

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen  
Sporthochschule Köln

Institutsleiter: Universitätsprofessor Dr. Wilhelm Bloch

Einfluss von Sport auf die Erythrozytenflexibilität bei männlichen Typ-II-Diabetikern

Inaugural – Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sabrina Bischof

aus Köln

promoviert am 27.09.2019

Dekan:                      Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Gutachterin:            Professorin Dr. rer. nat. K. Brixius

2. Gutachter:              Universitätsprofessor Dr. med. W. Krone

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Professorin Dr. rer. nat. Klara Brixius, Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch, Christian Brinkmann, Analytisches Labor 2 des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/ eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 19.12.2018

Unterschrift

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Professorin Dr. rer. nat. K. Brixius und Herrn Dr. sportwiss. C. Brinkmann von mir selbst ausgeführt worden.

## Danksagung

Bei Herrn Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch möchte ich mich für die Möglichkeit, die Untersuchungen und Ausarbeitung der Dissertation im Analytischen Labor 2 des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln durchführen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professorin Dr. rer. nat. K. Brixius, Herrn Dr. sportwiss. C. Brinkmann und Dr. Marijke Grau, für die Überlassung des Themas der Dissertation und ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie der Erstellung der schriftlichen Arbeit.

Ebenfalls danke ich ganz herzlich den Probanden der Studie, die Zeit und Anstrengungen auf sich genommen haben und so wesentlich zur Ermöglichung der Arbeit beigetragen haben.

Ein weiterer Dank gilt Anika Voss, Bianca Collins und Mojghan Ghilav, den medizinisch-technischen Angestellten des Analytischen Labors des Instituts für Molekulare und zelluläre Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente und Ihre Geduld mit mir.

Darüber hinaus möchte ich meinen Eltern einen großen Dank für ihre Förderung und Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit aussprechen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
1.1. ERYTHROZYTENVERFORMBARKEIT – DIE NOTWENDIGKEIT .....	9
1.2. STICKSTOFFMONOXID – PRODUKTION UND FUNKTION DES LEBENSWICHTIGEN REGULATIONSMOLEKÜLS.....	9
1.3. RBC-NOS.....	10
1.4. DER EINFLUSS VON NO AUF DIE ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT .....	11
1.5. DAS ZYTOSKELETT - ANATOMISCHE VORAUSSETZUNG FÜR DIE VERFORMBARKEIT .....	11
1.6. DIE REGULATION DER RBC-NOS-AKTIVITÄT .....	12
1.7. PATHOLOGIEEN UND DER EINFLUSS AUF DIE ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT .....	15
1.8. DIABETES MELLITUS TYP 2 UND DIE ANGIOPATHISCHEN FOLGEERKRANKUNGEN.....	16
1.9. DIE BEDEUTUNG EINER ERNIEDRIGTEN ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT FÜR DIABETIKER.....	17
1.10. SPORT UND SEIN EINFLUSS AUF DIE ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT .....	17
1.11. FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER STUDIE .....	19
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
2.1. STUDIENDESIGN .....	20
2.2. PROBANDEN .....	20
2.2.1. <i>Anthropometrische Daten der Probanden</i> .....	21
2.3. TRAININGSINTERVENTION.....	22
2.4. LEISTUNGSÜBERPRÜFUNG .....	23
2.5. BLUTPROBENAUFBEREITUNG .....	24
2.6. MESSUNG DER ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT .....	24
2.7. IMMUNHISTOCHEMIE AN ERYTHROZYTEN .....	27
2.7.1. <i>Auswertung der Immunhistochemiefärbung</i> .....	28
2.8. GASPHASEN-CHEMILUMINESZENZDETEKTION VON STICKSTOFFMONOXID IN RBC UND PLASMA.....	29
2.8.1. <i>Auswertung der CLD</i> .....	31
2.9. STATISTIK .....	31
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>32</b>
3.1. VERGLEICH DER VENÖSEN ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT PRÄ- UND POST-INTERVENTIONELL 32	
3.2. GRAUSTUFENWERTE DER RBC-NOS TOTAL.....	34
3.3. FEHLENDE TRAININGSINDUZIERTER ERHÖHUNG DER RBC-NOS-SERIN <sup>1177</sup> - PHOSPHORYLIERUNG .....	37
3.4. ERGEBNISSE DER CLD VON STICKSTOFFMONOXID IN RBC UND PLASMA.....	40
3.5. VERGLEICH DER FLEXIBILITÄTSWERTE VOR UND NACH EINER AKUTEN BELASTUNG.....	42
3.6. VERGLEICH VENÖSER UND KAPILLÄRE WERTE .....	44
<b>4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>
4.1. BEWERTUNG DER METHODEN.....	48
4.2. KEINE VERÄNDERUNGEN DER ERYTHROZYTÄREN NO-PRODUKTION UND DER ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT DURCH DREIMONATIGE TRAININGSINTERVENTION .....	50
4.3. BEI DIABETIKERN ALSO KEINE ÄNDERUNG DER BLUTRHEOLOGIE DURCH TRAINING? .....	52
4.4. KEINE VERÄNDERUNG DER FLEXIBILITÄT DURCH AKUTE PHYSISCHE BELASTUNG.....	54
4.5. VERGLEICH DER VENÖSEN UND KAPILLÄREN ERYTHROZYTENFLEXIBILITÄT .....	55
4.6. FAZIT.....	56
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>58</b>

<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN .....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>67</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADMA	asymmetrischem Dimethylarginin
BMI	Body Mass Index
CLD	Chemielumineszenzdetektion
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
Elmax	maximaler Elongationsindex
EKG	Elektrokardiographie
eNOS	endotheliale NO-Synthase
et al.	et alii, deutsch: und andere
HbA1c	Glykohämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HOMA Index	Homeostasis Model Assessment ( Insulin (µU/ml) × Glukose (mmol/l) / 22,5)
HRP	Horseradish-Peroxidase-Komplex
HSP90	Hitzestabiles Bindeprotein
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LDL	Low Density Lipoprotein
LORRCA	Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer
MW	Mittelwert
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Normales Goat Serum
NH <sub>4</sub>	Ammonium
NiSO <sub>4</sub>	Nickel-(II)-Sulfat
nM	Nenn Drehmomente
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthasen
Pa	Pascal

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
PVP	Polyvinylpyrrolidone-Lösung
RBC	red blood cell, Erythrozyten
RBC-NOS	erythrozytäre NO-Synthase
Rcf	relative centrifuge force, Relative Zentrifugalbeschleunigung
PI3K-AKT-Weg	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase/Akt-Weg
SS $\frac{1}{2}$	Scherstress, der aufgebracht werden muss, um die Hälfte des maximalen Elongationsindex zu erreichen
STA	Standardabweichung
TBS	Tris-buffered saline
$\mu\text{m}$	Mikrometer
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
W	Watt
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation

## 1. Einleitung

### 1.1. Erythrozytenverformbarkeit – Die Notwendigkeit

Das Blut setzt sich zusammen aus dem Blutplasma und den Blutzellen, also den Leukozyten und Thrombozyten und Erythrozyten. Die Erythrozyten haben einen Durchmesser von etwa 7,5 µm bei einem Volumen von ca. 90 µm<sup>3</sup>. (29) Durch den menschlichen Körper fließen etwa 4-6 Liter Blut durch die Blutgefäße. An die Arterien, die das Blut vom Herzen in den Körper transportieren, schließt sich das mikrovaskuläre Gefäßsystem an, welches aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen besteht (10). Die Letztgenannten münden in den Venen ein, durch welche das Blut zurück zum Herzen transportiert wird. Der Durchmesser der kleinsten Kapillaren beträgt lediglich 4-5 µm, weshalb die Erythrozyten mit ihrem durchschnittlichen Durchmesser von 7,5 µm verformbar sein müssen, um diese passieren zu können (10, 70).

Der üblichen Beschreibung, Erythrozyten hätten die Form einer bikonkaven Scheibe, widersprach Weinstein, da diese Aussage nicht die physiologische Umgebung der Erythrozyten berücksichtige, welche im Fluss des Blutes in den Gefäßen eine Vielzahl an Formen bieten und es somit einen stabilen Zustand der bikonkaven Scheibe quasi nicht gäbe (61). Abhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Zelle durch die Kapillare fließt, verändert sich die bikonvex scheibenförmige Form des Erythrozyten über eine achsensymmetrische Fallschirmform bis hin zu einer kugeligen asymptotischen Form (23, 70, 81, 82).

### 1.2. Stickstoffmonoxid – Produktion und Funktion des lebenswichtigen Regulationsmoleküls

Eine Familie von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) führt zur Bildung des körpereigenen Stickstoffmonoxid (NO) (42) durch Katalyse der Umwandlung von L-Arginin und molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und NO (42).

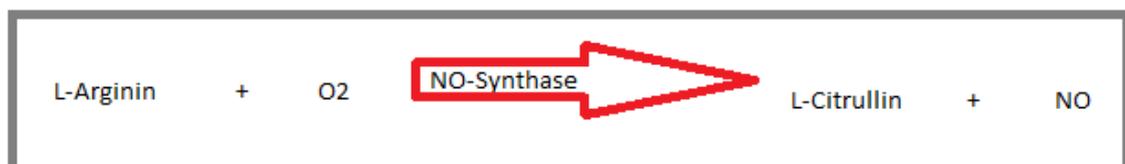


Abbildung 1: Darstellung der Reaktionsformel der NO-Entstehung nach Beschreibung durch Kleinbongard et al. (42)

NO wird für verschiedene Regulationsprozesse im menschlichen Körper benötigt, weshalb sich Isoformen der NO-Synthasen in zahlreichen Geweben finden lassen. So gibt es eine neuronale NO-Synthase (nNOS) (58), eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Zellen der Immunabwehr, wie beispielsweise Makrophagen (51, 58), die endotheliale NO-Synthase (eNOS) (58) und die erst kürzlich entdeckte erythrozytäre NO-Synthase (RBC-NOS) (42).

Die wohl wichtigste Funktion des NO als signalvermittelndes Molekül ist die Vasodilatation durch seine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Arterienwand (36). Des Weiteren inhibiert es die Aktivierung von Thrombozyten und verhindert somit die Entstehung von Thrombosen (14, 49). Neuronal fungiert das NO unter anderem als Neurotransmitter, während es in den Zellen der Immunabwehr eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen und Entzündungen spielt (14, 56).

NO ist ein Molekül, welches essentielle Funktionen in unserem Körper reguliert, aktiviert und/oder inhibiert. Die bedeutsamste Rolle spielt NO durch seine Wirkung auf den Gefäßtonus und die Thrombozyten vor allem in der Entstehung beziehungsweise Therapie vaskulärer Pathologien wie Bluthochdruck, Angina pectoris (47), Arteriosklerose (42) oder Thrombosen (49).

### 1.3. RBC-NOS

Die ersten Hinweise auf eine selbstständige NO-Produktion durch die Erythrozyten fanden 1996 Jubelin et al.. Sie untersuchten verschiedene Zelltypen auf das Vorhandensein der NOS-Isoformen. Sie fanden NOS-Unterformen in endothelialen Zellen, neuronalen Zellen und Leukozyten, und zu ihrer Überraschung auch in Erythrozyten, woraus sie auf eine erythrozytäre NO-Produktion schlossen. (39)

Zunächst konnten jedoch keine Hinweise auf eine Funktionalität im Sinne der Katalyse einer NO-Synthese der RBC-NOS gefunden werden (40). Doch schließlich konnte durch Kleinbongard et al. der Nachweis der Lokalisation und Funktion der erythrozytären NO-Synthase erbracht werden (42). Durch eine Reihe von laborchemischen Methoden wie Western Blot und Immunfluoreszenzmikroskopie konnte die RBC-NOS sowohl im Zytoplasma, als auch auf der Innenseite der Plasmamembran der Erythrozyten nachgewiesen werden. Ein Nachweis der Funktionalität der RBC-NOS erfolgte durch die quantitative Messung der Substrate und Endprodukte der NO-Synthese, die Messung der Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Es konnte eine Aktivität nachgewiesen werden, die vergleichbar ist zur endothelialen NO-

Synthese, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. (42) Die Aktivität der RBC-NOS wurde von Cortese et al. bestätigt, die noch einmal herausstellten, dass es sich bei der erythrozytären NO-Synthase vor allem um die „klassischen eNOS“ (25) handelt, welche in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysiert.

#### 1.4. Der Einfluss von NO auf die Erythrozytenflexibilität

Schon lange vor Entdeckung der funktionellen Aktivität der NO-Synthase gab es Untersuchungen zum Einfluss von NO auf die Erythrozytenflexibilität. Starzyk et al. fanden eine deutliche Steigerung der Verformbarkeit durch NO und Prostazykline (73). Durch Bor-Kucukatay et al. konnte gezeigt werden, dass NO-Inhibitoren die Verformbarkeit drastisch senken. Dieser Effekt konnte jedoch durch gleichzeitige Zugabe von L-Arginin abgepuffert werden. Im Kontrast dazu, konnte die Flexibilität durch NO-Donoren gesteigert werden. Einen Nachweis der RBC-NOS-Aktivität gab es zu diesem Zeitpunkt noch nicht, bisher war man davon ausgegangen, dass die Erythrozyten nur dem NO anderer Zellen vor allem aus Endothelzellen und Makrophagen ausgesetzt seien, doch auch durch Bor-Kucukatay et al. wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Erythrozyten eigenständig NO produzieren können. (11)

Die Beeinflussung der Flexibilität durch NO konnte mit Nachweis der aktiven erythrozytären NO-Produktion in neuem Licht gesehen werden. Kleinbongard et al. wiesen in ihren Experimenten zum Nachweis einer Funktionalität der RBC-NOS ebenfalls eine deutliche Minderung der Verformbarkeit durch NO-Inhibition nach, sowie ex vivo eine Steigerung der Verformbarkeit durch Zufügen von L-Arginin (42).

Die Verformbarkeit der Erythrozyten wird also durch die Produktion von NO einer erythrozytären NO-Synthase reguliert.

#### 1.5. Das Zytoskelett - anatomische Voraussetzung für die Verformbarkeit

Das erythrozytäre Zytoskelett besteht größtenteils aus Spektrin, einem filamentösen Protein, welches ein intrazytoplasmatisches Netzwerk ausbildet, an das sich andere zytoplasmatische Proteine binden können (17).

Durch Grau et al. konnte erstmal ex vivo gezeigt werden, dass die möglichen Zielmoleküle des RBC-NOS-produzierten NOs die Spektrine sind. Durch Stimulation der RBC-NOS konnte eine vermehrte S-Nitrosylierung der alpha- und beta-Einheiten des Spektrins nachgewiesen und eine dadurch verbesserte Erythrozytenflexibilität gemessen werden. Das Zielprotein des intraerythrozytär produzierten NO scheint also das Spektrin, zu sein, wodurch die Erythrozyten dann verstärkt verformbar werden. (34)

#### 1.6. Die Regulation der RBC-NOS-Aktivität

Die Regulation der NOS-Aktivität ist noch nicht vollkommen erforscht. Wie bereits beschrieben, stellten Cortese et al. fest, dass die erythrozytäre NOS der endothelialen NOS sehr ähnlich ist (25). Dies legt nahe, dass auch die Regulation ähnlich zur eNOS verläuft. Es gibt dabei einige vergleichbare Mechanismen, allerdings auch sehr Unterschiedliche (42, 58). Eine Besonderheit der Erythrozyten ist, dass sie kernlose Zellen sind, denen darüber hinaus auch die Mitochondrien und weitere Zellorganellen, wie das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat, fehlen (12, 58). Deshalb kann die Regulation der NOS nicht identisch ablaufen, da bei der eNOS-Regulation das endoplasmatische Retikulum sowie der Golgi-Apparat eingebunden sind (58).

Eine Theorie der Regulation ist die Folgende von Ozuyaman et al.: In seiner inaktiven Form liegt die RBS-NOS an caveolin-1/flotillin gebunden an der Innenseite der Plasmamembran. Beim Einstrom in die Zelle bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin. Calmodulin ist ein Calcium-Bindeprotein, welches Zielproteine durch Konformationsänderungen aktivieren kann (37). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex bindet die RBC-NOS, deren Bindung an die Membran verliert sich und RBC-NOS wird im Zytoplasma katalytisch aktiv, zusätzlich stabilisiert durch Bindung an HSP90. HSP90 ist ein erythrozytäres Hitzeschockprotein, welches die unersetzbaren Proteine in den Erythrozyten stabilisiert und vor äußeren Einflüssen schützt (35). Durch eine Reduktion des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wird die Bindung von RBC-NOS an Calmodulin geschwächt und die NOS wieder an caveolin-1/flotillin in die Plasmamembran eingebaut. (58)

Eine weitere Theorie ist die Regulation der NO-Produktion durch Acetylcholin. Carvalho et al. zeigten, dass durch Inkubation von Erythrozyten in Acetylcholin und Cholin eine deutliche Steigerung des NO-Gehaltes der Erythrozyten induziert werden kann (16). Mesquita et al. konnten ebenfalls eine Steigerung der Erythrozytenflexibilität durch Acetylcholin nachweisen (53). Durch die Bindung an membranständige

Acetylcholin-Rezeptoren könnte eine G-Protein-vermittelte Enzymkaskade in den Erythrozyten aktiviert werden, durch die die RBC-NOS aktiviert würde (16, 58).

Schließlich gibt es noch die Theorie über einen dritten Regulationsweg, über Phosphorylierung der RBS-NOS durch einen Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase/Akt-Weg (PI3K-AKT-Weg). Dieser wurde von Dimmeler et al. für die endotheliale NOS beschrieben. In der Studie konnte durch Inhibition des PI3K-Akt-Weges und Mutation der Akt-Bindungsstelle der eNOS eine verminderte eNOS-Aktivität nachgewiesen werden. Es kann also darauf geschlossen werden, dass über die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase die Proteinkinase Akt aktiviert wird, welche wiederum die NO-Synthase an spezifischen Bindungsstellen phosphoryliert und somit aktiviert. Die Phosphorylierungsstelle an der eNOS ist hierbei das Serin<sup>1177</sup>. (26) Durch eine Messung des eNOS-Serin<sup>1177</sup> kann dementsprechend auch eine Aktivitätsbestimmung der NO-Synthase erfolgen.

Zur Verdeutlichung der verschiedenen Wege hier eine Abbildung aus dem Review von Ozuyamam et al.(58):



Zelloberfläche zu Zellinhalt (6), die Zytoplasma-Viskosität (6) und durch Scherstress (83). Die Abhängigkeit von diesen Faktoren bezeichnet Kleinbongard et al. als „Feintun(ing) ihrer NO-Produktion“ (42).

Wie bereits beschrieben, besteht Blut aus einer Reihe geformter, fester Teilchen in Plasma und fließt in verschiedenen großen Gefäßen. Durch die festen Bestandteile verringert sich die Fluidität des Blutes, die Zellen machen das Blut viskös (19). Die Viskosität ihrerseits beeinflusst wiederum die Scherspannung, ein höherer Anteil fester Teilchen und somit eine höhere Viskosität erhöhen die Scherspannung (19). Durch die Spannung, die beim Fluss der Erythrozyten durch das Einwirken tangentialer Kräfte entsteht, verformen sich die Erythrozyten (83). Durch die Scherkraft werden einerseits die zellulären  $Ca^{2+}$ -Kanäle geöffnet (58), andererseits wird über cGMP der PI3K-AKT-Pfad der Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung aktiviert (64). So führt die Scherkraft über zwei Wege zu einer vermehrten Aktivität der eNOS.

Kleinbongard et al. stellten auf Grundlage ihren Untersuchungen zur Aktivität der RBC-NOS die These auf, dass die Erythrozyten die NOS unter anderem durch die Regulation der Verfügbarkeit von L-Arginin steuern, da in vitro eine erhöhte NOS-Aktivität nach L-Arginin-Zugabe zu sehen war (42).

### 1.7. Pathologien und der Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität

Bei diversen Erkrankungen wurde eine Verringerung der Erythrozytenflexibilität festgestellt, so beispielsweise bei Sichelzellanämie (20), Malaria (55), bei Hypertonie (22, 59), koronarer Herzkrankheit (25, 41) und weiteren Erkrankungsbilder der inneren Medizin (21). Vor allem jedoch wurde eine Änderung der Verformbarkeit auch bei Diabetes Mellitus erwiesen (3, 41, 63). Schwartz et al. wiesen bei Diabetikern eine Reduktion der Verformbarkeit um 5-23% nach (63), während Tillmann et al. zeigten, dass diese Reduktion vor allem von den metabolischen Konditionen des (in der vorliegenden Studie Typ-1-)Diabetikers abhängig ist (80). Einige der Gründe hierfür fassten Shin et al. in ihrer Arbeit über die Variation der Erythrozytenverformbarkeit bei Diabetes mellitus zusammen: erhöhter oxidativer Stress der Zellen, Veränderungen der Membranlipide, Glykosylierung von Membranproteinen und Veränderungen des empfindlichen Ionengleichgewichts intra- und extrazellulär bei Diabetikern (65).

