. 6B) (Vgl. Abb. 2B)

Die inaktivem iNOS  $-/-$  Mäuse ( $31,2 \pm 4,5\%$ ,  $n=6$ ) hingegen wiesen nach Ligatur der A. femoralis ähnlich gute Perfusionsergebnisse auf, wie die mit ihnen in der Behandlung übereinstimmenden Wildtypiere ( $37,4 \pm 1,7\%$ ,  $n=5$ ) (Abb. 6C und Abb. 2B)

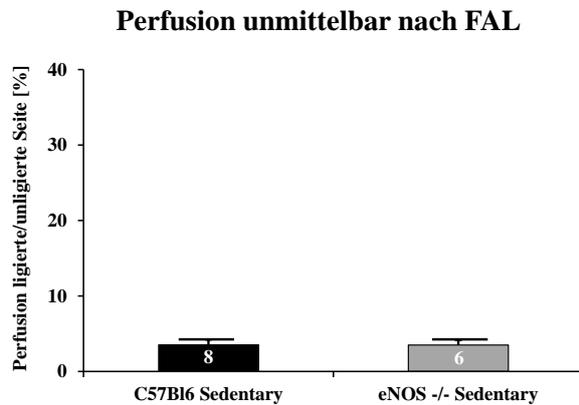
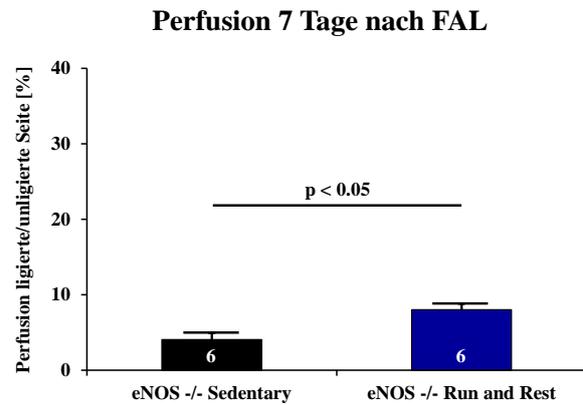
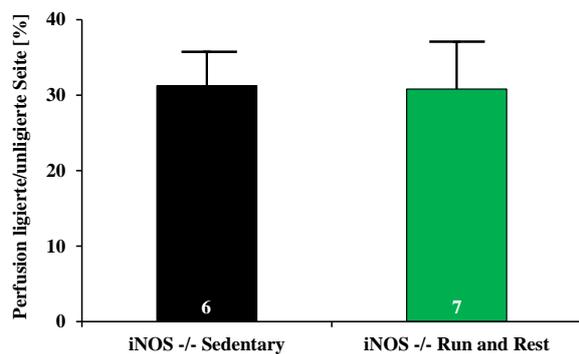
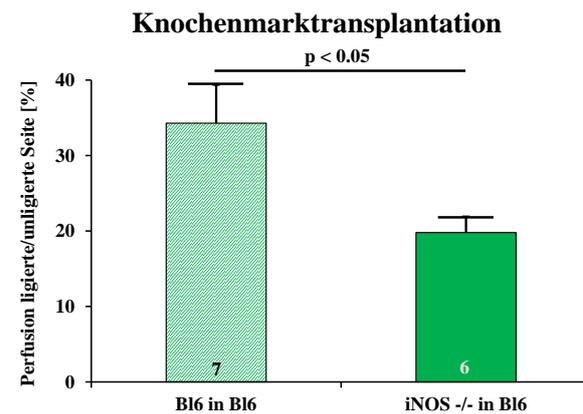
Durch präventives Training ließ sich bei iNOS  $-/-$  Mäusen ( $30,8 \pm 6,2\%$ ,  $n=7$ ) im Vergleich zu ihren inaktiven Kontrollen ( $31,2 \pm 4,5\%$ ,  $n=6$ ) jedoch keine Stimulation der Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur erzielen. (Abb. 6C)

### **5.7. Zirkulierende Zellen als Ursprung der iNOS?**

Um darüber hinaus zu evaluieren, woher die induzierbare NO-Synthase stammt, welche im Rahmen der Arteriogenese eine relevante Rolle zu spielen scheint, wurden Untersuchungen an Knochenmarktransplantieren Mäusen durchgeführt.

Wildtypiere, denen nach myeloablativer Bestrahlung Knochenmark (KM) von iNOS  $-/-$  Mäusen transplantiert wurde ( $19,8 \pm 2,1\%$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$ ), zeigten nach Femoralarterienligatur signifikant schlechterer Perfusionsergebnisse als ihre Vergleichsgruppe ( $34,3 \pm 5,1\%$ ,  $n=7$ ). Hierfür dienten Wildtypmäuse, denen KM anderer Wildtypiere transplantiert wurde (*Abb. 6D*).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die für die Stimulation des Kollateralarterienwachstums relevante iNOS zirkulierenden mononukleären Zellen entstammt.

**6 A****6 B****6 C****6 D**

**Abb. 6: Einfluss der eNOS und iNOS auf das Kollateralarterienwachstum.**

Nach Akutligatur wiesen eNOS -/- Mäuse eine ähnlich geringe Perfusion wie die Wildtypiere auf (A). Präventives Ausdauertraining bewirkte bei den eNOS Knockouttieren eine Stimulation der Perfusionswiederherstellung 7 Tage nach Femoralarterienligatur, jedoch in sehr viel geringerem Ausmaß als in der Vergleichsgruppe der Wildtypmäuse (B) (siehe auch Abb. 2 B).

Sportliche Aktivität führte bei iNOS -/- Tieren nicht zu einer Stimulation der Perfusionswiederherstellung nach Femoralarterienligatur (C). Wildtypmäuse, denen nach Bestrahlung Knochenmark von iNOS-Knockoutmäusen transplantiert wurde, zeigten nach Ligatur der A. femoralis signifikant schlechtere Perfusionsergebnisse, als ihre Vergleichsgruppe. Hierfür dienten Wildtypmäuse, denen Knochenmark anderer Wildtypiere transplantiert wurde (D).

## **5.8. Ausdauertraining vermindert TNF $\alpha$ und steigert iNOS in humanem mononukleären Zellen**

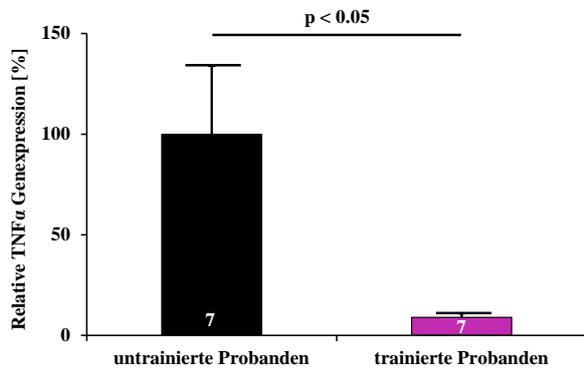
Um zu überprüfen, inwiefern sich die bisherigen Ergebnisse der tierexperimentellen Versuche auf den Menschen übertragen lassen, wurden auch Untersuchungen an humanen Blutproben vorgenommen. Hierfür wurden 10 junge gesunde männliche und weibliche sportlich inaktive Probanden rekrutiert. Diese wurden in eine Trainingsstudie eingeschlossen, die vorsah, dass über einen Zeitraum von 3 Monaten dreimal wöchentlich ein protokollarisch vorgegebenes Lauftraining zu absolvieren war.

**(siehe Abschnitt 4.2. Trainingsprotokoll der Sportler)**

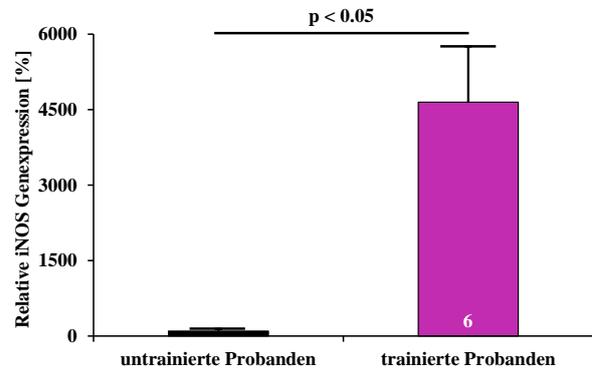
In Real-time PCR Untersuchungen von aus Citratblut isolierten mononukleären Zellen wurde deutlich, dass sich durch freiwilliges Training, bei zuvor sportlich inaktiven Probanden („untrainiert“  $100 \pm 34\%$ ,  $n=7$ ), eine signifikante Reduktion des klassischen Inflammationsparameters TNF $\alpha$  erzielen lässt („trainiert“  $9 \pm 2\%$ ,  $n=7$ ;  $p<0,05$ ).

