

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Geschlechts- und trainingsabhängige Effekte in der
Variabilität der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Björn J. Balcerek

aus Heide

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch).....	3
Abstract (english).....	5
1. Hintergrund und Fragestellung	6
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Kriterien für die Rekrutierung der Probandinnen und Probanden und Testvorbereitung.....	12
2.2 Ablauf der maximalen Auslastung auf dem Laufband und Blutentnahme	12
2.3 Blutgasanalyse	14
2.4 Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve mittels Tonometrie.....	14
2.5 Western Blot	15
2.6 Bestimmung: 2,3-BPG	16
2.7 Statistik.....	16
3. Ergebnisse.....	18
3.1 Definition des Probandenkollektivs.....	18
3.2 Ergebnisse der kapillären und venösen Blutgasanalyse	19
3.3 Tonometrische Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve	20
3.4 Korrelation zwischen p50 und 2,3-Bisphosphoglycerat	21
3.5 Durch den Belastungstest verursachte Veränderungen	22
3.6 Vergleich der tonometrisch erhobenen p50-Werte mit den Ergebnissen der Blutgasanalyse	23
4. Diskussion	24
5. Literaturverzeichnis.....	29
6. Eidesstattliche Versicherung	33
7. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation	34
8. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge).....	35
9. Publikation	36
10. Curriculum Vitae.....	51
11. Publikationsliste	53
12. Danksagung.....	54

Abstract (deutsch)

Einleitung: Hypoxie, definiert als ein Mangel an Sauerstoff (O_2), ist bei zahlreichen Pathologien von entscheidender Bedeutung. Die Hämoglobin- O_2 -Affinität, repräsentiert durch den p50 (O_2 -Partialdruck bei 50 % O_2 -Sättigung), ist ein für die Gewebeoxygenierung hochgradig relevanter Faktor, der im klinischen Alltag nur selten berücksichtigt wird.

Methoden: 60 junge gesunde Frauen und Männer (jeweils zur Hälfte trainiert, zur anderen Hälfte untrainiert) wurden einem Leistungstest zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität (VO_{2max}) nach erweitertem Bruce-Protokoll unterzogen. Venöses und kapilläres Blut wurde mittels Blutgasanalyse (BGA) vor und nach dem Test untersucht. Venöse Blutproben wurden weiterhin mittels Tonometrie zur Erstellung von O_2 -Bindungskurven verwendet. Des Weiteren wurden die 2,3-Bisphosphoglycerat- sowie die Bisphosphoglyceratmutase-Quantität im Blut bestimmt und eine bioelektrische Impedanzmessung zur Bestimmung der Körperzusammensetzung durchgeführt.

Ergebnisse: Sowohl die VO_{2max} als auch die Körperzusammensetzung der Versuchspersonen lagen im erwarteten Bereich und bestätigten die adäquate Zuordnung der Versuchspersonen in die Gruppen. Es konnte keine trainingsabhängige Veränderung der Hämoglobin- O_2 -Affinität festgestellt werden. Demgegenüber wurden deutliche geschlechtsabhängige Unterschiede der O_2 -Abgabefähigkeit *per se* festgestellt. Der tonometrisch bestimmte p50 der Probandinnen lag in Ruhe mit durchschnittlich $25,09 \pm 0,97$ mmHg signifikant höher als bei den Männern mit $23,7 \pm 0,9$ mmHg. Hiermit korrelierend war bei den Probandinnen auch die 2,3-Bisphosphoglycerat-Konzentration pro Hämoglobin sowie die Bisphosphoglyceratmutase-Konzentration erhöht. Nach absolviertem Ausbelastungstest erhöhte sich der p50 bei den Männern stärker als bei den Frauen, sodass der p50 nach Belastung bei $30,13 \pm 2,04$ mmHg ohne Unterschiede zwischen den Gruppen lag. Unabhängig davon zeigte sich eine unerwartet hohe Diversität der individuellen Hämoglobin- O_2 -Affinität. Der in der BGA kalkulierte p50 Wert aus venösen Proben korrelierte im Gegensatz zu den kapillären Proben gut mit den tonometrisch erhobenen p50 Werten.

Diskussion: Entgegen der aktuellen Sichtweise konnten wir keinen Trainingseinfluss auf die Hämoglobin- O_2 -Affinität nachweisen, jedoch zeigte sich ein deutlicher Geschlechterunterschied. Die bessere Abgabefähigkeit von Sauerstoff an das Gewebe bei Frauen wird bei Männern vermutlich durch eine kompensatorisch erhöhte Hämoglobinkonzentration ausgeglichen. Die in dieser Studie gezeigten großen Unterschiede der O_2 -Abgabefähigkeit innerhalb einer gesunden

Kohorte ($\Delta p50$ in Ruhe ~ 7 mmHg) lassen vermuten, dass es auch bei hospitalisierten Patientinnen und Patienten ein weites Spektrum gibt, welches therapeutisch unbedingt beachtet werden sollte. Weitere Studien sind dringend nötig, um die individuelle Hämoglobin- O_2 -Affinität im Kontext verschiedener Pathologien mit resultierender Gewebhypoxie einschätzen zu können. Der Einsatz von neuartigen Substanzen zur Modulation der Hämoglobin- O_2 -Affinität könnte erheblich zur personalisierten Therapie beitragen. Für die klinisch relevante Abschätzung der Hämoglobin- O_2 -Affinität aus einer einzelnen Blutprobe mittels BGA, sind venöse, jedoch nicht kapilläre Proben geeignet.

Abstract (english)

Introduction: Hypoxia, a condition of inadequate oxygen supply, plays a central role in numerous pathologies. The oxygen affinity to hemoglobin, as indicated by the p50 value, finally determines the grade of tissue oxygenation and is currently often neglected in clinical practice.

Methods: We collected data concerning oxygen release in 60 young and healthy volunteers (both sexes, either endurance trained or untrained) before and after a VO₂max test, which has been performed according to an extended Bruce protocol. Blood gas analysis (BGA) of venous and capillary probes were obtained before and after the test. Venous blood samples served for determination of oxygen dissociation curves (ODC) using tonometry. Furthermore, 2,3-bisphoglycerate and bisphosphoglycerate mutase (BPGM) levels were measured. Bioelectrical impedance analysis was carried out to determine body composition.

Results: VO₂max (maximal oxygen consumption per minute per kilogram body weight) and body composition were as expected, confirming adequate allocation of the volunteers into groups. No training-dependent changes in hemoglobin-O₂-affinity could be detected. In contrast, significant sex-dependent differences in hemoglobin-O₂-affinity at rest were found. Female p50 (25,09 ± 0,97 mmHg) indicated lower hemoglobin-O₂-affinity compared to men (p50: 23,7 ± 0,9 mmHg). In line, the 2,3-bisphosphoglycerate concentration per hemoglobin and the BPGM protein level were also elevated in women compared to men. However, after VO₂max test increased p50 values of women and men reached similar end points. While calculated p50_c values of venous BGAs show comparable results with p50 values obtained by ODC, the estimated p50_e of the capillary samples does not correlate with the tonometric results. The hemoglobin-O₂-affinity showed an unexpected diversity among individuals.

Discussion: In contrast to current perception, we found no difference of hemoglobin-O₂-affinity as a result of regular endurance exercise. Notably, we observed a significant sex dependent difference, indicating women having lower hemoglobin-O₂-affinity compared to men and thus, more easily release oxygen to the tissue. Men seem to compensate higher hemoglobin-O₂-affinity by elevated hemoglobin levels to ensure sufficient tissue oxygen availability. The broad diversity in hemoglobin-O₂-affinity within a healthy cohort (at rest ~7 mmHg) suggest that there is also a wide range in hospitalized patients. Individual differences of tissue oxygen availability need to be considered for individualized therapy. Future studies need to assess the effects of substances already used to modulate the p50. For clinical praxis, we can recommend calculated p50 values from venous, but not capillary blood samples.

1. Hintergrund und Fragestellung

Eines der elementaren Bedürfnisse des humanen Organismus, um den grundlegenden Energiestoffwechsel zu betreiben, ist Sauerstoff (O_2). Er wird über den Gasaustausch aus unserer Lunge in das Blut aufgenommen und mit Hilfe des in Erythrozyten enthaltenen Hämoglobins zu unseren Zellen transportiert. In den Mitochondrien wird im Rahmen der Atmungskette der Sauerstoff für die Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) verwendet, dem universellen Energieträger in unseren Zellen (Pittman, 2013). Bei einem O_2 -Mangel (Hypoxie) nehmen unsere Zellen bereits nach wenigen Minuten Schaden. Besonders betroffen sind beispielsweise Nierenzellen, Kardiomyozyten und Neurone, also Zellen, die auf einen oxydativen Stoffwechsel angewiesen sind und nicht so einfach auf anaerobe Glykolyse umschalten können (Wang et al., 2010).

Hypoxie ist definiert als eine Bedingung, in der der zelluläre O_2 -Bedarf über der O_2 -Versorgung liegt und ist in unserem Körper demnach ein pathologischer Zustand. Eine insuffiziente O_2 -Versorgung des Gewebes ist ein wesentlicher Faktor bei einer Vielzahl von Erkrankungen und stellt eine große Herausforderung für die Behandlung in Krankenhäusern dar. Ursächlich für die Ausbildung einer Hypoxie können eine Vielzahl von Faktoren sein, beispielsweise ein gestörter Atemantrieb, eine verminderte Diffusionskapazität der Lunge, eine geringe Hämoglobinkonzentration und somit eine verminderte O_2 -Transportkapazität, eine unzureichende Abgabefähigkeit an das Gewebe oder eine gestörte zelluläre Verwertung des Sauerstoffs. Je nach Ursache der Störung, müssen unterschiedliche Therapieoptionen gewählt werden.

Epidemiologisch sehr relevante Beispiele für Pathologien, bei denen aufgrund einer Durchblutungsstörung lokal Hypoxie auftritt, sind die ischämische Herzkrankheit sowie der ischämische Schlaganfall, zwei Entitäten, die im Jahr 2017 für 16,0 % bzw. 4,9 % aller Todesfälle weltweit verantwortlich waren (Yasin et al., 2019). Eine verminderte Diffusionskapazität der Lunge tritt zum Beispiel im Rahmen von respiratorischen Infekten oder bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) auf, die bei progredientem Krankheitsverlauf zu einer respiratorischen Erschöpfung führen können, worauf im Jahr 2017 6,7 % bzw. 5,7 % aller Todesfälle zurückzuführen waren (Yasin et al., 2019). Eine Übersicht zu möglichen Ursachen einer Gewebhypoxie ist in Abbildung 1 gezeigt.

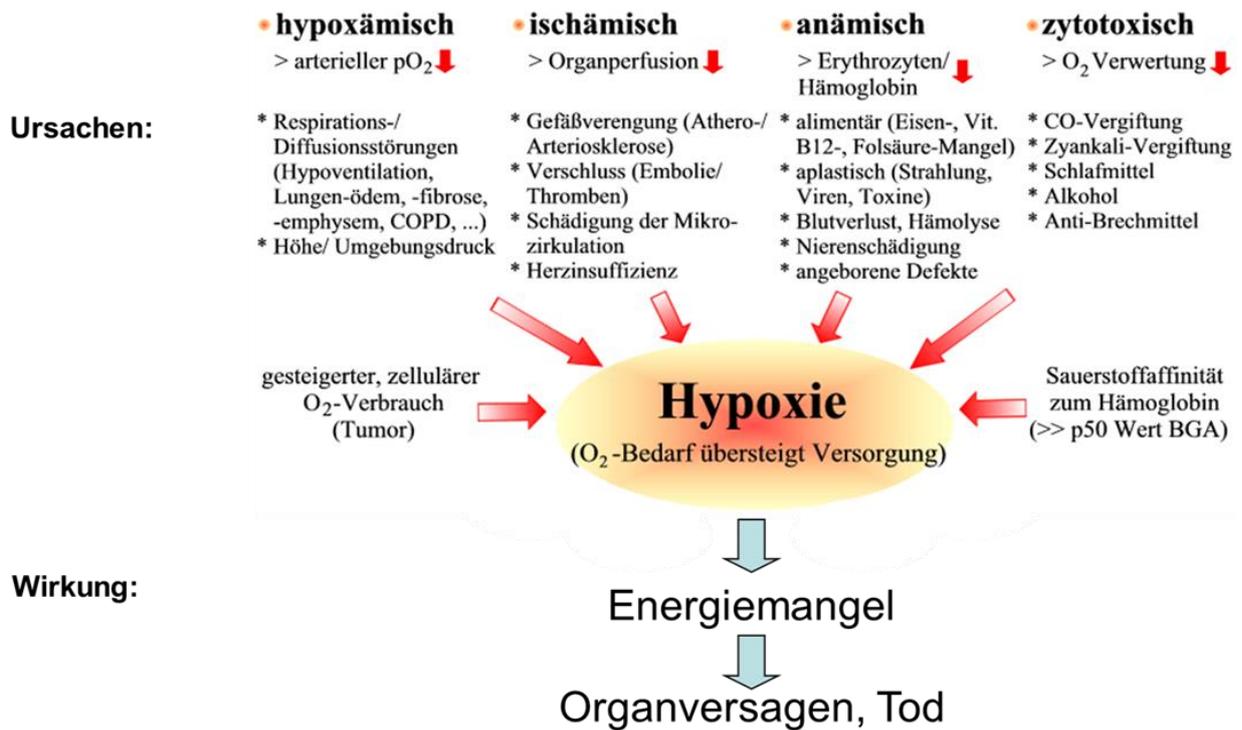


Abb. 1: Übersicht potenzieller Ursachen und Folgen einer Hypoxie. Quelle: eigene Darstellung

Im klinischen Alltag werden zum Monitoring der Oxygenierung von Patientinnen und Patienten die laborchemische Bestimmung des Hämoglobins, die pulsoxymetrische Messung der Sättigung des Hämoglobins mit Sauerstoff (sO_2) (Jubran, 2015) sowie die arterielle Blutgasanalyse verwendet. Die primäre Therapie bei unzureichender Oxygenierung der zu behandelnden Person beinhaltet vor allem die Gabe von Sauerstoff in erhöhter Konzentration und somit eine Erhöhung des O_2 -Angebots. Beim Vorliegen einer Anämie können gegebenenfalls Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden, um die O_2 -Transportkapazität zu erhöhen. Zur Verbesserung der Ventilation stellt auf der Intensivstation die endotracheale Intubation eine weitere Option dar. Insbesondere bei Hypoxämie (vermindertem arteriellem pO_2) kann nach Ausschöpfung der oben genannten Möglichkeiten eine ausreichende zelluläre Sauerstoffversorgung nur noch mit Hilfe invasiver Verfahren wie einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO) erreicht werden. Um solche invasiven Verfahren nach Möglichkeit zu vermeiden, erscheint es sinnvoll, weitere Optionen zu suchen, die die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff verbessern.

Ein wesentlicher Faktor für die O_2 -Verfügbarkeit, der bisher im klinischen Alltag wenig Berücksichtigung findet und nur selten einen Teil des Monitorings darstellt, ist die Affinität von Sauerstoff zu Hämoglobin. Eine hohe Affinität von Sauerstoff zu Hämoglobin ist relevant, um in der Lunge möglichst effizient Sauerstoff aufnehmen zu können. Eine erhöhte Affinität führt aber auch zu einer erschwerten Abgabe des Sauerstoffs an die Zellen. Unter physiologischen Bedingungen werden bei geringer Aktivität nur etwa 25 % des Sauerstoffs, der durch unseren

Körper zirkuliert, von den Zellen aufgenommen. Unter Belastung kann die O₂-Ausschöpfung auf ca. 50 % steigen (Brandes R, 2019). Gäbe es eine Möglichkeit, den Anteil des abgegebenen Sauerstoffs zu erhöhen, ließe sich potenziell die Versorgung von Patientinnen und Patienten mit schlechter sO₂ dennoch deutlich verbessern.

Die Affinität von Sauerstoff zu Hämoglobin wird graphisch in der Sauerstoffbindungskurve als Beziehung zwischen O₂-Partialdruck (pO₂) und sO₂ dargestellt (Adair, 1925). In ihr wird abgebildet, wie bei zunehmendem pO₂ das Hämoglobin vermehrt mit Sauerstoff beladen wird (siehe Abb. 2). Zur Charakterisierung der Steilheit der O₂-Bindungskurve wird eine logarithmische Darstellung, der sogenannter Hill-Plot, erstellt. Für das Verständnis spezifischer Charakteristika der O₂-Bindungskurve ist eine grundlegende Kenntnis der Eigenschaften des Hämoglobinmoleküls erforderlich.

Es handelt sich hierbei um ein tetrameres Molekül, dessen vier Untereinheiten sich gegenseitig beeinflussen und somit eine Funktionseinheit bilden. Diese vier Untereinheiten bestehen jeweils aus dem Globin, einer Polypeptidkette, und dem Häm, einer prosthetischen Gruppe. Das Häm bindet in der Mitte ein zweiwertiges Eisenatom, an welches im Rahmen der Oxygenierung Sauerstoff reversibel binden kann, wodurch eine Konformationsänderung des Hämoglobins verursacht wird. (Brandes R, 2019)

Desoxygeniert befindet sich das Hämoglobin im sogenannten Tense (T)-Zustand, der eine verringerte Affinität zu Sauerstoff aufweist. Durch die bei der Bindung des Sauerstoffs erfolgende Veränderung der Quartärstruktur des Hämoglobins wird eine entspanntere Konformation des Hämoglobins, der Relaxed (R)-Zustand, begünstigt, sodass die Bindung der folgenden Sauerstoffatome erleichtert wird (Perutz, 1979).

Durch diese Eigenschaften des Hämoglobins ergibt sich der sigmoidale Verlauf der O₂-Bindungskurve (Bohr et al., 1904) (Abb. 2). Unter physiologischen Bedingungen ist das Hämoglobin bei einem pO₂ von 90-100 mmHg zu über 97 % gesättigt. Bei einem pO₂ von 60 mmHg ist, aufgrund des flachen Verlaufs der O₂-Bindungskurve im oberen Abschnitt, das Hämoglobin noch immer zu 90 % gesättigt, sodass auch bei einem geringeren atmosphärischen pO₂, wie er zum Beispiel in größerer Höhe vorkommt, in der Lunge eine effiziente O₂-Aufsättigung des Hämoglobins erreicht werden kann. Im Bereich zwischen 60 und 10 mmHg pO₂ befindet sich der steile Abschnitt der O₂-Bindungskurve, in welchem die Abgabe von Sauerstoff begünstigt wird. Sauerstoff wird in Ruhe bis zu einer sO₂ von ca. 75 % abgegeben, sodass das venöse Blut einen pO₂ von ca. 40 mmHg aufweist. (Brandes R, 2019)

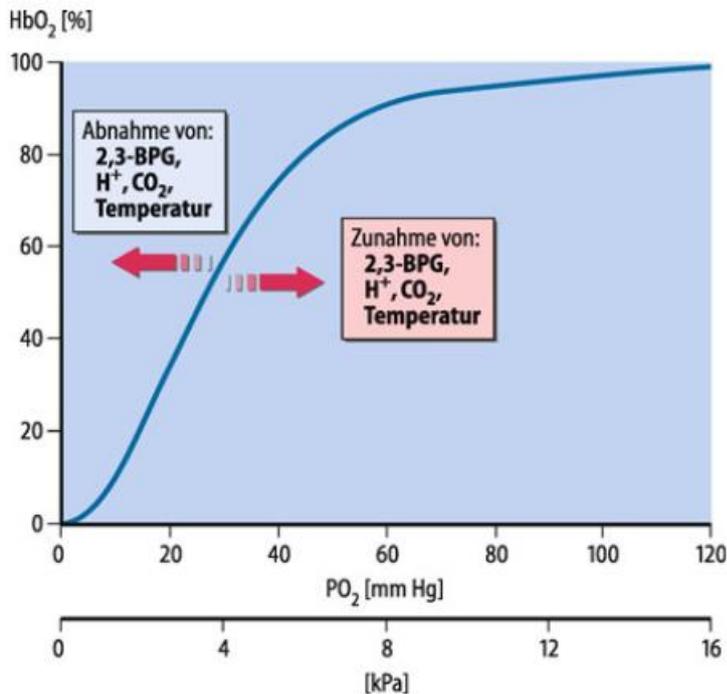


Abb. 2: Die Sauerstoffbindungskurve und ihre Effektoren. Eine Rechtsverschiebung begünstigt die Sauerstoffabgabe an das Gewebe. Eine Linksverschiebung senkt die Abgabefähigkeit, fördert jedoch die Aufnahme von Sauerstoff im Pulmonalkreislauf. Quelle: Jelkmann W. (2010) Atemgastransport. In: Schmidt R., Lang F., Heckmann M. (eds) Physiologie des Menschen. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Germany (Jelkmann W., 2010).