Jiang et al. fanden heraus, dass beim Typ-2-Diabetes das Enzym Arginase hochreguliert wird, welches mit der RBC-NOS um das Substrat L-Arginin konkurriert und somit die NO-Produktion und die Flexibilität verringert (38).

Des Weiteren könnte die Insulinresistenz für die verringerte NO-Produktion verantwortlich sein, da der PI3K-Akt-Kinase-Weg, welcher unter anderem die RBC-NOS induziert, insulinabhängig aktiviert wird (79).

Die Glykosylierung sowie die oxidative Schädigung der Membranproteinen  $\beta$ -Spektrin und Ankyrin reduziert die Verformbarkeit des Zytoskeletts (63).

Es gibt Hinweise darauf, dass eben diese Veränderungen des Metabolismus der Erythrozyten und der Fließeigenschaften des Blutes, einen Einfluss auf den Verlauf des Diabetes Typ 2 und seine Folgeerkrankungen, wie beispielsweise die Angiopathie, haben (38, 60).

### 1.8. Diabetes Mellitus Typ 2 und die angiopathischen Folgeerkrankungen

In Deutschland sind etwa 7-8 % der erwachsenen Bevölkerung an einem Diabetes Mellitus Typ 2 erkrankt, das sind 6 Millionen Menschen. Dabei zeigt sich die Inzidenz der letzten Jahre steigend.(27) Der Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine multifaktorielle Erkrankung, die auf Grund einer Insulinresistenz zu Hyperglykämie führt (43). Infolge der Insulinresistenz, chronisch metabolischer Störungen und erhöhtem oxidativem Stress durch die Hyperglykämie kommt es vor allem zu endothelialer Dysfunktion und hämatorheologischen Störungen (43, 45, 46). Diese Störungen führen zu weiteren Komplikationen und Folgeerkrankungen des Diabetes.

Die endotheliale Dysfunktion, auch Mikroangiopathie genannt, zeichnet sich durch eine reduzierte NO-Produktion des Endothels aus. Durch Hyperglykämie und oxidativen Stress kommt es im Plasma zu erhöhten Spiegeln von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem endogen produzierten Inhibitor der eNOS (36). Durch den Mangel an NO, das an den Gefäßen als Vasodilatator wirkt, können die Gefäße den Tonus nicht adäquat regulieren. Es kommt zu einer veränderten Hämatorheologie auf deren Grundlage Arteriosklerose und Thrombosen entstehen. Es besteht ein erhöhtes Risiko für Schlaganfälle und Herzinfarkte. Weitere Folgeerkrankungen sind diabetische Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie. (27, 43)

Die angiopathischen Komplikationen und der Diabetes Mellitus Typ 2 sind eng miteinander verbunden, sodass es Überlegungen gibt, ob der Typ 2 Diabetes nicht primär eine kardiovaskuläre Erkrankung mit Hyperglykämie als Symptom ist (36). So produzierten Duplain et al. genetisch veränderte Mäuse, die keine funktionsfähige eNOS besaßen. In Folge entwickelten sich Insulinresistenz, Hyperlipidämie und Bluthochdruck. (28) Des Weiteren wurde ein Genpolymorphismus am eNOS-Gen nachgewiesen, der mit Hypertension assoziiert ist (54).

Entscheidend ist es den Diabetes mellitus als Multisystemerkrankung in all seinen Krankheitsaspekten zu betrachten und zu behandeln (36) und sich nicht ausschließlich auf die Hyperglykämie zu konzentrieren. Was diese Studien auf jeden Fall aufzeigen ist die Bedeutung der eNOS-Funktion bei der Therapie des Diabetes. Auch wenn die dargelegten Studien ihren Fokus hauptsächlich auf die endotheliale NOS legen, so scheinen doch auch in einigen zuvor beschriebenen Studien zu beweisen, dass ebenfalls die RBC-NOS von der Funktionseinschränkung betroffen ist (63, 80). Auch dies hat wohl hämatorrheologische Konsequenzen und sollte deshalb in möglichen Therapieformen bedacht werden.

#### 1.9. Die Bedeutung einer erniedrigten Erythrozytenflexibilität für Diabetiker

Wie bereits beschrieben, müssen die Erythrozyten verformbar sein, um durch die kleinsten Kapillaren gelangen zu können (70). Daraus lässt sich folgern, dass eine reduzierte Verformbarkeit den Blutfluss stört. Cabrales et al. konnten in einer Studie zu gelagerten Bluttransfusionen nachweisen, dass es bei Erythrozyten mit reduzierter Flexibilität nicht nur zu einem erschwerten Blutfluss, sondern ebenfalls zu einer verminderten Sauerstoffaufnahme in der Lunge und Sauerstoffabgabe im Gewebe bekommt. Die Verformbarkeit scheint also ebenfalls Auswirkungen auf die Sauerstoffbindung der Erythrozyten zu haben (15).

Nun ist natürlich eine schlechtere Durchblutung und Sauerstoffversorgung des Gewebes beim Typ 2 Diabetiker, der sowieso ein großes Risiko für eine Mikroangiopathie hat (45), prädisponierend für weitere angiopathische Schäden, wie eine diabetische Retinopathie mit Neovaskularisation oder einen diabetischen Fuß. Auf Grund dessen ist das Thema der Erythrozytenflexibilität von großer Bedeutung für die Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2.

#### 1.10. Sport und sein Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität

Die bisherigen Studien zum Einfluss von Sport auf die Erythrozytenflexibilität lassen darauf schließen, dass Sport auf jeden Fall einen Einfluss hat. Die Verformbarkeit verändert sich allerdings in Abhängigkeit von der Intensität positiv oder negativ.

Eine von Suhr et al. 2009 durchgeführte Studie, bei der Profisportler ein intensivstes zweitägiges Trainingsprogramm absolvierten, erbrachte eine erniedrigte Erythrozytenflexibilität im direkten Anschluss an das Training. Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte eine verminderte Phosphorylierung der

RBC-NOS am Serin<sup>1177</sup> nachgewiesen werden, was auf eine verminderte Aktivität der RBC-NOS schließen lässt. Höchst intensives Training scheint also einen unmittelbaren negativen Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität zu haben. (75)

Bei einem moderaten Training hingegen konnte eine Erhöhung der Erythrozytenflexibilität festgestellt werden. Nach einem einstündigen Laufbandtraining konnte eine erhöhte Phosphorylierung der erythrozytären NO-Synthase am Serin<sup>1177</sup> nachgewiesen werden, ebenso wie ein erhöhter NO-Gehalt innerhalb der Erythrozyten und eine verbesserte Verformbarkeit. Suhr et al. schlossen auf Grund dieser Ergebnisse darauf, dass durch trainingsbedingten Scherstress die RBC-NOS über den PI3K/Akt-Weg aktiviert wird, was zu einer erhöhten Erythrozytenflexibilität führt und somit zu einem verbesserten peripheren Sauerstoffangebot, da die Erythrozyten leichter durch die kleinsten Kapillaren gelangen. (74)

Die erythrozytäre NO-Synthase scheint auch in diesem Aspekt der endothelialen NO-Synthase zu ähneln, da auch diese durch trainingsinduzierten Scherstress eine vermehrte Phosphorylierung der eNOS am Serin<sup>1177</sup> zeigt (7).

Darüber hinaus gab es einige Studien zu regelmäßigem Sporttraining bei chronischen Erkrankungen. So konnte durch ein zehnwöchiges Ausdauerprogramm bei Probanden mit COPD eine deutliche Steigerung der Erythrozytenflexibilität erreicht werden (1). Bei Typ 2 Diabetikern hingegen führte ein dreimonatiges Ausdauertraining in einer ebenfalls an der Deutschen Sporthochschule durchgeführten Studie nicht zu Veränderungen der Erythrozytenflexibilität (3). In anderen Studien wurde sogar eher eine Reduktion der Verformbarkeit bei Typ-2-Diabetikern nach Ausdauertraining nachgewiesen (44, 69).

Nicht nur auf die Erythrozyten scheint sich körperliche Aktivität in ihrer NO-Produktion auszuwirken, auch der NO-Gehalt und die iNOS-Aktivität von Neutrophilen und Lymphozyten ändert sich signifikant durch intensive körperliche Belastung, wie Sureda et al. herausfinden konnten (76).

Sport, bzw. der daraus resultierende verstärkte Scherstress, scheint also einen großen Einfluss auf die Aktivität der NO-Synthasen zu haben, der wohl vor allem von der Intensität der körperlichen Anstrengung abzuhängen scheint (74-76). Für Diabetiker konnte jedoch bislang keine Verbesserung durch Ausdauersport gezeigt werden (3).

### 1.11. Fragestellung und Ziel der Studie

Die durchgeführte Studie untersucht den Einfluss eines dreimonatigen Ausdauertrainings auf die Erythrozytenflexibilität, sowie die eNOS-Ser<sup>1177</sup>-Phosphorylierung und den NO Gehalt von adipösen Typ-2-Diabetikern.

Wie oben angeführt kommt der reduzierten Erythrozytenflexibilität beim Diabetiker eine besondere Bedeutung als zusätzlicher vaskulärer Risikofaktor zu (15, 45). Aus diesem Grund ist es wichtig, mögliche Therapieoptionen zur Verbesserung der Erythrozytenflexibilität zu erforschen.

Wie einige Studien schon zeigen konnten, kann die Erythrozytenflexibilität durch moderates Ausdauertraining verbessert werden (1, 74). Bisher konnte dies allerdings nicht für Diabetiker nachgewiesen werden (3, 44, 69).

Auf Grund der zahlreichen positiven Ergebnisse unter Training gingen wir jedoch in unserer Studie von der Hypothese aus, dass sich die Erythrozytenflexibilität unserer Probanden durch das dreimonatige moderate Ausdauertraining verbessert. Wir gingen davon aus, dass sowohl die RBC-NOS-Aktivierung über Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung ansteigt, als auch das intrazelluläre NO.

Die Studie führten wir durch, um Sport als mögliche Therapiemethode einer reduzierten Erythrozytenflexibilität beim Typ-2-Diabetiker zu überprüfen. Sport ist eine wichtige Therapiesäule in der Behandlung des Diabetes, unter anderem auch im Disease Management Programm. Es wirkt sich positiv auf die Hyperglykämie und Insulinresistenz aus, sowie auch auf die kardiovaskulären Komplikationen (24, 62). Deshalb ist es relevant, zu erforschen, ob Sport auch diesen Aspekt der diabetischen Komplikationen positiv beeinflussen kann.

Diese Arbeit fand eingebettet im Rahmen einer Studie statt, in welcher einerseits der Einfluss von Training auf die Flexibilität der Gesamtmenge an Erythrozyten untersucht, andererseits den Einfluss auf die nach Alter aufgetrennten Erythrozyten(13).

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Studiendesign

Das Protokoll des Forschungsprojektes wurde vor der Durchführung einem entsprechend konstituierten Ethikkomitee der Deutschen Sporthochschule Köln vorgelegt. Eine schriftliche Einverständniserklärung aller Probanden lag vor.

Nach einer ärztlichen Untersuchung wurden 17 männliche Typ-2-Diabetiker im durchschnittlichen Alter von 60 Jahren ( $\pm 9$  Jahre) in die Studie eingeführt. Alle Teilnehmer nahmen an einem dreimonatigen Ausdauertraining teil. Vor sowie nach dieser Intervention wurde venöses und kapilläres Nüchternblut abgenommen. Dies geschah nach einer mindestens 12-stündigen Nüchternheit über Nacht und vor Einnahme der Medikamente am frühen Morgen. Des Weiteren wurde die körperliche Leistungsfähigkeit durch eine Fahrrad-Spiroergometrie sowohl prä-interventionell als auch post-interventionell getestet. Im Rahmen dieser wurde ebenfalls kapilläres Blut aus dem Lobulus auriculae entnommen. In einem Fragebogen zum Ende der Studie bestätigten die Probanden, dass sie, wie vor der Studie instruiert, ihre Essgewohnheiten während der Intervention nicht geändert hatten.

### 2.2. Probanden

Alle Probanden wurden mit Hilfe einer Zeitungsanzeige rekrutiert. Gesucht wurden männliche Probanden mit einem nicht-insulinabhängigem Diabetes Mellitus Typ 2 (Nüchternserumglukose:  $186 \pm 84$  mg/dl, Plasma HbA1c:  $7,6 \pm 2,2$  %) und Adipositas (BMI:  $34 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>). Zu Beginn der Studie füllten die Patienten einen Fragebogen aus, in welchem sie diese Angaben bestätigten. Sie gaben außerdem weitere Erkrankungen und die regelmäßige Einnahme von Medikamenten an, bestätigten, dass Sie nicht unter Erkrankungen leiden, welche ein Ausdauertraining zu riskant erscheinen lassen und schlossen Infektionskrankheiten wie HIV und Hepatitis aus. Des Weiteren wurde eine körperliche Untersuchung durchgeführt, welche die Messung von Größe, Gewicht und Bauchumfang, sowie ein Ruhe-EKG beinhaltete. Die Dauer des diagnostizierten Diabetes gaben die Probanden selbst mit durchschnittlich  $5 \pm 5$  Jahren an. Sie bestätigten, dass sie nicht unter Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus leiden, dementsprechend keine diabetische Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie oder andere kardiovaskulären Komplikationen bekannt seien. Ausgenommen wurde ein

eingestellter Hypertonus der bei 12 der 17 Probanden bekannt war. Einige Probanden wiesen zum Zeitpunkt der Studie eine positive Medikamentenanamnese auf:

- 11 Probanden nahmen orale Antidiabetika ein
- 12 Probanden nahmen Antihypertensiva ein
- 2 Probanden nahmen antihyperlipidämische bzw. cholesterinsenkende Medikamente ein
- 6 Männer nahmen andere Medikamente ein

Die Probanden bestätigten im Fragebogen, dass sie in den letzten drei Jahren vor Ankündigung der Studie nicht regelmäßig Sport betrieben hatten.

### 2.2.1. Anthropometrische Daten der Probanden

Im Folgenden sind die anthropometrischen Daten der Patienten zum Zeitpunkt T0, etwa einen Monat vor T1, dem eigentlichen Beginn der Studie, tabellarisch dargestellt (Abbildung 3). Die morphometrischen Daten wurden im Rahmen einer körperlichen Untersuchung erhoben. Die Blutfettwerte und Blutzuckerparameter wurden mittels der ersten Nüchternblutabnahme bestimmt (Abbildung 4). In Zusammenschau der Befunde lässt sich, mit einem durchschnittlichen BMI von 33,8, einem Durchschnitts-HbA1C von 7,8 und deutlich erhöhten Fettwerten, eindeutig das Bild adipöser Typ-2-Diabetiker bestätigen.

Morphometrische Daten			
Alter	Größe in m	Gewicht in kg	BMI
61	1,77	89,1	28,44
63	1,71	117,7	40,25
50	1,79	137,6	42,94
75	1,74	100,0	33,03
48	1,86	114,0	32,95
52	1,85	140,0	40,91
57	1,76	114,60	37,00
51	1,77	108,5	34,63
64	1,68	90,0	31,89
74	1,80	99,2	30,62
56	1,73	101,3	33,85

58	1,72	85,7	28,97
74	1,81	102,4	31,26
65	1,76	89,8	28,99
53	1,73	100,9	33,71
65	1,81	113,3	34,58
54	1,7	88,1	29,78
MW	1,8	105,4	33,8
STA	0,0	16,1	4,3

Abbildung 3: Morphometrische Daten der Probanden vor Studienbeginn

	Lipidwerte				Blutzuckerwerte			
	Cholesterin	Triglyceride	HDL	LDL	Blutzucker (Serum)	Insulin	HOMA-Index	HbA1c (Plasma)
MW	218,8	198,5	44,2	157,5	194,5	20,6	8,9	7,8
STA	39,2	79,8	7,0	33,3	93,9	9,2	3,2	1,8

Abbildung 4: durchschnittliche Fett- und Blutzuckerwerte der Probanden vor Studienbeginn

### 2.3. Trainingsintervention

Das Training wurde drei Monate lang unter der Aufsicht professioneller Trainer der Deutschen Sporthochschule durchgeführt. Die Probanden trainierten an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche. Die Trainingsintensität wurde kontinuierlich gesteigert, von 20 Minuten Belastung in der ersten Woche auf bis zu 50 Minuten ab der siebten Woche konstant bis zum Ende der Intervention, zuzüglich jeweils 5 Minuten Warm-up und Cool-down. Die Probanden wechselten nach der Hälfte eines jeweiligen Trainings zwischen einem Fahrradergometer und einem elliptischem Cross-Trainer (Technogym, Neu-Isenburg, Deutschland). Die Intensität der Ausdauerbelastung wurde individuell adaptiert an 70-80% der maximalen Herzfrequenz, welche in der zuvor durchgeführten Spiroergometrie ermittelt wurde.

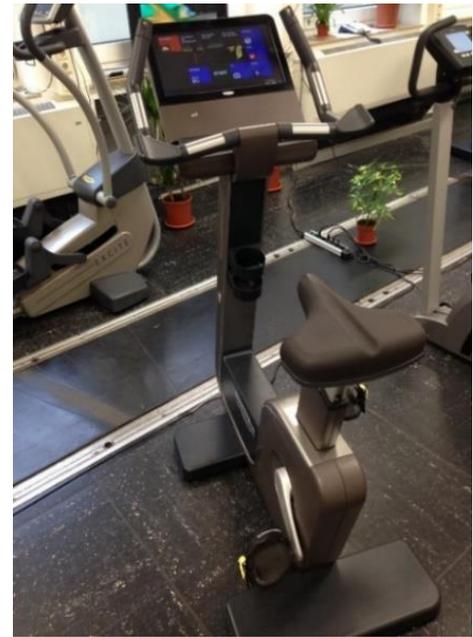


Abbildung 5 und 6: Fitnessgeräte für das dreimonatige Ausdauertraining der Probanden

#### 2.4. Leistungsüberprüfung

Zu den Untersuchungszeitpunkten T0 (1-2 Monat vor Beginn des Trainings), T1 (Kontrolluntersuchung unmittelbar vor Beginn der Intervention) und T2 (nach der Intervention) wurde auf einem aufrechten EKG-gekoppeltem Fahrradergometer (Ergoline, Bitz, Deutschland) mit einem externen „ZAN 600 USB“ System (nSpire Health, Longmont, Colorado, USA), welches die respiratorischen Gase misst, eine Leistungsüberprüfung durch Spiroergometrie durchgeführt. Mit folgenden Abbruchkriterien wurden die Probanden bis zu ihrem Maximum getestet: muskuläre Erschöpfung, Angina pectoris, Ischämiezeichen im EKG, Blässe, Zyanose, Arrhythmie, respiratorische Insuffizienz, Hypertonie (systolischer Druck  $> 250$  mmHg oder diastolischer Druck  $> 115$  mmHg), geistige Verwirrung, Schwindel oder Koordinationsprobleme. Der Ablauf erfolgte nach dem WHO-Stufenschema: gestartet wurde mit 25W Widerstand und die Intensität alle zwei Minuten um 25W erhöht. Die Probanden wurden immer zur selben Tageszeit getestet und instruiert 24 Stunden vor der Spiroergometrie keine erschöpfenden Aktivitäten zu betreiben.

Zu diesen Leistungsüberprüfungen wurde vor der Belastung und direkt im Anschluss an die Belastung Kapillarblut für die Messung der Erythrozytenflexibilität aus dem Lobulus Auriculae entnommen.

Des Weiteren fanden zu den Untersuchungszeitpunkten T1 und T2 gesondert Nüchternblutabnahmen von venösem und kapillärem Blut statt.

## 2.5. Blutprobenaufbereitung

Das Kapillarblut aus dem Lobulus auriculae wurde mittels Lanzette und Kapillarröhrchen gewonnen. Die 20 µl Kapillarblut aus dem Kapillarröhrchen wurden im Anschluss in 5ml Polyvinylpyrrolidone-Lösung (PVP, Viskosität 28,7 bzw. 32,5) pipettiert.

Das venöse Nüchternblut wurde aus der Vena mediana cubiti der Probanden gewonnen und in Heparin Vacutainern (BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) antikoaguliert. Es wurden 16ml Blut entnommen.

Für die RBC-Immunfixierung wurden 500 µl Vollblut in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl vorgefertigter PFA Lösung pipettiert und wie später beschrieben weiterverarbeitet

Zur Messung der Verformbarkeit wurden 20 µl in 5ml Polyvinylpyrrolidone-Lösung (PVP, Viskosität 28,7 bzw. 32,5) pipettiert.

Der Rest des Heparin Vacutainers wurde bei 4°C und 300 rcf eine Minute lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Plasmaüberstand aufgenommen und in einem Reaktionsgefäß gesammelt. 400 µl RBC Pellet vom Boden des Vacutainers wurden in 100 µl Stabilisierungslösung pipettiert und gevortexet Beide Proben wurden unmittelbar bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung und Messung des Nitritgehaltes eingefroren.