Auch der im Tiermodell erhobene Befund, dass körperliche Aktivität in einer Erhöhung der iNOS Genexpression resultiert, fand Bestätigung durch die anhand von humanen zirkulierenden mononukleären Zellen erhobenen Daten. Die Analyse der RNA-Expression mononukleärer Zellen nach Absolvierung des vorgegebenen dreimonatigen Trainingsprogramms („trainiert“  $4651 \pm 1109\%$ ,  $n=6$ ;  $p<0,05$ ) ließ, im Gegensatz zu den Untersuchungen zu Studienbeginn („untrainiert“  $100 \pm 41\%$ ,  $n=8$ ), eine signifikant gesteigerte iNOS Expression erkennen.

7 A



7 B



**Abb. 7: Körperliches Training reduziert TNF $\alpha$  und steigert die iNOS Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen von gesunden Probanden**

Gesunde junge sportlich inaktive Probanden wurden in eine Trainingsstudie aufgenommen. Diese sah vor, dass über einen Zeitraum von 3 Monaten dreimal wöchentlich ein protokollarisch fest vorgeschriebenes Lauftraining abzuleisten war. Untersuchungen der mononukleären Zellen der Probanden ergaben, dass besagtes Ausdauertraining in einer signifikanten Reduktion der TNF $\alpha$  mRNA-Expression resultiert (A). Die iNOS Expression hingegen wurde durch die körperliche Aktivität signifikant gesteigert (B).

## 6. Diskussion

Die Arbeit zeigt, dass freiwilliges körperliches Training in einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine resultiert. Das Kollateralarterienwachstum wird auf eine Stickstoffmonoxid-abhängige Art und Weise gefördert. Dies wird zum einen durch Stimulation der induzierbaren NO-Synthase, bevorzugt in zirkulierenden mononukleären Zellen erreicht, die zu einer gesteigerten iNOS mRNA Expression führt; daneben spielt auch die vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung des eNOS Proteins eine wichtige Rolle. Die Studie verdeutlicht darüber hinaus das mit einem körperlich inaktiven Lebensstil verbundene vaskuläre Risiko und betont den Nutzen von freiwilligem Ausdauertraining als effektive präventive Maßnahme, um Gefäßwachstum zu verbessern.

### **6.1. Präventives freiwilliges Ausdauertraining stimuliert das Kollateralarterienwachstum und steigert die vSMC Fläche in kollateralarterientragendem Adduktorgewebe**

Freiwilliges, über einen Zeitraum von 3 Wochen durchgeführtes Ausdauertraining resultiert unseren Experimenten zufolge nicht in einer Verbesserung der kollateralarterienabhängigen Durchblutung nach Akutligatur der Femoralarterie. Präventive körperliche Aktivität scheint demnach in gesunden Mäusen das Wachstum präexistenter Kollateralen in ihrem „funktionellen Ruhezustand“ nicht zu fördern<sup>101</sup>.

Im Unterschied hierzu haben Prior et al sowie Yang et al schon unmittelbar nach FAL einen signifikanten Perfusionsanstieg in der Präventivsportgruppe gemessen<sup>84,135</sup>. Für diese Diskrepanzen können verschiedene Gründe als ursächlich angesehen werden. Während in unseren Experimenten die Perfusion mit Microsphären unmittelbar nach FAL unter maximaler Vasodilatation durchgeführt wurde, um den kollateralarterienabhängigen Blutfluss zu ermitteln, beziehen sich die von Yang et al erhobenen Daten auf die ca. 5 Stunden nach FAL und unter Exercise-Bedingungen vorherrschenden Zustände. Darüber hinaus wurden unsere Untersuchungen an Bl6 Wildtypmäusen vorgenommen, wohingegen die andere Arbeitsgruppe Ratten untersuchte, sodass wohlmöglich auch speziesspezifische Differenzen als ursächlich für die unterschiedlichen Ergebnissen angesehen werden können.

In der Literatur herrscht Uneinigkeit darüber, ob der gesteigerten Leitfähigkeit der Kollateralarterien bei körperlich aktiven Versuchstieren strukturelle Umbauvorgänge und/oder ein veränderten Vasomotortonus dieser Gefäße zugrunde liegen <sup>135</sup>. Die vorteilhaften, durch präventives Ausdauertraining induzierten Effekte, scheinen Yang et al zufolge jedoch vor allem auf einer verbesserten vasodilatatorischen Reserve der Kollateralen zu beruhen <sup>135</sup>. Ausdauertraining resultiert vermutlich durch den täglichen Anstieg des Blutflusses über die Iliacalgefäße und deren Verzweigungen in einem gesteigerten Potenzial der Kollateralgefäße für eine endothelvermittelte Vasodilatation <sup>136</sup>. Diese günstigen, durch präventiven Sport induzierten Effekte, scheinen laut Prior et al auf einem durch eNOS vermittelten Prozess zu beruhen. Der durch freiwilliges Ausdauertraining erzielte Anstieg der kollateralarteriellen Leitfähigkeit wurde in Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe durch eine Hemmung der eNOS mittels L-Nitro-Arginine Methyl Ester (L-Name) aufgehoben und auf gleiche Werte, wie in der sessilen Kontrollgruppe reduziert <sup>84</sup>.

In unseren Experimenten resultierte körperliche Aktivität allerdings in einer Stimulation der Perfusionswiederherstellung NACH Femoralarterienligatur. Interessanterweise konnten wir diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe, welche nur freiwilliges Ausdauertraining bis zur FAL im Sinne einer Prävention betrieb („Run and Rest“) und derjenigen Gruppe, die auch darüber hinaus bis zum Ende des Experiments („Run“) sportlich aktiv war, feststellen. Demzufolge scheinen die günstigen durch freiwilliges Training vermittelten Effekte bereits bis zum Zeitpunkt der Gefäßokklusion ihre Wirkung auf die präexistenten Kollateralen zu entfalten. Und eine Fortführung des Ausdauertrainings über die FAL hinaus scheint, im Beobachtungszeitraum von sieben Tagen, zu keiner weiteren Verbesserung der Durchblutungsverhältnisse beizutragen.

Die Tatsache, dass der kollateralarterienabhängige Blutfluss erst nach FAL eine signifikante Verbesserung erfährt, legt zudem die Vermutung nahe, dass die Gefäßokklusion einen Schlüsselreiz darstellt, welcher die nachfolgenden Veränderungen erst in Gang zu setzen scheint. Diese Vermutung stellten auch Prior et al auf. Diese Arbeitsgruppe konnte anhand ihrer Experimente nachweisen, dass die exogene Applikation von proarteriogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF erst nach FAL zu einem Anstieg des Flusses über die Kollateralen führt und demnach die Gefäßokklusion als solche die nativen Kollateralen zu sensibilisieren scheint und es ihnen dadurch erst ermöglicht, die durch VEGF induzierten Signalkaskaden zu initiieren <sup>84</sup>.

Unklar bleibt darüber hinaus, ob auch für die Umsetzung der günstigen durch präventiven Sport vermittelten Effekte an den Kollateralen primär die Okklusion des entsprechenden Konduktanzgefäßes erforderlich ist. Aus diesem Grund stellt sich auch die Frage, ob der von Yang et al sowie von Prior et al beobachtete Anstieg des kollateralarterienabhängige Blutflusses unmittelbar nach FAL tatsächlich durch die präventive körperliche Aktivität bedingt wird, oder ob diese Veränderungen nicht eher als Folge der durch die Gefäßokklusion induzierten Endothelaktivierung und den dadurch in Gang gesetzten Mechanismen anzusehen ist. Körperliches Training führt zwar zu einer gesteigerten Expression der eNOS in den Kollateralgefäßen, jedoch ist fraglich, ob dieser Stimulus von der Intensität her ausreichend ist, oder es eines stärkeren Reizes in Form der FAL bedarf, um einen signifikanten Anstieg des FSS in den Kollateralen und damit eine signifikante Stimulation der eNOS Expression zu erzielen <sup>84</sup>. Letztere scheint wichtig für die Vermittlung der günstigen durch freiwilliges Ausdauertraining induzierten Effekte zu sein.