Eine der wesentlichen Größen bei der Diskussion der O₂-Bindungskurve ist der p50, also der O₂-Partialdruck, bei dem das Hämoglobin zu 50 % mit Sauerstoff gesättigt ist. Dieser Wert liegt bei einem gesunden Erwachsenen bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 37°C bei 26,9 mmHg (Severinghaus, 1979). Änderungen der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin zeigen sich als Rechts- oder Linksverschiebung der O₂-Bindungskurve. Eine Rechtsverschiebung bedeutet, dass der p50 bei einem höheren pO₂ liegt, also bereits bei einem höheren pO₂ die Hälfte des Sauerstoffs abgegeben wurde und indiziert somit eine relativ niedrige Affinität von Sauerstoff zu Hämoglobin. Bei einer Linksverschiebung ist entsprechend *vice versa* die Hämoglobin-O₂-Affinität erhöht.

Der p50 hängt im Wesentlichen von der individuellen Aminosäuresequenz des Hämoglobins ab (Shepherd et al., 2019). Die sich daraus ergebende intrinsische Hämoglobin-O₂-Affinität ist sehr hoch (Weber and Fago, 2004), wird physiologisch jedoch durch vier wesentliche allosterische Effektoren variiert. Die Grundlage für die Veränderungen der Affinität durch diese Effektoren sind die beiden Konformationszustände, in denen Hämoglobin vorliegen kann. Der T-Zustand wird sowohl durch Desoxygenierung als auch durch Bindung der allosterischen Effektoren an Hämoglobin stabilisiert, wohingegen Oxygenierung und das Fehlen der allosterischen Effektoren den R-Zustand begünstigen. (Brandes R, 2019)

Den größten modulatorischen Einfluss auf das Hämoglobin besitzen organische Phosphate, allen voran 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) (Brewer, 1974). 2,3 BPG ist ein Molekül, das im Rapoport-Lübering-Zyklus, einem Nebenweg der Glykolyse, durch die Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) gebildet wird (Rapoport et al., 1977, Benesch and Benesch, 1967). Die BPGM-Aktivität wird durch Verschiebungen im pH-Wert reguliert. Bei einem Aufenthalt in größerer Höhe stellt sich beispielsweise eine respiratorische Alkalose ein, wodurch die BPGM-Aktivität erhöht wird, während eine Azidose die BPGM inhibiert (Lenfant et al., 1968, Astrup et al., 1970, Chiba and Sasaki, 1978, Mairbaur et al., 1986). Eine dauerhafte Erhöhung der Konzentration von 2,3-BPG im Blut, zum Beispiel nach längeren Höheng Aufenthalten, sorgt für eine Vernetzung zweier Ketten des desoxygenierten Hämoglobins und fixiert somit die T-Struktur, sodass es zu einer längerfristigen Erhöhung des p50-Wertes kommt und somit zu einer dauerhaften Rechtsverschiebung der O₂-Bindungskurve. In einigen Studien wird zudem ein Anstieg der 2,3-BPG Konzentration durch regelmäßiges Ausdauertraining postuliert (Mairbaur, 2013).

Die weiteren Effektoren sind unter anderem Stoffwechselabfallprodukte und indizieren zum Beispiel bei akuter Belastung die Lokalisation, an der viel Energie verbraucht wird und sorgen durch lokale Stabilisierung des T-Zustandes des Hämoglobins für eine verbesserte O₂-Abgabe – eine grundlegende Voraussetzung für den aeroben Energiestoffwechsel.

Zu diesen kurzfristigen Modulatoren gehören Kohlenstoffdioxid (CO₂) sowie Protonen, die beide durch Stabilisierung des T-Zustandes die O₂-Affinität des Hämoglobins vermindern. CO₂ entsteht neben ATP als Produkt der Atmungskette. Teilweise beeinflusst es direkt das Hämoglobin (Jensen, 2004), größtenteils wirkt es allerdings über den Zerfall in Bikarbonat und Protonen in der Carboanhydrase-Reaktion. Die Protonen entstehen sowohl aus dem CO₂ als auch als Endprodukt der anaeroben Glykolyse auf lokaler Ebene, die Konzentration kann aber auch aus diversen weiteren Gründen systemisch erhöht sein. Der Einfluss von pH und CO₂ auf die O₂-Bindungskurve wird auch als Bohr-Effekt bezeichnet (Bohr et al., 1904).

Neben diesen allosterischen Effektoren spielt auch die Temperatur eine Rolle, die ebenfalls sowohl systemisch als auch lokal verändert sein kann. Eine lokale Erhöhung der Temperatur, zum Beispiel in der arbeitenden Muskulatur, sorgt für eine Erhöhung der Brownschen Molekularbewegung und somit für eine erleichterte O₂-Abgabe (Shappell et al., 1971).

Ein Herabsetzen der Hämoglobin-O₂-Affinität stellt also eine interessante Möglichkeit dar, um Patientinnen und Patienten mit Beeinträchtigung der O₂-Versorgung eine adäquate Oxygenierung des Gewebes zu ermöglichen (Srinivasan et al., 2017). Aktuell wird an unterschiedlichen Substanzen geforscht, die die Hämoglobin-O₂-Affinität entweder erhöhen oder senken (Patel et al., 2018, Safo et al., 2011). Paradoxerweise konnte für beide Möglichkeiten eine verbesserte Gewebeverfügbarkeit von Sauerstoff gezeigt werden, wobei eine pharmakologische

Erhöhung der Affinität nur bei Patientinnen und Patienten mit Störungen in der O₂-Aufnahme hilfreich war (Li et al., 2011, He et al., 2015, Dufu et al., 2017).

In dieser Arbeit wird die Hypothese vertreten, dass eine Senkung der Hämoglobin-O₂-Affinität die Gewebeverfügbarkeit von Sauerstoff verbessert. Da Sauerstoff letztlich den leistungslimitierenden Faktor darstellt, könnte regelmäßiges Ausdauertraining zu einer permanenten Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, beziehungsweise einem erhöhten p50 Wert, führen. Für diesen Fall wäre davon auszugehen, dass Personen mit einer guten Abgabefähigkeit von Sauerstoff an das Gewebe auch einen gewissen Schutz vor hypoxischen Bedingungen aufweisen. Frühere Untersuchungen unterstützen diese Hypothese (Boning et al., 1975, Braumann et al., 1979, Schmidt et al., 1988, Mairbaur et al., 1983). Allerdings wurden Trainingszustand und Geschlecht nur meist unzureichend definiert oder gar nicht berücksichtigt.

Das Ziel der in dieser Arbeit beschriebenen Studie ist daher, die Untersuchung der Hämoglobin-O₂-Affinität unter physiologischen Bedingungen bei gesunden Probandinnen und Probanden im Vergleich zwischen Ausdauerportlern und nicht-Sportlern unter Einbeziehung des direkten Geschlechtervergleichs. Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis der Hämoglobin-O₂-Affinität und zur Feststellung der individuellen Schwankungsbreite des p50 dienen. Diese ausführliche Datenerhebung der physiologischen Gegebenheiten ist ein erforderlicher Zwischenschritt, um den p50-Wert aus der Blutgas-Analyse zukünftig als klinischen Parameter zu verwenden. Weiterhin soll untersucht werden, ob sowohl kapilläre als auch venöse Blutproben für eine Vorhersage des p50 Wertes mittels Ein-Punkt-Messung geeignet sind.

2. Material und Methoden

2.1 Kriterien für die Rekrutierung der Probandinnen und Probanden und Testvorbereitung

Da die Studie sowohl Einflüsse des Geschlechts als auch Einflüsse von regelmäßigem Training auf die O₂-Gewebeverfügbarkeit untersuchen sollte, wurden 30 Männer und 30 Frauen rekrutiert, von denen jeweils die Hälfte laut eigenen Angaben wenig trainiert und die andere Hälfte trainiert war. Als trainiert galten Personen, die in den letzten zwölf Monaten mindestens drei Mal pro Woche für 60 bis 90 Minuten Ausdauersport betrieben hatten. Als Probandinnen und Probanden kamen ausschließlich gesunde Personen in Frage. Bis auf acht Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen, und zwei Frauen, die oral Eisen substituierten, wurden keine Medikamente oder Nahrungsergänzungsmittel eingenommen. Einschlusskriterien waren ein Alter zwischen 18 und 40 Jahren sowie ein BMI zwischen 18,5 und 25 kg/m². Alle Versuchspersonen wurden ausführlich über den Studienablauf und eventuelle Risiken durch die Studienleitung aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme, zur Probenverwendung & -aufbewahrung sowie der Datenverwertung. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt (Aktenzeichen: EA1/154/18) und entsprechend der *Declaration of Helsinki* (54th Revision 2008, Korea) durchgeführt. Die Tests wurden unabhängig von der Gruppenzuordnung durchgeführt. Zur Vermeidung circadianer Einflüsse, wurden die Tests in der Zeit von 08:00 bis 11:00 Uhr durchgeführt (Atkinson and Reilly, 1996). Die Teilnehmenden wurden gebeten, am Tag vor dem Test keinen Alkohol oder andere Drogen zu konsumieren und am Testtag selbst keine koffeinhaltigen Getränke zu sich zu nehmen. Ein EKG vor dem Test diente der Absicherung gegenüber unbekanntem Herz-Kreislaufkrankungen.

2.2 Ablauf der maximalen Auslastung auf dem Laufband und Blutentnahme

Die Probandinnen und Probanden wurden vor dem Lauf nach Entleerung der Blase gewogen und die Körperzusammensetzung mittels Multifrequenz-Bioimpedanzanalyse (Inbody 770, InBody Deutschland, Eschborn, Deutschland) bestimmt (Ling et al., 2011). Des Weiteren wurde den Versuchspersonen eine Capsaicin-haltige Creme (Finalgon, Sanofi-Aventis, Frankfurt / Main, Deutschland) zur Steigerung der Durchblutung auf ihr Ohrläppchen aufgetragen (Stephens et al., 2001) und ein Polar Herzfrequenz-Messgerät (Polar Electro Oy, Kempele, Finnland) angelegt. Initial wurde ein Ruhe-Elektrokardiogramm abgeleitet. Nach 15 bis 30-minütiger Ruhephase erfolgte eine Blutentnahme unter standardisierten Bedingungen. Etwa 100 µl kapilläres Blut wurde nach Entfernung von Rückständen der Salbe am Ohrläppchen mit Hilfe einer Sicherheitslanzette (BD Microtainer Blue, Becton and Dickinson Franklin Lakes, NJ, USA)

entnommen. Die Punktion für die venöse Blutentnahme erfolgte nach kurzer Stauung mit einer 21-G Butterfly-Kanüle (Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany) in der Armbeuge, woraufhin die Stauung gelöst und die Blutentnahme mit 30-sekündiger Latenz in Heparin-Monovetten (ca. 9 ml, Sarstedt AG) durchgeführt wurde. Daraufhin absolvierten die Probandinnen und Probanden einen standardisierten Laufbandtest auf einem kalibrierten Laufband (H/P/Cosmos, Pulsar, Nussdorf-Traunstein, Deutschland) nach Bruce-Protokoll (Bruce et al., 1963). Aufgrund des hohen Trainingsniveaus eines Teils der Versuchspersonen wurde das Protokoll um zwei weitere Stufen ergänzt (Abb.3; detaillierte Tabelle: Table S1 (Balcerek et al., 2020)), um eine maximale Auslastung der Probandinnen und Probanden zu gewährleisten. Um hierbei einen Sturz zu vermeiden, wurden die Versuchspersonen mit einem Seilzugsystem gesichert. Während der Testung wurden Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in der Ein- sowie in der Ausatemluft mit einem Spiroergometrie-Gerät (Metalyzer 3B, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Deutschland) bestimmt und die Daten an ein Rechensystem übermittelt (Metasoft 3, version 3.9.9 SR1, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Deutschland). Die Kalibrierung des Gasanalyse-Systems erfolgte mittels der Umgebungsluft sowie verifizierten Gaskonzentrationen von O₂ und CO₂. Das Volumenmesssystem wurde mit einer 3 l Kalibrierpumpe (Hans Rudolph, Cranlea Medical, Birmingham, Vereinigtes Königreich) geeicht. Während der Testung wurde parallel neben der Atem- und Herzfrequenz der Versuchspersonen auch die aktuelle Auslastung der Probandinnen und Probanden mit Hilfe der Borg-Skala (Borg, 1982) immer eine Minute nach dem Erreichen einer neuen Stufe erhoben.

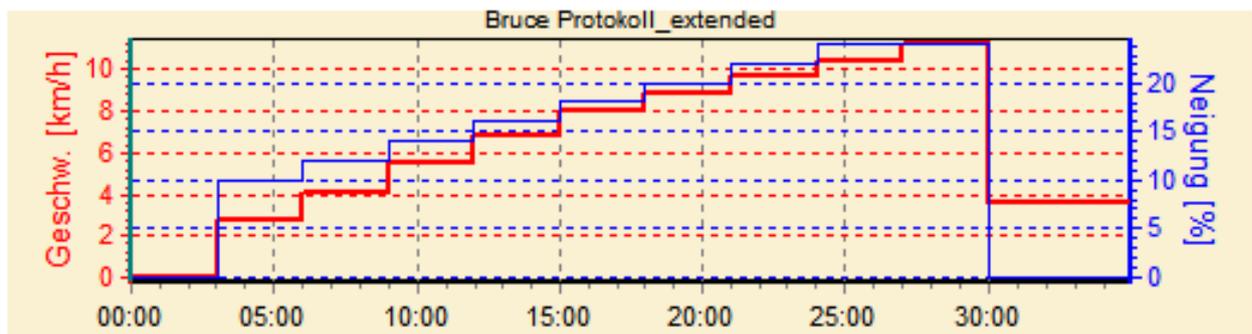


Abb. 3.: Das Bruce-Protokoll in erweiterter Variante. Auf der x-Achse wird die Zeit in Minuten angegeben, auf der y-Achse in Rot die Geschwindigkeit des Laufbandes in km/h und auf der y-Achse in Blau die Neigung und somit Steigung des Laufbandes in Prozent. Alle drei Minuten steigert sich die Anforderung an die Probandinnen und Probanden. Quelle: Metasoft 3, version 3.9.9 SR1, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany (Cortex Biophysik GmbH, 2019).

Die Versuchspersonen wurden bei Angabe starker Erschöpfung verbal motiviert (Midgley et al., 2018) und gaben letztendlich selbstständig den Zeitpunkt der vollständigen Erschöpfung an. In Begleitung begaben sich die Probandinnen und Probanden direkt zur ca. 10 Meter entfernten Blutentnahmestation, sodass unverzüglich die kapilläre und venöse Blutentnahme auf oben

beschriebene Art und Weise wiederholt werden konnte. Nach einer 10-minütigen Ruhephase erfolgte eine dritte Blutentnahme. Die Testungen wurden alle in denselben Räumlichkeiten unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Raumtemperatur betrug zwischen 20 und 22 °C, der Luftdruck 99-102 kPa und die Luftfeuchtigkeit 40-50 %.

2.3 Blutgasanalyse

Für die Blutgasanalyse wurde das Gerät ABL 800 FLEX (Radiometer, Krefeld, Deutschland) verwendet. Das Gerät wurde regelmäßig kalibriert und gewartet.

2.4 Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve mittels Tonometrie

Die Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve erfolgte manuell mit einem Tonometer (Typ 11075, VEB Kesselelektronik – Otto Schön, Dresden, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen. Eine Temperierung der Blutprobe bei 37 °C erfolgte mit Hilfe eines Wasserbades (Typ M3, Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland) und dem Zirkulationssystem des Tonometers (siehe Abb. 4). Zunächst wurden jeweils 2 Milliliter venösen Blutes in das Tonometer pipettiert, woraufhin die Probe mit Carbogen (einem Gasgemisch aus 5 % Kohlenstoffdioxid und 95 % Sauerstoff) für ca. 7 Minuten begast wurde. Nach Äquilibration wurde so eine vollständige Sauerstoffsättigung des Blutes sowie eine Normierung des Kohlenstoffdioxid-Partialdrucks ($p\text{CO}_2$) erreicht. Mit einer Kapillare (safeCLINITUBES, Radiometer, Krefeld, Deutschland) wurden Proben entnommen und Blutgasanalysen durchgeführt. Initial wurde ein oxygenierter Ausgangswert erhoben, woraufhin mit Hilfe einer Begasung mit 5 % CO_2 und 95 % Stickstoff (N_2) die Desoxygenierung („Entsättigung“) eingeleitet wurde. Alle 3 Minuten wurde eine Probe für die Blutgasanalyse entnommen, bis die $s\text{O}_2$ unter 20 % betrug.

Für die Bestimmung der Steigung der O_2 -Bindungskurve wurde im linearen Bereich zwischen 20 und 60 % $s\text{O}_2$ die Hill'sche Differentialgleichung verwendet. Die lineare Regression erfolgte nach der Methode der kleinsten Quadrate. Die Steigung der Regressionslinie sowie p_{25} , p_{50} und p_{75} wurden ebenfalls berechnet. Die Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM Version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) unter Verwendung der „Specific binding with Hill slope equation“.

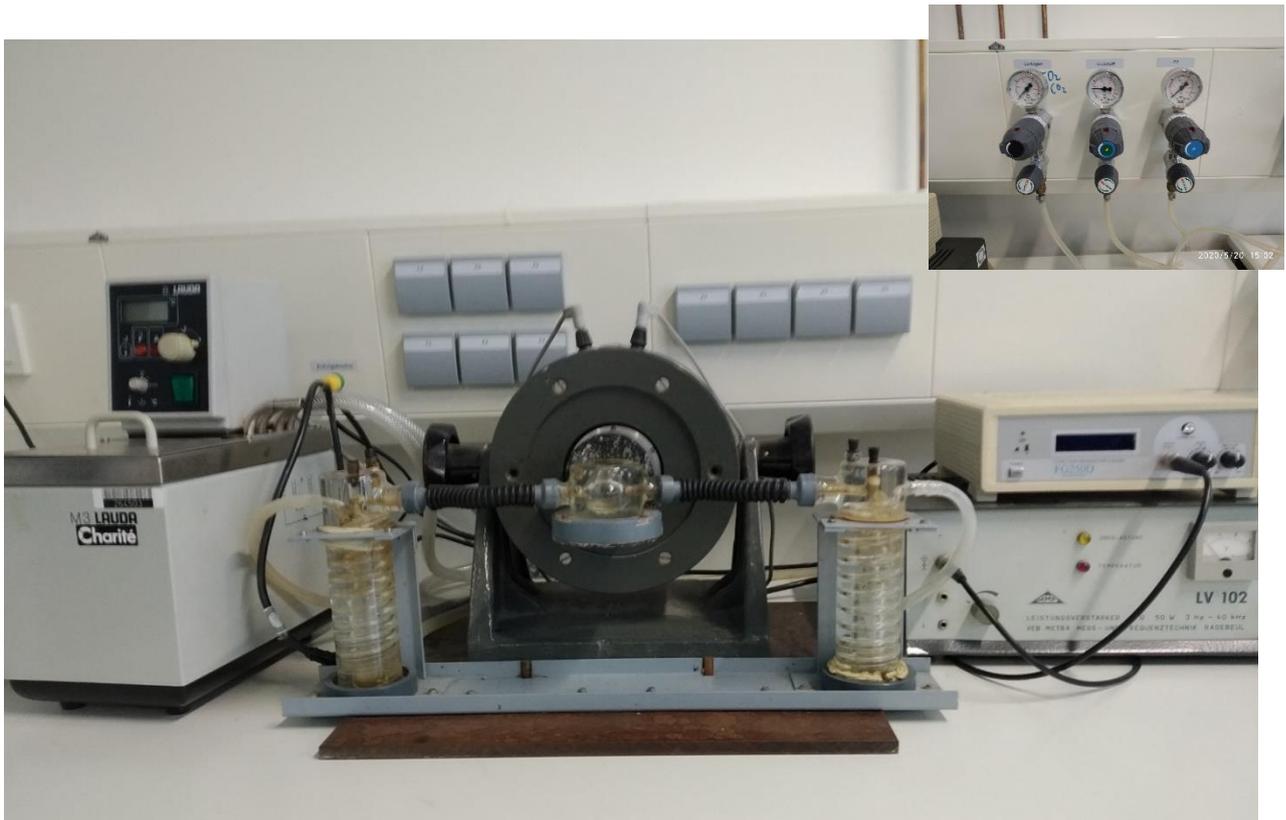


Abb. 4: Hauptbild: Tonometer (Typ 11075 von VEB Kesselelektronik – Otto Schön) und Wasserbad von Lauda. Die Apparatur ermöglicht ein gleichmäßiges Schütteln der Blutprobe bei Begasung mit erwärmter und angefeuchteter Luft (Spiralbehälter links und rechts simulieren den Respirationstrakt).
 Abbildung oben rechts: Gashähne mit unterschiedlichen Gasgemischen. Die Oxygenierung des Blutes erfolgte durch Begasung mit Carbogen (5 % CO₂ und 95 % O₂). Die Desoxygenierung erfolgte durch Begasung mit 5 % CO₂ und 95 % N₂. Quelle: Eigene Photographien des Versuchsaufbaus im Institut für Vegetative Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