Nach 20-minütiger Inkubation wurden die Proben für die RBC-Immunfixierung drei Minuten bei 100 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde verworfen und 1000 µl 0,1 mol PBS hinzugefügt. Die Probe wurde geschwenkt und drei bis fünf Minuten gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (drei Minuten, 100 rcf, Raumtemperatur) und Abnahme des Überstandes wurden 500 µl PBS hinzugefügt. Im Anschluss wurden Blutausrichungen der Proben angefertigt. 10 µl der Probe wurden auf einen Objektträger gegeben und ausgestrichen und anschließend hitzefixiert. Pro Proband wurden zehn Objektträger angefertigt.

## 2.6. Messung der Erythrozytenflexibilität

Die Messungen der Verformbarkeit wurden jeweils noch am Tag der Blutabnahme durchgeführt. Wie bereits beschrieben wurden 20 µl des Bluts in ein PVP Röhrchen pipettiert. In dieser Lösung wurde die Erythrozytenflexibilität mittels einer Laser-Diffraktions-Analyse durch einen Laser Optical Rotational Red Cell Analyzer

(LORRCA, RR Mechatronics, Hoorn, Niederlande) gemessen. Das Gerät ist verbunden mit einem Computer, auf dem die zugehörige Software LORRCA Elongation (Academic Medical Center, Amsterdam) aufgespielt ist.



Abbildung 7: Lorrca Messapparat mit dem zugehörigen Softwareprogramm bei einer Messung

Um einen inneren Zylinder (Bob) befindet sich ein äußerer Zylinder (Cup). In den engen Zwischenraum werden für die Messung 1000  $\mu$ l der PVP-Lösung mit Blut gegeben. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen entstehen, da diese die Messung verfälschen könnten. Die Haube des Geräts wird für die Messung geschlossen, um äußere Störeinflüsse zu vermeiden. Mit Starten der Messung heizt sich das Gerät nun auf  $37 \pm 0,1$  °C auf, damit es in etwa der Körpertemperatur und die Messung demnach physiologischen Verhältnissen entspricht.

Im Innern des Gerätes passiert nun Folgendes: die Zylinder rotieren umeinander, wodurch Scherkräfte auf die Erythrozyten wirken. Je schneller die Rotationsgeschwindigkeit umso höher die wirkenden Scherkräfte. Ein Laserstrahl wird auf die Erythrozyten gelenkt und dadurch einer Diffraktion ausgesetzt. Die Beugung wird von einer Kamera gefilmt. Das Diffraktionsmuster entspricht dem Ausmaß der

Erythrozytendeformität. In normaler Form sind die Erythrozyten rund, während sie sich bei Scherstress elliptisch deformieren können.



Abbildung 8: Innerer Aufbau des Messgeräts

Der Computer berechnet nun die Erythrozytendeformitätskurve indem er den Elongationsindex, welcher die Deformität der Erythrozyten angibt, gegen den Druck in Pascal aufträgt. Die definierten Druckstufen, die gemessen werden, sind:

0,03 Pa; 0,57 Pa; 1,08 Pa; 2,04 Pa; 3,87 Pa; 7,34 Pa; 13,92 Pa; 26,38 Pa und 50,00 Pa.

Der Elongationsindex errechnet sich folgendermaßen:

$$EI = (L-B) / (L+B)$$

Hierbei stellt L die Länge und B die Breite des Diffraktionsmusters dar.

Nachdem eine Probe gemessen wurde, wurde sie abgesaugt und der Zwischenraum zwischen Bob und Cup drei Mal mit 1000 µl destilliertem Wasser gespült, damit die folgende Messung nicht durch Erythrozyten der letzten Probe verfälscht wurde.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Elongationsindices zu den jeweiligen Druckstufen in eine Excel Tabelle übertragen. Es wurde ein Mittelwert mit zugehöriger

Standardabweichung aller Probanden zur jeweiligen Druckstufe ermittelt und die verschiedenen Untersuchungszeitpunkte T0, T1 und T2, sowie die Ergebnisse aus arteriellem und kapillärem Blut und vor und nach der Spiroergometrie miteinander verglichen. Mittels des Programms Graph Pad Prism 6 (Graph Pad Inc., San Diego, USA) wurden die Daten in non-lineare Michaelis-Menten-Kurven umgewandelt, welche die Vergleichswerte  $EI_{max}$ , der Elongationsindex unter maximal vorstellbarem Scherstress, sowie  $SS \frac{1}{2}$ , der Scherstress, der aufgebracht werden muss, um die Hälfte des maximalen Elongationsindex zu erreichen, ergaben (5).

## 2.7. Immunhistochemie an Erythrozyten

Die Objektträger wurden zum Zweck der Studie mit folgenden Antikörpern gefärbt: Anti-eNOS-Serin<sup>1177</sup>-Antikörper (abcam, Cambridge, Großbritannien), einem polyklonalen rabbit-Antikörper in der Verdünnung 1:200, und Anti-eNOS-Antikörper (BD, Franklin Lakes, USA), in der Verdünnung 1:700. Im Folgenden wird nun das Protokoll zur Immunhistochemie an Erythrozyten dargelegt, nach welchem die Objektträger gefärbt wurden.

Auf den hitzefixierten Objektträgern wurden mittels Fettstift ein Hauptfeld und ein Kontrollfeld markiert. Die Objektträger wurden zunächst zwei mal zwei Minuten mit TBS Lösung gespült und anschließend mit 0,1 % Trypsin für 30min bei 37°C im Brutschrank gelagert, um die Erythrozytenmembran permeabel zu machen. Mit Leitungswasser wurde die Reaktion gestoppt und erneut drei mal zwei Minuten mit TBS gewaschen.

Eine Methanollösung im Verhältnis 4000 µg Methanol, 900 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde unter dem Abzug frisch angesetzt und zur Hemmung der endogenen Peroxidase auf die Objektträger pipettiert. Die Objektträger wurden 30 Minuten abgedeckt bei Raumtemperatur ruhen gelassen und anschließend drei mal zwei Minuten mit TBS gespült.

Im Folgenden wurde 3%iges in TBS gelöstes Milchpulver für 30 Minuten auf die Objektträger gegeben, um ein Hintergrundrauschen durch die Blockierung einer unspezifischen Antikörperbindung zu vermindern. Ohne erneutes Waschen wurde der erste Antikörper (eNOS- bzw. eNOS-Serin<sup>1177</sup>-Antikörper) in der entsprechenden Verdünnung mit 0,3%igem Milchpulver und 0,03%igem Tween20 auf die Testflächen gegeben, während auf die Kontrollfläche lediglich 0,3%iges Milchpulver pipettiert wurde. 30 Minuten wurden die Objektträger so abgedeckt ruhen gelassen.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde für weitere 30 Minuten 3%iges Normales Goat Serum (NGS) in TBS aufgetragen. Im Anschluss wurde, ohne Waschen, der 2. Antikörper (Dako, Hamburg, Deutschland), ein polyklonaler goat anti-rabbit-Antikörper, in TGS gelöst (Verdünnung 1:400) aufgetragen und für 30 Minuten abgedeckt einwirken gelassen.

Der Objektträger wurde erneut mit TBS gespült und für 30 Minuten mit Horseradish-Peroxidase-Komplex (HRP) in TBS (Verdünnung 1:400) benetzt.

Nachdem der Objektträger erneut drei mal zwei Minuten mit TBS gespült wurde, wurde die DAB-Färbung angesetzt. Hierfür wurden in mengenangepasstem Verhältnis 15 ml PBS (0,1M), 300 µl Glukose, 150 µl NH<sup>4</sup> und 300 µl NiSO<sup>4</sup> gemischt, anschließend 150 µl Diaminobenzidin (DAB) hinzugefügt und zum Schluss 50 µl Glukoseoxidase zum Reaktionsstart dazugegeben. Die Lösung wurde filtriert und auf die Objektträger pipettiert. Zwischenzeitlich wurde die Färbung der Objektträger mehrfach unter dem Mikroskop beurteilt. Der Anti-eNOS<sup>1177</sup>-Antikörper wurde für 12:56,78 Minuten, der Anti-eNOS-Antikörper für 15:21,88 Minuten mit DAB gefärbt und anschließend drei Mal mit TBS gespült.

Zuletzt wurden die Objektträger durch Eintauchen in einer Alkoholreihe (70%, 96%, 100%, Xylol für jeweils 5 sec) entwässert und mit Entellan auf den Objektträgern mit Deckgläsern eingedeckt.

#### 2.7.1. Auswertung der Immunhistochemiefärbung

An einem Lichtmikroskop („Axiophot“, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden die Erythrozyten in 400-facher Vergrößerung beurteilt und ausgewertet. Die markierten Felder wurden durchsucht und anschließend pro Hauptfeld 100 Erythrozyten aus mindestens 4 Bildausschnitten und pro Kontrollfeld 50 Erythrozyten aus mindestens 2 Ausschnitten ausgewertet. Das Bild des Mikroskops wurde mittels einer Kamera („3CCD“, Sony, Japan) und der KS300 Software (Zeiss, Jena, Deutschland) auf den Computer übertragen und eingefroren. Mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) wurde nun die immunhistochemische Färbung der Erythrozyten analysiert. Die Farbintensität wurde in Graustufen ausgegeben. Zunächst wurde an mindestens drei Stellen des Ausschnitts der Hintergrund vermessen, dessen Grauwert  $220 \pm 5$  betragen sollte. Mit dem Werkzeug „oval selection“ konnten die Erythrozyten

umschlossen und anschließend durch die Messung von Graustufen densitrometrisch vermessen werden.

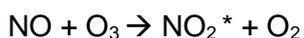
Die ermittelten Grauwerte der Erythrozyten wurden in eine Tabelle unter Microsoft Excel eingetragen, ein Graustufenmittelwert gebildet und von diesem die Graustufe des Hintergrundes subtrahiert, sodass man alleinig die Farbintensität der Erythrozyten erhielt. Hohe Werte bedeuten eine hohe Farbintensität, niedrigere eine geringe Anfärbung. Dies wurde jeweils für das Hauptfeld und das Kontrollfeld jedes Objektträgers berechnet und schließlich zum Vergleich wiederum subtrahiert.

Aus allen Patientenhauptfeldern, sowie allen Kontrollfeldern, wurden nun wiederum Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet

## 2.8. Gasphasen-Chemielumineszenzdetektion von Stickstoffmonoxid in RBC und Plasma

Die Messung des Nitritgehaltes der Erythrozyten und des Plasmas wurden mittels Gasphasen-Chemielumineszenzdetektion (CLD) 88e (EcoPhysics, Duernten, Schweiz) durchgeführt. Dieses Verfahren misst sowohl freies NO, als auch seine Abbau- und Speicherformen.

Das Verfahren beruht auf einer Reaktion von NO mit Ozon. Bei dieser Reaktion entsteht angeregtes Stickstoffdioxid, welches bei Rückkehr in seinen Grundzustand Energie in Form von Lichtquanten abgibt. Die Reaktion sieht folgendermaßen aus:



Das ausgesendete Licht wird mittels Lichtdetektor aufgenommen und als elektrisches Signal weitergeleitet an einen Recorder und von dort aus an einen angeschlossenen Computer.

Der CLD vorgeschaltet ist ein Reaktionssystem. Dieses besteht aus einer Reaktionskammer mit umgebendem Warmwasserbad (60°C). Im Reaktionssystem befinden sich unterschiedliche Reaktionslösungen für die Freisetzung von NO aus bestimmten Geweben. So wird für RBC eine oxidative Reaktionslösung benutzt, während für Plasma eine reduktive Reaktionslösung verwendet wird. Das NO wird mittels des Trägergases Helium, welches über eine Membran in die Kammer einströmt, durch eine gekühlte Kammer weiter transportiert und über eine NaOH-Falle, welche andere enthaltende Stoffe abfangen sollen, in die CLD geleitet



Abbildung 9: Reaktionskammer und Kältekammer

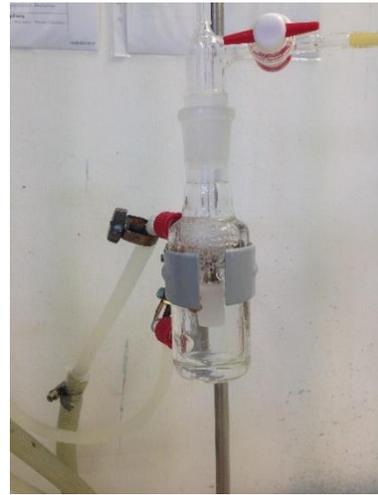


Abbildung 10: NaOH-Falle

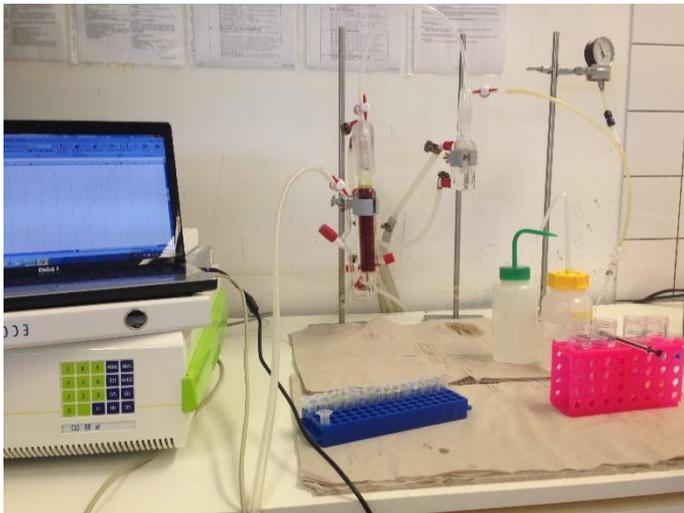


Abbildung 11: vorgeschaltetes System mit Computer und CLD am rechten Bildrand

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen Proben wurden zunächst aufgetaut. Die CLD wurde eingeschaltet, da sie zunächst alle Temperatur- und Drucksollwerte erreichen musste. Nachdem dies geschehen ist, wurden alle anderen Geräte eingeschaltet und die 1M NaOH Lösung der NaOH Falle gewechselt. Die Gasflasche wurde auf einem Druck von 0,5 Bar aufgedreht. Das Reaktionsgefäß wurde zu Beginn, sowie nach Messung von jeweils 6 Proben, mit destilliertem Wasser, Isopropanol und erneut destilliertem Wasser durchgespült. Diese Reinigung geschah ebenfalls nach jeder Probe mit der Hamiltonspritze. Die Reaktionslösung wurde eingefüllt und alle Schläuche verbunden.

Jede Messung begann zunächst mit der Messung einer Eichreihe, bestehend aus dreifachen Messungen 0 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM und 200 nM Nitritstammllösung in

PBS/NaCl. Anschließend konnten die Proben gemessen werden, ebenfalls je drei Mal pro Probe.

Nach Beenden der Messung wurde das System ausgeschaltet und gereinigt.

#### 2.8.1. Auswertung der CLD

Ausgewertet wurde die CLD des RBC- und Plasmanitritgehaltes mittels der Analysensoftware „PowerChrom“. Das Programm misst die Fläche unter den jeweiligen Peaks. Es wurden zunächst die Eichreihen gemessen und eine Eichkurve erstellt, in der die Konzentration gegen die Fläche unter den Peaks aufgetragen wurde. Durch die Software Origin 7.0 konnten weitere Berechnungen angestellt werden. Es wurden Tabellen angelegt, Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten berechnet

#### 2.9. Statistik

Die angegebenen Werte sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Für die Hypothesentestung haben wir nicht-parametrische Tests verwendet, da die Daten zum Teil nicht symmetrisch verteilt sind und nicht einer Normalverteilung entsprechen. Zum Vergleich der Daten zwischen Post-Training und Prä-Training wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Wir legten ein Signifikanzniveau von 0,05 zugrunde.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Vergleich der venösen Erythrozytenflexibilität prä- und post-interventionell

Das Ziel der Messung der Erythrozytenflexibilität mittels LORRCA war zunächst zu untersuchen, ob das drei-monatige Ausdauertraining bei den adipösen Typ-2-Diabetikern Einfluss auf die Verformbarkeit der Erythrozyten hat. Die Erythrozytenflexibilität wurde vor, sowie nach dem drei-monatigem Ausdauertraining venös nüchtern gemessen.

Zum Vergleich der Werte wurden verschiedene Parameter zur Beurteilung der Verformbarkeit herangezogen. Zunächst zeigt Abbildung 12 die Mittelwerte der Elongationsindices aller Probanden unter definiertem Scherstress (Pa).

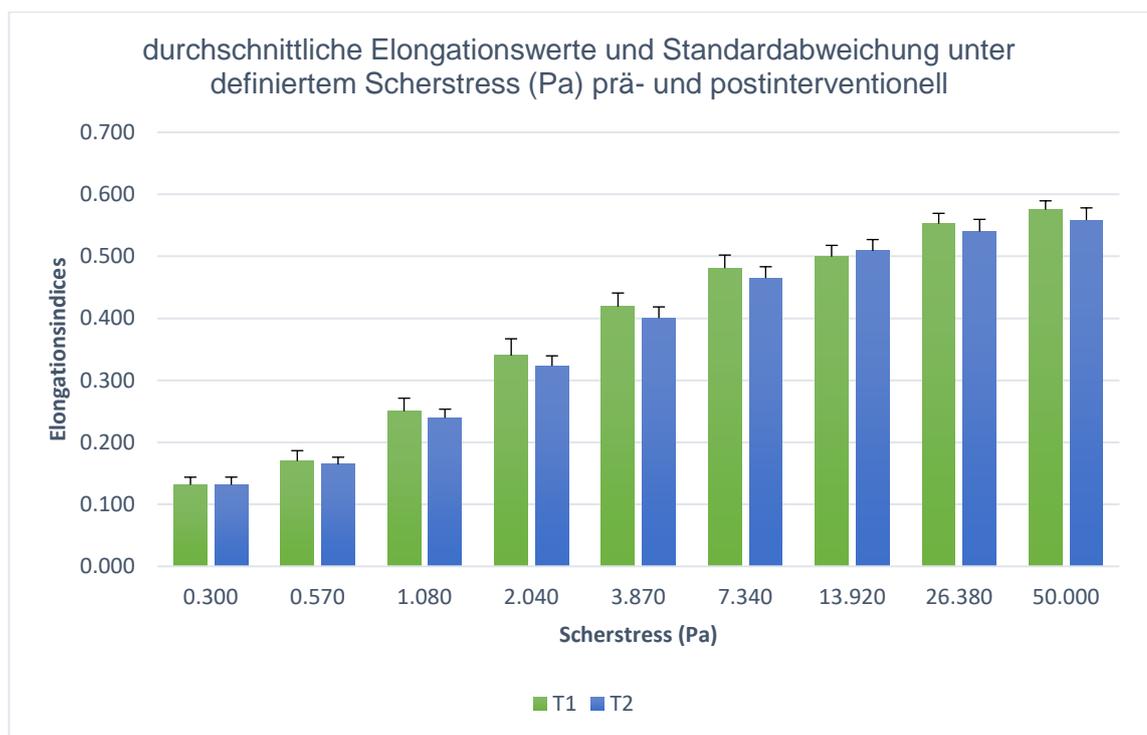


Abbildung 12: Mittlere Elongationswerte der Probanden unter definiertem Scherstress prä- vs. post-interventionell

Man sieht hier keine wesentlichen Veränderungen, insbesondere keine Verbesserung der Verformbarkeit nach dem Ausdauertraining.

Abbildung 13 und 14 stellen die Mittelwerte der maximalen Elongationsindices ( $EI_{max}$ ) sowie des  $SS\ 1/2$  Wertes dar, welcher angibt, welchen Scherstress man benötigt um die Hälfte des maximalen Elongationswertes zu erreichen.

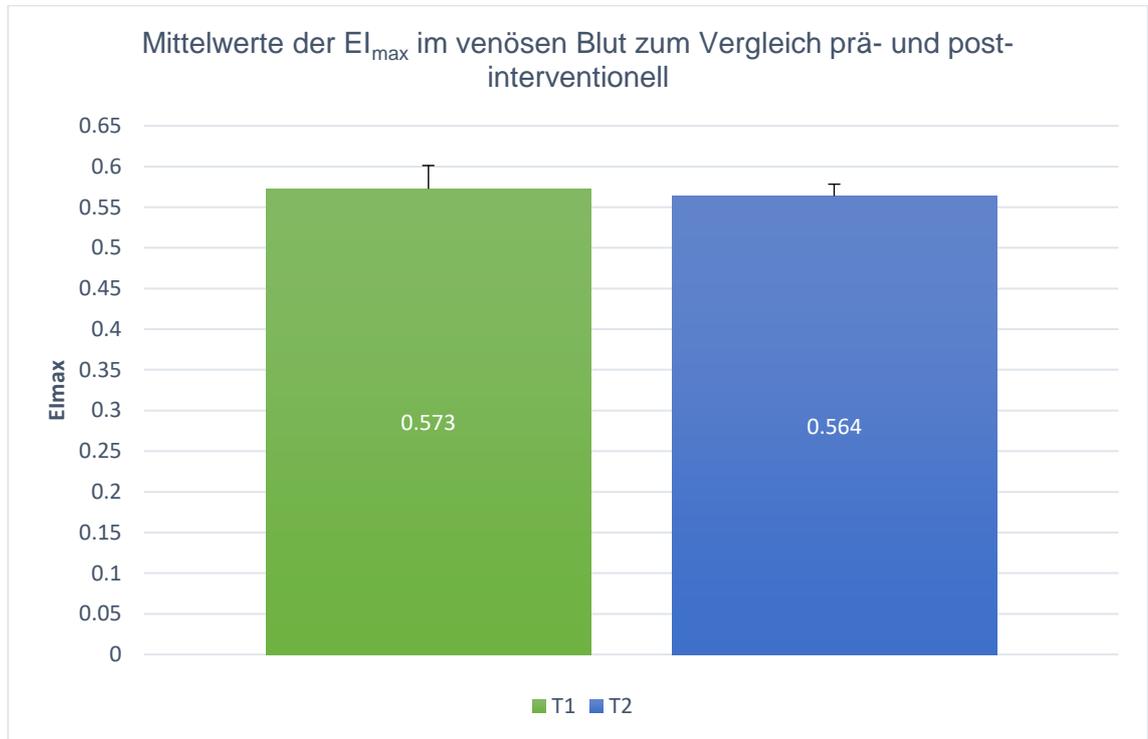


Abbildung 13 und 14: Mittelwerte der  $EI_{max}$  und  $SS\ 1/2$  im venösen Blut zum Vergleich prä- und post-interventionell.