Auch die inaktive Kontrollgruppe zeigt einen signifikanten Anstieg des kollateralarterienabhängigen Blutflusses nach FAL, was darauf hindeutet, dass neben den durch Ausdauersport induzierten Mechanismen noch andere Vorgänge stattzufinden scheinen, die nach Gefäßokklusion zu einer Durchblutungsverbesserung des poststenotischen Gewebes beitragen. Prior et al äußerten die Vermutung, dass die maximale radiale Größenausdehnung der Kollateralgefäße, unabhängig von der endothelvermittelten Dilatation, endgültig nur mit der Zeit realisiert zu werden kann <sup>84</sup>. Diesen Veränderungen liegen zelluläre Anpassungsreaktionen zugrunde, die auf einem veränderten Genexpressionsmuster basieren, und folglich eine gewisse Zeit in Anspruch nehmen, um realisiert zu werden <sup>62</sup>.

Freiwilliges Ausdauertraining führt, unseren Ergebnissen zu folge, darüber hinaus zu einer Flächenzunahme der vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen im kollateralarterientragenden Adduktorgewebe. Auch hier kann durch die Fortführung der körperlichen Aktivität über die FAL hinaus (Run), innerhalb einer Woche keine weitere Flächenzunahme der vSMC's erzielt werden. Der registrierten Flächenzunahme liegt eine gesteigerte Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen zugrunde, die den wichtigsten Schritt im Rahmen der Arteriogenese darstellt. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich ebenfalls durch den Exercise-induzierten eNOS/NO Anstieg vermittelt. Diese scheinen die Expression eines Gennetzwerkes zu steuern, welches die Zellzyklus-Kontrollpunkte reguliert, die wiederum entscheidend an der Zellproliferation während des kollateralarteriellen Remodelings beteiligt sind <sup>26</sup>.

Zudem zeigen die beiden aktiven Gruppen in den von uns durchgeführten Experimenten auch eine signifikant höhere Kollateralarteriendichte im Adduktorgewebe auf, als die ruhenden Kontrolltiere. Die eigentliche Anzahl der Kollateralgefäße dürfte durch das Ausdauertraining nicht beeinflusst werden. Diesem Effekt liegt wohlmöglich eher die Tatsache zugrunde, dass kleinste Kollateralgefäße durch körperliche Aktivität zu einer Expansion, sowie einer Proliferation intramuraler Zellen veranlasst werden und durch diese Größenzunahme in histologischen Untersuchungen überhaupt erst registriert werden können. Zwar ist es ebenfalls die eNOS, die entscheidend am Erhalt der nativen Kollateralarteriendichte bis ins Erwachsenenalter beteiligt ist, jedoch scheint kein Zusammenhang zwischen der durch Sport induzierten Steigerung der eNOS Expression und einer Zunahme der Kollateralarteriendichte zu bestehen <sup>26</sup>.

## **6.2. Freiwilliges Training führt zu einer gesteigerten iNOS Expression in zirkulierenden mononukleären Zellen und stimuliert die eNOS Aktivierung**

Aufgrund der hohen Bedeutung der NO-Synthasen/NO bei der Vermittlung der günstigen, durch freiwilliges Ausdauertraining induzierten Veränderungen im Rahmen der Arteriogenese, sollte deren Einfluss anhand von Untersuchungen an kollateralarterientragendem Adduktorgewebe näher eruiert werden.

In den von uns durchgeführten Experimenten resultierte präventives Training in einem signifikanten Anstieg der iNOS mRNA Expression. eNOS hingegen wurde auf mRNA-Ebene nicht vermehrt exprimiert, jedoch konnte eine gesteigerte Phosphorylierung und damit Aktivierung des eNOS Proteins durch körperliche Aktivität nachgewiesen werden.

Der trainingsinduzierte Anstieg der laminaren Scherkräfte (fluid shear stress, FSS) führt zu einer Aktivierung der endothelialen NADPH Oxidase und resultiert dadurch in einer gesteigerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies <sup>27,56</sup>. Dieser Anstieg des vaskulären oxidativen Stresses scheint jedoch nur durch akute und extensive körperliche Belastung ausgelöst und auch nur transient zu sein, da hierbei nur wenig Zeit für zelluläre Anpassungsreaktionen bleibt, die auf einem veränderten Genexpressionsmuster basieren <sup>62</sup>. Das durch die NADPH Oxidase gebildete Superoxid wird schnell durch Superoxiddismutasen (SOD) zu Hydrogenperoxid konvertiert <sup>63</sup>. Letzteres steigert wiederum die Expression und Aktivierung der eNOS durch Phosphorylierung mit Hilfe der Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II/Januskinase II <sup>31,14,3</sup>. Das durch die eNOS gebildete NO scheint seinerseits, durch die

Formation reaktiver Sauerstoffspezies, zu einer redox-sensitiven Aktivierung der iNOS Gentranskription und Expression zu führen<sup>11</sup>. Die durch körperliche Aktivität bedingte Steigerung der iNOS Expression scheint folglich einem Regulationsmechanismus zu unterliegen, welcher einer gesteigerten eNOS Aktivierung bedarf. Letztere hängt vermutlich entscheidend vom Ausmaß des oxidativen Stresses ab. Während milder oxidativer Stress die Phosphorylierung begünstigt, wird sie durch eine zu hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies gehemmt<sup>118</sup>. Außerdem kommt es während der Umbauvorgänge im Rahmen der Arteriogenese zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers und einem konsekutiven Abfall des FSS, der wiederum in einer verminderten Aktivierung der NADPH Oxidase und folglich geringerem vaskulärem oxidativem Stress resultiert. Somit scheint Langzeittraining mit einem anderen Genexpressionsmuster vergesellschaftet zu sein, als kurz- oder mittelfristig durchgeführtes Ausdauertraining<sup>62</sup>.

Unseren Experimenten zufolge scheint vor allem die iNOS für die Umsetzung der durch körperliche Aktivität induzierten Veränderungen an den Kollateralgefäßen von Bedeutung zu sein, wie wir anhand von Untersuchungen an Knockoutmäusen feststellen konnten.

Sessile iNOS -/- Mäuse zeigten nach FAL zwar ähnlich gute Perfusionsergebnisse auf, wie die mit ihnen in der Behandlung übereinstimmenden Wildtypiere. Präventives Ausdauertraining führte bei iNOS -/- Tieren, im Vergleich zu den ruhenden iNOS -/- Kontrolltieren, jedoch zu keiner Verbesserung der kollateralarteriolen Leitfähigkeit nach FAL. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass für die Umsetzung der vorteilhaften durch freiwilliges Ausdauertraining induzierten Veränderungen an den Kollateralgefäßen ein intaktes iNOS Expressionsvermögen erforderlich ist.

Sportlich aktive eNOS -/- Mäuse allerdings wiesen, im Gegensatz zu den iNOS -/- Tieren, eine geringe, aber signifikante Stimulation der Perfusionswiederherstellung nach FAL auf, wenn auch in geringerem Ausmaß als in der Vergleichsgruppe der Wildtypiere. Als Erklärung hierfür könnte die bei den eNOS -/- Mäusen intakte Möglichkeit der iNOS Expression angesehen werden, die offensichtlich auch, ohne vorherige Aktivierung durch die eNOS, vermehrt exprimiert werden kann, wenn auch scheinbar in geringerem Ausmaß, als in der Vergleichsgruppe der Wildtypieren. Diese Vermutung der eNOS-unabhängigen iNOS Aktivierung findet Bestätigung durch die von Sharp et al erhobenen Daten, dass auch eNOS -/- Tieren zur iNOS Expression fähig sind<sup>108</sup>.

Die Arbeitsgruppe von James Faber beschreibt bei eNOS  $-/-$  Mäusen zudem einen größeren Abfall des Flusses über die Kollateralen nach Akutligatur, im Vergleich zu den Wildtyptieren<sup>26</sup>. Dies könnte für eine geringere Dichte und/oder geringere Durchmesser der nativen Kollateralen im murinen Hinterlauf sprechen, wohingegen ein geringerer Blutfluss in der darauffolgenden Zeit eher auf ein eingeschränktes kollateralarterioläres Remodeling bei eNOS  $-/-$  Tieren hinzudeuten scheint<sup>26</sup>. Die geringere Kollateralarteriendichte beruht allerdings nicht auf einer Störung der embryonalen Bildung oder Reifung der nativen Kollateralen bei eNOS  $-/-$ . Die eNOS spielt vielmehr eine wichtige Rolle für den Erhalt der nativen Kollateralen bis ins Erwachsenenalter<sup>26</sup>.

Die Verbesserung der kollateralarterienabhängigen Durchblutung nach FAL bei sessilen iNOS  $-/-$  Mäusen, im Gegensatz zu den sessilen eNOS  $-/-$  Tieren, lässt sich wohlmöglich durch die Tatsache erklären, dass die nach FAL stattfindenden Veränderung vermutlich hauptsächlich durch die eNOS vermittelt werden.