2.5 Western Blot

Die Proteinanalyse wurde mittels Western Blot durchgeführt. Hierfür wurde venöses Blut verwendet, das kurz nach Entnahme im Verhältnis 1:80 mit einem Lysepuffer vermengt wurde. Der verwendete Lysepuffer setzte sich aus 50 mM Tris (pH 6,8), 12,5 mM Dithiothreitol (DTT), 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) sowie 4 M Harnstoff zusammen. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Spektrophotometer (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bestimmt, die Proben auf eine einheitliche Konzentration eingestellt und eine Gelelektrophorese in 10 %-igen Gelen durchgeführt. Für die Gele wurde zunächst ein Trenngel aus 4,5 ml SDS-Puffer (pH 8,8), 1,5 ml Aqua bidest., 3 ml 3 % Acrylamid, 7,5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) sowie 75 µl einer frisch angesetzten 10 %-igen Pierce Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung hergestellt. Nach erfolgter Polymerisierung wurde ein Sammelgel aus SDS-Puffer (pH 6,8), Aqua bidest., Acrylamid, TEMED und APS über das Trenngel gegossen. Nach Befüllen der Gelelektrophoresekammer mit Laemmli-Puffer (pH 8,3; TRIS 25 mM, Glycin 192 mM und SDS 0,1 %) wurden je 25 µg Gesamtprotein der Proben in die Taschen des Gels gefüllt und

anschließend die Gelelektrophorese durchgeführt (30 min bei 80 V, dann 1 h bei 100 V). Daraufhin wurden die aufgetrennten Proteine mit 100 V über 60 Minuten auf eine hydrophobe Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran geblottet. Hierfür wurde ein Blottingpuffer aus Aqua bidest. mit 22,5 mM Tris, 172,8 mM Glycin, 0,05 % SDS und 20 % Methanol verwendet. Im Folgenden wurden die Membranen über 60 Minuten in einer 5 %-igen Milchpulverlösung in TBS-T (20,1 mM Tris, 136,9 mM NaCl, 0,1 % Tween pH 7,6) blockiert und mit TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach einem erneuten Waschen in TBS-T erfolgte die 60-minütige Inkubation mit Sekundärantikörpern, die mit Meerrettichperoxidase gekoppelt waren (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, #sc-2030 and #sc-2031). Nach drei weiteren Waschschritten wurde das Chemilumineszenzsubstrat (WesternBight™ Sirius, Biozym Scientific, Hessian Oldendorf, Deutschland) zugegeben und die Visualisierung mit dem Intas ECL Chemostar (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion des "Protein of Interest" wurde als Primärantikörper anti-BPGM (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA, #NBP1-86064) verwendet. Nach der Darstellung erfolgte ein Stripping mit 0,2 mol/l Natronlauge und eine Inkubation mit anti-GAPDH (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Deutschland, #BM439), das als Referenzprotein zur Normalisierung verwendet wurde.

2.6 Bestimmung: 2,3-BPG

Zur Bestimmung der 2,3-BPG-Spiegel in den venösen Blutproben wurde das 2,3-Diphosphoglycerate Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, #10148334001) anhand des Protokolls in der 23. Version vom April 2018 verwendet. Das Protokoll wurde proportional an kleinere Probenmengen angepasst und in dieser Form vor Beginn der Studie getestet. Für die Probenvorbereitung wurde ein Fünftel der Mengen, für den Assay selber ein Zehntel der Menge im Dreifachansatz verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte in flachen Greiner-One 96-Well-Platten und wurde mit dem Synergy HTX Plattenleser (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) bei 340 nm durchgeführt.

2.7 Statistik

Für die statistischen Auswertungen wurde das Programm GraphPad PRISM Version 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) verwendet. Zur statistischen Signifikanzanalyse der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde die Varianzanalyse (ANOVA) sowie ergänzend die Bonferroni-Methode verwendet. Um die statistische Signifikanz im Vergleich zweier Gruppen zu

ermitteln, wurde der Students-t-test verwendet. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant gewertet. Für die Korrelationsanalyse wurde die Pearson-Korrelation durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Definition des Probandenkollektivs

Die Einteilung der Probandinnen und Probanden in ein untrainiertes und ein trainiertes Kollektiv erfolgte anhand von anamnestischen Angaben. Während des Ausdauerstestes wurden Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid in der Ein- und Ausatemluft bestimmt und hieraus die VO_2 berechnet, also die O_2 -Menge, die pro Minute pro Kilogramm Körpergewicht aufgenommen wird. Bei zunehmender Belastung erhöht sich der Wert, sodass bei der maximalen Auslastung, die im Test durch die Versuchspersonen erreicht wurde, die VO_{2max} ermittelt wurde. Die VO_{2max} erhöht sich durch Leistungstraining und ist ein etablierter Referenzwert für den Trainingszustand (Poole and Jones, 2017, Morton and Billat, 2000, Fletcher et al., 2013), sodass sich der Wert für die Verifizierung der anamnestischen Angaben anbietet.

Die trainierten Frauen wiesen mit einer VO_{2max} von durchschnittlich $52,47 \pm 5,30$ $mlO_2/min/kg$ eine signifikant höhere Leistungsfähigkeit auf als die untrainierte weibliche Gruppe mit einer VO_{2max} von $44,13 \pm 4,72$ $mlO_2/min/kg$. Noch ausgeprägter stellte sich der Unterschied zwischen der Gruppe der trainierten Männer und der untrainierten Männern dar. Während die trainierten Männer eine VO_{2max} von $60,57 \pm 6,96$ $mlO_2/min/kg$ aufwiesen, lagen die untrainierten Männer durchschnittlich bei $51,40 \pm 6,20$ $mlO_2/min/kg$. Somit lagen die Männer mit einer gesamt durchschnittlichen VO_{2max} von $56,2 \pm 8,11$ $mlO_2/min/kg$ deutlich vor den weiblichen Studienteilnehmerinnen, die durchschnittlich eine VO_{2max} von $48,30 \pm 6,50$ $mlO_2/min/kg$ erbrachten (Fig. 1a–c (Balcerek et al., 2020)).

Bei den Hämoglobinniveaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen trainierten und untrainierten Versuchspersonen. Während die Frauen durchschnittlich eine Hämoglobinkonzentration von $14,37 \pm 0,83$ g/dl aufwiesen, hatten die Männer im Durchschnitt ein Hämoglobin von $16,37 \pm 0,97$ g/dl (Fig.1d (Balcerek et al., 2020)).

Das Durchschnittsalter der Probandinnen und Probanden lag bei 27 Jahren ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Supplementary Fig. S1a (Balcerek et al., 2020)). Der BMI der Probandinnen war mit $22,34 \pm 2,22$ kg/m^2 etwas geringer als bei den männlichen Probanden mit einem BMI von $23,83 \pm 2,42$ kg/m^2 . Zwischen der trainierten und der untrainierten Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Supplementary Fig. S1b (Balcerek et al., 2020)), was auch das Ziel über die Ein- bzw. Ausschlusskriterien war (siehe Material und Methoden).

Betrachtet man die prozentuale Muskelmasse der Versuchspersonen, stellt man fest, dass die trainierten Frauen mit einem Muskelanteil von $44,47 \pm 2,57$ % einen signifikant höheren Anteil haben als die untrainierten Probandinnen mit $39,75 \pm 3,35$ %. Zwischen den trainierten und den

untrainierten Männern zeigte sich ein gleichartiger Trend, jedoch kein signifikanter Unterschied. Wie zu erwarten, wiesen die Männer mit einem Gesamtdurchschnitt von $48,02 \pm 3,76$ % einen deutlich höheren Muskelanteil auf als die Frauen mit einem Gesamtdurchschnitt von $42,11 \pm 3,79$ %. Analog lag der Körperfettanteil bei untrainierten Frauen mit $27,15 \pm 6,01$ % deutlich über dem der trainierten Frauen mit $19,75 \pm 4,58$ %. Insgesamt lagen die Probandinnen somit bei $23,45 \pm 6,46$ %, wohingegen die Männer einen durchschnittlichen Körperfettanteil von $15,37 \pm 6,32$ % aufwiesen (siehe: Supplementary Fig. S1c, d (Balcerek et al., 2020)). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Kohortengruppen den Erwartungen und Anforderungen für die geplanten Untersuchungen sehr gut entsprachen.

3.2 Ergebnisse der kapillären und venösen Blutgasanalyse

Die Bestimmung der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin kann auf zwei Arten erfolgen. Eine einfache Variante ist die kalkulierte Ausgabe des p50 Wertes im Rahmen der BGA. Hier beruhen die p50 Werte auf einer Schätzung anhand einer Messung aus einer einzelnen Probe, dementsprechend nur einer pO₂/sO₂-Kombination. Die zweite, deutlich aufwändigere, Variante ist die Erstellung einer Sauerstoffbindungskurve mittels Tonometrie. Nur letztere Variante liefert zuverlässige Werte (Srinivasan et al., 2017), bedarf jedoch einer speziellen Apparatur und ist sehr aufwendig in der Datenerhebung. So liegt der Zeitaufwand für die Erstellung einer O₂-Bindungskurve bei etwa 40 min mit etwa 10 Messpunkten.

Zunächst sollen die Ergebnisse aus der Blutgasanalyse (Abschätzung aus einer Messung) betrachtet werden. Diese Variante ist aufgrund der schnellen und unkomplizierten Ausgabe für die klinische Anwendung besonders attraktiv. Sowohl die venösen als auch die kapillären Blutproben wurden für die Blutgasanalyse verwendet. Während die kapillären Proben eine sO₂ über 95 % ähnlich der arteriellen Blutgase aufweisen und man hieraus den p50-Wert schätzen kann (p50_e: „estimated“ p50) (Zavorsky et al., 2007, Ekkernkamp et al., 2015), unterliegt die sO₂ der venösen Proben der Probandinnen und Probanden aufgrund hämodynamischer und metabolischer Faktoren einer deutlich größeren Schwankung. Die männlichen Versuchspersonen wiesen eine venöse sO₂ von $57,90 \pm 14,06$ % auf, die Frauen lagen bei $52,62 \pm 12,89$ %. Bei Proben <97 % sO₂ (venöse Proben) wird in der Blutgasanalyse der p50 Wert kalkuliert (p50_c: „calculated“ p50), das heißt mittels eines anderen Algorithmus als bei kapillären Proben berechnet (Radiometer, 2006).

In den kapillären Proben stellten sich keine wesentlichen Unterschiede im pH-Wert zwischen den Gruppen dar. Der gesamt durchschnittliche pH betrug $7,41 \pm 0,002$ (Fig. 2b (Balcerek et al., 2020)). Der pCO₂ lag kapillär bei den Probandinnen mit $36,42 \pm 2,65$ mmHg signifikant niedriger als bei den männlichen Probanden mit $38,81 \pm 2,67$ mmHg (Fig. 2c (Balcerek et al., 2020)).

Entsprechend war bei gleichem pH auch das Standardbikarbonat bei den Männern mit $24,53 \pm 0,09$ mmol/l signifikant höher als bei den Frauen mit $23,55 \pm 0,38$ mmol/l (Fig. 2d (Balcerek et al., 2020)). Interessanterweise zeigten sich trotz signifikant höherer $p\text{CO}_2$ -Werte bei gleichem pH-Wert keine relevanten Unterschiede im $p50_e$ zwischen den Gruppen. Der $p50_e$ betrug gesamtdurchschnittlich $25,75 \pm 0,72$ mmHg. Die Werte variierten zwischen 25,08 und 26,94 mmHg (Fig. 2a (Balcerek et al., 2020)). Die kapillären $p50$ Werte korrelieren bei den Männern mit den $p\text{CO}_2$ -Werten (Fig. 2e (Balcerek et al., 2020)) und bei beiden Geschlechtern invers mit dem pH (Fig. 2f (Balcerek et al., 2020)). Bei den Frauen korrelieren die $p\text{CO}_2$ -Werte interessanterweise nicht mit dem $p50_e$.

Die Blutgasanalyse der venösen Proben ergab einen pH-Wert von durchschnittlich $7,35 \pm 0,03$, ebenfalls ohne Unterschiede zwischen den Gruppen (Fig. 3b (Balcerek et al., 2020)). Auch $p\text{CO}_2$ und Standardbikarbonat verhielten sich ähnlich wie in den kapillären Messungen. Bei den Probandinnen betrug der $p\text{CO}_2$ $47,71 \pm 4,56$ mmHg und lag somit signifikant niedriger als bei den männlichen Probanden, die durchschnittlich einen venösen $p\text{CO}_2$ von $51,18 \pm 5,63$ mmHg aufwiesen (Fig. 3c (Balcerek et al., 2020)). Das Standardbikarbonat lag bei den Frauen bei $23,30 \pm 1,28$ mmol/l, bei den Männern bei $24,05 \pm 1,02$ mmol/l (Fig. 3d (Balcerek et al., 2020)). Bei nahezu identischem pH-Wert und signifikant höherem $p\text{CO}_2$ sollten die männlichen Probanden einen höheren $p50_c$ aufweisen. Tatsächlich hatten die Männer durchschnittlich einen $p50_c$ von $27,97 \pm 1,54$ mmHg und somit entgegen der Erwartung einen signifikant niedrigeren $p50_c$ als die Probandinnen mit einem $p50_c$ von $28,90 \pm 1,25$ mmHg. Eine signifikante Differenz zwischen dem trainierten und dem untrainierten Kollektiv stellte sich nicht dar. Die Werte variierten zwischen 24,87 und 31,80 mmHg, wobei die Männer eine höhere Variation aufwiesen (Fig. 3a (Balcerek et al., 2020)). Bei beiden Geschlechtern korrelieren sowohl pH und $p50_c$ als auch $p\text{CO}_2$ und $p50_c$ (Fig. 3e, f (Balcerek et al., 2020)).

Um präzisere Erkenntnisse bezüglich der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin zu erlangen und tatsächlich gemessene und nicht nur kalkulierte Werte zu verwenden, wurde mit den Proben zusätzlich via Tonometrie manuell die O_2 -Bindungskurve zur Ermittlung des $p50$ erstellt.

3.3 Tonometrische Bestimmung der Sauerstoffbindungskurve

Die tonometrische Bestimmung der O_2 -Bindungskurve erfolgte unter oben beschriebenen standardisierten Bedingungen einschließlich einer konstanten Temperatur von 37°C . Weder beim $p\text{CO}_2$ noch bei den pH-Werten zeigten sich nach Äquilibrierung der Proben signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Der $p\text{CO}_2$ während der Messungen betrug im Durchschnitt $35,25 \pm 0,7$ mmHg und der pH $7,43 \pm 0,02$ (Supplementary Fig. S2a, b (Balcerek et al., 2020)), womit die Werte physiologischen Normen entsprechen. In der Literatur wird der Standard- $p\text{CO}_2$

für arterielles Blut von 40 mmHg verwendet, womit dieser Wert leicht von unserem experimentellen Aufbau, jedoch auch von den Ausgangswerten unserer Kohorten, abweicht.

Auf Grundlage der tonometrischen Messwerte wurden O₂-Bindungskurven erstellt. Die daraus errechneten Funktionen stimmen sehr gut mit der Hill-Gleichung überein (siehe R² Fig. 4a–d (Balcerek et al., 2020)). Um diese numerisch miteinander vergleichen zu können, wurden der p25, der p50 sowie der p75 ermittelt (Fig. 4 (Balcerek et al., 2020)).

Der p50 der trainierten Männer lag bei $23,46 \pm 1,11$ mmHg, der der untrainierten bei $23,95 \pm 0,54$ mmHg (Fig. 4 c, d (Balcerek et al., 2020)). Dagegen lagen die trainierten Frauen bei $25,43 \pm 1,08$ mmHg und die untrainierten bei $24,77 \pm 0,76$ mmHg (Fig. 4 a, b (Balcerek et al., 2020)). Somit zeigten sich zwischen den untrainierten und den trainierten Versuchspersonen im p50 keine signifikanten Unterschiede, wohingegen ein deutlicher Geschlechterunterschied auffällt. Der Gesamtdurchschnitt der Probandinnen betrug $25,09 \pm 0,97$ mmHg im Verhältnis zu den männlichen Probanden mit einem Durchschnitt von $23,7 \pm 0,9$ mmHg, sodass sich eine Differenz von 1,39 mmHg ergibt. Die Differenz zwischen dem niedrigsten p50 (männlicher Proband) und dem höchsten p50 (Probandin) betrug 6,11 mmHg (Fig. 4 e (Balcerek et al., 2020)). Die Beobachtung, dass Frauen eine niedrigere Affinität von O₂ und Hämoglobin aufweisen, deckt sich mit den Ergebnissen der Blutgasanalyse der venösen Blutproben.

Beim p75 stellt sich ein vergleichbarer Unterschied dar. Die Probandinnen lagen auch hier mit einem p75 von $37,61 \pm 1,19$ mmHg signifikant höher als die männlichen Probanden mit einem p75 von $36,07 \pm 1,14$ mmHg. Die Differenz beläuft sich somit auf 1,54 mmHg.

Die Probandinnen hatten durchschnittlich einen p25 von $15,76 \pm 0,7$ mmHg, die männlichen Probanden einen p25 von $14,86 \pm 0,63$ mmHg. Folglich ergibt sich hier mit 0,89 mmHg die geringste Differenz.

Wenn man die Geschlechterdifferenzen in den verschiedenen Abschnitten der O₂-Bindungskurve vergleicht, stellt man fest, dass die Kurve der männlichen Probanden steiler verläuft als die Bindungskurve der verhältnismäßig rechtsverschobenen Probandinnen (Fig. 4 f (Balcerek et al., 2020)).

3.4 Korrelation zwischen p50 und 2,3-Bisphosphoglycerat

Während der tonometrischen Bestimmung wurden pCO₂ und Temperatur standardisiert und im pH zeigten sich keine Unterschiede, sodass bezüglich der festgestellten Geschlechterunterschiede im p50 eine nähere Untersuchung von 2,3-BPG von großem Interesse war.

Tatsächlich wurden signifikant höhere 2,3-BPG-Spiegel bei den Probandinnen im Vergleich zur männlichen Kohorte festgestellt. Die Frauen wiesen eine 2,3-BPG-Menge im Verhältnis zum Hämoglobin von $3,8 \pm 0,36$ mg/g auf, während die Männer mit $3,25 \pm 0,47$ mg/g signifikant

niedriger lagen (Fig. 5 a (Balcerek et al., 2020)). Unterschiede in Abhängigkeit vom Trainingszustand zeigten sich nicht. Die 2,3-BPG-Spiegel korrelierten sehr gut mit den experimentell erhobenen p50-Werten (Fig. 5b (Balcerek et al., 2020)).

Es stellte sich weiterhin die Frage, ob dieser Geschlechterunterschied aus unterschiedlichen Expressionsniveaus der BPGM oder aus einer unterschiedlichen Aktivität der BPGM resultierte. Der einzige bekannte Effektor der BPGM-Aktivität ist die Protonenkonzentration im Blut (Astrup et al., 1970, Mairbaurl et al., 1986), jedoch wiesen alle Gruppen vergleichbare pH-Werte auf. Bei Bestimmung des BPGM-Levels im Blut wurde festgestellt, dass das Proteinniveau der männlichen Probanden tatsächlich unter dem der Probandinnen lag (Fig. 5c, d (Balcerek et al., 2020)), womit die höheren 2,3-BPG Spiegel bei den Frauen mit einer stärkeren BPGM Expression korreliert. Da 2,3-BPG die Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin senkt, kann der beobachtete Geschlechtsunterschied in der basalen Hämoglobin-O₂-Affinität durch die stärkere BPGM Expression bei Frauen erklärt werden.