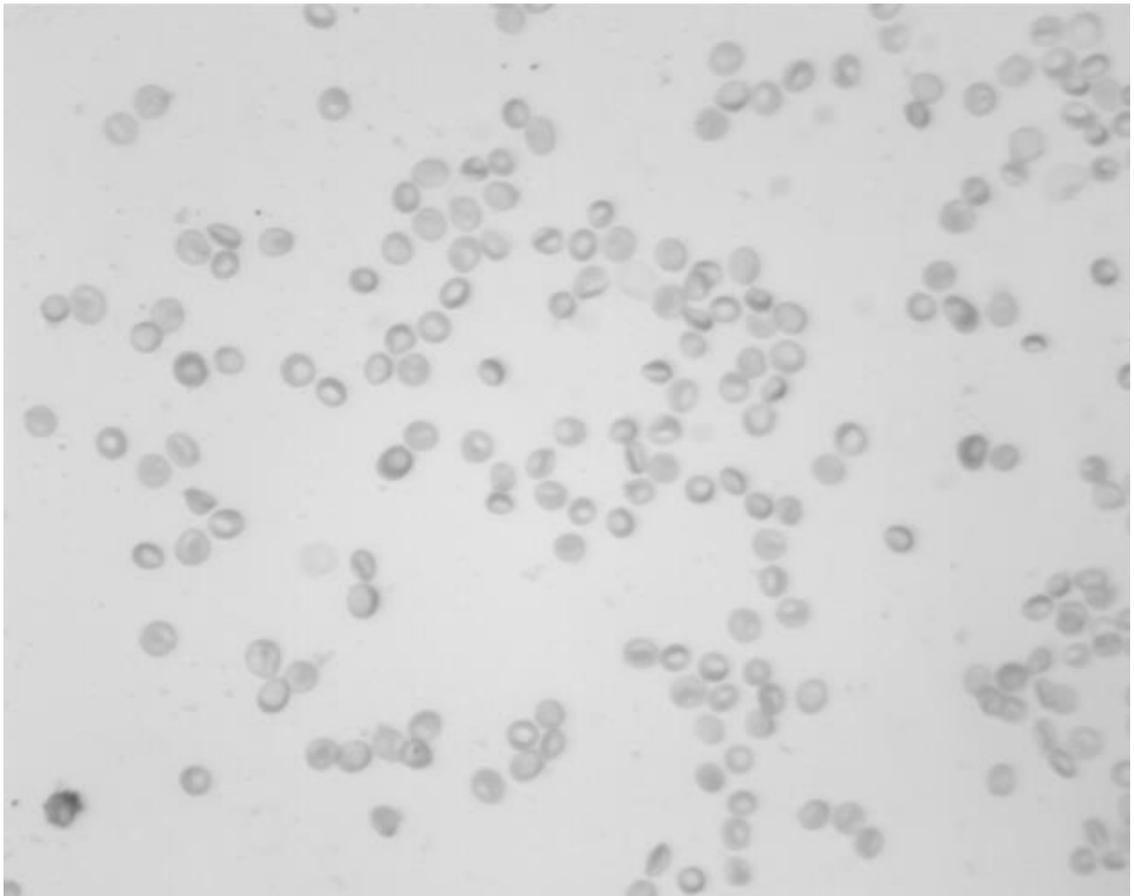
Der maximale Elongationswert vor Beginn der Intervention betrug 0,573 und nach Absolvieren des dreimonatigen Trainings 0,564.  $E_{I_{max}}$  und  $SS \frac{1}{2}$ , beides aussagekräftige Parameter zur Beurteilung der Verformbarkeit, zeigen keine Verbesserung der Verformbarkeit nach dem dreimonatigen Ausdauertraining an.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Verformbarkeit durch das hier durchgeführte moderate Ausdauertraining prä- zu post-interventionell bei den adipösen Typ-2-Diabetikern nicht signifikant ändert.

### 3.2. Graustufenwerte der RBC-NOS Total

Die Graustufenwerte der Immunhistochemiefärbungen der RBC-NOS veränderten sich durch das Ausdauertraining nicht signifikant (Abbildung 20). Es konnten von 17 Proben 9 ausgewertet und berücksichtigt werden. Der Mittelwert der Graustufen beträgt prä-interventionell  $3,80 \pm 3,53$  und post-interventionell  $5,64 \pm 3,71$ . Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten Veränderungen durch die Intervention.

Die Abbildungen 15-6 zeigten Fotos der Erythrozyten nach Anfärbung. Aus diesen Fotos wurden mittels des Programms ImageJ die Graustufen ermittelt.



Abbildungen 15 und 16: Fotos der RBC-NOS-Total-Färbung prä (oben) und post (unten)

Abbildung 17 gibt die durchschnittlichen Graustufenwerte der einzelnen Probanden vor und nach der Intervention wieder. Es lässt sich insgesamt keine Tendenz einer Änderung der Graustufenwerte erkennen.

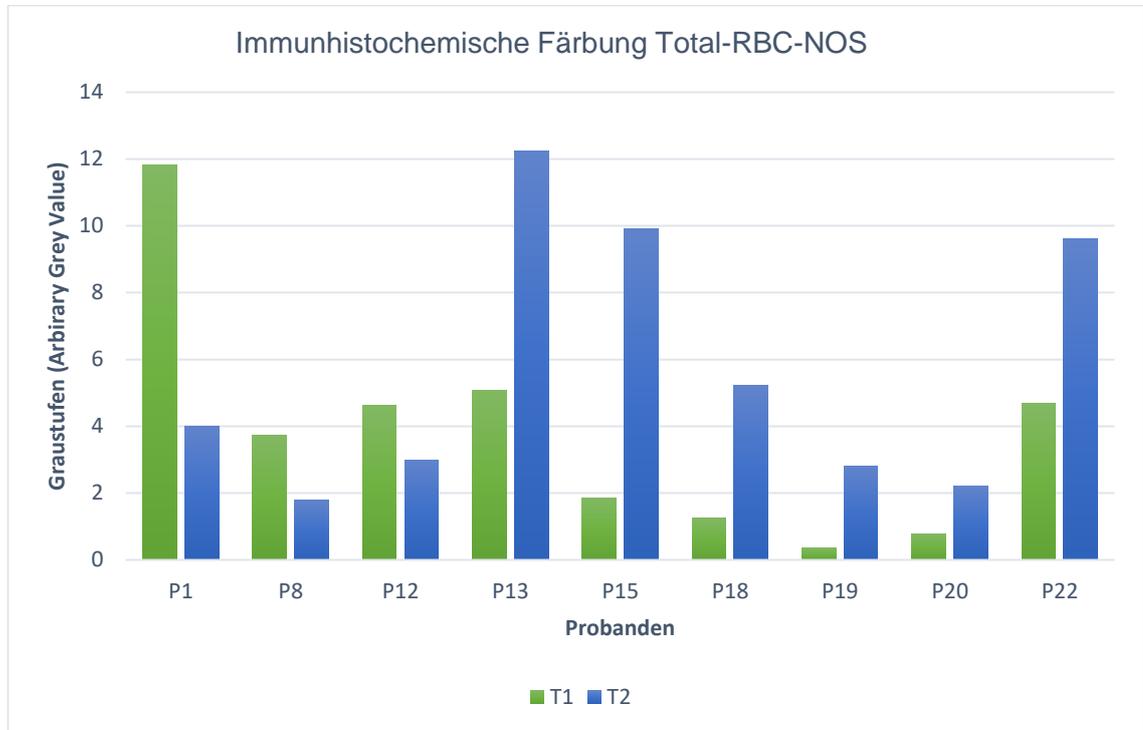


Abbildung 17: Graustufenwerte der Erythrozyten nach immunhistochemischer Anfärbung der RBC-NOS.

Abbildung 18 zeigt die Mittelwerte der Graustufenwerte aller Probanden prä- und post-interventionell, zur Verdeutlichung, dass es keine signifikante Änderung gibt.

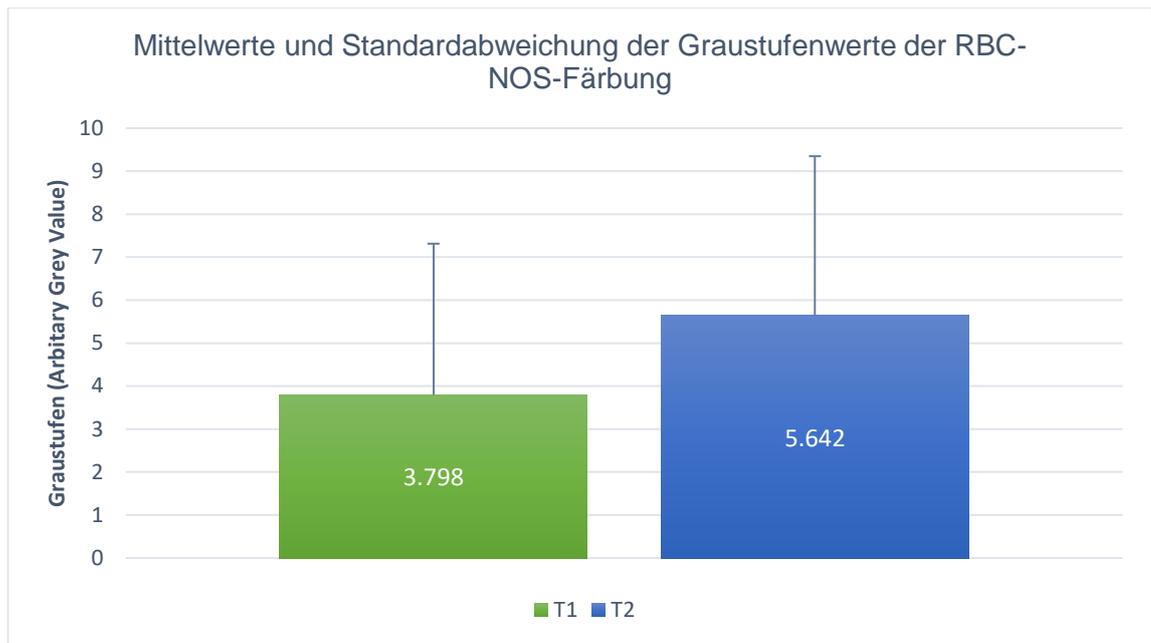
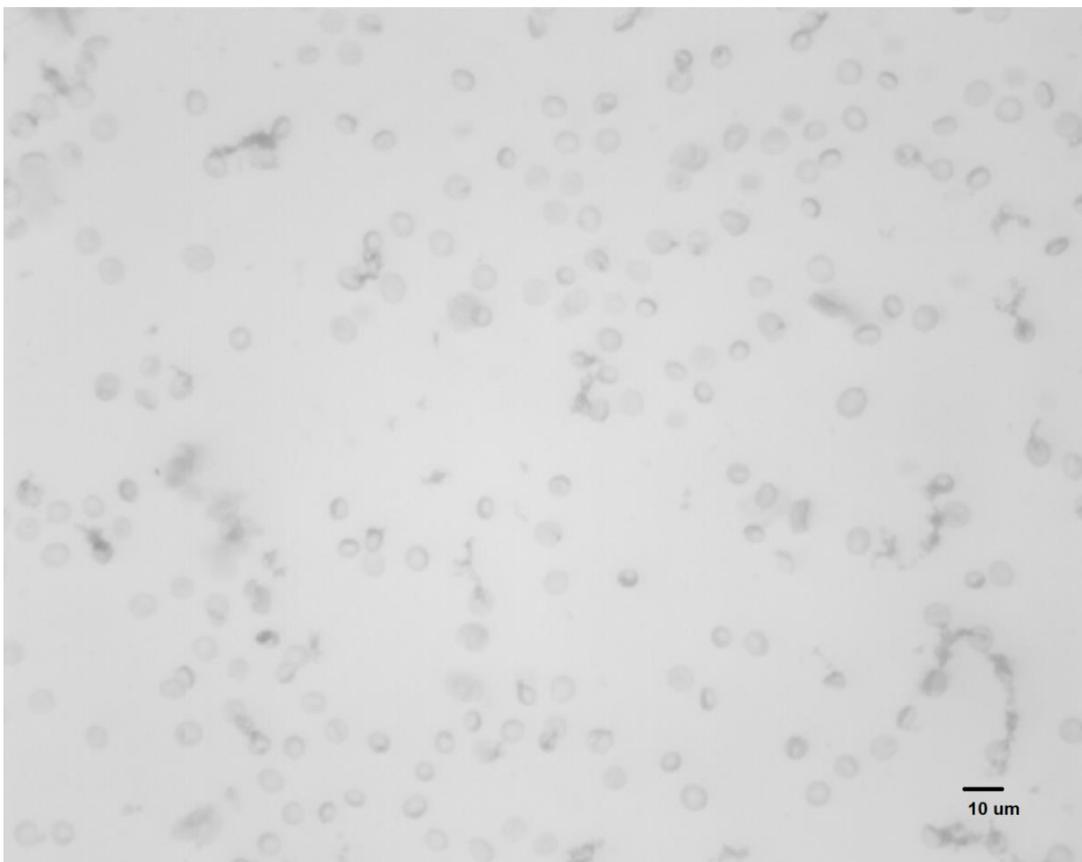
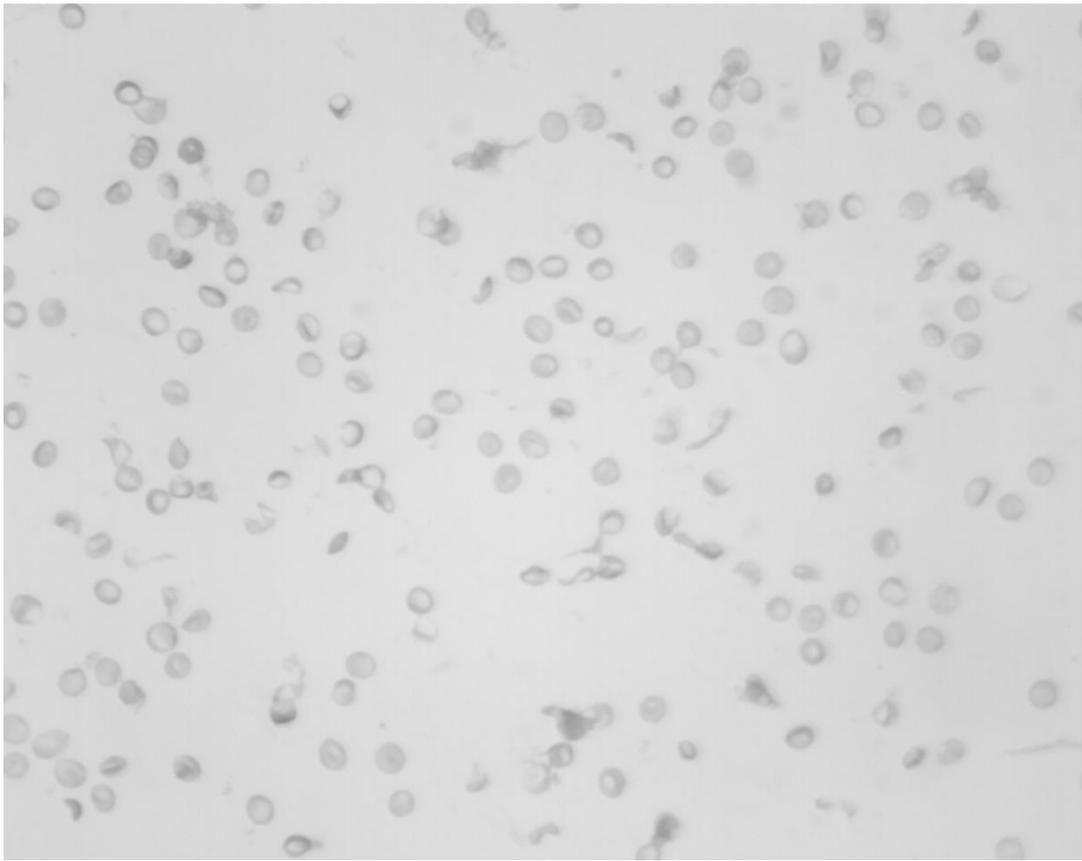


Abbildung 18: Mittelwert und Standardabweichung der Graustufenwerte der immunhistochemischen RBC-NOS-Färbung aller Probanden.

### 3.3. Fehlende trainingsinduzierte Erhöhung der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung

Die immunhistochemischen Färbungen der phosphorylierten RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup> ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Graustufen im Vergleich vor zu nach der Trainingsintervention. Die Färbung konnte bei 11 von 17 Probanden beurteilt und in die statistischen Berechnungen mit einbezogen werden.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigt Fotos der immunhistochemisch gefärbten Erythrozyten unter dem Mikroskop, welche in die Berechnungen miteingingen.



Abbildungen 19 und 20: Fotos der Erythrozyten nach Anfärbung der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup> prä- (oben) und post- (unten) interventionell

Abbildung 21 zeigt die Graustufenwerte aller Probanden vor und nach der Intervention. In Abbildung 22 wird der Mittelwert der Graustufenwerte aller Probanden vor und nach dem Ausdauertraining vergleichend dargestellt.