Auch in den von Xuming Dai et al erhobenen Daten weisen eNOS  $-/-$  Mäuse, im Vergleich zu den Wildtyptieren, nach FAL schlechtere Perfusionsergebnisse auf. Diese beruhen der Arbeitsgruppe zufolge auf einem verminderten kollateralarteriolären Remodeling, in Verbindung mit einer eingeschränkten flussvermittelten Vasodilatation sowie einer eingeschränkten Proliferation vaskulärer SMCs bei diesen Tieren<sup>26</sup>. Für die Umsetzung eben dieser Effekte ist wahrscheinlich die eNOS von erheblicher Bedeutung. Darüber hinaus verfügen eNOS  $-/-$  Tiere zwar über ein ähnliches Genexpressionsprofil bezüglich der Chemokine/Zytokine und Inflammation wie Wildtypmäuse, allerdings kommt es bei ihnen nur zu einer geringeren Aktivierung des Zellzyklus-Gennetzwerks und folglich zu einer geringeren Anzahl proliferierender Zellen in den Kollateralen, sodass die für die Arteriogenese so bedeutende Proliferation der vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen bei diesen Tieren deutlich eingeschränkt ist<sup>26</sup>.

Interessanterweise zeigen unsere Experimente, dass neben der für die Vasodilatation erforderlichen Grundvoraussetzung einer vorhandenen eNOS Aktivität, vor allem die Steigerung der iNOS-Expression für die Vermittlung der günstigen durch präventives Ausdauertraining induzierten Effekte auf das Kollateralarterienwachstum verantwortlich ist. Die zugrunde liegenden biochemischen sowie physiologischen Vorgänge sind bisher jedoch nur unzureichend verstanden und bedürfen daher weitergehenden Nachforschungen.

Aufgrund der scheinbar erheblichen Bedeutung der iNOS für die Vermittlung der positiven durch Exercise induzierten Effekte auf die Arteriogenese wurden unsererseits Experimenten an Knochenmarkstransplantierten Mäusen durchgeführt, um zu eruieren, welchen Ursprungs die iNOS ist.

Wildtypmäuse, denen nach myeloablativer Bestrahlung Knochenmark (KM) von iNOS -/- Mäusen appliziert wurde, zeigen deutlich schlechtere Perfusionsergebnisse, als die B16 Kontrollen, denen KM anderer Wildtypiere transplantiert wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass die lokal im Gewebe benötigte iNOS von einer Expression durch zirkulierende Zellen abhängig ist. Diese Zellen entstammen dem KM und werden auf entsprechende Stimuli hin in die Zirkulation freigesetzt und zur iNOS Synthese angeregt. Prinzipiell sind fast alle Körperzellen zur iNOS Bildung fähig<sup>43</sup>. Im menschlichen Organismus wird die iNOS jedoch hauptsächlich durch immunkompetente Zellen, wie Monozyten exprimiert<sup>8,69,128,130</sup>. Letztere sind demnach wahrscheinlich die entscheidenden Protagonisten im Rahmen der Exercise-induzierten Stimulation der Arteriogenese, vermutlich bereits durch ihre Funktionsbeeinflussung VOR Femoralarterienligatur.

### **6.3. Körperliche Betätigung führt zur verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine in Adduktorgewebe und Milz**

Unsere Experimente zeigen, dass präventives Ausdauertraining in einer verminderten Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL6 in kollateralarterientragendem Adduktorgewebe resultiert. Eine Fortführung des Trainings über die FAL hinaus führt allerdings zu keiner weiteren Verminderung besagter Parameter. Demzufolge scheinen die günstigen, durch freiwillige körperliche Aktivität vermittelten Effekte auf das perivaskuläre inflammatorische Milieu bereits bis zum Zeitpunkt der Gefäßokklusion ihre Wirkung zu entfalten.

Der Einfluss von freiwilligem Ausdauertraining auf die Zytokinexpression wurde zudem anhand von aus Milzen isolierten und mit LPS stimulierten mononukleären Zellen untersucht, wodurch eine gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine erzielt werden sollte. Die Milz fungiert als wichtiger Speicherort für Monozyten, von wo aus diese auf entsprechende Stimuli hin, wie beispielsweise im Rahmen von Entzündungsreaktionen, in die Zirkulation freigesetzt werden. Präventives Ausdauertraining resultiert auch bei aus Milzgewebe isolierten mononukleären Zellen in einer signifikanten Reduktion der TNF $\alpha$  Expression. Eine

Fortsetzung der sportlichen Aktivität über die FAL hinaus führt auch hier zu keiner weiteren Beeinflussung des besagten Parameters.

Die von Monozyten/Makrophagen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der Arteriogenese. So generiert  $\text{TNF}\alpha$  das notwendige lokale inflammatorische Milieu, in welches durch MCP-1 weitere Monozyten angelockt und zur Sezernierung weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren angehalten werden<sup>12</sup>.  $\text{TNF}\alpha$  stimuliert zudem die Arteriogenese via des Rezeptors p55 und der dadurch induzierten Signalkaskade<sup>102,52</sup>. Im Gegensatz dazu wirkt eine zu hohe Konzentration inflammatorischer Zytokine, v.a. die des  $\text{IFN}\beta$  Signalwegs, hemmend auf das Kollateralarterienwachstum<sup>100,104</sup>.

Eine zu hohe Konzentration proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. von  $\text{TNF}\alpha$ , führt zudem zur Instabilität atherosklerotischer Plaques und inflammatorischem Schaden der arteriellen Gefäßwand<sup>112</sup>. Darüber hinaus sind proinflammatorische Zytokine vermutlich ebenfalls an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt, in dem diese zu einer gesteigerten Produktion freier Sauerstoffradikale beitragen, die in einer verminderten Halbwertszeit der mRNA der NO-Synthasen und/oder der Zerstörung des vom Endothel gebildeten NOs resultieren, bzw. sie die Apoptose endothelialer Zellen durch oxidativen Stress induzieren<sup>34</sup>. Die endotheliale Dysfunktion wiederum ist als ursächlich für die eingeschränkte Entwicklung der Kollateralgefäße im Rahmen der Arteriogenese anzusehen<sup>83</sup>.

Präventives Ausdauertraining trägt unseren Ergebnissen zufolge jedoch zu einer Reduktion proinflammatorischer Zytokine bei. Hierbei sollte jedoch erwähnt werden, dass (starke) sportliche Aktivität mehreren Studien zufolge initial in einer vorübergehenden proinflammatorischen Reaktion resultiert, wohingegen über einen längeren Zeitraum durchgeführtes Ausdauertraining schließlich einen antiinflammatorischen Effekt aufweist<sup>57</sup>. Beginnende körperliche Aktivität führt, durch den damit einhergehenden Anstieg des FSS, und die konsekutive Aktivierung der endothelialen NADPH Oxidase, zu vorübergehendem gesteigertem vaskulären oxidativen Stress, da nur wenig Zeit für zelluläre Anpassungsreaktionen bleibt, die auf einer veränderten Genexpression basieren<sup>27,62</sup>. Oxidativer Stress wiederum scheint als proinflammatorischer Stimulus zu fungieren, sodass es initial vermutlich u.a. zur gesteigerten Expression von IL6 und  $\text{TNF}\alpha$  durch körperliche Aktivität kommt<sup>39</sup>.

Langzeittraining hingegen führt zu einer Dominanz des Parasympathikotonus und resultiert dadurch in einer verminderten Zytokinfreisetzung durch Monozyten, in dem das durch den

Nervus vagus freigesetzte Acetylcholin (ACh) eine cholinerge antiinflammatorische Signalkaskade initiiert <sup>129</sup>. Außerdem kommt es durch gesteigerten FSS, im Rahmen von körperlicher Aktivität, zur vermehrten eNOS Expression <sup>84</sup>. Das durch die eNOS gebildete NO fungiert zum einen selbst als Radikalfänger und steigert zusätzlich die SOD Expression durch glatte Gefäßmuskelzellen (vascular smooth muscle cells, vSMCs), wodurch der lokale oxidative Stress vermindert wird <sup>36</sup>.

Vermutlich liegt zudem ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen dem Ausmaß der körperlichen Fitness und der Konzentration inflammatorischer Marker vor <sup>68,38,73,93,32</sup>. Darüber hinaus scheint die Ausgangsfitness zu Studienbeginn von Bedeutung zu sein, da laut Kojda et al die durch körperliche Aktivität bedingten günstigen Effekte bei zuvor sportlich inaktiven Individuen von größerem Ausmaß sind <sup>62</sup>.