3.5 Durch den Belastungstest verursachte Veränderungen

Um den Geschlechterunterschied im p50 besser einschätzen zu können, wurde der maximal erreichbare Grad der Rechtsverschiebung in der Sauerstoffbindungskurve bestimmt. Die maximale Erhöhung des p50 unter Ausbelastung kann als physiologisch relevante Obergrenze angesehen werden, da sowohl eine zu hohe als auch eine zu geringe Hämoglobin-O₂-Affinität zu einer inadäquaten Sauerstoffversorgung führen. Um einen Einblick in die O₂-Versorgung in Belastungssituationen zu erhalten, wurden die O₂-Bindungskurven nach dem VO₂max-Test erneut tonometrisch erstellt und mit den O₂-Bindungskurven vor dem Belastungstest verglichen. Da bereits festgestellt wurde, dass es zwar keinen Unterschied zwischen trainierten und untrainierten Versuchspersonen, aber einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen gibt, wurde insbesondere der Geschlechtervergleich in den Fokus gerückt.

Während Frauen in Ruhe einen durchschnittlichen p50 von $25,09 \pm 0,96$ mmHg aufwiesen, erhöhte sich der p50 nach dem Belastungstest durchschnittlich um 4,91 mmHg auf $30,00 \pm 2,54$ mmHg (Fig. 6a; 7a (Balcerek et al., 2020)). Bei den Männern erhöhte sich der durchschnittliche p50 von $23,7 \pm 0,9$ mmHg in Ruhe auf $30,26 \pm 1,58$ mmHg nach der Belastung (Fig. 6b; 7a (Balcerek et al., 2020)). Folglich ergibt sich bei den Männern eine Differenz von 6,56 mmHg und somit eine größere Differenz als bei den Probandinnen. Während die Frauen in Ruhe durchschnittlich einen um 1,39 mmHg höheren p50 als die Männer aufwiesen, entfällt dieser Unterschied nach der Belastung (Fig. 6c, d; 7a (Balcerek et al., 2020)). Hierbei gilt zu beachten, dass während der tonometrischen Messung sowohl die Temperatur als auch das CO₂ genormt

wurden, sodass die Veränderungen im p50 zum überwiegenden Teil aus Veränderungen im pH-Wert resultieren.

Der kapilläre pH-Wert vor der Belastung lag sowohl bei den Probandinnen als auch bei den Probanden bei $7,41 \pm 0,02$. Nach dem VO₂max-Test hingegen lag der pH-Wert bei den Frauen bei $7,22 \pm 0,05$ und bei den Männern signifikant niedriger bei $7,20 \pm 0,05$ (Fig. 7c (Balcerek et al., 2020)). Hiermit korrelierend lag das kapilläre Laktat nach der Belastung bei den männlichen Probanden bei $124,99 \pm 18,62$ mg/dl, bei den Probandinnen lediglich bei $98,10 \pm 16,18$ mg/dl. In Ruhe lag das Laktat ohne wesentliche Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei $12,13 \pm 4,35$ mg/dl (Fig. 7d (Balcerek et al., 2020)). Des Weiteren ist ein deutlicher Abfall des kapillären Standardbikarbonats bei beiden Geschlechtern aufgetreten, was dessen Bedeutung als größtes Blutpuffer-System des Menschen unterstreicht. Hierbei war der Abfall bei den Männern größer als bei den Frauen (Fig. 7f (Balcerek et al., 2020)).

Auch bei den anderen Effektoren der O₂-Bindungskurve stellten sich Veränderungen durch den Belastungstest dar. Die Körpertemperatur vor der Belastung lag bei den Versuchspersonen insgesamt durchschnittlich bei $36,55 \pm 0,13$ °C, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen darstellten. Nach dem Belastungstest hingegen erhöhte sich die Körpertemperatur der männlichen Probanden auf $37,30 \pm 0,76$ °C und lag damit signifikant über der ebenfalls erhöhten Körpertemperatur der Frauen mit $36,90 \pm 0,59$ °C (Fig. 7b (Balcerek et al., 2020)).

Wie bereits beschrieben, lag der pCO₂ kapillär bei den Probandinnen mit $36,42 \pm 2,65$ mmHg signifikant niedriger war als bei den männlichen Probanden mit $38,81 \pm 2,67$ mmHg (Fig. 2c (Balcerek et al., 2020)). Nach der Belastung lagen alle Versuchspersonen ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei $34,32 \pm 3,36$ mmHg (Fig. 7e (Balcerek et al., 2020)). Die Absenkung des pCO₂ trotz erniedrigtem pH-Wert ist am ehesten auf Hyperventilation im Rahmen des Auslastungstests zurückzuführen.

3.6 Vergleich der tonometrisch erhobenen p50-Werte mit den Ergebnissen der Blutgasanalyse

Da die Durchführung einer tonometrischen Bestimmung der O₂-Bindungskurve für den klinischen Alltag keine praktikable Option darstellt, stellt sich die Frage, ob die in der Blutgasanalyse bestimmten Werte adäquate Rückschlüsse auf die Hämoglobin-O₂-Affinität zulassen. Um dies zu untersuchen, wurden die kapillären p50_e- und die venösen p50_c-Werte mit den in der Tonometrie erhobenen p50-Werten korreliert (Fig. 8 [26]). Während sich für die kapillären Messungen bei keinem der Geschlechter eine Korrelation zeigte, korrelierten die venösen Daten gut mit den Messungen der Tonometrie.

4. Diskussion

In der Affinität von Sauerstoff zu Hämoglobin gibt es große individuelle Unterschiede – ein Aspekt, der in der medizinischen Behandlung nur sehr wenig Berücksichtigung findet. In der hier vorgestellten Studie wurde die O₂-Abgabefähigkeit von 60 gesunden Probandinnen und Probanden, von denen jeweils die Hälfte regelmäßig Ausdauersport betrieb, in Ruhe sowie nach einem Ausbelastungstest untersucht. Erwartet wurde ein in der Literatur zuvor beschriebenes durch Ausdauersport erhöhtes 2,3-BPG-Niveau sowie eine damit verbundene Rechtsverschiebung der O₂-Bindungskurve (Boning et al., 1975, Braumann et al., 1979, Schmidt et al., 1988, Mairbaurl et al., 1983). Tatsächlich wurde in Hinblick auf den Trainingszustand der Versuchspersonen keine relevante Veränderung der Hämoglobin-O₂-Affinität festgestellt, was wiederum die Ergebnisse anderer Studien unterstützt (Shappell et al., 1971, Pawlak and Szydlowski, 1990). Stattdessen stellten sich eine hohe individuelle Varianz der O₂-Bindungskurve sowie ausgeprägte Unterschiede zwischen Frauen und Männern dar, die bei der Betrachtung der O₂-Verfügbarkeit des Gewebes berücksichtigt werden müssen.

Die tonometrische Bestimmung der O₂-Bindungskurve ergab in Ruhe einen p50 von durchschnittlich $24,4 \pm 1,17$ mmHg (bei pH $7,43 \pm 0,02$; pCO₂ $35,25 \pm 0,7$ mmHg; 37°C) mit einer Differenz zwischen dem höchsten und niedrigsten p50 von 6,11 mmHg. In der venösen BGA ergab sich ein p50_c von $28,4 \pm 1,47$ mmHg (bei pH $7,35 \pm 0,03$; pCO₂ $49,35 \pm 5,37$ mmHg; 37°C) mit einem $\Delta p50_c$ von 6,93 mmHg. Es ist bemerkenswert, dass auch bei einer jungen, gesunden Kohorte eine so starke Streuung vorliegt. Mit hierfür verantwortlich ist der deutliche Geschlechterunterschied im p50. Die Männer zeigten im Vergleich zu den Frauen eine linksverschobene O₂-Bindungskurve, korrelierend mit niedrigerer 2,3-BPG Konzentration und geringerer BPGM-Expression. Während der tonometrisch bestimmte p50 bei den Probandinnen $25,09 \pm 0,97$ mmHg betrug, lag er bei den männlichen Probanden bei $23,7 \pm 0,9$ mmHg, sodass sich eine Differenz von 1,39 mmHg ergibt. In früheren Studien erlangte man ähnliche Resultate (Arturson and Robertz 1971, Humpeler and Amor, 1973). Des Weiteren wurde gezeigt, dass diese Unterschiede lediglich im zeugungsfähigen Alter, aber nicht vor der Pubertät oder postmenopausal auftreten (Humpeler et al., 1989). Entsprechend wurde von einem Einfluss von Sexualhormonen auf die 2,3-BPG-Synthese bzw. auf den p50 ausgegangen, allerdings ließ sich nur eine schwache oder keine Korrelation zwischen Testosteron/Östrogen und p50 nachweisen (Humpeler et al., 1989, Bille-Brahe et al., 1976, Bauer et al., 2003).

Ein weiterer Geschlechterunterschied stellt sich bei Betrachtung des pCO₂ dar. Der pCO₂ lag bei den männlichen Probanden sowohl venös als auch kapillär deutlich höher als bei den Probandinnen. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor in arteriellen Proben festgestellt (Esposito et al., 1996). Bei einer höherer Bikarbonatkonzentration der Männer war der pH in allen Gruppen

vergleichbar. Da ein höherer $p\text{CO}_2$ jedoch über den Bohr-Effekt zu einer Rechtsverschiebung der O_2 -Bindungskurve führt, würde eine geringere Hämoglobin- O_2 -Affinität bei Männern erwartet werden – genau das Gegenteil zu den Befunden, wonach Frauen im Vergleich zu den Männern eine niedrigere Hämoglobin- O_2 -Affinität aufweisen. Auch hier wird die Bedeutung von 2,3-BPG in der Determination des $p50$ unter Basalbedingungen deutlich.

Sowohl aufgrund der höheren Bikarbonat- als auch der höheren Hämoglobinwerte verfügen Männer während sportlicher Aktivitäten über eine größere Pufferkapazität. Die höheren Hämoglobinwerte der Männer könnten essenziell sein, um die höhere Hämoglobin- O_2 -Affinität und die dadurch bedingte schlechtere O_2 -Abgabe zu kompensieren. Sowohl in unseren als auch in zuvor publizierten Daten (Yudin and Verhovsek, 2019, Shepherd et al., 2019) konnte eine Korrelation zwischen Hämoglobin und Hämoglobin- O_2 -Affinität nachgewiesen werden. Wir stellen die Hypothese auf, dass die O_2 -Transportkapazität und der $p50$ engmaschig reguliert werden, um eine ausreichende Oxygenierung zu gewährleisten, sodass die letztendliche O_2 -Verfügbarkeit in Ruhe bei Männern und Frauen vergleichbar ist. Unterstützt wird diese Auffassung zum Beispiel durch den Fakt, dass genetische Variationen des Hämoglobins oder Mutationen der BPGM mit einer resultierend hohen Hämoglobin- O_2 -Affinität sich bei moderatem Einfluss klinisch asymptomatisch präsentieren, bei stärkerer Ausprägung aber zu einer Erythrozytose führen (Rosa et al., 1978, Shin et al., 2016, Lee and Harrison, 2018, Hoyer et al., 2004).

Die im Ausbelastungstest erreichte VO_2max der Studienteilnehmenden zeigt einen deutlichen Einfluss von Training auf die O_2 -Aufnahmefähigkeit. Die männlichen Versuchspersonen wiesen zwar eine höhere VO_2max als die Probandinnen auf, interessanterweise stellt sich zwischen den trainierten Frauen und den untrainierten Männern kein Unterschied dar, sodass der Geschlechterunterschied hier durch Training kompensiert werden konnte.

Der Ausbelastungstest hatte auch deutliche Einflüsse auf die Hämoglobin- O_2 -Affinität. Während sich der tonometrisch bestimmte $p50$ bei den Probandinnen um 4,91 mmHg erhöhte, stieg er bei den Männern um 6,56 mmHg an, sodass sich beim durchschnittlichen $p50$ nach der Belastung kein Unterschied mehr zwischen den Geschlechtern feststellen ließ. Darüber hinaus wurde während der tonometrischen Bestimmung des $p50$ die Temperatur normalisiert, wohingegen die nach dem Ausbelastungstest gemessene Temperatur der männlichen Probanden signifikant über der der Probandinnen lag, wodurch der tatsächliche Anstieg im $p50$ der Männer noch größer sein dürfte. Da während der Messung sowohl die Temperatur als auch der $p\text{CO}_2$ normalisiert wurden, sind die Veränderungen im $p50$ ausschließlich auf Veränderungen im pH-Wert zurückzuführen. Die Messungen der O_2 -Bindungskurve nahmen mindestens 40 Minuten in Anspruch, sodass es bei konstanter Begasung mit CO_2 im Verlauf über die Carboanhydrase-Reaktion zu einem anteiligen Ausgleich des pH-Wertes kam, was eine Limitation unserer Messmethodik darstellt.

Bemerkenswert jedoch ist, dass die physiologische Variation im $p50$ in Ruhe innerhalb der Kohorte ($\Delta p50$ 6,11 mmHg) nur geringfügig kleiner ist als der größte $p50$ -Anstieg bei maximaler

Belastung (8-10 mmHg). Diese enorme Schwankungsbreite in einem gesunden Kollektiv lässt darauf schließen, dass auch bei hospitalisierten Patientinnen und Patienten große Unterschiede in der Hämoglobin-O₂-Affinität bestehen. Um die O₂-Versorgung der zu behandelnden Person adäquat einschätzen zu können, sollte also auch der p50 gemonitort werden. Da während der p50-Bestimmung in Ruhe der pH, der pCO₂ und die Temperatur zwischen den Gruppen identisch waren, liegt die Ursache für den höheren p50 der Frauen an der erhöhten 2,3-BPG-Konzentration. Weitere Forschung wird zukünftig nötig sein, um die Regulation der BPGM-Aktivität und -Expression zu verstehen.

Die Variation des p50 geht mit einer Veränderung der Steigung der O₂-Bindungskurve einher. Mit einer zunehmenden Rechtsverschiebung zeigte sich eine vermehrte Abflachung der Kurve. Dieser Effekt zeigte sich unabhängig davon, ob die Rechtsverschiebung durch eine Azidose nach dem Leistungstest oder durch eine erhöhte 2,3-BPG-Konzentration (Geschlechter) verursacht wurde. Bei der Betrachtung der verschiedenen Bereiche der O₂-Bindungskurve fällt die Abflachung besonders im oberen Bereich um den p75 herum auf, wohingegen die Steigung im Bereich des p25 im Verhältnis deutlich weniger abnimmt. Folglich erscheint es wahrscheinlich, dass Veränderungen des p50 einen stärkeren Einfluss auf die O₂-Aufnahme als auf die O₂-Abgabe haben. Bereits seit einigen Jahren wird an Substanzen geforscht, welche die Hämoglobin-O₂-Affinität verändern. Es wäre von großem Interesse p50-Modifikatoren zu finden, durch die über einen steilen Anstieg der O₂-Bindungskurve sowohl eine gute O₂-Aufnahme als auch eine gute O₂-Abgabe ermöglicht wird.

Es wird allgemein angenommen, dass eine Rechtsverschiebung der O₂-Bindungskurve durch eine erleichterte O₂-Abgabe auch zu einer besseren Oxygenierung führt. In Untersuchungen hingegen wurde gezeigt, dass unter bestimmten Voraussetzungen auch eine Erhöhung der Hämoglobin-O₂-Affinität zum Beispiel durch die p50-Modifikatoren 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (5-HMF) oder GPT1118 vor Hypoxie schützen kann (Li et al., 2011, He et al., 2015, Dufu et al., 2017). Dieser scheinbare Widerspruch könnte durch eine Veränderung der Steigung der O₂-Bindungskurve erklärt werden, die dazu führt, dass im Endeffekt bei nur moderat erniedrigter O₂-Abgabe eine deutliche Verbesserung der O₂-Aufnahme vorliegt. Diese Hypothese wird durch den Fakt unterstützt, dass eine pharmakologische Erhöhung der Affinität nur bei Patientinnen und Patienten mit Störungen in der O₂-Aufnahme (und damit resultierender Hypoxämie) hilfreich war. Neben gezielten pharmakologischen Versuchen den p50 zu modifizieren, gibt es potenziell auch zahlreiche Substanzen, die aus anderen Indikationen bereits im medizinischen Rahmen Verwendung finden und einen Einfluss auf die O₂-Bindungskurve haben. Bei Kontrastmitteln zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass sie bei normalem pH zu einer Erhöhung der Hämoglobin-O₂-Affinität führen und dass bei Azidose der Bohr-Effekt nur verzögert auftritt (Rosenthal et al., 1973, Kim et al., 1990). Angewendet werden Kontrastmittel unter anderem in der computertomographischen Darstellung des Thorax bei Patientinnen und Patienten mit

Dyspnoe, wenn eine Lungenarterienembolie ausgeschlossen werden soll. Wenn man bedenkt, dass die O₂-Versorgung bei Erkrankten mit Dyspnoe schon im Vorfeld eingeschränkt ist, erscheint es klinisch hochgradig relevant vor Anordnung einer solchen Bildgebung Informationen über die O₂-Abgabefähigkeit der zu behandelnden Person sowie über den potenziellen Einfluss des Verfahrens für die Patientin oder den Patienten zu haben.

Die Hämoglobin-O₂-Affinität findet bisher im klinischen Rahmen relativ wenig Beachtung, was zum Teil dadurch bedingt sein könnte, dass es verhältnismäßig aufwendig ist, eine O₂-Bindungskurve beziehungsweise einen Hill Plot zu erstellen (Srinivasan et al., 2017). Folglich sollten für den klinischen Alltag einfachere Methoden in Erwägung gezogen werden. Im Rahmen unserer Studie wurde der p50 sowohl tonometrisch als auch mittels Blutgasanalyse bestimmt, wobei die Ergebnisse der aus dem kapillären Blut geschätzten p50_e-Werte und der aus dem venösen Blut kalkulierten p50_c-Werte sich deutlich unterscheiden. Die p50_e-Werte der Versuchspersonen korrelieren geschlechtsunabhängig nur sehr schlecht mit den tonometrisch ermittelten p50-Werten. Dagegen korrelieren sie bei beiden Geschlechtern sehr gut mit den pH-Werten und ausschließlich bei den Männern mit dem pCO₂. Obwohl der den Berechnungen zugrunde liegende Siggard-Andersen Oxygen-Status-Algorithmus (Siggaardandersen et al., 1984, Siggaardandersen and Siggaardandersen, 1990) alle relevanten Parameter für die Einschätzung der O₂-Bindungskurve beinhaltet, vermittelt dies den Anschein einer vorrangig pH-Wert abhängigen Schätzung. Die Korrektheit des p50 aus einfachen arteriellen Blutgasanalysen wurde in einer Studie an Patientinnen und Patienten bereits untersucht und insbesondere bei Proben mit einer hohen Sauerstoffsättigung von über 97 % wurden zum Teil enorme Abweichungen des p50 festgestellt (Morgan et al., 1995).

Die Ursache der Fehlkalkulationen könnte die hohe sO₂ sein, da im oberen flachen Anteil der O₂-Bindungskurve eine Veränderung der Faktoren, welche die Hämoglobin-O₂-Affinität beeinflussen, nur einen relativ geringen Einfluss auf die sO₂ hat. Ist die sO₂ hingegen im steilen Bereich der O₂-Bindungskurve, treten individuelle Unterschiede deutlicher hervor, sodass Rückrechnungen auf den p50 adäquatere Ergebnisse bieten. In unseren Daten sind die Schätzungen aus den kapillären Proben inakkurat, sodass sie für den klinischen Alltag auch als grober Anhaltspunkt für die Hämoglobin-O₂-Affinität nicht zu verwenden sind.

Die aus venösem Blut kalkulierten p50_c-Werte hingegen korrelieren signifikant mit den tonometrisch erhobenen Werten und haben trotz individueller Abweichungen im Vergleich zu den kapillären Messungen einen deutlich höheren Aussagewert. Diese Feststellung bestätigt die Daten einer Studie, die untersucht hat, ob die Bestimmung der p50-Werte aus der Blutgasanalyse von venösen Proben eine Alternative zur tonometrischen Erhebung des p50 darstellt, um eine pathologische Abweichung des p50 bei Patientinnen und Patienten mit Erythrozytose festzustellen (Huber et al., 2013). Während auch dort die Abweichungen des p50_c laut der

Autoren gering war, reicht der venöse p50_c dennoch nicht aus, um bei der Evaluation der Polyzythämie den tonometrisch erhobenen p50 zu ersetzen (Huber et al., 2013).