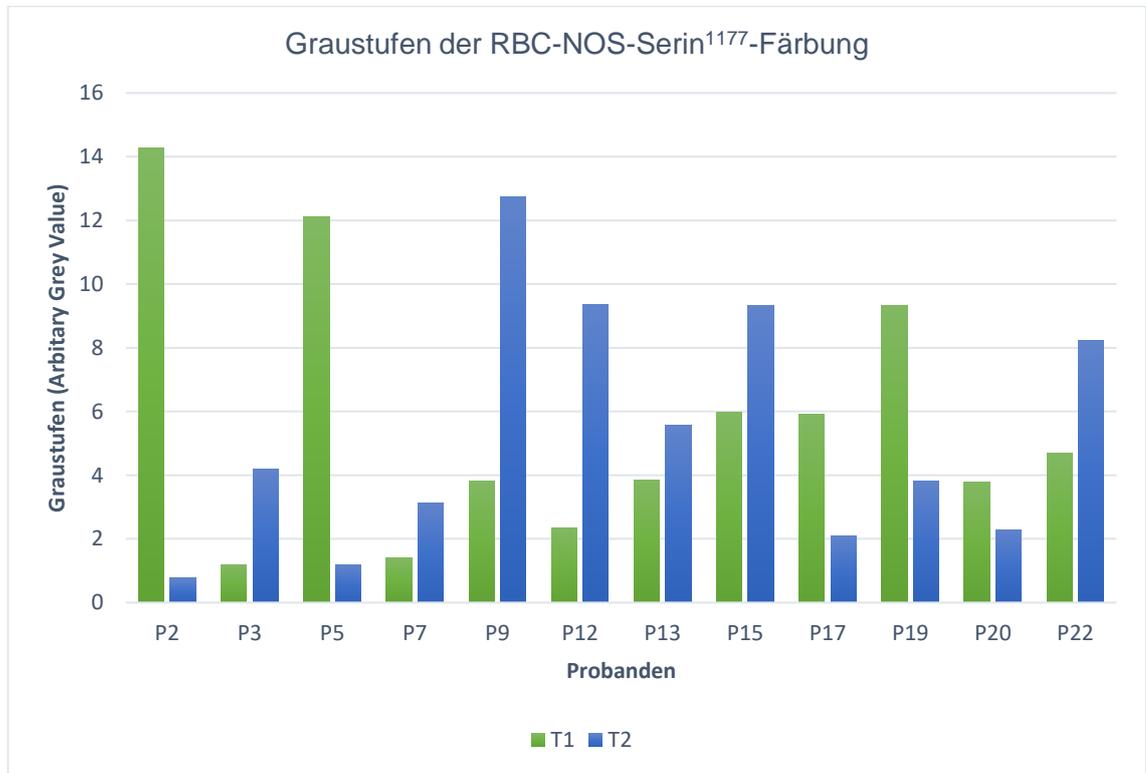


Abbildung 21: Graustufenwerte der Erythrozyten nach immunhistochemischer Färbung der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>

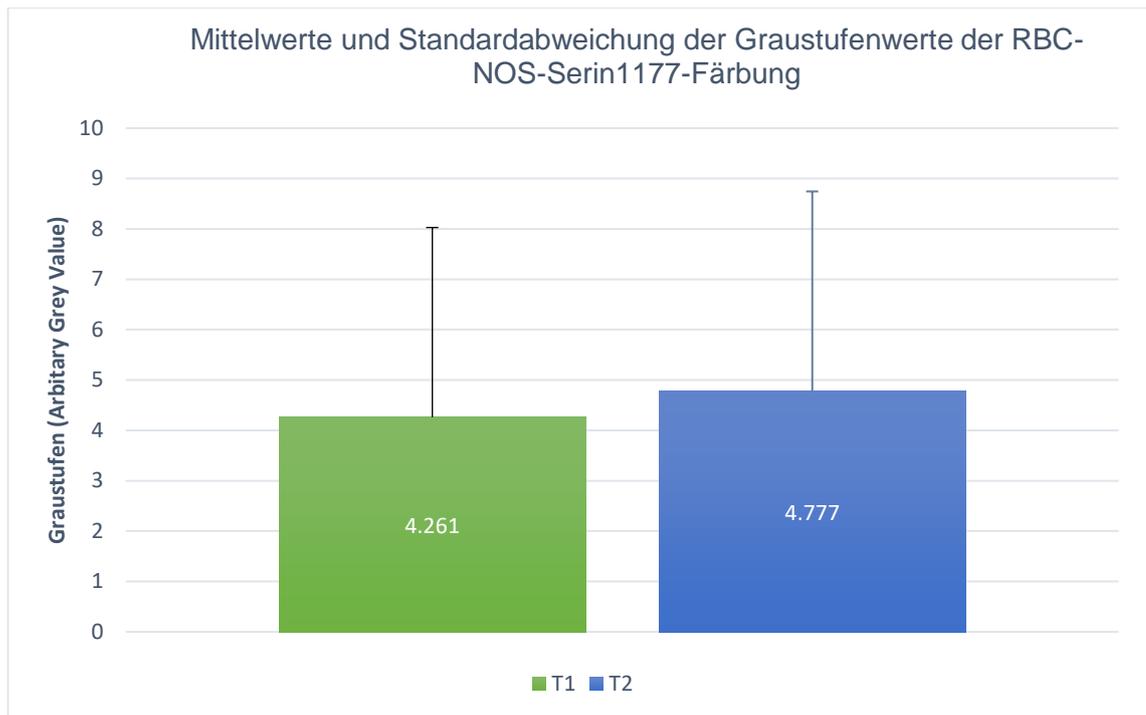


Abbildung 22: Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der Graustufenwerte der immunhistochemischen RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Färbung aller Probanden.

Der mittlere Graustufenwert vor Beginn des Ausdauertrainings beträgt  $4,26 \pm 3,77$ . Nach dem Ausdauertraining beträgt der Mittelwert der Graustufen  $4,78 \pm 3,97$ . Der Unterschied ist unter einem Signifikanzniveau von 0,05 nicht signifikant.

Es scheint also so, dass es durch das Ausdauertraining nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung der RBC-NOS am Serin<sup>1177</sup> beim Typ-2-Diabetiker kommt, somit also nicht zu einer vermehrten Aktivität des Enzyms. Dies wäre passend zum Ergebnis der Erythrozytenflexibilitätsmessung, die ebenfalls keine erhöhte Verformbarkeit zeigt.

#### 3.4. Ergebnisse der CLD von Stickstoffmonoxid in RBC und Plasma

Die Werte des Stickstoffmonoxids wurden sowohl im Plasma als auch in den Erythrozyten gemessen. Generell zeigt sich ein deutlich höherer NO-Gehalt in den Erythrozyten im Vergleich zum Plasma, was auch auf die Aktivität der RBC-NOS zurückzuführen ist.

Abbildung 23 und 24 zeigen die Mittelwerte des NO-Gehalts von Plasma und RBC im Vergleich prä- und post-interventionell. Der Mittelwert für das Stickstoffmonoxid im Plasma beträgt  $56,03 \pm 36,50$  zum Zeitpunkt T1 und  $43,65 \pm 19,46$  zum Zeitpunkt T2 (Abbildung 27). In den Erythrozyten beträgt der Mittelwert des Stickstoffmonoxid

173,82±93,14 zum Zeitpunkt T1 und 249,42±158,00 bei T2 (Abbildung 27). Die Unterschiede sind auf Grund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Es kann also nicht auf eine Änderung des Stickstoffgehaltes im Plasma und den Erythrozyten durch das Ausdauertraining geschlossen werden.

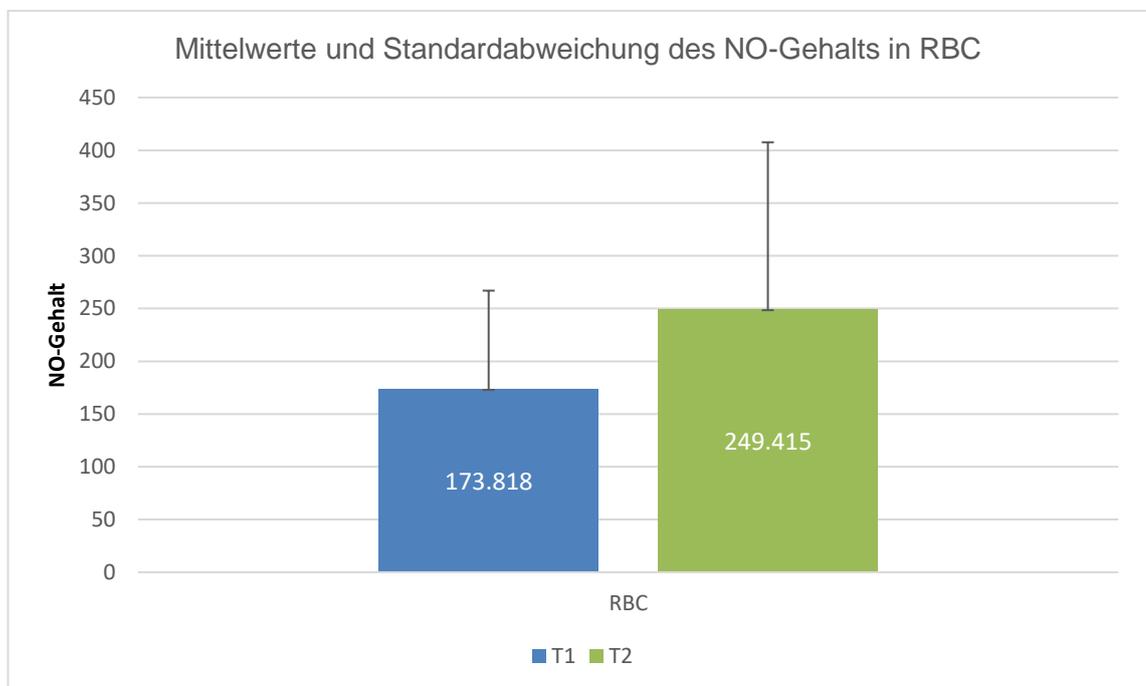
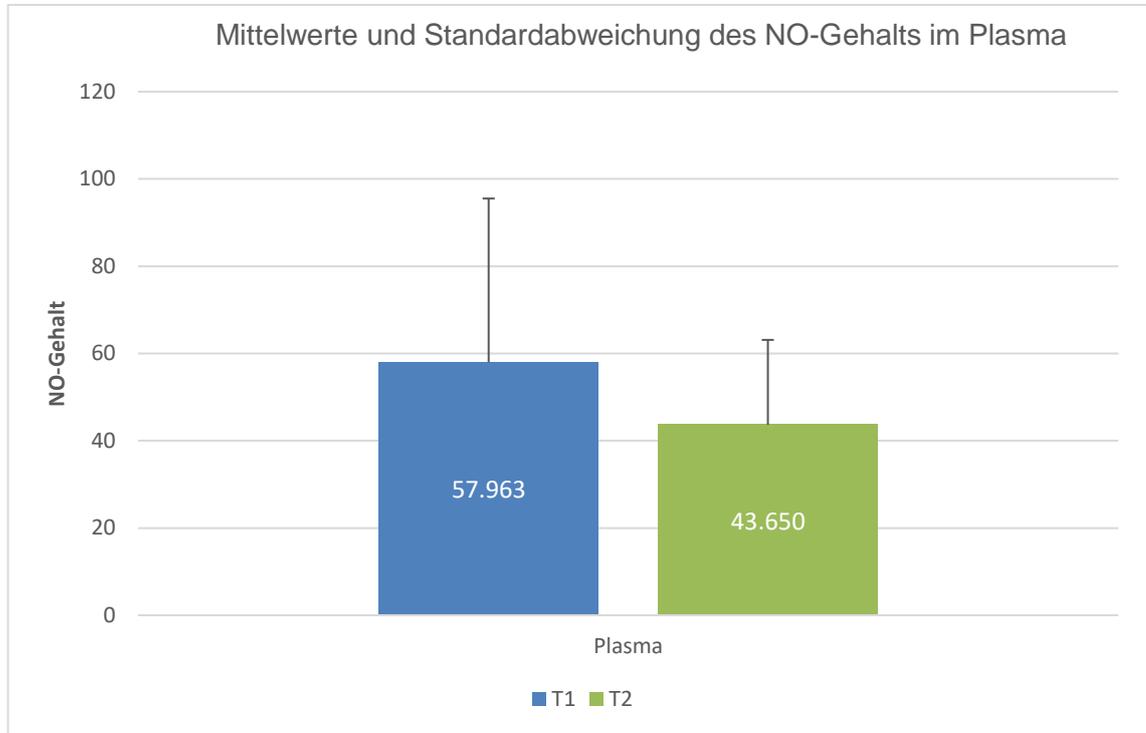


Abbildung 23 und 24: Mittelwerte des NO-Gehalts aller Probanden in Plasma und Erythrozyten bei T1 und T2

Auch der NO-Gehalt im Blut der Patienten scheint sich also nicht zu verändern. Dies steht im Einklang mit den ausbleibenden Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit und dem fehlenden Anstieg der eNOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung.

### 3.5. Vergleich der Flexibilitätswerte vor und nach einer akuten Belastung

Des Weiteren wurde untersucht ob es durch eine akute Belastung zu einer Änderung der Verformbarkeit kommt. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der spiroergometrischen Fahrradbelastungstests, die wir zur Leistungsüberprüfung durchführten, unmittelbar vor, sowie im direkten Anschluss an die Belastung Kapillarblut entnommen und untersucht.

Abbildung 25 zeigt die Erythrozyten-Elongationsindices in Abhängigkeit von definierten Scherstressdruckstufen (Pa).

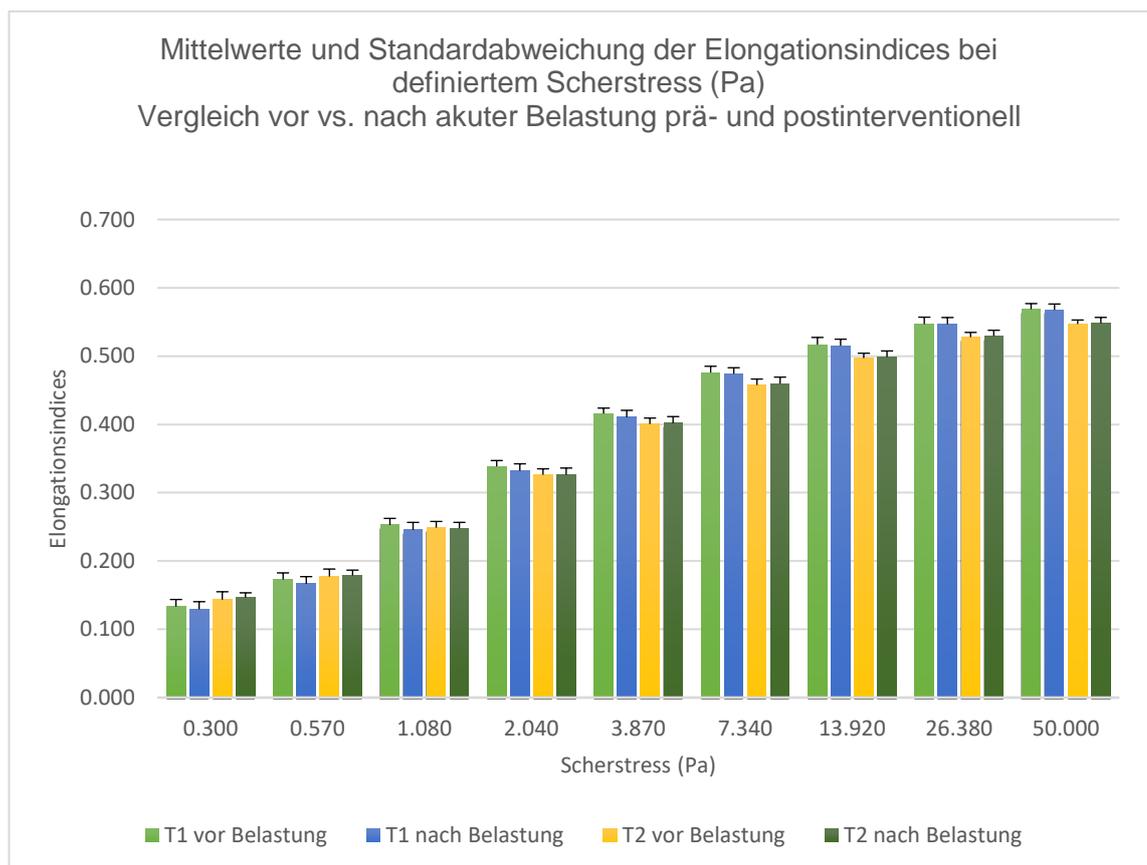


Abbildung 25: Elongationsindices prä- und post-interventionell vor und nach einer akuten Belastung auf dem Fahrradergometer.

Die Elongationsindizes, die vor und unmittelbar nach einer Belastung durch Spirometrie zu den beiden Untersuchungszeitpunkten gemessen wurden, waren vergleichbar und zeigten auch nach dem dreimonatigen Ausdauertraining keine signifikante Veränderung.

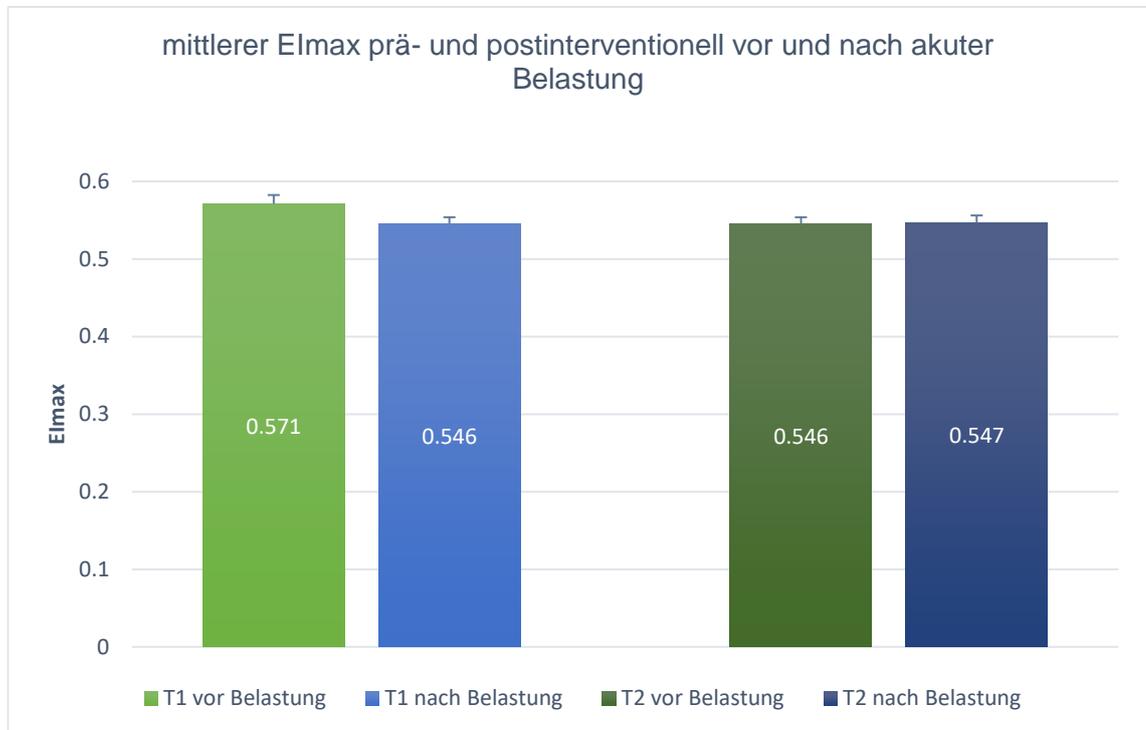


Abbildung 26: Mittlerer maximaler Elongationsindex prä- und post-interventionell jeweils kapillär abgenommen vor und nach einer fahrradergometrischen Belastung.

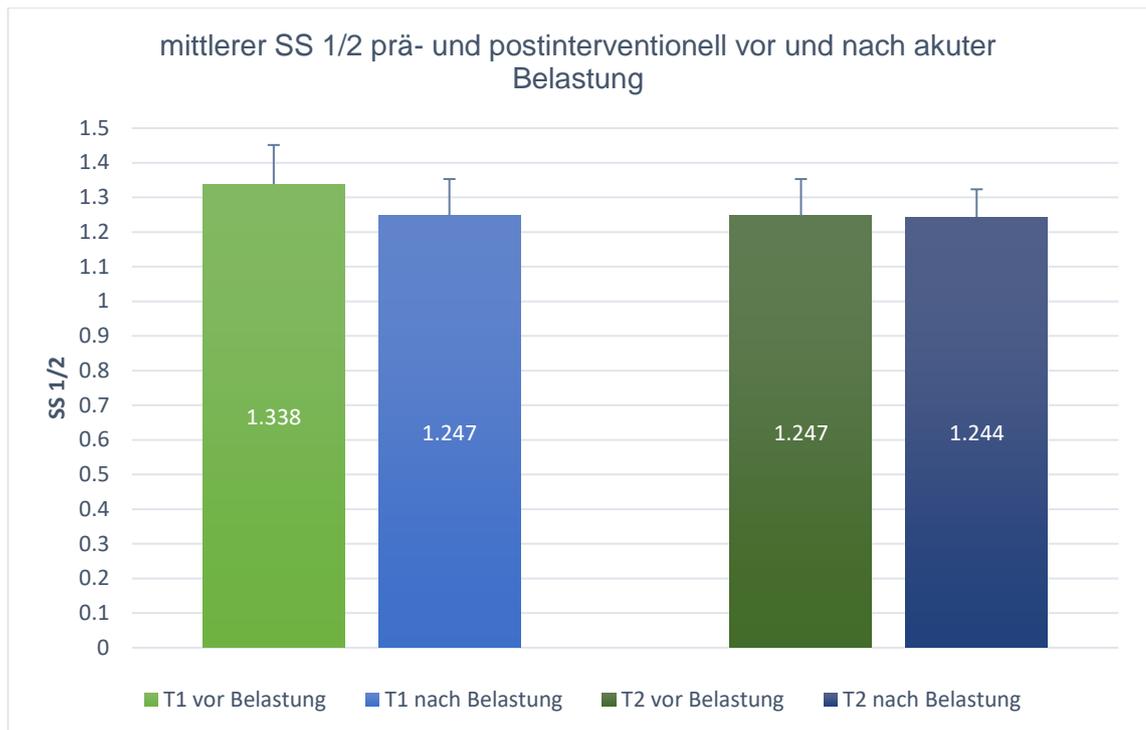


Abbildung 27: Mittlerer SS 1/2 Wert prä- und post-interventionell jeweils kapillär abgenommen vor und nach einer fahradergometrischen Belastung.

Abbildung 26 bildet die maximalen Elongationsindizes vor und nach der Belastung prä- und post-interventionell ab, Diagramm 27 stellt die zugehörigen SS 1/2 Werte dar. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der Verformbarkeitswerte vor zu nach einer akuten Belastung herausstellen.

Die zugrundeliegenden Rohdaten der Verformbarkeitsmessungen sind im Anhang zu finden.

### 3.6. Vergleich venöser und kapillärer Werte

Des Weiteren wurde untersucht, ob Verformbarkeitsunterschiede zwischen venösem und kapillärem Blut bestehen. Die Erythrozytenverformbarkeit wurde hierzu zu den beiden Untersuchungszeitpunkten T1 und T2 jeweils morgens nüchtern kapillär und venös gemessen.