Präventives Ausdauertraining trägt, unseren Ergebnissen zufolge, durch die verminderte Expression proinflammatorischer Zytokine, zu einer günstigen Beeinflussung des perivaskulären inflammatorischen Milieus bei, was durch eine positive Beeinflussung der Endothelfunktion zu einem verbesserten arteriogenen Potential nach Gefäßokklusion führt. Die von uns erhobenen Daten decken allerdings nur die lokalen Gegebenheiten in kollateralarterientragendem Adduktorgewebe sowie in Milzen auf, die als wichtiger Speicherort mononukleärer Zellen fungieren. Ob und inwiefern, freiwilliges Ausdauertraining jedoch auch die systemische Zytokinexpression beeinflusst, müssen zukünftige Studien, unter Berücksichtigung zugrunde liegender Mechanismen, zeigen.

Außerdem stellt sich die Frage, wie lange die günstigen durch freiwilliges Training erzielten Auswirkungen auf die Zytokinexpression anhalten und warum die positiven Effekte auf die Arteriogenese auch nach Beendigung des Trainings weiterhin fortdauern. Als ursächlich hierfür könnte, neben der vorteilhaften Beeinflussung der Zytokinexpression, der günstige Einfluss auf die NO-Synthasen angesehen werden. Unbekannt ist darüber hinaus auch, wie lange die sportliche Aktivität betrieben werden muss, um die gewünschten vorteilhaften Effekte überhaupt erzielen zu können.

#### **6.4. Anzahl und Aktivität zirkulierender Monozyten in peripherem Blut werden durch Ausdauertraining nicht beeinflusst**

Da Makrophagen als Hauptproduzenten der Wachstumsfaktoren und Zytokine eine wichtige Rolle im Rahmen der Arteriogenese spielen, kommt die Frage auf, ob präventives Ausdauertraining auch zu einer Beeinflussung der Chemotaxis von Monozyten/ Makrophagen führt. Unseren Ergebnissen zufolge kommt es durch freiwillige körperliche Aktivität weder zu einer gesteigerten Rekrutierung, noch zu einer gesteigerten Aktivierung der Makrophagen in peripherem Blut.

Die Datenlage bezüglich der Beeinflussung der Chemotaxis mononukleärer Zellen durch freiwillige körperliche Betätigung ist allerdings diskrepant. Während in einigen Studien ein gesteigerter Chemotaxisindex durch trainingsinduzierten Stress beschrieben wurde, resultiert Ausdauertraining moderater Intensität, Batista et al zufolge, in einer Normalisierung der Rekrutierung sowie Funktion der Makrophagen<sup>33,116,117</sup>. Diese Daten wurden anhand von Ratten erhoben, die nach Okklusion der linken Koronararterie eine terminale Herzinsuffizienz (congestive heart failure CHF) entwickelten, welche mit einer gesteigerten Produktion proinflammatorischer Zytokine einherging<sup>9</sup>.

In den von Gielen et al durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität in einer Reduktion der Serumkonzentration von GM-CSF, MCP-1, sICAM sowie sVCAM bei Patienten mit CHF resultiert, was als Begründung für das fehlende Auftreten einer gesteigerten Monozytenrekrutierung durch freiwilliges Training angesehen werden kann<sup>1</sup>. Denn diese Faktoren sind allesamt an der Stimulation der Monozytenbildung im KM, deren Freisetzung in die Zirkulation und der Chemotaxis in das perivaskuläre Gewebe beteiligt<sup>28,102,41,89,110,109</sup>. Fraglich bleibt allerdings, ob diese Mechanismen auch bei gesunden Individuen zu tragen kommen, oder ob diese nur im Rahmen von sportlicher Aktivität bei CHF stattfinden. Woods et al äußerten zudem die Vermutung, dass der modulatorische Effekt von freiwilligem Ausdauertraining auf die Makrophagenfunktion von der Intensität, der Frequenz und der Art des durchgeführten Sports abhängt<sup>132</sup>. Aus diesem Grund erfordert es weitere Studien, die den Einfluss von freiwilligem Ausdauertraining auf die Chemotaxis und Aktivität von Monozyten/Makrophagen, unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, näher untersuchen. Hierbei sollten vor allem Einflussfaktoren wie Art, Frequenz und Intensität der ausgeführten körperlichen Betätigung Beachtung finden.

## **6.5. freiwilliges Ausdauertraining resultiert in verminderter TNF $\alpha$ - und gesteigerter iNOS Expression in humanen mononukleären Zellen**

Um den Einfluss von freiwilligem Training auf die Zytokinexpression junger gesunder Individuen zu eruieren, wurden Untersuchungen an humanen zirkulierenden mononukleären Zellen vorgenommen. Bei zuvor sportlich inaktiven Probanden ließ sich durch Ausdauertraining eine signifikante Reduktion der TNF $\alpha$  Expression erzielen.

Starke sportliche Aktivität resultiert mehreren Studien zufolge initial in einer vorübergehenden proinflammatorischen Reaktion, wohingegen über einen längeren Zeitraum durchgeführtes Ausdauertraining schließlich einen antiinflammatorischen Effekt aufweist<sup>57</sup>. Diese Feststellung stimmt sowohl mit den unsererseits, als auch den von Sloan et al erhobenen Daten überein. Dessen Arbeitsgruppe konnte ebenfalls eine Reduktion der TNF $\alpha$  Expression in humanen zirkulierenden mononukleären Zellen durch aerobes Ausdauertraining, bei zuvor sportlich inaktiven Probanden, nachweisen<sup>112</sup>. Diese Studie widmete sich zudem der Frage nach der notwendigen Intensität des Trainings, um die günstigen durch Sport induzierten Effekte erzielen zu können. Überraschenderweise resultierte dabei nur Ausdauertraining hoher Intensität in einer Verminderung der TNF $\alpha$  Expression in den untersuchten Blutproben<sup>112</sup>. Im Gegensatz dazu stehen die von Yakeu et al erhobenen Daten, laut derer bereits Training geringer Intensität ausreicht, um eine systemische Reduktion proinflammatorischer Zytokine zu erzielen<sup>134</sup>. In einer von Smith et al durchgeführten Untersuchung resultierte moderates, über einen Zeitraum von 6 Monaten durchgeführtes Ausdauertraining ebenfalls in einer verminderten Expression von TNF $\alpha$  und anderen inflammatorischen Parametern in zirkulierenden Zellen aus peripherem Blut<sup>113</sup>. Zusammenfassend kann jedoch festgestellt werden, dass AUSDAUERtraining- unbeachtet der Intensität- mehreren Studien zufolge zu einer signifikanten Reduktion proinflammatorischer Zytokine führt<sup>1,39</sup>.

Sowohl die unsererseits, als auch die von Sloan et al erhobenen Daten stützen sich allerdings auf Untersuchungen an jungen gesunden Probanden. Interessant zu wissen wäre darüber hinaus, inwiefern freiwilliges Ausdauertraining die Zytokinexpression bei älteren Individuen, mit einem höheren Risiko für das Vorliegen stenosierender Gefäßerkrankungen im Rahmen atherosklerotischer Prozesse, beeinflusst. Eine zu hohe Konzentration inflammatorischer Zytokine führt zur Instabilität atherosklerotischer Plaques und inflammatorischem Schaden der arteriellen Gefäßwand<sup>112</sup>. Dabei ist v.a. MCP-1 entscheidend an der Progression der endothelialen Dysfunktion hin zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen beteiligt, in dem

es Monozyten dazu veranlasst in die Gefäßwand zu migrieren, wo diese proinflammatorische Zytokine sowie ROS sezernieren und sich zudem durch die Aufnahme von Lipiden und Cholesterinestern zu Schaumzellen entwickeln<sup>2</sup>. Darüber hinaus üben inflammatorische Mediatoren einen anti-arteriogenen Effekt aus<sup>100,104</sup>. Eine anti-inflammatorische, pro-arteriogene Therapie würde sich daher wahrscheinlich nicht nur vorteilhaft auf das Wachstum präexistenter Kollateralgefäße auswirken, sondern könnte möglicherweise auch das Voranschreiten atherosklerotischer Prozesse unterbinden.