Zusammenfassend stellt der p50 einen relevanten Faktor in der Oxygenierung dar, der bisher in der klinischen Beurteilung von Patientinnen und Patienten stark vernachlässigt wird. Aufgrund der starken individuellen Schwankungen, die wir bereits in einem gesunden Kollektiv nachweisen konnten, ist auch bei erkrankten Personen von einem breiten Spektrum auszugehen. Wir halten eine Studie an Patientinnen und Patienten mit kritischer Oxygenierung für sinnvoll, um den p50 als potenziellen Prognosemarker zu evaluieren und den Einfluss bestimmter Pharmaka weiter zu untersuchen. Dies könnte zum Beispiel in der Intensivmedizin helfen, wichtige Entscheidungen zu treffen und gegebenenfalls auf bestimmte Medikamente zu verzichten. Des Weiteren sollten aus unserer Sicht im Verlauf weitere Untersuchungen mit präklinisch als unbedenklich getesteten Substanzen mit Einfluss auf die Hämoglobin-O₂-Affinität bei ausgewählten Patientengruppen durchgeführt werden, um zukünftig in der Lage zu sein, den p50 zum Wohle der zu behandelnden Person zu modulieren. Schlussendlich liegen hier mehrere Möglichkeiten vor, eine auf die Patientin oder den Patienten besser zugeschnittene und somit personalisierte Medizin zu praktizieren.

5. Literaturverzeichnis

- ADAIR, G. S. 1925. The hemoglobin system. VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 63, 529-545.
- ARTURSON, G. & ROBERT, M. 1971. Oxygen affinity of whole blood in normal human subjects. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*, 45, 22-5.
- ASTRUP, P., RORTH, M. & THORSHAUGE, C. 1970. Dependency on Acid-Base Status of Oxyhemoglobin Dissociation and 2,3-Diphosphoglycerate Level in Human Erythrocytes .2. In-Vivo Studies. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 26, 47-+.
- ATKINSON, G. & REILLY, T. 1996. Circadian Variation in sports performance. *Sports Medicine*, 21, 292-312.
- BALCEREK, B., STEINACH, M., LICHTI, J., MAGGIONI, M. A., BECKER, P. N., LABES, R., GUNGA, H. C., PERSSON, P. B. & FAHLING, M. 2020. A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin. *Scientific Reports*, 10.
- BAUER, K., ELGER, W., SCHNEIDER, B., KRAHL, E. & BAUER, R. 2003. Effect of estradiol sulfamate (ES-J995) on affinity of hemoglobin for oxygen, cardiovascular function and acid-base balance in ovariectomized rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55, 301-307.
- BENESCH, R. & BENESCH, R. E. 1967. Effect of Organic Phosphates from Human Erythrocyte on Allosteric Properties of Hemoglobin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 26, 162-&.
- BILLE-BRAHE, N. E., KEHLET, H., MADSBAD, S. & RORTH, M. 1976. Effects of androgens on oxygen affinity in vivo and 2,3-diphosphoglycerate content of red cells in peripheral arterial insufficiency. *Scand J Clin Lab Invest*, 36, 801-4.
- BOHR, C., HASSELBALCH, K. & KROGH, A. 1904. About a new biological relation of high importance that the blood carbonic acid tension exercises on its oxygen binding. *Skandinavisches Archiv Fur Physiologie*, 16, 402-412.
- BONING, D., SCHWIEGART, U., TIBES, U. & HEMMER, B. 1975. Influences of exercise and endurance training on the oxygen dissociation curve of blood under in vivo and in vitro conditions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 34, 1-10.
- BORG, G. A. 1982. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc*, 14, 377-81.
- BRANDES R, L. F., SCHMIDT RF 2019. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Germany, Springer.
- BRAUMANN, K. M., BONING, D. & TROST, F. 1979. Oxygen dissociation curves in trained and untrained subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 42, 51-60.
- BREWER, G. J. 1974. 2,3-Dpg and Erythrocyte Oxygen-Affinity. *Annual Review of Medicine*, 25, 29-38.
- BRUCE, R. A., BLACKMON, J. R., JONES, J. W. & STRAIT, G. 1963. Exercising Testing in Adult Normal Subjects and Cardiac Patients. *Pediatrics*, 32, SUPPL 742-56.
- CHIBA, H. & SASAKI, R. 1978. Functions, of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. *Curr Top Cell Regul*, 14, 75-116.
- CORTEX BIOPHYSICS GMBH 2019. Metasoft 3, version 3.9.9 SR1. Leipzig, Germany.
- DUFU, K., YALCIN, O., AO-IEONG, E. S. Y., HUTCHALEELALA, A., XU, Q., LI, Z., VLAHAKIS, N., OKSENBERG, D., LEHRER-GRAIWER, J. & CABRALES, P. 2017. GBT1118, a potent allosteric modifier of hemoglobin O₂ affinity, increases tolerance to severe hypoxia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 313, H381-H391.
- EKKERNKAMP, E., WELTE, L., SCHMOOR, C., HUTTMANN, S. E., DREHER, M., WINDISCH, W. & STORRE, J. H. 2015. Spot Check Analysis of Gas Exchange: Invasive versus Noninvasive Methods. *Respiration*, 89, 294-303.
- ESPOSITO, G., VANHORN, J. D., WEINBERGER, D. R. & BERMAN, K. F. 1996. Gender differences in cerebral blood flow as a function of cognitive state with PET. *Journal of Nuclear Medicine*, 37, 559-564.

- FLETCHER, G. F., ADES, P. A., KLIGFIELD, P., ARENA, R., BALADY, G. J., BITTNER, V. A., COKE, L. A., FLEG, J. L., FORMAN, D. E., GERBER, T. C., GULATI, M., MADAN, K., RHODES, J., THOMPSON, P. D., WILLIAMS, M. A., ASSOC, A. H., CARDIOLOGY, C. C., METAB, C. N. P. A., NURSING, C. C. S. & PREVENTION, C. E. 2013. Exercise Standards for Testing and Training: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 128, 873-934.
- HE, Y. L., LI, M. M., WU, L. Y., ZHAO, T., DI, Y., HUANG, X., DING, X. F., WU, K. W., FAN, M. & ZHU, L. L. 2015. Enhanced hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α stability induced by 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) contributes to protection against hypoxia. *Mol Med*, 20, 590-600.
- HOYER, J. D., ALLEN, S. L., BEUTLER, E., KUBIK, K., WEST, C. & FAIRBANKS, V. F. 2004. Erythrocytosis due to bisphosphoglycerate mutase deficiency with concurrent glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *American Journal of Hematology*, 75, 205-208.
- HUBER, F. L., LATSHANG, T. D., GOEDE, J. S. & BLOCH, K. E. 2013. Does venous blood gas analysis provide accurate estimates of hemoglobin oxygen affinity? *Annals of Hematology*, 92, 517-521.
- HUMPELER, E. & AMOR, H. 1973. Sex differences in the oxygen affinity of hemoglobin. *Pflugers Arch*, 343, 151-6.
- HUMPELER, E., VOGEL, S., SCHOBERSBERGER, W. & MAIRBAURL, H. 1989. Red-Cell Oxygen-Transport in Man in Relation to Gender and Age. *Mechanisms of Ageing and Development*, 47, 229-239.
- JELKMANN W., S. R., LANG F., HECKMANN M. 2010. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Germany, Springer.
- JENSEN, F. B. 2004. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand*, 182, 215-27.
- JUBRAN, A. 2015. Pulse oximetry. *Critical Care*, 19.
- KIM, S. J., SALEM, M. R., JOSEPH, N. J., MADAYAG, M. A., CAVALLINO, R. P. & CRYSTAL, G. J. 1990. Contrast media adversely affect oxyhemoglobin dissociation. *Anesth Analg*, 71, 73-6.
- LEE, J. & HARRISON, C. N. 2018. Hb Baden: a rare high affinity haemoglobin variant and its management. *Journal of Clinical Pathology*, 71, 79-80.
- LENFANT, C., TORRANCE, J., ENGLISH, E., FINCH, C. A., REYNAFARJE, C., RAMOS, J. & FAURA, J. 1968. Effect of Altitude on Oxygen Binding by Hemoglobin and on Organic Phosphate Levels. *Journal of Clinical Investigation*, 47, 2652-+.
- LI, M. M., WU, L. Y., ZHAO, T., WU, K. W., XIONG, L., ZHU, L. L. & FAN, M. 2011. The protective role of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) against acute hypobaric hypoxia. *Cell Stress Chaperones*, 16, 529-37.
- LING, C. H. Y., DE CRAEN, A. J. M., SLAGBOOM, P. E., GUNN, D. A., STOKKEL, M. P. M., WESTENDORP, R. G. J. & MAIER, A. B. 2011. Accuracy of direct segmental multi-frequency bioimpedance analysis in the assessment of total body and segmental body composition in middle-aged adult population. *Clinical Nutrition*, 30, 610-615.
- MAIRBAURL, H. 2013. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 4.
- MAIRBAURL, H., HUMPELER, E., SCHWABERGER, G. & PESSENHOFER, H. 1983. Training-Dependent Changes of Red-Cell Density and Erythrocytic Oxygen-Transport. *Journal of Applied Physiology*, 55, 1403-1407.
- MAIRBAURL, H., SCHOBERSBERGER, W., HASIBEDER, W., SCHWABERGER, G., GAESSER, G. & TANAKA, K. R. 1986. Regulation of red cell 2,3-DPG and Hb-O₂-affinity during acute exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 55, 174-80.
- MIDGLEY, A. W., MARCHANT, D. C. & LEVY, A. R. 2018. A call to action towards an evidence-based approach to using verbal encouragement during maximal exercise testing. *Clin Physiol Funct Imaging*, 38, 547-553.
- MORGAN, T. J., ENDRE, Z. H., KANOWSKI, D. M., WORTHLEY, L. I. G. & JONES, R. D. M. 1995. Siggaard-Andersen Algorithm-Derived P50 Parameters - Perturbation by Abnormal

- Hemoglobin-Oxygen Affinity and Acid-Base Disturbances. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 126, 365-372.
- MORTON, R. H. & BILLAT, V. 2000. Maximal endurance time at VO₂max. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32, 1496-1504.
- PATEL, M. P., SIU, V., SILVA-GARCIA, A., XU, Q., LI, Z. & OKSENBERG, D. 2018. Development and validation of an oxygen dissociation assay, a screening platform for discovering, and characterizing hemoglobin-oxygen affinity modifiers. *Drug Design Development and Therapy*, 12, 1599-1607.
- PAWLAK, A. L. & SZYDLOWSKI, E. 1990. Increase in Cooperativity of Oxygen Binding as a Factor Related to High Maximal Oxygen-Uptake during Physical Effort. *Biomedica Biochimica Acta*, 49, S323-S326.
- PERUTZ, M. F. 1979. Regulation of Oxygen-Affinity of Hemoglobin - Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 327-386.
- PITTMAN, R. N. 2013. Oxygen transport in the microcirculation and its regulation. *Microcirculation*, 20, 117-37.
- POOLE, D. C. & JONES, A. M. 2017. Measurement of the maximum oxygen uptake (V_̇O₂max) : (V_̇O₂peak) is no longer acceptable. *Journal of Applied Physiology*, 122, 997-1002.
- RADIOMETER 2006. *ABL800FLEX Referenzhandbuch*, Denmark, Radiometer.
- RAPOPORT, I., BERGER, H., ELSNER, R. & RAPOPORT, S. 1977. Ph-Dependent Changes of 2,3-Bisphosphoglycerate in Human Red-Cells during Transitional and Steady States *Invitro*. *European Journal of Biochemistry*, 73, 421-427.
- ROSA, R., PREHU, M. O., BEUZARD, Y. & ROSA, J. 1978. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. *J Clin Invest*, 62, 907-15.
- ROSENTHAL, A., LITWIN, S. B. & LAVER, M. B. 1973. Effect of Contrast-Media Used in Angiocardiography on Hemoglobin-Oxygen Equilibrium. *Investigative Radiology*, 8, 191-198.
- SAFO, M. K., AHMED, M. H., GHATGE, M. S. & BOYIRI, T. 2011. Hemoglobin-ligand binding: Understanding Hb function and allostery on atomic level. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1814, 797-809.
- SCHMIDT, W., MAASSEN, N., TROST, F. & BONING, D. 1988. Training Induced Effects on Blood-Volume, Erythrocyte Turnover and Hemoglobin Oxygen Binding-Properties. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 57, 490-498.
- SEVERINGHAUS, J. W. 1979. Simple, Accurate Equations for Human-Blood O₂ Dissociation Computations. *Journal of Applied Physiology*, 46, 599-602.
- SHAPPELL, S. D., MURRAY, J. A., BELLINGHAM, A. J., WOODSON, R. D., DETTER, J. C. & LENFANT, C. 1971. Adaptation to exercise: role of hemoglobin affinity for oxygen and 2,3-diphosphoglycerate. *J Appl Physiol*, 30, 827-32.
- SHEPHERD, J. R. A., DOMINELLI, P. B., ROY, T. K., SECOMB, T. W., HOYER, J. D., OLIVEIRA, J. L. & JOYNER, M. J. 2019. Modelling the relationships between haemoglobin oxygen affinity and the oxygen cascade in humans. *Journal of Physiology-London*, 597, 4193-4202.
- SHIN, S. Y., BANG, S. M. & KIM, H. J. 2016. A Novel Hemoglobin Variant Associated with Congenital Erythrocytosis: Hb Seoul [beta 86(F2)Ala -> Thr] (HBB:c.259G > A). *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46, 312-314.
- SIGGAARDANDERSEN, O. & SIGGAARDANDERSEN, M. 1990. The Oxygen Status Algorithm - a Computer-Program for Calculating and Displaying Ph and Blood-Gas Data. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 50, 29-45.
- SIGGAARDANDERSEN, O., WIMBERLEY, P. D., GOTHGEN, I. & SIGGAARDANDERSEN, M. 1984. A Mathematical-Model of the Hemoglobin Oxygen Dissociation Curve of Human-Blood and of the Oxygen Partial-Pressure as a Function of Temperature. *Clinical Chemistry*, 30, 1646-1651.

- SRINIVASAN, A. J., MORKANE, C., MARTIN, D. S. & WELSBY, I. J. 2017. Should modulation of p50 be a therapeutic target in the critically ill? *Expert Review of Hematology*, 10, 449-458.
- STEPHENS, D. P., CHARKOUDIAN, N., BENEVENTO, J. M., JOHNSON, J. M. & SAUMET, J. L. 2001. The influence of topical capsaicin on the local thermal control of skin blood flow in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281, R894-901.
- WANG, Z., YING, Z., BOSY-WESTPHAL, A., ZHANG, J., SCHAUTZ, B., LATER, W., HEYMSFIELD, S. B. & MULLER, M. J. 2010. Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *Am J Clin Nutr*, 92, 1369-77.
- WEBER, R. E. & FAGO, A. 2004. Functional adaptation and its molecular basis in vertebrate hemoglobins, neuroglobins and cytoglobins. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 144, 141-159.
- YASIN, Y. J., BANOUB, J. A. M. & HUSSEINI, A. 2019. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age- sex- specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 (vol 392, pg 1736, 2017). *Lancet*, 393, E44-E44.
- YUDIN, J. & VERHOVSEK, M. 2019. How we diagnose and manage altered oxygen affinity hemoglobin variants. *American Journal of Hematology*, 94, 597-603.
- ZAVORSKY, G. S., CAO, J. G., MAYO, N. E., GABBAY, R. & MURIAS, J. M. 2007. Arterial versus capillary blood gases: A meta-analysis. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 155, 268-279.

6. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Björn Balcerek, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Geschlechts- und trainingsabhängige Effekte in der Variabilität der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

7. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Top-Journal-Publikation:

BALCEREK, B., STEINACH, M., LICHTI, J., MAGGIONI, M. A., BECKER, P. N., LABES, R., GUNGA, H. C., PERSSON, P. B. & FAHLING, M. 2020. **A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin. *Scientific Reports*, 10.**

Beitrag im Einzelnen:

Die Entwicklung der Projektidee und Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit von Prof. Michael Fähling, Dr. Martina Maggioni und Dr. Mathias Steinach. Die „p50 Studie“ bestand aus drei Schwerpunktfragen: 1) Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin, 2) Leistungsparameter und metabolische Faktoren, 3) Trainingseffekte. Die Bearbeitung des ersten Themenkomplexes (Hämoglobin-O₂-Affinität) erfolgte im Wesentlichen durch mich und Prof. Fähling. Gemeinsam mit Julia Lichti (Doktorandin für die Themenkomplexe 2 & 3) war ich maßgeblich an der Rekrutierung der Probandinnen und Probanden sowie ihrer Betreuung während der Tests beteiligt.

Die venösen Blutentnahmen wurden ausschließlich durch mich in meiner Funktion als approbierter Arzt durchgeführt, während die kapillären Blutentnahmen durch Dr. Mathias Steinach durchgeführt wurden. Die Blutgasanalysen sowie die tonometrische Bestimmung der Sauerstoffbindungskurven erfolgte durch mich in Zusammenarbeit mit Prof. Michael Fähling. Parallel wurde die Leistungstests durch Dr. Mathias Steinach, Julia Lichti und Dr. Martina Maggioni angeleitet und beaufsichtigt.

Die Versuchsdurchführung für die Bestimmung der 2,3-BPG-Konzentration wurde in Rücksprache mit meinem Betreuer konzipiert und durch mich mit Unterstützung von Jeannette Schmidt (technische Assistentin) durchgeführt. Die Erstellung der Western Blots erfolgte durch mich nach einem etablierten Protokoll der Arbeitsgruppe.

Die Datenanalyse wurde von mir im Dialog mit meinem Betreuer durchgeführt. Alle in der Arbeit publizierten Säulendiagramme wurden von mir mit der Software PRISM erstellt. An der Erstellung der Korrelationsanalysen sowie der Auswertung der Sauerstoffbindungskurven war ich maßgeblich beteiligt. In technischen sowie statistischen Fragen erhielten wir Unterstützung durch Robert Labes.

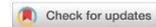
Zusammen mit Prof. Fähling und Dr. Steinach war ich an der Konzeption und Umsetzung der Manuskripterstellung maßgeblich beteiligt. Die schlussendliche Ausformulierung erfolgte unter Einbeziehung aller Co-Autoren.

Unterschrift des Doktoranden

8. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category Scheme:
 WoS
Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190

**OPEN** **A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin**Björn Balcerek^{1,4}, Mathias Steinach^{2,4}, Julia Lichti^{1,2}, Martina A. Maggioni^{2,3}, Philipp N. Becker¹, Robert Labes¹, Hanns-Christian Gunga², Pontus B. Persson¹ & Michael Fähring¹✉

Oxygen affinity to haemoglobin is indicated by the p50 value (pO₂ at 50% O₂Hb) and critically determines cellular oxygen availability. Although high Hb-O₂ affinity can cause tissue hypoxia under conditions of well O₂ saturated blood, individual differences in p50 are commonly not considered in clinical routine. Here, we investigated the diversity in Hb-O₂ affinity in the context of physiological relevance. Oxyhaemoglobin dissociation curves (ODCs) of 60 volunteers (18–40 years, both sexes, either endurance trained or untrained) were measured at rest and after maximum exercise (VO₂max) test. At rest, p50 values of all participants ranged over 7 mmHg. For comparison, right shift of ODC after VO₂max test, representing the maximal physiological range to release oxygen to the tissue, indicated a p50 difference of up to 10 mmHg. P50 at rest differs significantly between women and men, with women showing lower Hb-O₂ affinity that is determined by higher 2,3-BPG and BPGM levels. Regular endurance exercise did not alter baseline Hb-O₂ affinity. Thus, p50 diversity is already high at baseline level and needs to be considered under conditions of impaired tissue oxygenation. For fast prediction of Hb-O₂ affinity by blood gas analysis, only venous but not capillary blood samples can be recommended.

In clinical routine, the oxygenation of patients can be determined in two ways: haemoglobin (Hb) concentration serves to estimate the oxygen (O₂) carrying capacity of the blood, and pulse oximetry indicates oxygen saturation (sO₂). However, inadequate O₂ delivery to the tissue (hypoxia) may occur under conditions of high O₂ affinity to haemoglobin. In a worst-case scenario, anemia or hypoxemia is combined with a compromised release of oxygen to the cells, enhancing the risk of tissue hypoxia.

Cellular oxygen availability is fundamental for energy metabolism. Alteration of cellular oxygen demand is compensated by adaptation of respiration, cardiac output, and perfusion rate. Tissue oxygen availability is severely disturbed in pathological conditions such as shock, sepsis, pulmonary diseases or coronary heart disease, which are associated with a dysbalance of oxygen consumption and delivery.