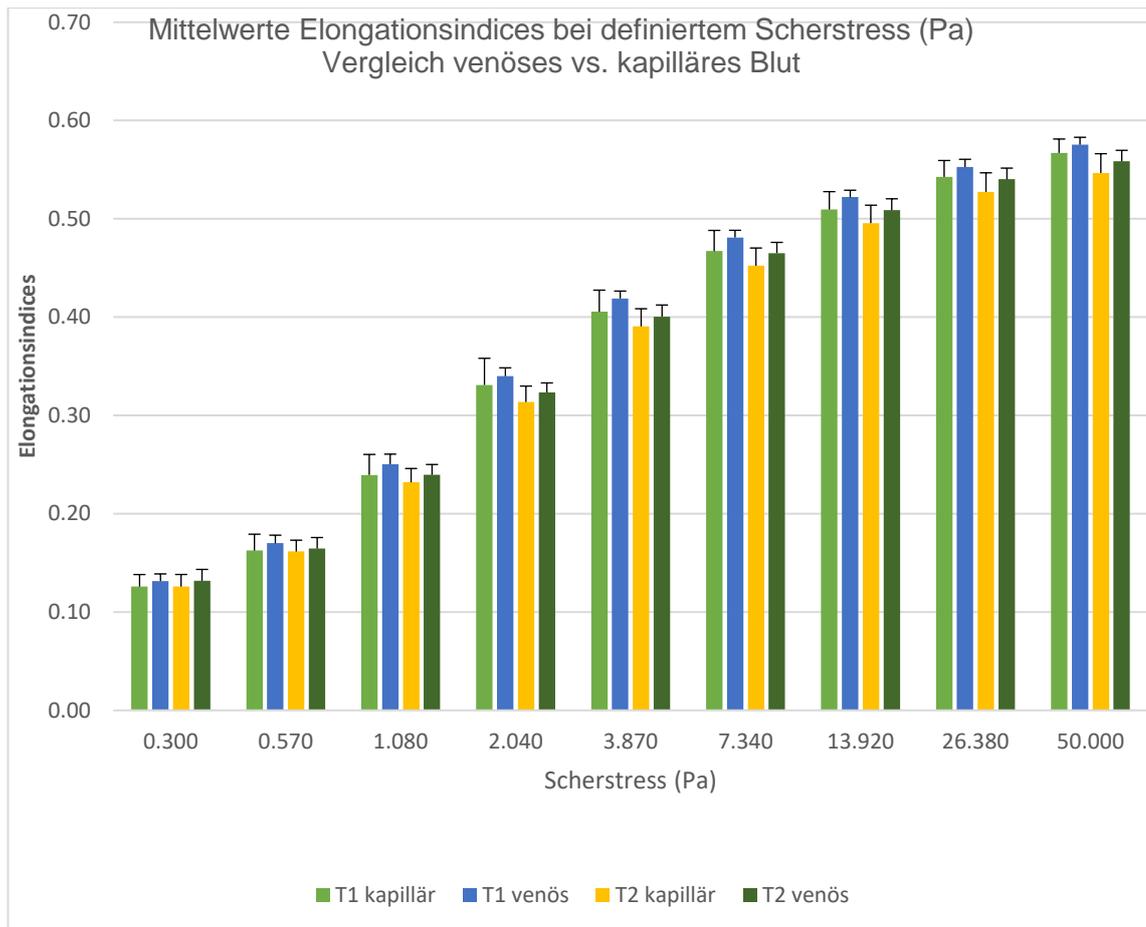


Abbildung 28: Vergleich der Elongationsindices unter definiertem Scherstress in venösem und kapillärem Blut.

Abbildung 28 zeigt die Mittelwerte der Elongationswerte der Erythrozyten aller Probanden bei definiertem Scherstress (Pa). Hier zeigen sich unter zunehmendem Druck keine wesentlichen Unterschiede der Elongationsindices zwischen venösem und kapillärem Blut.

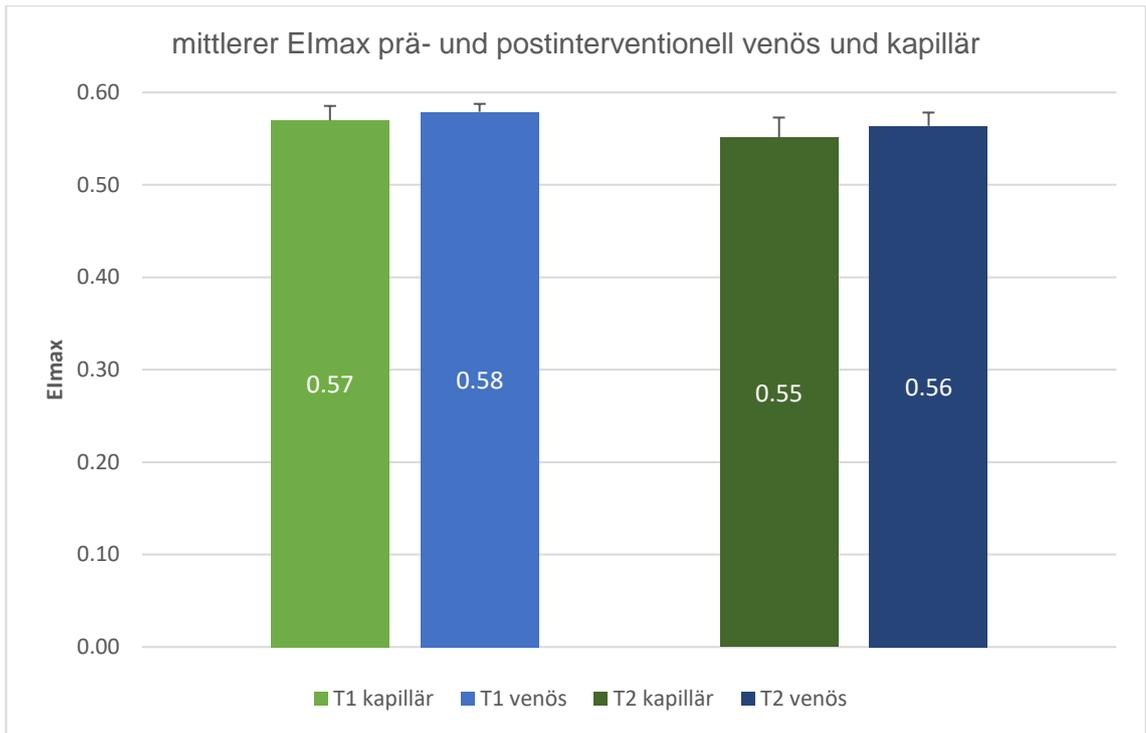


Abbildung 29: Vergleich der Mittelwerte der maximalen Elongationsindices venös und kapillär vor und nach dem dreimonatigen Ausdauertraining.

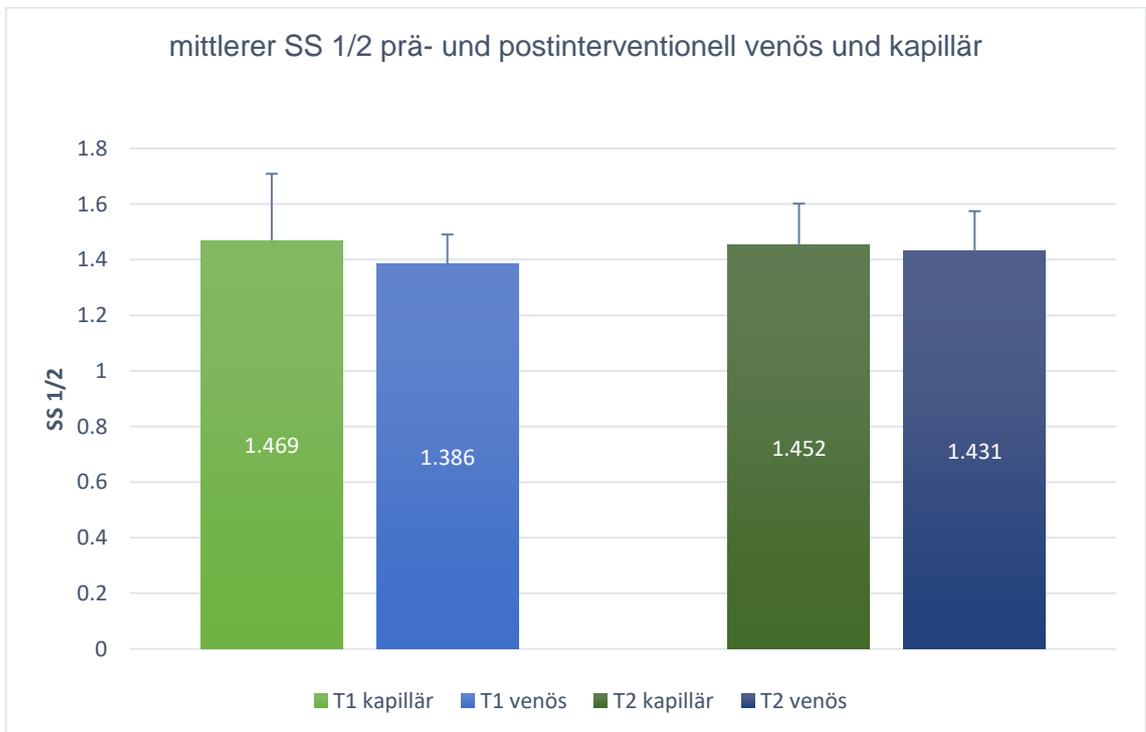


Abbildung 30: Vergleich der Mittelwerte der SS 1/2 Werte venös und kapillär vor und nach dem dreimonatigen Ausdauertraining.

Abbildung 29 zeigt einen Vergleich der Mittelwerte der maximalen Elongationsindizes aus Kapillarblut und venösem Blut. Der mittlere maximale Elongationsindex zeigte hier keine wesentlichen Änderungen prä- zu post-interventionell. Im kapillären Blut lag der Mittelwert der maximalen Elongationsindizes vor dem Ausdauertraining bei 0,570, nach dem Training bei 0,551. Im venösen Blut zeigte sich der maximale Elongationsindex nicht signifikant different zu dem im Kapillarblut gemessenen. Er betrug 0,573 vor und 0,564 nach der Intervention. Abbildung 30 zeigt einen Vergleich der SS ½ Werte.

Es konnten insgesamt keine signifikanten Unterschiede der Verformbarkeit der Erythrozyten im venösen bzw. kapillären Fluss herausgestellt werden.

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

Die durchgeführte Studie untersucht den Einfluss eines dreimonatigen Ausdauertrainings auf die Erythrozytenflexibilität von Typ-2-Diabetikern. Die vor Beginn und nach Abschluss der Trainingsperiode durchgeführten Untersuchungen beinhalteten Messungen der Erythrozytenflexibilität, immunhistochemische Färbungen der RBC-NOS-Total und der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>, sowie Messungen des NO-Gehalts in Erythrozyten und Plasma.

Die Ergebnisse der Messungen können keine signifikanten Änderungen der Erythrozytenflexibilität nachweisen. In den Messungen mittels LORRCA zeigte sich die Erythrozytenflexibilität nach dem dreimonatigen Ausdauertraining unverändert. Auch die Aktivierung der erythrozytären NO-Synthase durch Phosphorylierung am Serin<sup>1177</sup> zeigte keine Erhöhung. Dementsprechend war auch der NO-Gehalt im Plasma und den Erythrozyten nicht signifikant verändert. Die Ergebnisse der Messungen prä- und post-interventionell zeigen also übereinstimmend, dass es durch das Training nicht zu einer Änderung des NO-Haushaltes der Erythrozyten und somit nicht zu einer Änderung der Erythrozytenflexibilität gekommen ist.

Ein weiterer Aspekt, der in der Studie untersucht wurde, war die Änderung der Erythrozytenflexibilität nach kurzfristiger intensiver Belastung. Auch hier zeigten sich keine Veränderungen.

Außerdem wurde untersucht, ob venöse beziehungsweise kapilläre Blutentnahmen unterschiedliche Ergebnisse der Erythrozytenflexibilität erbringen. Die Ergebnisse zeigten sich hierbei übereinstimmend.

##### 4.1. Bewertung der Methoden

Die Messergebnisse der Studie sind untereinander übereinstimmend. Es wurde nicht nur die Erythrozytenflexibilität gemessen, sondern auch die RBC-NOS-Total, die RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung und der NO-Gehalt.

Zur Überprüfung des Trainingserfolges (beziehungsweise zur Überprüfung der Hypothese) wurde nicht nur die Erythrozytenflexibilität mittels LORRCA gemessen. Es wurde ebenfalls die Phosphorylierung der erythrozytären NO-Synthase am Serin<sup>1177</sup> durch immunhistochemische Färbungen beurteilt und der NO-Gehalt in Plasma und Erythrozyten durch Gasphasen-Chemielumineszenzdetektion gemessen. Die RBC-NOS wird auf verschiedene Wege aktiviert, beispielsweise durch Kalzium-Einstrom oder Scherstress (58). Einer der Wege ist die Aktivierung über den PI3K/Akt-Weg, der

die NOS über Phosphorylierung am Serin<sup>1177</sup> aktiviert (26). Deshalb kann man RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup> messen, um die Aktivität der RBC-NOS zu überprüfen. Die Phosphorylierung am Serin<sup>1177</sup> ist nicht die einzige Aktivitätsbestimmende, so wird die RBC-NOS durch eine Phosphorylierung am Thyrosin<sup>495</sup> inaktiviert (31). Durch eine Aktivierung der NO-Synthase kommt es zur Produktion von NO. Dieses führt dann zu einer S-Nitrosylierung des Spektrins, des Zytoskeletts der Erythrozyten, wodurch diese eine höhere Flexibilität erlangen (34). Es ist also sinnvoll, nicht nur die Erythrozytenflexibilität zu überprüfen, sondern auch die RBC-NOS-Aktivität und den NO-Gehalt, da diese Faktoren korrelieren. Die übereinstimmenden Ergebnisse machen die Studie somit valider. In der durchgeführten Studie korrelieren die Ergebnisse, es konnten weder signifikante Veränderungen der Erythrozytenflexibilität nachgewiesen werden, noch signifikante Änderungen der RBC-NOS-Aktivierung und des NO-Gehaltes.

Ein möglicher Einfluss unterschiedlicher Trainingsintensität wurde unterbunden. Alle Teilnehmer waren zu 90% und mehr bei den Trainingsterminen anwesend. Die Dauer des Trainings war vorgegeben und steigerte sich über die Periode hinweg. Die Intensität des Trainings richtete sich nach der Herzfrequenz: Die Teilnehmer sollten im Bereich einer bestimmten Herzfrequenz trainieren, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass sie sich zu wenig anstrebten oder verausgabten. Mögliche Störfaktoren durch zu leichtes oder exzessives Ausdauertraining, welches die Erythrozytenflexibilität eher negativ beeinflusst (75), können also ausgeschlossen werden.

Die Probandengruppe bestand aus männlichen, adipösen Typ-2-Diabetikern ohne Insulinpflichtigkeit. Keiner von Ihnen litt zum Zeitpunkt der Studie schon unter Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus. Alle gaben in einem Fragebogen an, zuvor nicht regelmäßig Sport betrieben zu haben.

Lediglich das Vorliegen einer Hypertonie musste aus den Ausschlusskriterien herausgenommen werden, denn diese war bei 12 der 17 Patienten diagnostiziert. Nicht nur der Diabetes Mellitus, sondern auch eine Hypertonie kann Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität haben. Bei hypertensiven Probanden konnte in Studien ebenfalls eine erniedrigte Erythrozytenflexibilität nachgewiesen werden (22, 32, 59). Die Hypertonie kann also als potentieller Störfaktor gewertet werden, da sie die Bedingungen jedoch nicht grundsätzlich ändert, sondern nur gegebenenfalls die ohnehin erniedrigte Erythrozytenflexibilität verstärkt, sollte der Einfluss nicht als verfälschend gewertet werden. Des Weiteren ist die Hypertonie als Komorbidität bei Diabetikern so häufig (27), dass sie definitiv nicht außer Acht gelassen werden sollte,

wenn man den Einfluss von Sport auf die Erythrozytenflexibilität bei Typ-2-Diabetikern untersucht.

Teilweise nahmen die Probanden Medikamente ein, die ebenfalls Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität nehmen können. Elf Probanden nahmen regelmäßig orale antidiabetische Medikamente ein. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus Pioglitazon und Metformin die Erythrozytenflexibilität verbessern konnte (33). Auch durch eine gleichzeitige Einnahme von Vildagliptin und Metformin konnte eine verbesserte Erythrozytenflexibilität erreicht werden. Dieser Einfluss war aber eher nicht auf die Medikamente an sich zurückzuführen, sondern korrelierte mit der verbesserten metabolischen Kontrolle (8). Zwölf Probanden nahmen antihypertensive Medikamente ein, von denen bisher keine Effekte auf die Erythrozytenflexibilität nachgewiesen wurden. Außerdem nahmen zwei der Patienten cholesterinsenkende Medikamente ein. Eine Studie von Ludolph et al. konnte eine vermehrte RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung sowie eine verbesserte Verformbarkeit durch die Einnahme von Rosuvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer nachweisen (50).

Die metabolische Kontrolle ist ebenfalls ein Einflussfaktor. In Studien wurde eine deutliche Korrelation der Erythrozytenflexibilität mit dem HbA1c-Wert der unter Diabetes Mellitus leidenden Probanden gefunden (66, 77), sowie eine leichte Korrelation mit den Serumlipiden. Da sich diese jedoch durch Sport auch eher verbessern (24), könnten sie die Wirkung des Sports verstärken, aber die Ergebnisse nicht verfälschen.

Insgesamt gab es also einige patientenbezogene Faktoren, die Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität haben. Da diese sich jedoch im Verlauf der Studie nicht änderten, verfälschten sie die Ergebnisse nicht.

#### 4.2. Keine Veränderungen der erythrozytären NO-Produktion und der Erythrozytenflexibilität durch dreimonatige Trainingsintervention

Schon 2000 konnte erstmals eine NO-Synthese in Erythrozyten nachgewiesen werden (40) und durch Kleinbongard et al. konnte nicht nur die funktionelle Aktivität der RBC-NOS bestätigt werden, sondern auch ihr Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität (42). Zahlreiche Studien ergaben eine Verbesserung der Erythrozytenflexibilität durch Stimulation der RBC-NOS, sowie eine reduzierte Flexibilität durch deren Inhibition (11, 25, 42). Die Werte der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>, des NO-Gehalts in der Zelle und der Erythrozytenflexibilität sollten also stets miteinander korrelieren. Dies ist auch in der

durchgeführten Studie so, in keiner der Messungen zeigten sich bei den adipösen Typ-2-Diabetikern signifikante Änderungen nach dem durchgeführten dreimonatigen Ausdauertraining.

Generell haben Typ-2-Diabetiker, wie es die Probanden seit durchschnittlich fünf Jahren waren, eine erniedrigte Erythrozytenflexibilität (41, 63). Dies liegt an den metabolischen Veränderungen im Blut. So kommt es zu Glykosylierung von Membranproteinen und dem Zytoskelett, was die Flexibilität behindert (63) und zu erhöhtem oxidativem Stress führt (65). Eine reduzierte Erythrozytenflexibilität hat Einfluss auf die Hämorheologie (11, 15, 42). Durch eine reduzierte Flexibilität wird einerseits der Blutfluss erschwert, da die Erythrozyten nicht so unvermittelt durch die kleinsten Kapillaren gelangen können, andererseits aber auch die Sauerstoffaufnahme in der Lunge sowie die Sauerstoffabgabe ins Gewebe erschwert (15), was das beim Diabetes Mellitus bestehende Risiko für eine Angiopathie zunehmend vergrößert (45). Die Erythrozytenflexibilität ist also ein bedeutender Faktor für den Krankheitsverlauf, weshalb erforscht werden sollte, wie man sie optimieren kann.

Es ist beschrieben, dass die Erythrozytenflexibilität durch ein moderates Ausdauertraining verbessert werden kann (74). Suhr et al. führten mit gesunden, jungen, männlichen Probanden einen einstündigen moderaten Laufbandtest durch und ermittelten die Erythrozytenflexibilität sowie korrelierende Werte. Sie fanden nach dem Test eine signifikant erhöhte RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung bei immunhistochemischen Färbungen, einen erhöhten NO-Gehalt in den Erythrozyten, sichtbar gemacht durch DAF-Fluorometrie, und eine signifikant verbesserte Erythrozytenflexibilität. Der maximale Elongationsindex verbesserte sich von  $0,57 \pm 0,019$  auf  $0,6 \pm 0,013$ . Sie schlossen darauf, dass moderater Sport die NO-Produktion und somit die Flexibilität stimuliert. Auch gaben sie einen Ausblick auf Sport als Therapiemöglichkeit für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, da dort Sport häufig bereits Teil der multimodalen Therapie ist (74).