In einer von Schirmer et al durchgeführten Studie, in der der Einfluss einer Herzfrequenzreduktion mittels des selektiven I<sub>(f)</sub>-Kanalinhitors Ivabradin auf das Kollateralarterienwachstum am Modell der Apo E<sup>-/-</sup> defizienten Maus untersucht wurde, führte die Behandlung mit Ivabradin zu einer verbesserten Arteriogenese im Mäusehinterlauf. Diese günstigen durch Ivabradininduzierten Effekte auf die vaskuläre Pathophysiologie lassen sich auf antiinflammatorische (Reduktion der systemischen Konzentration inflammatorischer Zytokine, wie z.B. TNF $\alpha$ , IL6 und MCP-1) sowie antioxidative Veränderungen zurückführen<sup>25</sup>. Laut Schirmer et al würden insbesondere Patienten mit pAVK von einer antiinflammatorischen, pro-arteriogenen Therapie profitieren, was sich unseren Ergebnissen zufolge durch freiwilliges Ausdauertraining erzielen lassen würde<sup>99</sup>. Diese Annahme findet auch Bestätigung durch die in der Clever-Studie erhobenen Daten, dass sich bei Patienten mit pAVK durch sportliche Aktivität höhere Erfolge bezüglich der schmerzfreien Gehstrecke verzeichnen lassen, als durch interventionelle Verfahren, wie die Stentimplantation<sup>75</sup>.

Anhand der von Kohut et al erhobenen Daten resultiert Ausdauertraining, auch bei Probanden mit einem Durchschnittsalter von  $\geq 64$  Jahren, in einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine in humanem Blut<sup>61</sup>. Demzufolge entfalten die günstigen durch Sport induzierten Veränderungen ihre Wirkung auch bei älteren Probanden mit einem höheren Risikoprofil und können wohlmöglich aus diesem Grund als vielversprechende sekundärpräventive Maßnahme in der Behandlung stenosierender Gefäßprozesse angesehen werden. Allerdings liegen bislang keine validen Daten über die erforderliche Dauer und Intensität des Trainings vor, um diese günstigen Effekte verwirklichen zu können. Aus diesem Grund bedarf es weitergehender Untersuchungen, die gerade diese Fragestellung aufgreifen und die zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen weiter eruieren.

Die von uns untersuchten, zuvor sportlich inaktiven Probanden zeigten zudem, nach Absolvierung des dreiwöchigen Trainingsprogramms, eine Steigerung der iNOS Expression. Diese Feststellung steht im Einklang mit den in tierexperimentellen Untersuchungen erhobenen Daten, in denen freiwilliges Ausdauertraining ebenfalls in einer gesteigerten iNOS Expression resultierte. Mardsen et al sowie Nunokawa et al konnten in der Promotorregionen des humanen iNOS-, und eNOS Gens ein FSS-sensibles Element nachweisen, was als Hinweis dafür angesehen werden kann, dass die Transkription besagter Gene tatsächlich durch körperliche Aktivität beeinflussbar ist <sup>72,77</sup>. Auch hier kommt allerdings wieder die Frage auf, wie lange die günstigen, durch präventives Training vermittelten Effekte anhalten. In einer von Pullin et al durchgeführten Untersuchung an gesunden jungen, zuvor sportlich inaktiven, männlichen Probanden konnte gezeigt werden, dass die vorteilhaften, durch Training induzierten Effekte, zwar schnell eintreten, jedoch nur sehr kurzlebig zu sein scheinen <sup>85</sup>. Es bedarf folglich vermutlich eines regelmäßigen und konstant über einen längeren Zeitraum durchgeführten Trainingsprogramms relativ häufiger Frequenz, um die günstigen, durch Sport vermittelten Effekte, im Speziellen auf die Endothelfunktion, aufrecht zu erhalten <sup>85</sup>. Auch Zdrenghea et al sind der Annahme, dass körperliche Aktivität optimalerweise lebenslang betrieben werden sollte, um die vorteilhaften, durch freiwilliges Training induzierten Effekte auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität zu bewahren <sup>138</sup>.

Zusammenfassend resultiert freiwilliges Training vor Femoralarterienligatur in einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine und stimuliert das Kollateralarterienwachstum auf eine Stickstoffmonoxid-abhängige Art und Weise. Hierbei führt Ausdauertraining sowohl zu einer vermehrten iNOS mRNA Expression, als auch zu einer gesteigerten Phosphorylierung und damit Aktivierung des eNOS Proteins. Insbesondere die induzierbare NO-Synthase aus zirkulierenden mononukleären Zellen ist entscheidend am prophylaktischen Trainingseffekt beteiligt. Diese Studie unterstreicht zudem das mit einem sportlich inaktiven Lebensstil assoziierte vaskuläre Risikoprofil und identifiziert freiwillige körperliche Aktivität als prophylaktische Maßnahme, um das Gefäßwachstum zu verbessern.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Adamopoulos S, Parissis J, Kroupis C, Georgiadis M, Karatzas D, Karavolias G, Koniavitou K, Coats AJ, Kremastinos DT (2001) Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. *European Heart Journal* 22:791-797
- 2) Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, Weng W, Natoli E, Rollins BJ, Milos PM (1999) Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 19:1518-1525
- 3) Akita Y, Otani H, Matsuhisa S, Kyoj S, Enoki C, Hattori R, Imamura H, Kamihata H, Kimura Y, Iwasaka T (2007) Exercise-induced activation of cardiac sympathetic nerve triggers cardioprotection via redox-sensitive activation of eNOS and upregulation of iNOS. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292:H2051-H2059
- 4) Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *Journal of Clinical Investigation* 101:40-50
- 5) Arras M, Strasser R, Mohri M, Doll R, Eckert P, Schaper W, Schaper J (1998) Tumor necrosis factor-alpha is expressed by monocytes/macrophages following cardiac microembolization and is antagonized by cyclosporine. *Basic Research in Cardiology* 93:97-107
- 6) Ärzte Zeitung (2008) KHK weltweit häufigste Todesursache. Veröffentlicht am 28.10.2008
- 7) Balady GJ, Fletcher BJ, Froelicher ES (1994) Cardiac rehabilitation programs: a statement for healthcare professionals from the American heart Association. *Circulation* 90:1602-1610

- 8) Barnes PJ, Liew FY (1993) Nitric oxide and asthmatic inflammation. *Immunology Today* 16:128-130
- 9) Batista ML Jr, Santos RV, Oliveira EM, Seelaender MC, Costa Rosa LF (2007) Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. *Journal of Applied Physiology* 102:2033-2039
- 10) Belardinelli R, Paolini I, Cianci G, Piva R, Georgiou D, Purcaro A (2001) Exercise training intervention after coronary angioplasty: the ETICA trial. *Journal of the American College of Cardiology* 37:1891-1900
- 11) Bolli R, Manchikalapudi S, Tang XL, Takano H, Qiu Y, Guo Y, Zhang Q, Jadoon AK (1997) The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning. *Circulation Research* 81:1094-1107
- 12) Bondke A, Buschmann IR, Bode C, Buschmann EE (2007) Inducing collaterals in due time. Arteriogenesis as a preventive principle. *Hamostaseologie* 27:363-372
- 13) Brendle DC, Joseph LJ, Corretti MC, Gardner AW, Katzel LI (2001) Effects of exercise rehabilitation on endothelial reactivity in older patients with peripheral arterial disease. *American Journal of Cardiology* 87:324-329
- 14) Cai H, Davis ME, Drummond GR, Harrison DG (2001) Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 21:1571-1576
- 15) Cai W, Schaper W (2008) Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 40:681-692

- 16) Cai W, Vosschulte R, Afsah-Hedijri A, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Schaper W, Schaper J (2000) Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 997-1011
- 17) Cai WJ, Kocsis E, Wu X, Rodríguez M, Luo X, Schaper W, Schaper J (2004) Remodeling of the vascular tunica media is essential for development of collateral vessels in the canine heart. *Molecular and Cellular Biochemistry* 264:201-210
- 18) Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J (1997) Phenotype changes of smooth muscle cells and growth factors in growing collateral arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: A42:Th7
- 19) Cai WJ, Koltai S, Kocsis E, Scholz D, Kostin S, Luo X, Schaper W, Schaper J (2003) Remodeling of the adventitia during coronary arteriogenesis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 284:H31-H40
- 20) Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine* 6:389-395
- 21) Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394:485-490
- 22) Chen Hi, Chiang IP, Jen CJ (1996) Exercise Training Increases Acetylcholine-Stimulated Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Biomedical Science* 3:454-460
- 23) Chen HI, Li HT (1993) Physical conditioning can modulate endothelium-dependent vasorelaxation in rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 13:852-856

- 24) Chen HI, Li HT, Chen CC (1994) Physical conditioning decreases norepinephrine-induced vasoconstriction in rabbits. Possible roles of norepinephrine-evoked endothelium-derived relaxing factor. *Circulation* 90:970-975
- 25) Custodis F, Baumhäkel M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Böhm M, Laufs U (2008) Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 117:2377-2387
- 26) Dai X, Faber JE (2010) Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circulation Research* 106:1870-1881
- 27) De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling KK (1998) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state: role of a superoxide-producing NADH oxidase. *Circulation Research* 82:1094-1101
- 28) Deindl E, Zaruba MM, Brunner S, Huber B, Mehl U, Assmann G, Hofer IE, Mueller-Hoecker J, Franz WM (2006) G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB Journal* 20:956-958
- 29) Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH (1993) Exercise training alters endothelium-dependent vasoreactivity of rat abdominal aorta. *Journal of Applied Physiology* 75:1354-1363
- 30) Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605
- 31) Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circulation Research* 86:347-354