Oxygen demand differs between organs and is highest in heart and kidney, followed by brain and liver¹. Increased activity, e.g. of the skeletal muscle during exercise, requires rapid adaptation of oxygen delivery. Thus, blood flow is regulated according to tissue specific ratio of oxygen delivery (DO₂) to oxygen consumption (VO₂)². Under resting conditions, overall oxygen extraction ratio (O₂ER) amounts to 25–35% only, resulting in a blood oxygen reserve utilized e.g. in chronic anemia. The low oxygen carrying capacity of the blood in anemia is compensated by an increased concentration of 2,3-Bisphosphoglycerate (2,3-BPG, alias 2,3-DPG), an allosteric effector promoting the offloading of oxygen to the tissues by lowering Hb-O₂ affinity³. Thus, O₂ER can adapt to meet VO₂⁴ and here, the ability to release the required amount of oxygen to the tissue is of major significance.

Hence, accessing the blood's oxygen reserve by lowering Hb-O₂ affinity constitutes a fascinating option to improve tissue oxygenation without any additional metabolic demand for the organism. Increased oxygen off-loading in the tissues has been shown to improve systemic hemodynamics, microvascular function, and exercise capacity⁵. Moreover, lowering Hb-O₂ affinity offers the possibility of improved tissue oxygenation, while avoiding

¹Institut für Vegetative Physiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ²Institut für Physiologie, Zentrum für Weltraummedizin Berlin (ZWMB), Charité – Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. ³Department of Biomedical Sciences for Health, Università Degli Studi Di Milano, Milan, Italy. ⁴These authors contributed equally: Björn Balcerek and Mathias Steinach. ✉email: michael.faehering@charite.de

high blood viscosity and arrhythmias. Consequently, recent therapeutic attempts for hypoxia-related pathologies have targeted Hb-O₂ affinity exogenous modifiers^{6,7}.

Oxygen affinity to haemoglobin was first described by Bohr, Hasselbalch and Krogh (1904), who discovered the S-shaped form of the oxyhaemoglobin dissociation curve (ODC)⁸. Haemoglobin may exist in two alternative structures, the deoxy or T (tense) and the oxy or R (relaxed) structure. Effectors of oxygen binding to haemoglobin modulate the transition between both structures⁹. Temperature and allosteric effectors such as hydrogen ions (pH), carbon dioxide (CO₂), and organic phosphates, of which 2,3-BPG is the most important, modulate Hb-O₂ affinity through cooperative effects on haemoglobin¹⁰. Hb-O₂ affinity is commonly expressed as the p50 value representing pO₂ at 50% saturation of haemoglobin with O₂. Standard p50 in humans is 26.9 mmHg at pH 7.4 and 37°C¹¹. Increased values of temperature, hydrogen ions (acidosis), pCO₂, and 2,3-BPG all lower Hb-O₂ affinity with higher p50 values and a right shift in ODC. For instance, working muscle elevates local temperature and produces more H⁺ and CO₂, causing improved oxygen release¹². The main explanation for the influence of CO₂ on Hb-O₂ affinity is the simultaneous change in pH, due to conversion of CO₂ to bicarbonate via the carbonic anhydrase reaction. Nevertheless, CO₂ also exerts a specific effect on Hb-O₂ affinity at constant pH¹³. 2,3-BPG levels are increased in maternal blood providing good oxygen release, while fetal blood shows high oxygen affinity to fetal haemoglobin that is less susceptible to 2,3-BPG^{14,15}.

An increase in p50 (lowered Hb-O₂ affinity) would benefit tissues insufficiently supplied with oxygen. While pH, pCO₂ and body temperature are tightly regulated, the level of 2,3-BPG might be a useful target. 2,3-BPG is synthesized by Bisphosphoglycerate mutase (BPGM), as described by the Rapoport-Luebering glycolytic shunt^{16,17}. Acidosis inhibits and alkalosis promotes BPGM activity, as observed in respiratory alkalosis at high altitude or lactic acidosis during exercise^{18–21}. Elevation of BPGM activity at high altitude has been further linked to Sphingosine-1-phosphate levels²² and A2B adenosine receptor that mediates phosphorylation of BPGM via the AMP-activated protein kinase²³. Moreover, a long-term effect of endurance exercise by increasing 2,3-BPG has been reported²⁴.

To estimate the impact of Hb-O₂ affinity on tissue oxygenation and its putative clinical application, it is essential to know the maximum physiological range and individual diversity. This study was designed to address three questions: (i) Is Hb-O₂ affinity tightly regulated or exists a rather broad diversity in humans at rest that might contribute to individual differences in tissue oxygenation? (ii) Does endurance exercise cause improved cellular oxygen availability by lowering Hb-O₂ affinity? (iii) Does estimated p50 values from blood gas analysis provide good estimates of Hb-O₂ affinity? To address these questions, we tested 60 volunteers of both sexes who were either endurance trained or untrained. ODCs were obtained under isocapnic conditions for all participants and VO₂max test served to define the maximum physiological range of Hb-O₂ affinity. Strikingly, we observed a marked diversity in Hb-O₂ affinity that is mainly attributed to sexes and correlates with 2,3-BPG levels and BPGM expression.

Results

Definition of cohorts. As the selection of untrained versus trained groups based on by self-reports, we determined maximal oxygen consumption rate (VO₂max) as the standard index for fitness level (Fig. 1a–c). We found significantly elevated VO₂max level in trained versus untrained women (52.47 ± 10.11 vs. 44.13 ± 10.69 mL O₂/min/kg BW) and men (60.57 ± 11.49 vs. 51.4 ± 12.06 mL O₂/min/kg BW). Measurements of haemoglobin revealed no differences by fitness level (Fig. 1d), while woman had significantly lower Hb levels compared to men (14.37 ± 0.83 vs. 16.37 ± 0.97 g/dl).

Selected groups showed no significant differences by age, with an average age of 27 years (Supplementary Figure S1a). BMI was slightly lower in women compared to men (22.34 ± 2.22 vs. 23.83 ± 2.42 kg/m²), while no differences were found between untrained and trained groups (Supplementary Figure S1b). Muscle mass was higher in trained versus untrained women (44.47 ± 2.57% vs. 39.75 ± 3.35%) with higher body fat in untrained women (19.75 ± 4.58% vs. 27.15 ± 6.01%) (Supplementary Figure S1c, d). Men, however, showed no significant differences between trained and untrained groups in this regard (Supplementary Figure S1c, d). Muscle tissue percentage was lower (42.11 ± 3.79% vs. 48.02 ± 3.76%) and body fat content was higher (23.45 ± 6.46 vs. 15.37 ± 6.32 kg) in female subjects.

Taken together, cohorts indicated group specificity by elevated VO₂max values because of endurance exercise. Differences in muscle mass, body fat and haemoglobin concentration were as expected regarding fitness level and sexes.

Estimated (capillary) and calculated (venous) p50 values from blood gas analysis. Blood gas analysis may provide estimated p50_c (capillary) and calculated p50_v (venous) values from a single blood sample. Capillary blood samples typically reflect the arterial blood gas composition^{25,26} and, thus, estimate p50_c from samples of high pO₂ and oxygen saturation of >95% in healthy subjects. Venous blood samples show a much greater variation that may depend on haemodynamic and/ or metabolic effects. However, typical venous sO₂ values lie between 55 and 75%.

Capillary blood indicated no difference in p50_c (mean p50_c of all participants: 25.75 ± 0.72 mmHg) (Fig. 2a). Values ranged between 25.08 mmHg (lowest p50_c) and 26.94 mmHg (highest p50_c). Capillary pH was identical in all groups (pH: 7.41 ± 0.02) as indicated by H⁺-concentration (Fig. 2b). Notably, pCO₂ was significantly lower in women (36.42 ± 2.65 mmHg) than men (38.81 ± 2.67 mmHg) (Fig. 2c) that is associated with lower standard bicarbonate (Fig. 2d), causing similar pH levels in women and men. However, under conditions of similar pH and lower pCO₂, a higher Hb-O₂ affinity in women would have been expected but was not observed. Interestingly, estimated p50_c is correlated with pCO₂ in men, but not in women (Fig. 2e), raising the question of a sex related miss-estimation. In both sexes, however, estimated p50_c indicated an inverse correlation with pH (Fig. 2f).

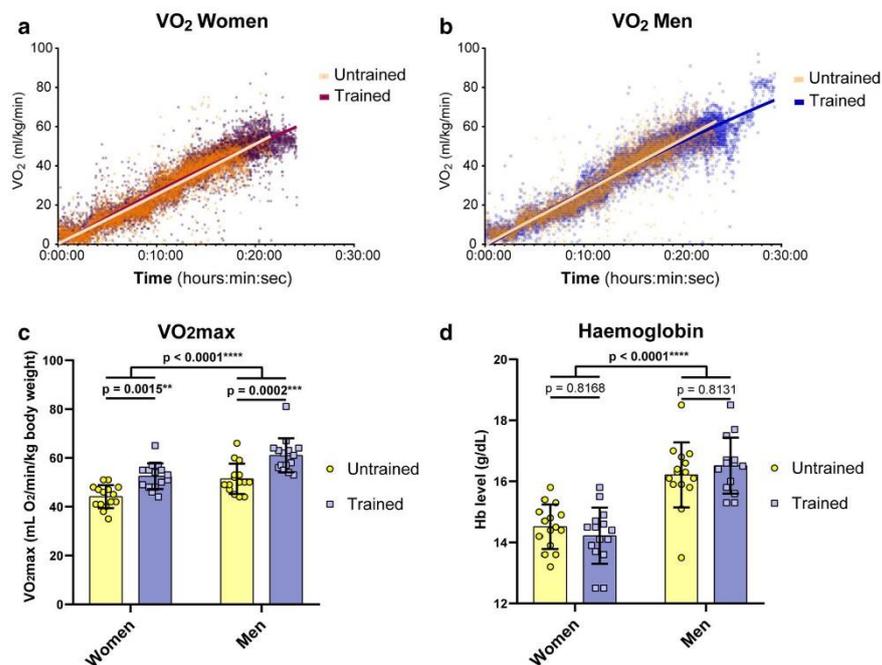


Figure 1. Baseline parameters. 60 volunteers of both sexes and either endurance trained or untrained. (a, b) VO_2 values revealed elevated levels in trained groups of women (a) and men (b). (c) Statistics for $\text{VO}_{2\max}$ values comparing either trained versus untrained groups and women versus men. (d) Haemoglobin levels by blood gas analysis of capillary probes. $N=15$ per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted p values are indicated.

Venous blood samples showed no difference in calculated $p50_c$ values by fitness level, while indicating a significantly higher Hb- O_2 affinity in men compared to women ($p50_c$: women = 28.9 ± 1.25 mmHg vs. men = 27.97 ± 1.54 mmHg) (Fig. 3a). Values ranged between 24.87 mmHg (lowest $p50_c$) and 31.8 mmHg (highest $p50_c$). Venous pH values were comparable in all groups (7.35 ± 0.03 ; values were calculated by means of H^+ -levels) (Fig. 3b). Notably, as observed in capillary blood samples, venous $p\text{CO}_2$ and standard bicarbonate were significantly higher in men versus women ($p\text{CO}_2$ women: 47.71 ± 4.56 mmHg vs. men: 51.18 ± 5.63 mmHg; HCO_3^- women: 23.3 ± 1.28 mmol/L vs. men: 24.05 ± 1.02 mmol/L) (Fig. 3c,d). Still, higher $p\text{CO}_2$ should be associated with lower Hb- O_2 affinity. Therefore, the controversy of higher $p\text{CO}_2$ level and lower $p50_c$ values in men versus women remains open. Nevertheless, venous blood samples showed significant correlations of $p50_c$ with $p\text{CO}_2$ as well as pH for both sexes, while men showed a greater distribution in $p50_c$ (Fig. 3e,f).

Taken together, no alteration of oxygen affinity to haemoglobin due to endurance exercise has been observed, neither in estimated (capillary), nor calculated (venous) $p50_{e/c}$ values. Men showed higher bicarbonate levels that are associated with higher $p\text{CO}_2$ level to maintain a pH similar to women. Notably, between sexes, higher $p\text{CO}_2$ in men should cause lower Hb- O_2 affinity, which is not observed. In contrast, calculated $p50_c$ values indicated a significantly higher Hb- O_2 affinity in men compared to women.

A sex difference in oxygen affinity to haemoglobin. To clarify the issue of $p50$ prediction, we recorded oxyhaemoglobin dissociation curves (ODC). After equilibration of venous blood, the pH during determination of ODCs was identical in all groups (7.42 ± 0.02), as well as the $p\text{CO}_2$ (35.25 ± 0.7 mmHg) (Supplementary Figure S2a, b). Of note, the standard $p\text{CO}_2$ is 40 mmHg for arterial blood and, thus, higher as in our experimental setting, resulting in slightly lower $p50$ values compared to the literature.

To define the Hb- O_2 affinity regarding fitness level and/or sexes, we determined $p75$, $p50$, and $p25$ values (Fig. 4). All data sets from single ODCs per group were combined. Resulting ODCs fit to the Hill slope as indicated by R^2 values of above 0.99 in each group (Fig. 4a–d). In line with venous $p50_c$ values, we found no alteration of Hb- O_2 affinity due to endurance exercise (Fig. 4e). Nevertheless, women showed a significantly lower Hb- O_2 affinity compared to men, as indicated by higher $p50$ values (Fig. 4e). Values ranged in a difference of 6.11 mmHg (highest to lowest $p50$) (Figs. 4e, 5b). After combining the data of untrained and trained participants and calculating the mean \pm SD for women and men, we found $p75$ values of 37.61 ± 1.19 mmHg (women) versus

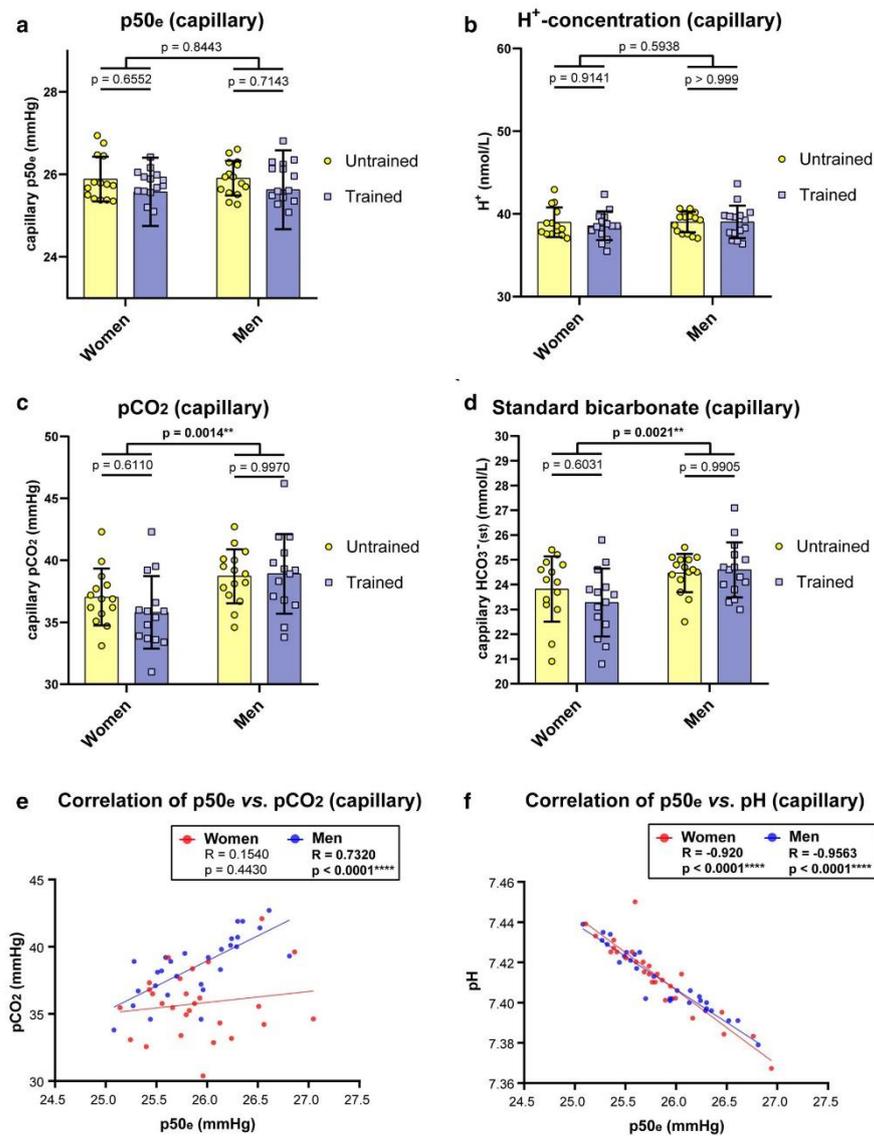


Figure 2. Capillary blood gas analysis. Estimated p50_e values (a), H⁺-level (b), pCO₂ (c) and Standard bicarbonate (d) values were obtained from trained versus untrained women and men. Estimated p50_e values from capillary probes were correlated with pCO₂ (e) and pH (f), both known determinants that affect O₂-affinity to haemoglobin. N = 15 per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted p values are indicated (a–d). In correlation analysis, the Pearson correlation coefficient R is indicated. Two tailed test with confidence interval 95% served to test for significance (e, f).

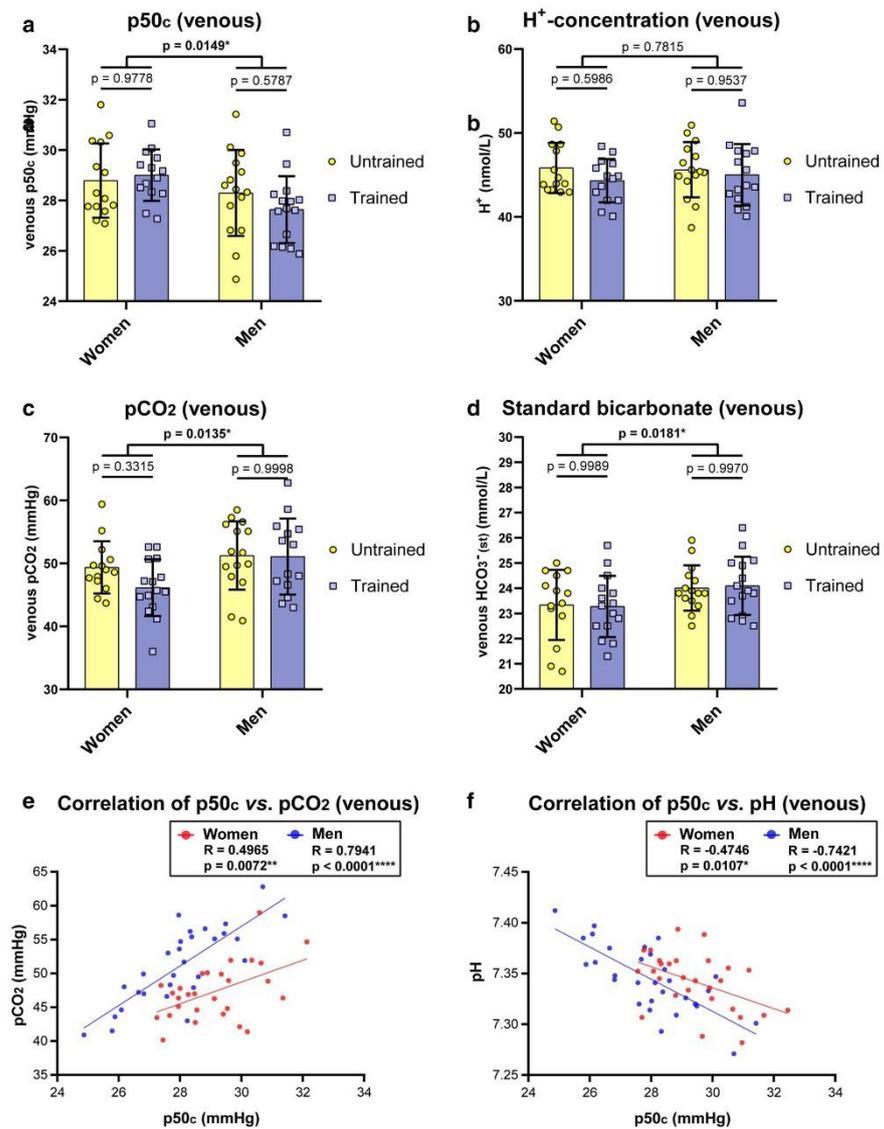


Figure 3. Venous blood gas analysis. Calculated p50_c values (a), H⁺-level (b), pCO₂ (c) and Standard bicarbonate (d) values were obtained from trained versus untrained women and men. Calculated p50_c values from venous probes were correlated with pCO₂ (e) and pH (f). N = 15 per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted p values are indicated (a–d). In correlation analysis, the Pearson correlation coefficient R is indicated. Two tailed test with confidence interval 95% served to test for significance (e, f).