Aus diesem Grunde wurden die Veränderungen der Erythrozytenflexibilität durch moderates Ausdauertraining auch unter pathologischen Bedingungen getestet. Ahmad et al. stellten eine signifikante Verbesserung der Erythrozytenflexibilität bei Probanden mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung fest, nachdem diese ein zehnwöchiges Ausdauertraining absolviert hatten (1). Bei HIV-erkrankten Probanden wurden innerhalb eines Jahres Marathontrainings unterschiedliche Veränderungen entdeckt: nach vier Monaten, bei noch moderater Trainingsintensität, zeigte sich die Flexibilität signifikant erhöht, während sie zum Ende der Studie, unter intensivsten Trainingsbedingungen, erniedrigt war (2). Dies stimmt insgesamt mit den

Beobachtungen überein, dass ein moderates Training die Erythrozytenflexibilität verbessert (74), während intensiver Training sie eher reduziert (75, 84).

Auch mit Typ-2-Diabetikern wurden bereits Trainingsstudien durchgeführt. In einer weiteren Studie von Ahmad et al. absolvierten Typ-2-Diabetiker ein dreimonatiges Ausdauertraining mit zwei bis vier Trainingseinheiten die Woche, wovon mindestens die Hälfte der Trainingseinheiten auf dem Ergometer ausgeführt wurde. Das Training war also sehr ähnlich zu unserer Studie aufgebaut, deren Training von drei Monaten Dauer drei Mal Training die Woche auf dem Ergometer beinhaltete. Gemessen wurden in der Studie von Ahmad et al. die Erythrozytenflexibilität mittels LORRCA sowie der HbA1c-Wert. Die Werte der Erythrozytenflexibilität, Elmax und SS  $\frac{1}{2}$ , vor und nach der dreimonatigen Intervention unterschieden sich nicht signifikant (3). Simmonds et al. ließen weibliche Typ-2-Diabetikerinnen ein 12-wöchiges Walking-Training auf dem Laufband durchführen. Dies führte zu einer Verschlechterung der Erythrozytenflexibilität (69). Auch Ladage et al. beobachteten einen Abfall der Erythrozytenflexibilität nach einem sechswöchigen Hypoxie-Intervall-Training bei männlichen Typ-2-Diabetikern (44). Zu beachten ist beim Vergleich der Studien vor allem, dass die unterschiedlichen Trainingsarten, sowie Geschlecht, Alter und BMI der Probanden einen Einfluss auf die Hämorheologie haben (30, 78).

Bisher konnte also bei gesunden Probanden, sowie bei COPD- und HIV-erkrankten Probanden eine Verbesserung der Erythrozytenflexibilität durch Ausdauertraining nachgewiesen werden. Für Diabetiker zeigten sich bislang keine Verbesserungen, sowie es auch in dieser Studie der Fall ist. Die Erythrozytenflexibilität zeigte keine signifikante Änderung nach der dreimonatigen Trainingsepisode. Auch in den vorgeschalteten molekularen Ebenen konnten keine Änderungen nachgewiesen werden. Es zeigte sich keine erhöhte RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Aktivierung. Auch der NO-Gehalt in den Erythrozyten war nach der Intervention nicht erhöht.

#### 4.3. Bei Diabetikern also keine Änderung der Blutrheologie durch Training?

Das Gesamtblut konnte zwar keine Änderungen der Erythrozytenflexibilität nach dem Training nachweisen, jedoch war diese Arbeit Teil einer größeren Studie, in welcher nicht nur das Gesamtblut untersucht wurde, sondern die Erythrozyten auch nach Alter bzw. Dichte getrennt untersucht wurden. Hierbei zeigten sich sehr wohl Änderungen (13).

Einige Eigenschaften der Erythrozyten verändern sich während der Alterung. Das Volumen und die Oberfläche verkleinern sich, wobei die Oberfläche verhältnismäßig

stärker schrumpft, und die Viskosität der Membran steigt während des Alterns (48). Auch die Form der Erythrozyten verändert sich während des Alterungsprozesses (9). Diese Eigenschaften beeinflussen insbesondere die Erythrozytenflexibilität (6), die somit während des Alterungsprozesses der Erythrozyten vermindert wird (9, 13, 48). Die Alterung insgesamt, bzw. die Altersverteilung, scheint beim Typ-2-Diabetes verändert zu sein: in einer vorherigen Studie von Bizjak et al. konnte bei Diabetikern ein deutlich verminderter Anteil junger, sowie ein signifikant erhöhter Anteil alter Erythrozyten nachgewiesen werden. Dies könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die bekannte reduzierte Erythrozytenflexibilität bei Diabetikern darstellen. (9)

Doch während in der Studie eine reduzierte Erythrozytenflexibilität während des Alterns nachgewiesen wurde, zeigten sich die RBC-NOS-Aktivierung und der NO-Gehalt in den älteren Erythrozyten erhöht, bei den Diabetikern noch deutlich stärker als bei gesunden Probanden (9). Diese Aktivierung der NO-Produktion geschieht möglicherweise um der reduzierten Erythrozytenflexibilität während der Zellalterung entgegenzuwirken (13). Die Kompensierung des Verformbarkeitsverlustes führt zu einer Lebensverlängerung der Erythrozyten, da sie länger durch die Milzsinus gelangen können ohne eliminiert zu werden (9, 18).

Durch das in der Studie durchgeführte dreimonatige Ausdauertraining zeigte sich ein erhöhter Anteil an jungen Erythrozyten, sowie eine reduzierte Verformbarkeit und eine verminderte NOS-Aktivierung der älteren Erythrozyten bei Dichtestufe 1,072 g/ml (13). Der Elimination der Erythrozyten scheint nicht mehr entgegengewirkt zu werden, vielmehr scheint es zu einem erhöhten Erythrozyten-Umsatz zu kommen: alte Erythrozyten werden schneller eliminiert, die Produktion der Erythrozyten erhöht. Diese Regulation des Körpers geschieht, weil junge Erythrozyten Sauerstoff effizienter transportieren können und somit dem Gewebe den zusätzlich benötigten Sauerstoff unter Anstrengung schneller zuführen können (71). Smith et al. fand bei langzeittrainierten Profi-Radsportlern einen höheren Anteil an jungen Erythrozyten, sowie eine verbesserte Verformbarkeit, woraus er darauf schloss, dass diese Bedingungen eine bessere und schnellere Sauerstoffversorgung durch die Kapillaren verursachen (72).

Die Ergebnisse dieser Studie könnten bedeuten, dass die beim Diabetiker veränderten hämatorheologischen Eigenschaften, der proportional höhere Anteil alter Erythrozyten (9), sowie die reduzierte Erythrozytenflexibilität (63, 79), durch ein moderates Ausdauertraining partiell reversibel sind. Damit könnte das Risiko für angiopathische Folgeerkrankungen vermindert werden. Interessant wäre, zu erforschen, ob sich bei den Typ-2-Diabetikern auch die Gesamt-Erythrozytenflexibilität durch eine längere Trainingsperiode verbessern würde, da in diesen drei Monaten Training scheinbar

bereits eine mögliche Grundlage dafür, ein erhöhter Erythrozytenumsatz mit einem größeren Anteil junger Erythrozyten, geschaffen wurde (13).

#### 4.4. Keine Veränderung der Flexibilität durch akute physische Belastung

Um Änderungen der Flexibilität durch akute hohe körperliche Belastung zu testen entnahmen wir vor und nach einem Leistungstest auf dem Fahrrad-Ergometer Kapillarblut und maßen die Erythrozytenflexibilität mittels LORRCA. Der Leistungstest wurde nach dem WHO-Stufenschema durchgeführt, bei dem die Wattzahl alle zwei Minuten um 25 Watt gesteigert wurde. Die Patienten belasteten sich aus, bis sie das Tempo nicht mehr halten konnten oder die Abbruchkriterien sie zum Aufhören zwangen. Die Leistungsüberprüfung stellte also eine kurzfristige intensive Belastung dar. Im Vergleich der Messungen vor und nach der Belastung fanden sich keine Änderungen der Erythrozytenflexibilität.

Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen einer Studie von Simmonds et al. überein. Profiradfahrer absolvierten hier ebenfalls einen kurzen aber intensiven Fahrradtest und anschließend wurden die Erythrozytenflexibilität, der Laktatspiegel und weitere Blutparameter gemessen. Im Gegensatz zu in-vitro-Experimenten von Varlet et al. (85) zeigte sich hier keine Verschlechterung der Erythrozytenflexibilität durch steigende Laktatspiegel. Die Flexibilität zeigte keine signifikante Änderung nach der intensiven Belastung (68).

In unserer Studie ist das Laktat beim Belastungstest nicht gemessen worden. Simmons et al. zogen den Schluss, dass das Laktat, welches schon bei sehr kurzer intensiver Belastung entsteht, hat also eher keinen Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität, sondern eher Methämoglobin und andere Substanzen, die Marker für oxidativen Stress darstellen, Einflussfaktoren auf die Erythrozytenflexibilität sind, die erst nach etwas längeren Trainingseinheiten entstehen (68).

So konnte in einer Studie von Suhr et al. eine Erniedrigung der RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup>-Phosphorylierung durch ein zweitägiges intensives Trainingscamp bei Profi-Hockeyspielern nachgewiesen werden, was eine Reduktion der Flexibilität zu Folge hat (75). Durch van der Brug et al. wurde nach einem einstündigen intensiven Training, bestehend aus Laufen und Radfahren, eine leichte Erniedrigung der Erythrozytenflexibilität nachgewiesen, die sich nicht korrelierend mit anderen Blutparameter zeigte. Auch Oosenbrug et al. fanden eine leicht reduzierte Flexibilität nach einem einstündigen intensiven Training auf dem Fahrradergometer, diese war allerdings nur bei niedrigen Druckstufen signifikant (57).

In einer Studie von Yalcin et al. konnte allerdings auch bei kürzerer Belastungsdauer, einem Ergometertest von nur 30 Sekunden Dauer nach dem Wingate-Protokoll, eine reduzierte Erythrozytenflexibilität nachgewiesen werden. Diese blieb bis zu 12 Stunden nach Durchführung der Belastungseinheit reduziert (86). Die Intensität hierbei war allerdings deutlich höher, mit einer stärkeren anaeroben Belastung, über einen kürzeren Zeitraum, als bei dieser Studie.

Bei Typ-2-Diabetikern konnte nach akutem Training eine reduzierte Erythrozytenflexibilität gemessen werden (3, 44). Ladage et al. wiesen eine verminderte Erythrozytenflexibilität nach einem Ergometertest nach, die durch ein sechswöchiges Hypoxie-Intervall-Training nach dem Test weniger stark absank. Dies würde nicht nur bedeuten, dass eine akute Trainingsbelastung die Erythrozytenflexibilität vermindern würde, sondern auch, dass dieser Effekt durch regelmäßiges Training abgefangen werden könnte (44). In der durchgeführten Studie jedoch konnte keine Änderung der hämatorheologischen Reaktion auf eine akute Belastung nachgewiesen werden. Durch Ahmad et al. konnte bei Typ-2-Diabetikern eine reduzierte Verformbarkeit im Anschluss an eine akute Belastung nachgewiesen werden, aber keine Veränderung dieser durch ein zehnwöchiges Ausdauertraining (3).

Die Erythrozytenflexibilität bei kurzem intensiven Training scheint also von diversen Faktoren abhängig zu sein, beispielsweise von der Art der Belastung und der Dauer der Trainingseinheit (68). Ein intensives etwa zehnminütiges Ergometertraining scheint, wie durch diese Studie gezeigt, eher keinen Einfluss auf die Erythrozytenflexibilität zu haben.

#### 4.5. Vergleich der venösen und kapillären Erythrozytenflexibilität

Im Rahmen der Studie wurde den Probanden bei den Kontrolluntersuchungen sowohl venöses als auch kapilläres Blut zur Messung mittels LORRCA entnommen, um mögliche Unterschiede der Flexibilität messen zu können.

Der erste der das vaskuläre System beschrieb war van Leeuwenhoek. Er benannte die kleinsten Blutgefäße Kapillaren als er sie 1683 erstmals entdeckte und stellte fest, dass ihr Durchmesser deutlich kleiner war als der Durchmesser der Erythrozyten. Obwohl er Erythrozyten schon in unterschiedlichen Formen gesehen hatte, folgerte er, dass sich die Erythrozyten mehrfach teilen müssten um durch die Kapillaren zu gelangen. (52) Heutzutage wissen wir, dass sich die Erythrozyten verformen um durch die kleinsten Kapillaren mit Durchmessern von 4,5 µm zu gelangen (29, 70). In den Kapillaren haben

die Erythrozyten also eine andere Form, doch bedeutet das auch, dass sie in den Kapillaren eine größere Flexibilität haben als in den venösen Gefäßen?

Beim Vergleich von zeitgleich entnommenem venösem und kapillärem Blut zeigten sich in den Messungen der Erythrozytenflexibilität keine signifikanten Unterschiede.

Es gibt wenig Literatur, die diesen Aspekt untersucht hat. Eine Studie von Simmonds et al. verglich venöse und kapilläre Blutproben im Hinblick auf die Hämostaseologie, da insbesondere in Studien, die Sport als Intervention beinhalten, die venöse Blutentnahme erschwert sein kann. Es wurden keine Unterschiede des Hämatokritgehaltes, sowie der Erythrozytenflexibilität gefunden. Lediglich die Messung der Erythrozytenaggregation wies leichte Unterschiede auf. Insgesamt beurteilten Simmonds et al. die kapilläre Blutentnahme, insbesondere abgenommen aus der Fingerkuppe, als gleichwertige Alternative zur venösen Blutentnahme. (67)

Auch wir konnten keine signifikanten Unterschiede feststellen, weder vor, noch nach der Trainingsintervention. Die beiden Methoden können also zur Messung der Erythrozytenflexibilität als gleichwertig angesehen werden. Dies bringt besonders für Studien Vorteile, bei denen die Flexibilität während eines Trainings gemessen werden soll oder bei denen die Flexibilität mehrfach in Zeitintervallen gemessen werden soll.

#### 4.6. Fazit

Insgesamt konnte die Studie keine Verbesserung der Erythrozytenflexibilität bei Typ-2-Diabetikern durch ein moderates zehnwöchiges Ausdauertraining nachweisen. Was die Gesamtstudie allerdings zeigt ist, dass es nicht ausreicht, lediglich die Veränderungen des Gesamtblutes zu betrachten. In den nach Alter fraktionierten Erythrozyten zeigt sich ein proportional erhöhter Anteil junger Erythrozyten und eine verschlechterte Erythrozytenflexibilität bei den älteren Erythrozyten, was vermutlich zu einem erhöhten Erythrozytenumsatz führt. Dieser erhöhte Umsatz, mit vermehrt jungen transportfähigen und flexiblen Erythrozyten, könnte helfen, das Risiko für angiopathische Folgeerkrankungen des Diabetes Mellitus Typ 2 zu minimieren. Zukünftige Studien könnten erforschen, ob es durch eine längere Trainingsperiode durch den erhöhten Erythrozytenumsatz schließlich zu einer Verbesserung der Gesamtflexibilität käme. Eine zehnwöchige Trainingsperiode scheint nicht ausreichend, um die Verformbarkeit des Gesamtblutes zu verbessern.

Außerdem betrachtet die Studie den Effekt einer akuten intensiven Belastung auf die Erythrozytenflexibilität und beobachtet hierbei ebenfalls keinen Unterschied. Weitere

Studien sollten die Einflussfaktoren, wie oxidativen Stress oder Laktatspiegel weiter untersuchen, da der Einfluss abhängig von Dauer und Intensität des Trainings zu sein scheint.

Ein weiterer Aspekt den die Studie untersucht hat, ist die Vergleichbarkeit der Erythrozytenflexibilität von venösen Blutabnahmen der Vena mediana cubita und Kapillarblutentnahmen aus dem Lobulus auriculae. Die Messungen zeigen vergleichbare Ergebnisse und machen die Kapillarblutentnahme somit zu einer relevanten Alternative, die besonders bei Trainingsstudien und Studien mit mehrfachen Messungen leichter durchführbar ist.

## 5. Zusammenfassung

Die Inzidenz des Diabetes Mellitus Typ 2 ist steigend in der Bevölkerung, doch ist es nicht nur der erhöhte Blutzucker, der die Krankheit charakterisiert, sondern auch das hohe Risiko für angiopathische Folgeerkrankungen. Eine besondere Bedeutung in der Pathogenese spielt hierbei auch die reduzierte Erythrozytenflexibilität, weshalb diesbezügliche Therapieoptionen wichtig zu erforschen sind. Ziel der Studie war es, den Einfluss von moderatem Ausdauersport auf die Erythrozytenflexibilität zu erforschen, um Sport, Teil nahezu jeder multimodalen Therapie, als mögliche Therapieoption zu überprüfen.

Hierzu absolvierten 17 männliche, adipöse, nicht-insulinpflichtige Typ-2-Diabetiker ohne Folgeerkrankungen ein zehnwöchiges, moderates Ausdauertraining. Vor und nach der Trainingsintervention wurde die Erythrozytenflexibilität gemessen, sowie die RBC-NOS-Aktivität über immunhistochemische Färbungen von RBC-NOS-Serin<sup>1177</sup> und der NO-Gehalt in Erythrozyten und Plasma bestimmt. Außerdem fanden Flexibilitätsmessungen vor und nach einem spiroergometrischen Belastungstest und aus venösem und kapillärem Blut statt.

Die Messungen vor und nach dem zehnwöchigen Training konnten keine Veränderung der Erythrozytenflexibilität nachweisen, ebenso wenig wie Veränderungen der RBC-NOS-Aktivierung und des NO-Gehaltes. Das Training schien keinen Einfluss auf die Verformbarkeit des Gesamtblutes gehabt zu haben, jedoch zeigte sich bei Fraktionierung der Erythrozyten nach Alter im erweiterten Rahmen der Studie ein erhöhter Erythrozytenumsatz mit vermehrt jungen, verformbareren Erythrozyten. Im Anschluss an eine akute Belastung konnte bei erhöhten Laktatspiegeln keine Verschlechterung der Erythrozytenflexibilität erwiesen werden. Die Ergebnisse des venösen und kapillären Blutes zeigten sich vergleichbar, was die simple Kapillarblutentnahme zu einer gleichwertigen Alternative macht.

Diese Studie zeigt, dass ein zehnwöchiges Ausdauertraining bei Typ-2-Diabetikern nicht ausreichend ist, um Veränderungen der Verformbarkeit des Gesamtblutes zu verursachen. Es bliebe zu erforschen, ob eine längere Trainingsperiode die Gesamtverformbarkeit bei erhöhtem Erythrozytenumsatz schließlich verbessern kann.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Ahmad B, Ferrari N, Montiel G, Bloch W, Raabe-Oetker A, Skrobala N, and Brixius K.** Influence of a moderate physical activity intervention on red cell deformability in patients suffering from chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Wien Med Wochenschr* 163: 334-339, 2013.
2. **Ahmad B, Glufke K, Grau M, Sandig D, Rockstroh J, Vogel M, Wasmuth JC, Bloch W, and Brixius K.** Influence of endurance training and marathon running on red cell deformability in HIV patients. *Clin Hemorheol Microcirc* 57: 355-366, 2014.
3. **Ahmad B, Opitz D, Bloch W, and Brixius K.** Influence of 3 months endurance training on red cell deformability in non insulin dependent type 2 diabetes mellitus patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 121: 461-465, 2013.
4. **Barodka V, Mohanty JG, Mustafa AK, Santhanam L, Nyhan A, Bhunia AK, Sikka G, Nyhan D, Berkowitz DE, and Rifkind JM.** Nitroprusside inhibits calcium-induced impairment of red blood cell deformability. *Transfusion* 54: 434-444, 2014.
5. **Baskurt OK, Hardeman MR, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Shin S, Alexy T, and Meiselman HJ.** Parameterization of red blood cell elongation index--shear stress curves obtained by ektacytometry. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 69: 777-788, 2009.
6. **Baskurt OK, and Meiselman HJ.** Blood rheology and hemodynamics. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 29: 435-450, 2003.
7. **Baskurt OK, Ulker P, and Meiselman HJ.** Nitric oxide, erythrocytes and exercise. *Clin Hemorheol Microcirc* 49: 175-181, 2011.
8. **Berndt-Zipfel C, Michelson G, Dworak M, Mitry M, Loffler A, Pfutzner A, and Forst T.** Vildagliptin in addition to metformin improves retinal blood flow and erythrocyte deformability in patients with type 2 diabetes mellitus - results from an exploratory study. *Cardiovascular Diabetology* 12: 59, 2013.
9. **Bizjak DA, Brinkmann C, Bloch W, and Grau M.** Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells. *PLoS One* 10: e0125206, 2015.
10. **Bloch EH.** Principles of the microvascular system. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 5: 250-255, 1966.
11. **Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 284: H1577-1584, 2003.