- 32) Dufaux B, Order U, Geyer H, Hollmann W (1984) C-reactive protein serum concentrations in well-trained athletes. *International Journal of Sports Medicine* 5:102-106
- 33) Ferrandez MD, De la Fuente M (1999) Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal macrophages. *Acta Physiologica Scandinavica* 166:47-53
- 34) Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Visioli O (1998) Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *European Heart Journal* 19, Suppl B, B2-11
- 35) Ford ES (2002) Does exercise reduce inflammation? Physical activity and C-reactive protein among U.S. adults. *Epidemiology* 13:561-568
- 36) Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG (2000) Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation* 105:1631-1639
- 37) Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB Journal* 3:2007-2018
- 38) Geffken DF, Cushman M, Burke GL, Polak JF, Sakkinen PA, Tracy RP (2001) Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *American Journal of Epidemiology* 153:242-250
- 39) Gielen S, Adams V, Möbius-Winkler S, Linke A, Erbs S, Yu J, Kempf W, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R (2003) Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 42:861-868

- 40) Gielen S, Schuler G, Hambrecht R (2002) Exercise training and clinical events in coronary artery disease: role of the coronary endothelium. *Journal of the Irish Colleges of Physicians and Surgeons* 31:158-162
- 41) Gimbrone MA Jr, Nagel T, Topper JN (1997) Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *Journal of Clinical Investigation* 99:1809-1813
- 42) Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL (2002) Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 105:1291-1297
- 43) Grozdanovic Z (2001) NO message from muscle. *Microscopy Research and Technique* 55:148-153
- 44) Grundmann S, van Royen N, Pasterkamp G, Gonzalez N, Tijssma EJ, Piek JJ, Hoefer IE (2007) A new intra-arterial delivery platform for pro-arteriogenic compounds to stimulate collateral artery growth via transforming growth factor-beta1 release. *Journal of the American College of Cardiology* 50:351-358
- 45) Haas TL, Doyle JL, Distasi MR, Norton LE, Sheridan KM, Unthank JL (2007) Involvement of MMPs in the outward remodeling of collateral mesenteric arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 293:H2429-H2437
- 46) Hakim AA, Petrovitch H, Burchfield CM, Ross GW, Rodriguez BL, White LR, Yano K, Curb JD, Abbott RD (1998) Effects of Walking on mortality among nonsmoking retired men. *New England Journal of Medicine* 338:94-99
- 47) Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G (1998) Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation* 98:2709-2715

- 48) Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G (2000) Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *New England Journal of Medicine* 342:454-460
- 49) Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J (1988) Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* 107:307-319
- 50) Hedin U, Bottger BA, Luthman J, Johansson S, Thyberg J (1989) A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Developmental Biology* 133:489-501
- 51) Heil M, Schaper W (2004) Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circulation Research* 95:449-458
- 52) Hoefer IE, van Royen N, Rectenwald JE, Bray EJ, Abouhamze Z, Moldawer LL, Voskuil M, Piek JJ, Buschmann IR, Ozaki CK (2002) Direct evidence for tumor necrosis factor-alpha signaling in arteriogenesis. *Circulation* 105:1639-1641
- 53) Hornig B, Maier V, Drexler H (1996) Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure. *Circulation* 93:210-214
- 54) Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, Schaper W (1997) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *American Journal of Physiology* 273:H1255-H1265
- 55) Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes and Development* 12:149-162

- 56) Ji LL (1999) Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 222:283-292
- 57) Kasapis C, Thompson PD (2005) The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. *Journal of the American College of Cardiology* 45:1563-1569
- 58) Kashem A, Endoh M, Yano N, Yamauchi F, Nomoto Y, Sakai H (1996) Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney International* 50:392-399
- 59) King DE, Carek P, Mainous AG 3rd, Pearson WS (2003) Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 35:575-581
- 60) Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 109:1543-1549
- 61) Kohut ML, McCann DA, Russell DW, Konopka DN, Cunnick JE, Franke WD, Castillo MC, Reighard AE, Vanderah E (2006) Aerobic exercise, but not flexibility/resistance exercise, reduces serum IL-18, CRP, and IL-6 independent of beta-blockers, BMI, and psychosocial factors in older adults. *Brain, Behavior and Immunity* 20:201-209
- 62) Kojda G, Hambrecht R (2005) Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovascular Research* 67:187-197
- 63) Kojda G, Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research* 43:562-571

- 64) Kullo IJ, Khaleghi M, Hensrud DD (2007) Markers of inflammation are inversely associated with VO<sub>2</sub> max in asymptomatic men. *Journal of Applied Physiology* 102:1374-1379
- 65) Laughlin MH, Korthuis RJ, Duncker DJ, Bache RJ (1996) Control of bloodflow to cardiac and skeletal muscle during exercise. *Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems*. Bethesda, MD: Am Physiol Soc, Section 12:705-769
- 66) Laughlin MH, Oltman CL, Bowles DK (1998) Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 30:352-360
- 67) Leon AS, Connett J, Jacobs DR Jr, Rauramaa R (1987) Leisure-time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death. The Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Journal of the American Medical Association* 258:2388-2395
- 68) Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y (2008) Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Medicine* 38:1009-1024
- 69) Lincoln J, Hoyle CHV, Burnstock G (1997) *Nitric Oxide in Health and Disease*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp.163
- 70) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*
- 71) Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB, Siscovick DS (2002) Walking compared with vigorous exercise for the prevention of cardiovascular events in women. *New England Journal of Medicine* 347: 716-725
- 72) Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry* 268:17478-17488

- 73) Mattusch F, Dufaux B, Heine O, Mertens I, Rost R (2000) Reduction of the plasma concentration of C-reactive protein following nine months of endurance training. *International Journal of Sports Medicine* 21:21-24
- 74) McAllister RM, Newcomer SC, Laughlin MH (2008) Vascular nitric oxide: effects of exercise training in animals. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 33:173-178
- 75) Murphy TP, Cutlip DE, Regensteiner JG, Mohler ER, Cohen DJ, Reynolds MR, Massaro JM, Lewis BA, Cerezo J, Oldenburg NC, Thum CC, Goldberg S, Jaff MR, Steffes MW, Comerota AJ, Ehrman J, Treat-Jacobson D, Walsh ME, Collins T, Badenhop DT, Bronas U, Hirsch AT; CLEVER Study Investigators (2012) Supervised exercise versus primary stenting for claudication resulting from aortoiliac peripheral artery disease: six-month outcomes from the claudication: exercise versus endoluminal revascularization (CLEVER) study. *Circulation* 125:130-139
- 76) Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Fopollo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A (1995) Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circulation Research* 76:536-543
- 77) Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S (1994) Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200:802-807
- 78) Okura J, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S, Abo T (1997) Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29:491-502
- 79) Palmberg L, Claesson HE, Thyberg J (1989) Effects of leukotrienes on phenotypic properties and growth of arterial smooth muscle cells in primary culture. *Journal of Cell Science* 93:403-408

- 80) Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA (1998) Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *American Journal of Physiology* 274:L212-L219
- 81) Parker JL, Oltman CL, Muller JM, Myers PR, Adams HR, Laughlin MH (1994) Effects of exercise training on regulation of tone in coronary arteries and arterioles. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 26:1252-1261
- 82) Pate RR, Pratt M, Blair SN, Haskell WL, Macera CA, Bouchard C, Buchner D, Ettinger W, Heath GW, King AC et al (1995) Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine. *Journal of the American Medical Association* 273:402-407
- 83) Prior BM, Lloyd PG, Ren J, Li H, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL (2004) Time course of changes in collateral blood flow and isolated vessel size and gene expression after femoral artery occlusion in rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287:H2434-H2447
- 84) Prior BM, Lloyd PG, Ren J, Li Z, Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL (2003) Arteriogenesis: role of nitric oxide. *Endothelium* 10:207-216
- 85) Pullin CH, Bellamy MF, Bailey D, Ashton M, Davies B, Williams S, Goodfellow J, Wilson JF, Lewis MJ (2004) Time course of changes in endothelial function following exercise in habitually sedentary men. *Journal of Exercise Physiology online* 4:14-22
- 86) Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH (2003) Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 108:1933-1938