36.07 ± 1.14 mmHg (men), p50 values of 25.09 ± 0.97 mmHg (women) versus 23.7 ± 0.9 mmHg (men) and p25 values of 15.76 ± 0.7 mmHg (women) versus 14.86 ± 0.63 mmHg (men). Thus, the mean difference of sexes observed is 1.54 mmHg (p75), 1.39 mmHg (p50), and 0.89 mmHg (p25). When comparing the differences of p75, p50 and p25 values, it is obvious that the slope of ODC is lower when shifting to the right, thus, the slope of ODC is steeper in men compared to women (Fig. 4f).

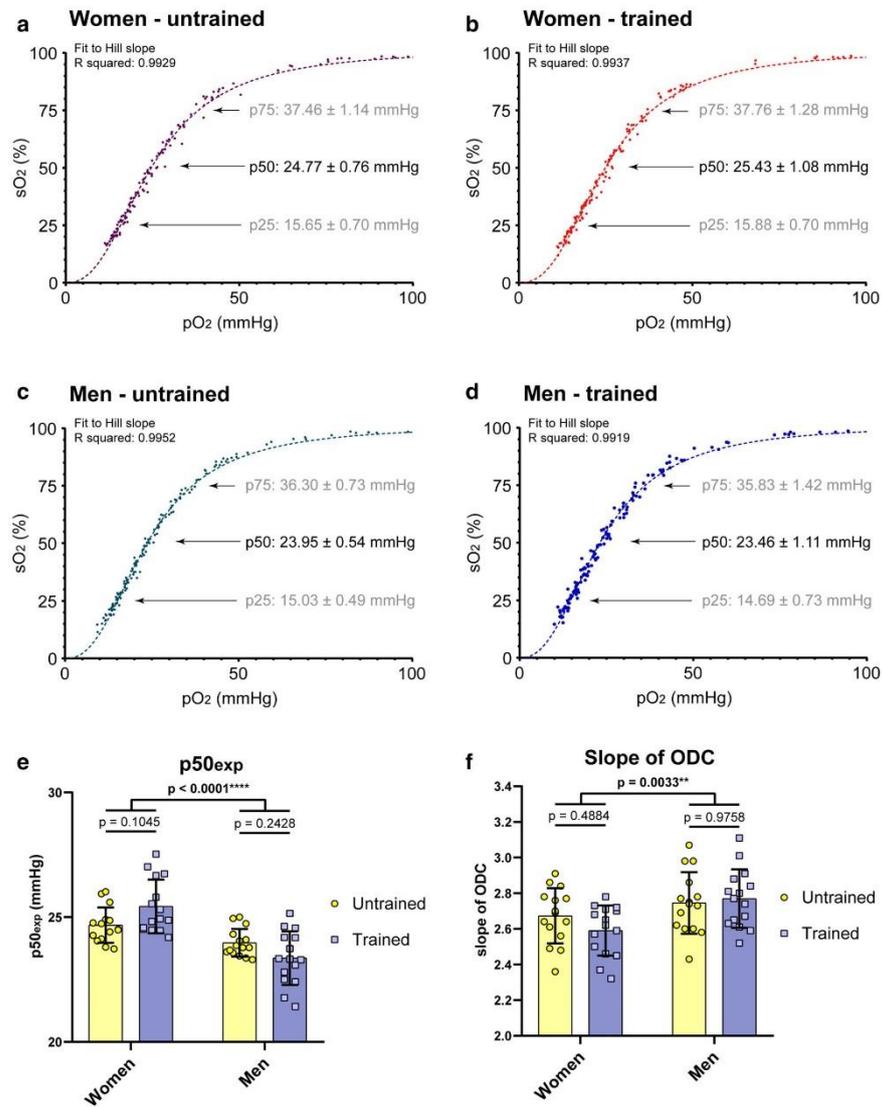


Figure 4. Oxyhaemoglobin dissociation curves (ODC) for trained versus untrained women and men. ODCs of women and men that were either trained or untrained were recorded from venous blood samples and plotted using the “specific binding with Hill slope” model. Data fit to the Hill slope algorithm as shown by R squared values. ODCs shown, depict of 136 (a), 149 (b), 173 (c) and 151 (d) data points resulting from 15 single ODCs per group. Oxygen affinity to haemoglobin is indicated by p50 as well as p75 and p25 values. (e) Statistics for p50 values indicate no alteration in oxygen affinity to haemoglobin by fitness levels; however, Hb-O₂ affinity is lower in women than men. (f) The Hill slope declines when ODC shifts to the right. The higher affinity of oxygen to haemoglobin (lower p50) in men results in a more precipitous slope. (e, f) N = 15 per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted *p* values are indicated.

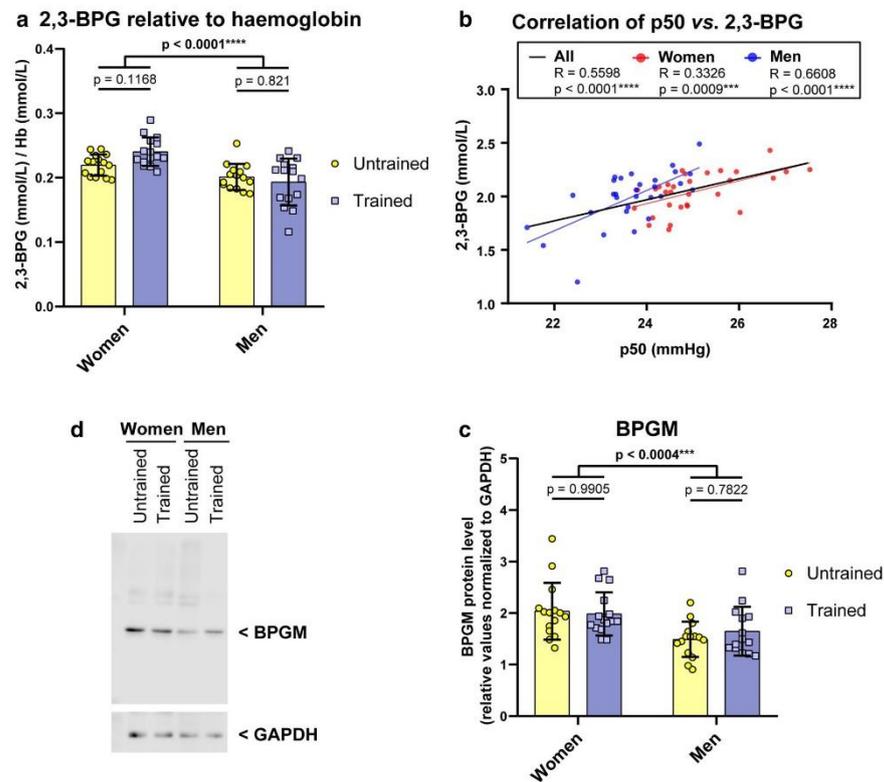


Figure 5. Lower Hb-O₂ affinity in women compared to men is explained by 2,3-BPG. (a) 2,3-BPG levels were normalised to haemoglobin levels, a significant difference was found between sexes, but not fitness levels. (b) Correlation of 2,3-BPG level and p50 values revealed significance for women and men as well. The Pearson correlation coefficient R is indicated. Two tailed test with confidence interval 95% served to test for significance. (c) Representative Western blot of pooled blood probes to visualise BPGM level. Values were normalised to GAPDH, a glycolytic enzyme that is well expressed in erythrocytes. (d) Statistics of BPGM protein level. A and D: N=15 per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted *p* values are indicated.

3-BPG determines p50 of sexes. As pCO₂ and temperature were standardised and pH showed no difference between groups, we suggested 2,3-Bisphosphoglycerate (2,3-BPG, alias 2,3-DPG) to be responsible for the sex dependent difference in oxygen affinity to haemoglobin. We found significantly higher 2,3-BPG levels in women compared to men (Fig. 5a), with no differences by fitness level. 2,3-BPG correlated strongly with corresponding p50 values (Fig. 5b), which also holds true when correlating values of women and men separately.

Differences in 2,3-BPG level might either result from differences in BPGM expression level or BPGM activity. As the only known effector of BPGM activity is blood proton (H⁺) level (low pH is blocking BPGM activity)^{19,21}, and pH values were similar in our groups, we determined BPGM protein level (Fig. 5c,d). The measurements revealed that lower 2,3-BPG level is, indeed, associated with lower BPGM expression in men compared to women.

No limitation of cellular oxygen availability in men during exercise. The observed range of individual p50 values per se, warranted further investigation to estimate its impact. Thus, we recorded ODCs after VO₂max test and focussed on the sex difference. ODCs are presented for women and men before versus after exercise (Fig. 6a,b) as well as women versus men before and after exercise (Fig. 6c,d). The maximum right shift of ODC under physiological conditions is indicated for women (Fig. 6a) and men (Fig. 6b). It is important to note that the right shift of ODC after exercise (shown in Fig. 6a,b) is solely attributed to the alteration of pH, as the pCO₂ and temperature were kept stable.

Before exercise, women showed a mean p50 of 25.09 ± 0.96 mmHg and after VO₂max test of 30 ± 2.54 mmHg, indicating an ODC right shift at p50 of 4.91 mmHg on average (Fig. 7a).

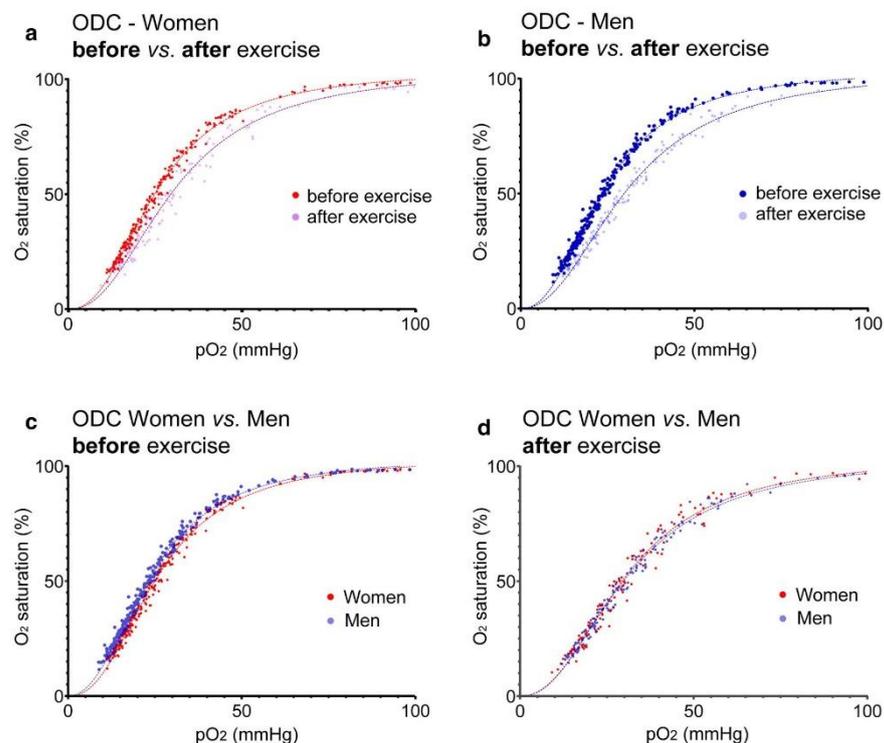


Figure 6. Oxyhaemoglobin dissociation curves (ODC) in women versus men before versus after VO_2 max test. Individual venous blood samples were used to monitor the ODCs by tonometry under isocapnic conditions at 37 °C. Measurements were performed after arterialisation of blood using carbogen gas (95% O_2 , 5% CO_2) followed by deoxygenation (95% N_2 , 5% CO_2) up to a blood oxygen saturation of lower than 20%. $N=30$ women and 30 men before exercise; $N=15$ women and 15 men after exercise.

In men, we found a $p50$ of 23.7 ± 0.9 mmHg at rest and a mean $p50$ of 30.26 ± 1.58 mmHg following VO_2 max test, indicating a right shift of ODC at $p50$ of 6.56 mmHg on average that is greater compared to women. The sex dependent $\Delta p50$ on average was 1.39 mmHg. No difference has been observed between women and men after the VO_2 max test (Fig. 7a). Thus, the greater right shift observed in men fully compensates for the higher affinity of oxygen to haemoglobin at rest and results from lower pH.

While alterations of ODCs before and after exercise were attributed to the pH only, blood gas analysis indicated that in vivo the alteration of Hb- O_2 affinity following VO_2 max test is influenced by more factors. Although both sexes showed increased body temperature after exercise, body temperature in men was much more elevated (Fig. 7b), which also contributes to lower Hb- O_2 affinity. Further, H^+ -level in men increased to a significantly higher level (causing lower pH) compared to women (Fig. 7c) that is attributed to a more pronounced lactate production in men (Fig. 7d). The blood pCO_2 after exercise showed no difference (Fig. 7e). Interestingly, bicarbonate level strongly decreased during exercise (Fig. 7f), indicating the importance of the metabolic bicarbonate pool to buffer protons. Moreover, while bicarbonate level in men was higher compared to women at rest, after VO_2 max test, metabolic bicarbonate pool was lower in men (Fig. 7f).

Venous but not capillary $p50$ estimates provide a good prediction of Hb- O_2 affinity. As $p50$ values derived from ODCs by tonometry need special equipment for measurements, it is crucial to know whether estimates from blood gas analysis provide sufficient information. We therefore correlated estimated (capillary) and calculated (venous) $p50_{v/c}$ values with $p50$ values measured by tonometry (Fig. 8). We found no correlation, in neither women nor men, when correlating capillary blood samples, while venous probes indicated a good correlation.

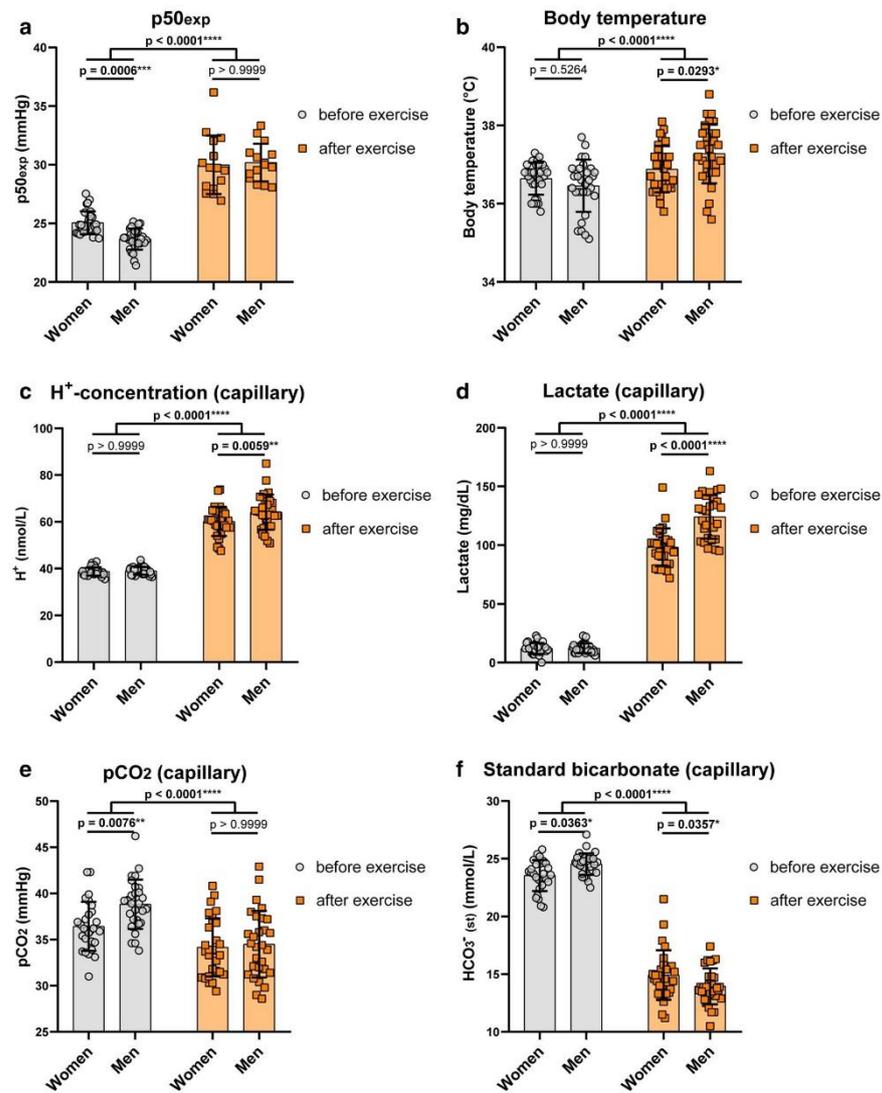


Figure 7. Experimental p50 and effectors of Hb-O₂ affinity before and after exercise in women and men. (a) Oxygen affinity to haemoglobin is lowered during exercise to ensure that oxygen demand corresponds to cellular availability. Hb-O₂ affinity is higher in men versus women at rest; however, after exercising this difference is nullified. Note: ODCs were recorded at isocapnic conditions and 37 °C, thus, p50 values are only attributed to pH in this setting. (b) Body temperature elevates during exercise, while men reached higher levels. (c, d) In vivo, at rest, capillary blood pH (c, as indicated by H⁺-level) and lactate level (d) were similar in both sexes. After VO₂max test, men showed higher proton level (lower pH) that is explained by a stronger increase in lactate. (e, f) Capillary pCO₂ (e) and standard bicarbonate (f) before and after exercise in women and men. (a) N = 30 for women and men before exercise; N = 15 after exercise. (b–f) N = 30 per group. Two-way ANOVA with post hoc Bonferroni test served to test for significance. Adjusted *p* values are indicated.

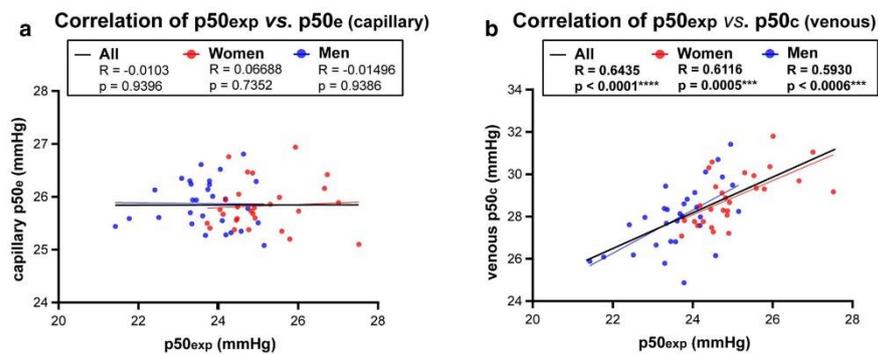


Figure 8. Correlation of experimental p50 (p50exp) values with predicted p50e/c values from blood gas analysis. (a, b) Correlation of p50 values as shown in Fig. 4 with estimated p50e values derived from capillary blood samples (a) and calculated p50c values from venous blood samples (b). The Pearson correlation coefficient R is indicated. Two tailed test with confidence interval 95% served to test for significance.

Discussion

Oxygen affinity to haemoglobin, as indicated by the p50 value, may be the most underestimated blood parameter in clinical practice. Moreover, potential influences of medication on cellular oxygen availability remains largely unknown. For instance, it has been shown that contrast media cause increased Hb-O₂ affinity at normal pH and attenuated the Bohr effect in response to reduced pH^{27,28}. This might be true for other compounds that interact with red blood cell membranes. Patients with high Hb-O₂ affinity and/or reduced oxygen delivering capacity (anemia, hypoxemia) might therefore be at higher risk for tissue hypoxia, also during clinical treatments. By testing a group of 60 young, healthy volunteers, we show a marked diversity in baseline Hb-O₂ affinity that is relevant for individual cellular oxygen availability.