12. **Bratosin D, Estaquier J, Petit F, Arnoult D, Quatannens B, Tissier JP, Slomianny C, Sartiaux C, Alonso C, Huart JJ, Montreuil J, and Ameisen JC.** Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell death and differentiation* 8: 1143-1156, 2001.
13. **Brinkmann C, Bizjak DA, Bischof S, Latsch J, Brixius K, Bloch W, and Grau M.** Endurance training alters enzymatic and rheological properties of red blood cells (RBC) in type 2 diabetic men during in vivo RBC aging. *Clin Hemorheol Microcirc* 2015.
14. **Bruckdorfer R.** The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine* 26: 3-31, 2005.
15. **Cabrales P.** Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 293: H1206-1215, 2007.
16. **Carvalho FA, Mesquita R, Martins-Silva J, and Saldanha C.** Acetylcholine and choline effects on erythrocyte nitrite and nitrate levels. *J Appl Toxicol* 24: 419-427, 2004.
17. **Chakrabarti A, Kelkar DA, and Chattopadhyay A.** Spectrin organization and dynamics: new insights. *Bioscience reports* 26: 369-386, 2006.
18. **Chen LT, and Weiss L.** The role of the sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen. *Blood* 41: 529-537, 1973.
19. **Chien S.** Biosophysical Behaviour in Suspensions. In: *The Red Blood Cell 2nd Edition*, edited by Surgenor DM. New York: Academic Press Inc., 1975, p. 1032-1133.
20. **Chien S, Usami S, and Bertles JF.** Abnormal rheology of oxygenated blood in sickle cell anemia. *The Journal of clinical investigation* 49: 623-634, 1970.
21. **Cicco G, and Cicco S.** Hemorheological aspects in the microvasculature of several pathologies. *Advances in experimental medicine and biology* 599: 7-15, 2007.
22. **Cicco G, and Pirrelli A.** Red blood cell (RBC) deformability, RBC aggregability and tissue oxygenation in hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 21: 169-177, 1999.
23. **Cluitmans JC, Chokkalingam V, Janssen AM, Brock R, Huck WT, and Bosman GJ.** Alterations in red blood cell deformability during storage: a microfluidic approach. *BioMed research international* 2014: 764268, 2014.
24. **Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, Chasan-Taber L, Albright AL, and Braun B.** Exercise and Type 2 Diabetes: The American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care* 33: e147-167, 2010.

25. **Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiss C, Kroncke KD, Hogg N, Feelisch M, and Kelm M.** Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. *Blood* 120: 4229-4237, 2012.
26. **Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM.** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
27. **Dr. Wolfgang Rathmann DTT, Prof. Rüdiger, Landgraf PPEHS, PD Dr. Erhard G. Siegel, Prof. Eberhard G. Siegel ES, Eric Risch, Dipl.-Psych. Berthold Maier, Prof. Diethelm, Tschöpe PCD, Dr. Holger Lawall, Prof. Gunter Wolf, Prof. Hans-Peter, Hammes PDZ, Prof. Thomas Danne, Dr. Ralph Ziegler, Prof. Reinhard W., Holl MG, Dr. Hermann Finck, Oliver Ebert, Dr. Andrej Zeyfang, Dr. Helmut, Kleinwechter PUS-G, Prof. Baptist Gallwitz, Prof. Monika Kellerer,, Prof. Stephan Matthaei PDM-W, Dr. Uta Müller, Dr. Alexander, Risse MK, Prof. Andrea Icks, Prof. Anette-Gabriele Ziegler, Prof. Hans-, Ulrich Häring PMHdA, Prof. Michael Roden, PD Dr. Bernhard, and Kulzer JT.** Diabetes 2015 - Die Bestandsaufnahme Mainz: Deutsche Diabetes-Hilfe, 2015.
28. **Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, Vollenweider P, Pedrazzini T, Nicod P, Thorens B, and Scherrer U.** Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 104: 342-345, 2001.
29. **Fahlke C, Linke W, Raßler B, and Wiesner R.** *Taschenatlas Physiologie*. München, Jena, Deutschland: Elsevier, 2008, p. 473.
30. **Filatova OV, Sidorenko AA, and Agarkova SA.** [The Rheological Properties of Blood Depending on Age and Sex]. *Fiziologija cheloveka* 41: 110-118, 2015.
31. **Fleming I, and Busse R.** Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 284: R1-12, 2003.
32. **Fornal M, Korbut RA, and Grodzicki T.** Relevance of erythrocyte deformability to the concentration of soluble cell adhesion molecules and glomerular filtration rate in patients with untreated essential hypertension. *Clin Hemorheol Microcirc* 49: 323-329, 2011.
33. **Forst T, Weber MM, Lobig M, Lehmann U, Muller J, Hohberg C, Friedrich C, Fuchs W, and Pfutzner A.** Pioglitazone in addition to metformin improves erythrocyte deformability in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Clinical science (London, England : 1979)* 119: 345-351, 2010.

34. **Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, and Suhr F.** RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. *PLoS One* 8: e56759, 2013.
35. **Gromov PS, and Celis JE.** Identification of two molecular chaperons (HSX70, HSC70) in mature human erythrocytes. *Experimental cell research* 195: 556-559, 1991.
36. **Hayden MR, and Tyagi SC.** Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovascular Diabetology* 2: 2, 2003.
37. **Hoeflich KP, and Ikura M.** Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108: 739-742, 2002.
38. **Jiang M, Ding Y, Su Y, Hu X, Li J, and Zhang Z.** Arginase-flotillin interaction brings arginase to red blood cell membrane. *FEBS letters* 580: 6561-6564, 2006.
39. **Jubelin BC, and Gierman JL.** Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *American journal of hypertension* 9: 1214-1219, 1996.
40. **Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, and Acchiardo SR.** Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 135: 444-451, 2000.
41. **Keymel S, Heiss C, Kleinbongard P, Kelm M, and Lauer T.** Impaired red blood cell deformability in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 43: 760-765, 2011.
42. **Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, and Kelm M.** Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 107: 2943-2951, 2006.
43. **Kolluru GK, Bir SC, and Kevil CG.** Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *International journal of vascular medicine* 2012: 918267, 2012.
44. **Ladage D, Braunroth C, Lenzen E, Berghofer S, Graf C, Bloch W, and Brixius K.** Influence of intermittent hypoxia interval training on exercise-dependent erythrocyte NOS activation and blood pressure in diabetic patients. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 90: 1591-1598, 2012.
45. **Le Devehat C, Khodabandehlou T, and Vimeux M.** Relationship between hemorheological and microcirculatory abnormalities in diabetes mellitus. *Diabete & metabolisme* 20: 401-404, 1994.
46. **Le Devehat C, Vimeux M, and Khodabandehlou T.** Blood rheology in patients with diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc* 30: 297-300, 2004.

47. **Levine AB, Punihale D, and Levine TB.** Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology* 122: 55-68, 2012.
48. **Linderkamp O, and Meiselman HJ.** Geometric, osmotic, and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. *Blood* 59: 1121-1127, 1982.
49. **Loscalzo J.** Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circulation research* 88: 756-762, 2001.
50. **Ludolph B, Bloch W, Kelm M, Schulz R, and Kleinbongard P.** Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity. *Vascular health and risk management* 3: 1069-1073, 2007.
51. **MacMicking J, Xie QW, and Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15: 323-350, 1997.
52. **Martins e Silva J.** From the discovery of the circulation of the blood to the first steps in hemorheology: part 2. *Revista portuguesa de cardiologia : orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology* 28: 1405-1439, 2009.
53. **Mesquita R, Pires I, Saldanha C, and Martins-Silva J.** Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties. *Clin Hemorheol Microcirc* 25: 153-163, 2001.
54. **Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, and Nakao K.** Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3-8, 1998.
55. **Nash G, O'Brien E, Gordon-Smith E, and Dormandy J.** Abnormalities in the mechanical properties of red blood cells caused by Plasmodium falciparum. *Blood* 74: 855-861, 1989.
56. **Nathan C.** Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *The Journal of clinical investigation* 100: 2417-2423, 1997.
57. **Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, and Hornstra G.** Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 83: 746-752, 1997.
58. **Ozuyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, and Kleinbongard P.** RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects. *Trends Mol Med* 14: 314-322, 2008.

59. **Pretolani E, Salvi P, Montaguti L, and Pretolani M.** [The blood rheological and microcirculatory changes in the hypertensive patient]. *Cardiologia (Rome, Italy)* 36: 355-363, 1991.
60. **Ramirez-Zamora S, Mendez-Rodriguez ML, Olguin-Martinez M, Sanchez-Sevilla L, Quintana-Quintana M, Garcia-Garcia N, and Hernandez-Munoz R.** Increased erythrocytes by-products of arginine catabolism are associated with hyperglycemia and could be involved in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 8: e66823, 2013.
61. **S. WR.** The Morphology of Adult Red Cells. In: *The Red Blood Cell*, edited by Surgenor DM. New York: Academic Press Inc., 1974, p. 214-269.
62. **Sato Y, Nagasaki M, Kubota M, Uno T, and Nakai N.** Clinical aspects of physical exercise for diabetes/metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract* 77 Suppl 1: S87-91, 2007.
63. **Schwartz RS, Madsen JW, Rybicki AC, and Nagel RL.** Oxidation of spectrin and deformability defects in diabetic erythrocytes. *Diabetes* 40: 701-708, 1991.
64. **Sessa WC.** eNOS at a glance. *Journal of cell science* 117: 2427-2429, 2004.
65. **Shin S, Ku Y, Babu N, and Singh M.** Erythrocyte deformability and its variation in diabetes mellitus. In: *Indian Journal of Experimental Biology*. India: 2006, p. 121-128.
66. **Shin S, Ku YH, Ho JX, Kim YK, Suh JS, and Singh M.** Progressive impairment of erythrocyte deformability as indicator of microangiopathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Hemorheol Microcirc* 36: 253-261, 2007.
67. **Simmonds MJ, Baskurt OK, Meiselman HJ, and Marshall-Gradisnik SM.** A comparison of capillary and venous blood sampling methods for the use in haemorheology studies. *Clin Hemorheol Microcirc* 47: 111-119, 2011.
68. **Simmonds MJ, Connes P, and Sabapathy S.** Exercise-induced blood lactate increase does not change red blood cell deformability in cyclists. *PLoS One* 8: e71219, 2013.
69. **Simmonds MJ, Minahan CL, Serre KR, Gass GC, Marshall-Gradisnik SM, Haseler LJ, and Sabapathy S.** Preliminary findings in the heart rate variability and haemorheology response to varied frequency and duration of walking in women 65-74 yr with type 2 diabetes. *Clin Hemorheol Microcirc* 51: 87-99, 2012.
70. **Skalak R, and Branemark PI.** Deformation of red blood cells in capillaries. *Science (New York, NY)* 164: 717-719, 1969.
71. **Smith JA.** Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 19: 9-31, 1995.

72. **Smith JA, Martin DT, Telford RD, and Ballas SK.** Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *The American journal of physiology* 276: H2188-2193, 1999.
73. **Starzyk D, Korbut R, and Gryglewski RJ.** Effects of nitric oxide and prostacyclin on deformability and aggregability of red blood cells of rats ex vivo and in vitro. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 50: 629-637, 1999.
74. **Suhr F, Brenig J, Muller R, Behrens H, Bloch W, and Grau M.** Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. *PLoS One* 7: e45982, 2012.
75. **Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, and Bloch W.** Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. *Nitric Oxide* 20: 95-103, 2009.
76. **Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, and Pons A.** Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide* 15: 5-12, 2006.
77. **Symeonidis A, Athanassiou G, Psiroyannis A, Kyriazopoulou V, Kapatais-Zoumbos K, Missirlis Y, and Zoumbos N.** Impairment of erythrocyte viscoelasticity is correlated with levels of glycosylated haemoglobin in diabetic patients. *Clinical and laboratory haematology* 23: 103-109, 2001.
78. **Telford RD, and Cunningham RB.** Sex, sport, and body-size dependency of hematology in highly trained athletes. *Medicine and science in sports and exercise* 23: 788-794, 1991.
79. **Tessari P, Cecchet D, Cosma A, Vettore M, Coracina A, Millionsi R, Iori E, Puricelli L, Avogaro A, and Vedovato M.** Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes* 59: 2152-2159, 2010.
80. **Tillmann W, Merten A, Lakomek M, Gahr M, Fiechtl J, and Schroter W.** Flexibility of erythrocytes in juvenile diabetes mellitus. *Blut* 43: 125-128, 1981.
81. **Tomaiuolo G, Lanotte L, D'Apolito R, Cassinese A, and Guido S.** Microconfined flow behavior of red blood cells. *Medical engineering & physics* 2015.
82. **Tomaiuolo G, Simeone M, Martinelli V, Rotoli B, and Guido S.** Red blood cell deformation in microconfined flow. *Soft Matter* 5: 3736-3740, 2009.
83. **Ulker P, Meiselman HJ, and Baskurt OK.** Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress. *Clin Hemorheol Microcirc* 45: 169-175, 2010.
84. **van der Brug GE, Peters HP, Hardeman MR, Schep G, and Mosterd WL.** Hemorheological response to prolonged exercise--no effects of different kinds of feedings. *International journal of sports medicine* 16: 231-237, 1995.

85. **Varlet-Marie E, and Brun JF.** Reciprocal relationships between blood lactate and hemorheology in athletes: another hemorheologic paradox? *Clin Hemorheol Microcirc* 30: 331-337, 2004.
86. **Yalcin O, Erman A, Muratli S, Bor-Kucukatay M, and Baskurt OK.** Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained human subjects. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 94: 997-1002, 2003.

7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Endurance training alters enzymatic and rheological properties of red blood cells (RBC) in type 2 diabetic men during in vivo RBC aging.

Autoren: Brinkmann C, Bizjak DA, Bischof S, Latsch J, Brixius K, Bloch W, Grau M.

Journal: Clinical Hemorheology and Microcirculation, vol. 63, no. 3, pp. 173-184, 2016

Erscheinungsdatum: 12 September 2016

## 8. Anhang

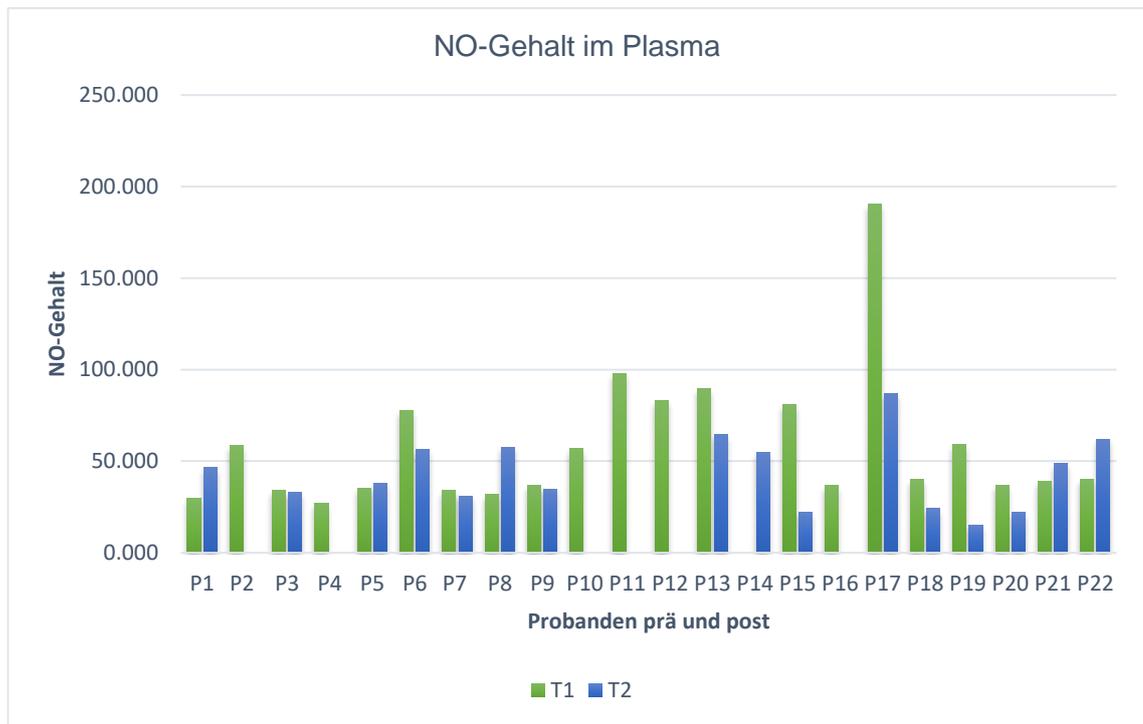


Abbildung 34: NO-Gehalt im Plasma der Probanden prä- und post-interventionell

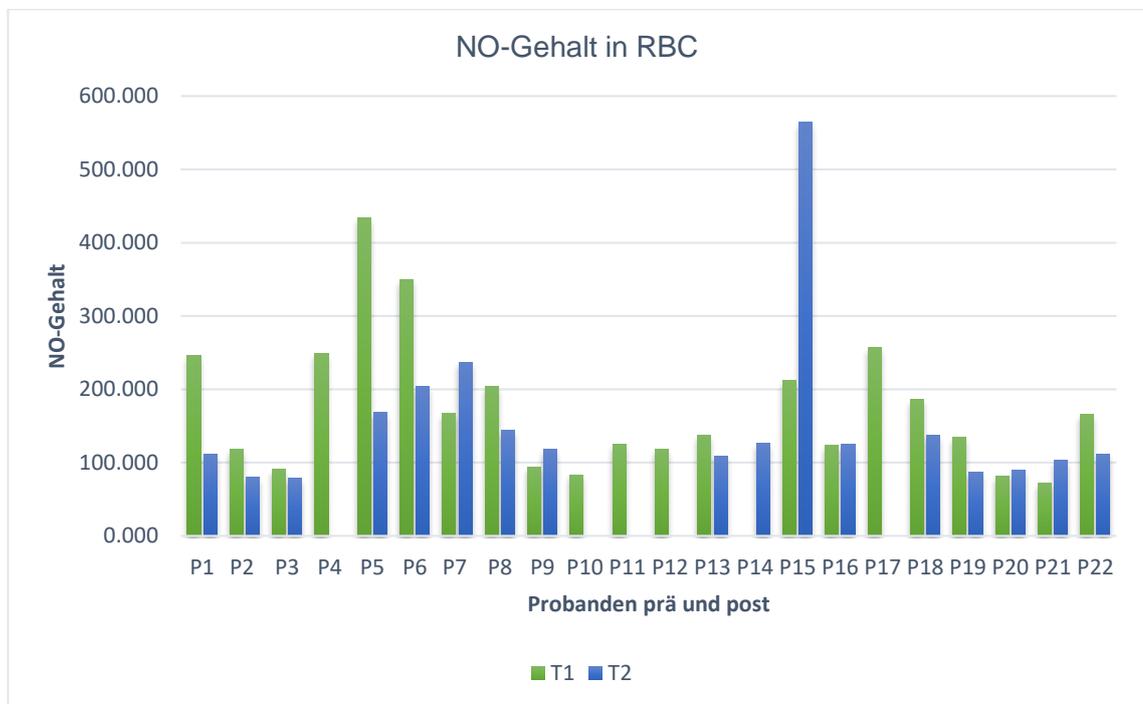


Abbildung 35: NO-Gehalt der Erythrozyten vor und nach dem drei-monatigen Ausdauertraining.

## 9. Lebenslauf



Sabrina Bischof

Dissertation zum Erlangen der Doktorwürde

Venloerstr. 280

50823 Köln

sabrina.bischof@hotmail.de

### PERSÖNLICHE DATEN

Geburt 18.02.1991 in Köln  
Nationalität Deutsch

### BERUFLICHE ERFAHRUNG

01.08.2012-30.06.2017	Arbeit als studentische Aushilfe in der Uniklinik Köln
25.02.2013-30.03.2013	Famulatur in der Kinderarztpraxis Dr. Sabine Krüger
23.09.2013-04.10.2013	Famulatur in der Unfallchirurgie der Uniklinik Köln
01.02.2012 bis heute	klinisch-experimentelle Dissertationsarbeit an der Deutschen Sporthochschule Köln
12.09.2014-26.09.2014	Famulatur in der Anästhesie im Krankenhaus der Augustinerinnen, Köln
20.02.2015-23.03.2015	Famulatur in der Orthopädie der Mediaparkklinik, Köln
23.11.2015-23.12.2015	Praktikum in der Neuropädiatrie der Kinderklinik Amsterdamerstraße

05.01.2016-04.02.2016	Praktikum in der Kinderklinik Amsterdamerstraße (Allgemeinpädiatrische Station und Station für chronische erkrankte Kinder)
17.05.2016-14.04.2017	Absolvierung des praktischen Jahres - Innere Medizin: Krankenhaus Porz am Rhein - Chirurgie: Mayo General Hospital, Irland Heilig-Geist-Krankenhaus - Pädiatrie: Klinikum Leverkusen
seit 17.07.2017	Ärztin in der Weiterbildung zur Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin am Städtischen Klinikum Solingen
seit 06.2018	Mitarbeit in der interdisziplinären Kinderschutzgruppe des Städtischen Klinikums Solingens
AUSBILDUNG	
1997 bis 2001	Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Steinbergerstraße, Köln
2001 bis 2007	Besuch des Dreikönigsgymnasiums, Köln
2007 bis 2010	Besuch des Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen-Opladen
27.06.2010	Erlangen des Abiturs
11.10.2010-01.06.2017	Medizinstudium an der Universität zu Köln
14.09.2012	Physikum mit der Note „gut“ (2,38)
15.10.2016	Bestehen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“

01.06.2017

Bestehen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit  
der Note „sehr gut“

26.06.2018

Approbation als Ärztin

Köln, den 19.12.2018