- 87) Rajavashisth TB, Liao JK, Galis ZS, Tripathi S, Laufs U, Tripathi J, Chai NN, Xu XP, Jovinge S, Shah PK, Libby P (1999) Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Journal of Biological Chemistry* 274:11924-11929
- 88) Rauramaa R, Halonen P, Väisänen SB, Lakka TA, Schmidt-Trucksäss A, Berg A, Penttilä IM, Rankinen T, Bouchard C (2004) Effects of aerobic physical exercise on inflammation and atherosclerosis in men: the DNASCO Study: a six-year randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine* 140:1007-1014
- 89) Resnick N, Gimbrone MA Jr (1995) Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB Journal* 9:874-882
- 90) Rieder MJ, Carmona R, Krieger JE, Pritchard KA Jr, Greene AS (1997) Suppression of angiotensin-converting enzyme expression and activity by shear stress. *Circulation Research* 80:312-319
- 91) Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
- 92) Risau W, Flamme I (1995) Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11:73-91
- 93) Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM (1999) Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *American Journal of Cardiology* 84:1018-1022
- 94) Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine* 340:115-126
- 95) Schaper W, Buschmann I (1999) Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovascular Research* 43:835-837

- 96) Schaper W, De Brabander M, Lewi P (1971) DNA synthesis and mitoses in coronary collateral vessels of the dog. *Circulation Research* 28:671-679
- 97) Schaper W, Flameng W, Winkler B, Wüsten B, Türschmann W, Neugebauer G, Carl M, Pasyk S (1976) Quantification of collateral resistance in acute and chronic experimental coronary occlusion in the dog. *Circulation Research* 39:371-377
- 98) Schaper W, Pasyk S (1976) Influence of collateral flow on the ischemic tolerance of the heart following acute and subacute coronary occlusion. *Circulation* 53:I57-I62
- 99) Schirmer SH, Degen A, Baumhäkel M, Custodis F, Schuh L, Kohlhaas M, Friedrich E, Bahlmann F, Kappl R, Maack C, Böhm M, Laufs U (2012) Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. *European Heart Journal* 33:1223-1231
- 100) Schirmer SH, Fledderus JO, Bot PT, Moerland PD, Hofer IE, Baan J Jr, Henriques JP, van der Schaaf RJ, Vis MM, Horrevoets AJ, Piek JJ, van Royen N (2008) Interferon-beta signaling is enhanced in patients with insufficient coronary collateral artery development and inhibits arteriogenesis in mice. *Circulation Research* 102:1286-1294
- 101) Schirmer SH, Schuh L, Boehm M, Laufs U (2011) Physical exercise prior to femoral artery ligation stimulates collateral artery growth in an nitric oxide-dependent manner. *European Heart Journal*, Suppl 32, P440
- 102) Schirmer SH, van Nooijen FC, Piek JJ, van Royen N (2009) Stimulation of collateral artery growth: travelling further down the road to clinical application. *Heart* 95:191-197
- 103) Schirmer SH, van Royen N, Laufs U, Böhm M (2009) Mechanisms and potential of the therapeutic stimulation of arteriogenesis. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 134:302-306

- 104) Schirmer SH, van Royen N, Moerland PD, Fledderus JO, Henriques JP, van der Schaaf RJ, Vis MM, Baan J Jr, Koch KT, Horrevoets AJ, Hoefler IE, Piek JJ (2009) Local cytokine concentrations and oxygen pressure are related to maturation of the collateral circulation in humans. *Journal of the American College of Cardiology* 53:2141-2147
- 105) Seiler C (2003) The human coronary collateral circulation. *Heart* 89:1352-1357
- 106) Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B (2001) Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 104:2012-2027
- 107) Semenza GL (1999) Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:551-578
- 108) Sharp BR, Jones SP, Rimmer DM, Lefer DJ (2002) Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282:H2422-H2426
- 109) Shyy JY, Lin MC, Han J, Lu Y, Petrim M, Chien S (1995) The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92:8069-8073
- 110) Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S (1994) Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:4678-4682
- 111) Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA (2002) Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 105:788-793

- 112) Sloan RP, Shapiro PA, Demeersman RE, McKinley PS, Tracey KJ, Slavov I, Fang Y, Flood PD (2007) Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *Journal of Applied Physiology* 103:1007-1011
- 113) Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S (1999) Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *Journal of the American Medical Association* 281:1722-1727
- 114) Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, Epstein SE, Burnett MS (2006) CD8+ T-lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 113: 118-124
- 115) Stewart KJ, Hiatt WR, Regensteiner JG, Hirsch AT (2002) Exercise training for claudication. *New England Journal of Medicine* 347:1941-1951
- 116) Sugiura H, Nishida H, Inaba R, Mirbod SM, Iwata H (2000) Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. *Acta Physiologica Scandinavica* 168:413-420
- 117) Sugiura H, Nishida H, Sugiura H, Mirbod SM (2002) Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiologica Scandinavica* 174:247-256
- 118) Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET (2005) Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radical Biology and Medicine* 38:1231-1242
- 119) Thyberg J (1996) Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *International Review of Cytology* 169:183-265

- 120) Tyagi SC, Kumar S, Cassatt S, Parker JL (1996) Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74:983-995
- 121) Unthank JL, Nixon JC, Dalsing MC (1994) Acute compensation to abrupt occlusion of rat femoral artery is prevented by NO synthase inhibitors. *American Journal of Physiology* 267:H2523-H2530
- 122) Unthank JL, Nixon JC, Dalsing MC (1996) Nitric oxide maintains dilation of immature and mature collaterals in rat hindlimb. *Journal of Vascular Research* 33:471-479
- 123) Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, Tripathi PV, Jovinge S, Wilkin DJ, Asotra K, Shah PK, Rajavashisth TB (2002) Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* 106:3024-3030
- 124) van Royen N, Hoefer I, Böttinger M, Hua J, Grundmann S, Voskuil M, Bode C, Schaper W, Buschmann I, Piek JJ (2003) Local monocyte chemoattractant protein-1 therapy increases collateral artery formation in apolipoprotein E-deficient mice but induces systemic monocytic CD11b expression, neointimal formation, and plaque progression. *Circulation Research* 92:218-225
- 125) van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hoefer I, Voskuil M, Schaper W (2001) Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular Research* 49:543-553
- 126) van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, Verloop RE, Eilers PH, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH (2006) Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 26:1383-1390

- 127) van Weel V, Toes RE, Seghers L, Deckers MM, de Vries MR, Eilers PH, Sipkens J, Schepers A, Eefting D, van Hinsbergh VW, van Bockel JH, Quax PH (2007) Natural killer cells and CD4+ T-cells modulate collateral artery development. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 27:2310-2318
- 128) Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Förstermann U (1997) Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 77:163-167
- 129) Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ (2003) Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421:384-388
- 130) Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, et al (1995) Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA , iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86:1184-1195
- 131) Wolf C, Cai WJ, Vosschulte R, Koltai S, Mousavipour D, Scholz D, Afsah-Hedijri A, Schaper W, Schaper J (1998) Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 30: 2291-2305
- 132) Woods JA, Davis JM, Smith JA, Nieman DC (1999) Exercise and cellular innate immune function. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 31:57-66
- 133) World Health Organisation (2010) Global status report on noncommunicable diseases 2010

- 134) Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE, Morris K (2010) Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR $\gamma$  and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* 212:668-673
- 135) Yang HT, Laughlin MH, Terjung RL (2000) Prior exercise training increases collateral-dependent blood flow in rats after acute femoral artery occlusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 279:H1890-H1897
- 136) Yang HT, Ren J, Laughlin MH, Terjung RL (2002) Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282:H301-H310
- 137) Zbinden S, Zbinden R, Meier P, Windecker S, Seiler C (2005) Safety and efficacy of subcutaneous-only granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for collateral growth promotion in patients with coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 46:1636-1642
- 138) Zdrengea D, Poantă L, Pop D, Zdrengea V, Zdrengea M (2008) Physical training--beyond increasing exercise capacity. *Romanian Journal of Internal Medicine* 46:17-27

## 8. Publikationen

### 8.1. Publikationen und Abstract

#### Publikationen

Schirmer SH, Degen A, Baumhäkel M, Custodis F, **Schuh L**, Kohlhaas M, Friedrich E, Bahlmann F, Kappl R, Maack C, Böhm M, Laufs U (2012) Heart-rate reduction by If-channel inhibition with ivabradine restores collateral artery growth in hypercholesterolemic atherosclerosis. European Heart Journal 33:1223-1231

#### Abstract

Schirmer SH, **Schuh L**, Boehm M, Laufs U (2011) Physical exercise prior to femoral artery ligation stimulates collateral artery growth in an nitric oxide-dependent manner. European Heart Journal, Suppl 32, P440