One reason that Hb-O₂ affinity is often neglected, might be that to accurately determine the p50, the ODC or its log-scale counterpart, a Hill plot, must be constructed⁵. P50 estimations from single blood samples have been shown to be misleading, especially at high oxygen saturation, which has been attributed to changes in shape of the ODC²⁹. In our study, estimated p50_e values from capillary blood as well as calculated p50_c values from mixed venous blood were to be interpreted differently. By measuring ODCs and subsequent correlation analysis, it turned out that capillary p50_e values provide an insufficient prediction. We found a poor estimate for women and men as well. Of note, when correlating capillary p50_e values with capillary pCO₂ values, a significant correlation was observed only for men but not women. In contrast, when correlating capillary p50_e values with capillary pH values, a very strong correlation was observed for both sexes. Thus, our data suggest that the estimation of p50_e is mainly based on blood pH, albeit the used Siggaard-Andersen Oxygen Status Algorithm^{30,31} includes the relevant parameters crucial for the estimation of ODC. We assume that if sO₂ is above 97%, which corresponds to the upper flat part of ODC, the alteration of factors influencing the relationship between pO₂ and sO₂ will have only modest impact on the corresponding alteration of sO₂. Thus, calculation of p50 from blood samples having an oxygen saturation of > 97% are likely to represent inaccurate estimates and, according to our data, cannot be recommended. In line with earlier assumptions²⁹, we suppose that individual differences in the ODC shape are responsible for poor predictions of capillary probes.

In contrast, when correlating p50 values from ODCs with calculated p50_c values of venous blood samples, we found a significant correlation. Although individual values may differ, venous blood samples, thus, allow a much better prediction. These findings are in line with data using a Hemox-Analyzer, showing that estimates of p50 values based on venous blood gas analysis have a low bias compared to tonometry³². It has to be noted that these authors stated that despite a negligible bias, the precision of calculated venous p50 values was not sufficiently high to allow their use as substitutes for p50 values measured by tonometry in the clinical evaluation of polycythemia in individual patients³².

To address the issue of physiological differences in Hb-O₂ affinity per se, we tested 60 volunteers that were either endurance exercise trained or not and of both sexes. Venous blood samples of all participants indicated p50_e values of 28.4 ± 1.47 mmHg (at pH: 7.35 ± 0.03 and pCO₂: 49.35 ± 5.37 mmHg). Values derived from individual ODCs indicated a p50 of 24.4 ± 1.17 mmHg (at pH: 7.43 ± 0.02; pCO₂: 35.25 ± 0.7 mmHg; 37 °C). Standard deviation of p50 in both cases was slightly above 1 mmHg. However, when comparing lowest and highest measurements, we found a difference of Δp50_e: 6.93 mmHg (calculated values from blood gas analysis; lowest p50_e: 24.87 mmHg, highest p50_e: 31.8 mmHg), which is supported by ODC derived values of Δp50: 6.11 mmHg. Thus, even in a cohort of young, healthy volunteers we found a marked diversity in Hb-O₂ affinity.

We expected diversity in baseline p50 mainly attributable to fitness levels. In earlier reports, the right shift of ODC in athletes at rest has been attributed to higher 2,3-BPG level^{33–36}. However, in line with other studies^{12,37}, we found no influence of endurance exercise on Hb-O₂ affinity.

Instead, sex differences mainly accounted for p50 diversity. In male blood, higher Hb-O₂ affinity correlated with lower 2,3-BPG level and BPGM expression. In our study, the Δp50 of sexes was 1.39 mmHg. Earlier studies

reported similar results^{38,39}. This sex difference has been shown to exist only during sexual maturity, but not during pre-puberty or post-maturity⁴⁰. Consequently, sex hormones have been postulated to influence 2,3-BPG synthesis and p50. However, only a weak or even no correlation has been found between testosterone/ estrogen and p50^{40–42}. Our data add to observations of sex dependent differences in muscle fiber-type composition^{43,44}, muscle myoglobin^{45,46} and the microcirculation⁴⁷, all of which participate in cellular oxygen availability and utilization.

Another significant sex difference has been observed in blood pCO₂, a further modulator of Hb-O₂ affinity. Men showed higher capillary as well as venous pCO₂ level than women. However, due to adequate higher bicarbonate levels, the pH was similar in all groups tested. Similar results have been reported for arterial pCO₂, were a significant effect of sex was seen, with lower values for women (36.3 ± 2.9 mmHg) than men (41.0 ± 2.9 mmHg)¹⁸.

High bicarbonate level in men provide a better buffer capacity of the blood during exercise, allowing to compensate the greater lactate production. In addition, a higher haemoglobin concentration in men can bind more hydrogen ions. Moreover, higher haemoglobin level in men might be crucial to compensate the high Hb-O₂ affinity, thus, low oxygen release to the tissue. We assume that cellular oxygen availability is similar in women and men at rest, due to a final balance in oxygen carrying capacity of the blood (Hb level) and the ability to release oxygen to the tissue (p50). Our data, thus, contribute to recent reports showing a correlation of Hb level and Hb-O₂ affinity^{49,50}.

Individual properties of Hb-O₂ affinity are associated with an alteration of steepness of ODC. The slope of ODC represents one crucial feature of oxygen uptake (lung) and release (tissue). Our data show that a right shift of ODC is associated with lower slope of ODC. This has been observed following exercise mediated acidosis (increased hydrogen ions, Bohr-effect), as well as elevated 2,3-BPG levels (women vs. men at rest). When comparing p75, p50 and p25 values, the difference is always most pronounced in p75 and more modest in p25. This suggests that the steepness may have a stronger effect on oxygen uptake, while oxygen delivery is, relatively, less affected. It would be of interest to find p50 modifiers that cause a steeply sloping of ODC, as it would cause both, good O₂-uptake as well as delivery.

When comparing the alteration in p50 due to maximum physiological exercise (VO₂max test), we found a mean ODC right shift at p50 of 4.91 mmHg in women and of 6.56 mmHg in men. The strongest increase in p50 of all women was 10.37 mmHg (trained woman). The maximum p50 increase in men was 8.6 mmHg (untrained man). The alteration of p50 at maximum activity level may be seen as physiological tolerance, which is preserved only for minutes, when ATP demand exceeds its production by oxidative phosphorylation. Notably, the physiological difference in p50 (Δ p50 at rest: approx. 6–7 mmHg), thus, lies only slightly below the range of maximum physiological tolerance (Δ p50 between rest and VO₂max: 8–10 mmHg). Individual baseline Hb-O₂ affinity, therefore, is of huge importance. At rest, 2,3-BPG determinates the baseline p50 in healthy subjects, because of its strong correlation and the finding that pCO₂ levels were in contrast to the observed Hb-O₂ affinity. Thus, it is crucial and of clinical importance to understand the regulation of BPGM activity and expression.

Finally, it has to be noted that although oxygen release is crucial for cellular oxygen availability, elevated Hb-O₂ affinity was shown to protect from hypoxia too. Some examples are 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) and GBT1118 (a structural analog of GBT440) that represent allosteric effectors increasing Hb-O₂ affinity and being beneficial in hypoxia^{51–53}. This obvious paradox might be explained by the alteration of ODC slope in response to increased or decreased Hb-O₂ affinity. As we have shown, the slope of ODC differs at rest, due to sex dependent differences in 2,3-BPG levels and during maximum exercise, due to changes in the blood pH. A left or right shift of ODC is most pronounced in the p75 and less in the p25 values. Therefore, with increasing Hb-O₂ affinity, oxygen uptake is enhanced much stronger than oxygen release is impaired and, thus, elevated oxygen carrying capacity of the blood may fully compensate the high Hb-O₂ affinity. Supporting, the beneficial effect of modifiers enhancing Hb-O₂ affinity, were described in models of hypoxemia resulting from impaired oxygen uptake. We propose that oxygen transport capacity (Hb) and release (p50) are tightly balanced to ensure sufficient cellular oxygen availability. This is supported by findings that haemoglobin variants with high O₂ affinity or mutations in the BPGM gene are clinically asymptomatic if the influence is mild, however, are associated with erythrocytosis at severe level^{54–57}.

High Hb level causes increased blood viscosity and represents a risk factor for stroke and cardiovascular diseases. High Hb-O₂ affinity is associated with elevated Hb level, as observed in women and men. Future studies are needed to better understand critical aspects of alterations of p50 at rest with the potential of more personalized medicine.

Methods

Recruitment of volunteers. Sixty healthy volunteers were recruited through online and in-print advertisements briefly outlining the study. Inclusion criteria were age (18 to 40 years), body mass index (18.5 to 25 kg/m²) and either being endurance trained (3 times per week for a minimum of 1 h per session since for at least one year) or untrained (no or only occasional sports activity). Upon volunteering for inclusion, potential participants received further detailed information with the option to ask questions, and reasonable time to decide whether to participate in the study. All volunteers gave their informed written consent. With the exception of 8 women using oral contraceptives and two women using iron preparation, the participants consumed no further drugs or nutritional supplements. The study was approved by the Charité Ethics Committee (EA1/154/18). All procedures and measurements complied with the Declaration of Helsinki (54th Revision 2008, Korea) regarding human subjects. Finally, four groups were selected by sex and exercise level (women trained, women untrained, men trained, men untrained), with N = 15 per group. Tests were performed in mixed order.

Body composition. Body muscle- and fat mass were measured through multi-frequency bioimpedance analysis (Inbody 770, InBody Deutschland, Eschborn, Germany)⁵⁸.

VO₂max test. Maximal oxygen consumption (VO₂max) was determined on a calibrated motorized treadmill (H/P/Cosmos, Pulsar, Nussdorf-Traunstein, Germany) using an enhanced version of the Bruce protocol graded exercise test until each subject's volitional fatigue⁵⁹. The protocol was chosen as a performance test to be tolerated by the untrained participants of the study⁶⁰. However, in order to further quantify the higher performance from the well-trained subjects, two more stages were added (Supplementary Table S1).

Oxygen consumption and carbon dioxide production were continuously measured from expired air using a breath-by-breath gas analysis system (Metalyzer 3B, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany) connected to a computer for data-collection (Metasoft 3, version 3.9.9 SR1, Cortex Biophysik GmbH, Leipzig, Germany). The gas analysis system was calibrated using ambient air and verified gas concentrations of oxygen and carbon dioxide. The volume measurement system was calibrated using a 3-L Hans Rudolph calibration syringe (Cranlea Medical, Birmingham, UK). Heart rate was continuously recorded using a heart rate transmitter (Polar Electro Oy, Kempele, Finland) connected to the system. Subjects rated their perceived exertion (RPE) after 1 min into each stage according to the RPE-scale by Borg⁶¹. Upon reaching their individual maximum effort, subjects were verbally encouraged to continue the test for as long as possible⁶². All tests took place in the same air-conditioned laboratory under standardized conditions (19–22 °C ambient temperature, 99–102 kPa air pressure, 40–50% relative humidity) and were performed between 09 a.m. to 12 p.m. to avoid possible circadian influence on the test⁶³. Subjects were advised to abstain from sleep deprivation the previous night as well as alcohol and drug consumption (except for oral contraceptives for the female subjects) and from caffeine consumption the morning of the test. During the test, all subjects wore light sportswear (T-shirt, sweatpants), the measurement equipment (mask, HR-transmitter), as well as a harness-system to prevent injury from falling. Immediately after cessation of the test, subjects walked to an adjacent room (distance 10 m) for blood-collection.

Blood parameters. Upon arrival at the lab, subjects voided their bladder, had capsaicin-containing salve (Finalgon, Sanofi-Aventis, Frankfurt / Main, Germany) applied to their earlobe to increase local blood-flow for capillary blood collection⁶⁴ and rested for 15 to 30 min. Capillary blood from the earlobe (approx. 100 µl) was then taken in a sitting position using a contact-activated lancet (BD Microtainer Blue, Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and venous blood (approx. 7 ml) was taken from the cubital vein using a 21-gauge Sarstedt-Multifly canula (Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany). These blood collections were repeated immediately after the performance test. Capillary and venous blood samples were tested immediately using a Blood gas analyser (Radiometer ABL800 flex).

Tonometry. Blood samples were arterialised via tonometry using humidified carbogen gas (95% O₂, 5% CO₂) at 37 °C, gently shaking. Deoxygenation was performed under identical conditions using a gas mixture of 95% N₂, 5% CO₂, 5% carbon dioxide corresponds to 38 mmHg pCO₂ at sea level (760 mmHg), thus, represents the arterial pCO₂ at 37 °C. Oxygen pressure (pO₂) and blood oxygen saturation (sO₂) were measured over time during de-oxygenation at isocapnic conditions via Blood gas analyser (Radiometer ABL800 flex) until blood oxygen saturation fell below 20%.

Parameter calculation of oxyhaemoglobin dissociation curves (ODC). The slope was determined for all oxyhaemoglobin dissociation curves (ODC) using the linear range of the Hill equation (20–60% sO₂). Linear regression was performed according to the method of least squares and slope of the regression line was calculated. To determine p25, p50 and p75 values, polynomial regression for each ODC (20–85% sO₂) was performed by the multiple least squares method and values were calculated using the regression function.

2,3-BPG. Measurement of 2,3-BPG in venous blood samples was performed using the 2,3-Diphosphoglycerate Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, #10148334001) according to the manufacturer's instructions and a 96-well Synergy HTX Plate Reader (BioTek Instruments, Winooski, USA) at 340 nm.

Western blotting. To quantify BPGM protein level, full blood samples were lysed using a lysis buffer containing 50 mM Tris (pH 6, 8), 4 M urea, 1% SDS, and 12.5 mM DTT. Western blotting was performed as described previously⁶⁵. Briefly, proteins of blood lysates were separated by SDS-PAGE and transferred to Hybond-P membranes with BPGM protein being detected using a polyclonal rabbit anti-BPGM antibody (Novus Biologicals, Centennial, USA, #NBP1-86064). Following stripping with 0.2 mol/L NaOH, membranes were incubated with a polyclonal rabbit anti-GAPDH antibody (Acris Antibodies, Hiddenhausen, Germany, #BM439) to detect GAPDH protein as a loading control. Bound primary antibodies were visualized with horseradish peroxidase coupled secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, #sc-2030 and #sc-2031, respectively) and Western Bright Sirius substrate (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Germany) in an Intas ECL Chemostar Imager (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Germany).

Statistics. Statistical analysis was performed with the GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, USA). To determine statistical differences between groups, two-way analysis of variance (ANOVA) coupled with a Bonferroni multiple comparison post hoc analysis was used. For correlation analysis, the Pearson's correlation coefficient (R) was calculated and a two-tailed Student's t-tests was performed to test for statistical significance. *P* values below 0.05 were considered significant.

Data availability

For original data (including de-identified individual participant data), please contact michael.fahling@charite.de.

Received: 19 June 2020; Accepted: 17 September 2020

Published online: 09 October 2020

References

- Wang, Z. *et al.* Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure. *Am. J. Clin. Nutr.* **92**, 1369–1377. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.29885> (2010).
- Wolff, C. B. Normal cardiac output, oxygen delivery and oxygen extraction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **599**, 169–182. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71764-7_23 (2007).
- Douglas, S. W. & Adamson, J. W. The anemia of chronic disorders: studies of marrow regulation and iron metabolism. *Blood* **45**, 55–65 (1975).
- Lundsgaard, C. Studies of oxygen in the venous blood: V. Determinations on patients with anemia. *J. Exp. Med.* **30**, 147–158. <https://doi.org/10.1084/jem.30.2.147> (1919).
- Srinivasan, A. J., Morkane, C., Martin, D. S. & Welsby, I. J. Should modulation of p50 be a therapeutic target in the critically ill?. *Expert. Rev. Hematol.* **10**, 449–458. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1313699> (2017).
- Patel, M. P. *et al.* Development and validation of an oxygen dissociation assay, a screening platform for discovering, and characterizing hemoglobin-oxygen affinity modifiers. *Drug Des. Dev. Ther.* **12**, 1599–1607. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S157570> (2018).
- Safo, M. K., Ahmed, M. H., Ghatge, M. S. & Boyiri, T. Hemoglobin-ligand binding: understanding Hb function and allostery on atomic level. *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 797–809. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.02.013> (2011).
- Bohr, C., Hasselbalch, K. & Krogh, A. Ueber einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Skand. Arch. Physiol.* **16**, 402–412. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1904.tb01382.x> (1904).
- Perutz, M. F. Regulation of oxygen affinity of hemoglobin: influence of structure of the globin on the heme iron. *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 327–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001551> (1979).
- Brewer, G. J. 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. *Annu. Rev. Med.* **25**, 29–38. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.25.020174.000333> (1974).
- Severinghaus, J. W. Simple, accurate equations for human blood O₂ dissociation computations. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **46**, 599–602. <https://doi.org/10.1152/jappl.1979.46.3.599> (1979).
- Shappell, S. D. *et al.* Adaptation to exercise: role of hemoglobin affinity for oxygen and 2,3-diphosphoglycerate. *J. Appl. Physiol.* **30**, 827–832. <https://doi.org/10.1152/jappl.1971.30.6.827> (1971).
- Jensen, F. B. Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol. Scand.* **182**, 215–227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201X.2004.01361.x> (2004).
- Barcroft, J., Herkel, W. & Hill, S. The rate of blood flow and gaseous metabolism of the uterus during pregnancy. *J. Physiol.* **77**, 194–206. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1933.sp002963> (1933).
- Delivoria-Papadopoulos, M., Morrow, G. 3rd. & Oski, F. A. Exchange transfusion in the newborn infant with fresh and "old" blood: the role of storage on 2,3-diphosphoglycerate, hemoglobin-oxygen affinity, and oxygen release. *J. Pediatr.* **79**, 898–903. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(71\)80181-6](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(71)80181-6) (1971).
- Rapoport, I., Berger, H., Elsnér, R. & Rapoport, S. PH-dependent changes of 2,3-bisphosphoglycerate in human red cells during transitional and steady states in vitro. *Eur. J. Biochem.* **73**, 421–427. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11333.x> (1977).
- Benesch, R. & Benesch, R. E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **26**, 162–167. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(67\)90228-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(67)90228-8) (1967).
- Lenfant, C. *et al.* Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. *J. Clin. Invest.* **47**, 2652–2656. <https://doi.org/10.1172/JCI105948> (1968).
- Astrup, P., Rorth, M. & Thorshaug, C. Dependency on acid-base status of oxyhemoglobin dissociation and 2,3-diphosphoglycerate level in human erythrocytes. II. In vivo studies. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **26**, 47–52. <https://doi.org/10.3109/0036517009049213> (1970).
- Chiba, H. & Sasaki, R. Functions, of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **14**, 75–116. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-152814-0.50007-1> (1978).
- Mairbaurl, H. *et al.* Regulation of red cell 2,3-DPG and Hb-O₂-affinity during acute exercise. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **55**, 174–180. <https://doi.org/10.1007/bf00715001> (1986).
- Sun, K. *et al.* Sphingosine-1-phosphate promotes erythrocyte glycolysis and oxygen release for adaptation to high-altitude hypoxia. *Nat. Commun.* **7**, 12086. <https://doi.org/10.1038/ncomms12086> (2016).
- Liu, H. *et al.* Beneficial role of erythrocyte adenosine A2B receptor-mediated AMP-activated protein kinase activation in high-altitude hypoxia. *Circulation* **134**, 405–421. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021311> (2016).
- Mairbaurl, H. Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Front. Physiol.* **4**, 332. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00332> (2013).
- Zavorsky, G. S., Cao, J., Mayo, N. E., Gabbay, R. & Murias, J. M. Arterial versus capillary blood gases: a meta-analysis. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **155**, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.07.002> (2007).
- Ekkernkamp, E. *et al.* Spot check analysis of gas exchange: invasive versus noninvasive methods. *Respiration* **89**, 294–303. <https://doi.org/10.1159/000371769> (2015).
- Rosenthal, A., Litwin, S. B. & Laver, M. B. Effect of contrast media used in angiocardiology on hemoglobin-oxygen equilibrium. *Invest. Radiol.* **8**, 191–198. <https://doi.org/10.1097/0004424-197307000-00002> (1973).
- Kim, S. J. *et al.* Contrast media adversely affect oxyhemoglobin dissociation. *Anesth. Analg.* **71**, 73–76. <https://doi.org/10.1213/0000539-199007000-00013> (1990).
- Morgan, T. J., Endre, Z. H., Kanowski, D. M., Worthley, L. I. & Jones, R. D. Siggaard-Andersen algorithm-derived p50 parameters: perturbation by abnormal hemoglobin-oxygen affinity and acid-base disturbances. *J. Lab. Clin. Med.* **126**, 365–372 (1995).
- Siggaard-Andersen, O., Wimberley, P. D., Gothen, I. & Siggaard-Andersen, M. A mathematical model of the hemoglobin-oxygen dissociation curve of human blood and of the oxygen partial pressure as a function of temperature. *Clin. Chem.* **30**, 1646–1651 (1984).
- Siggaard-Andersen, O. & Siggaard-Andersen, M. The oxygen status algorithm: a computer program for calculating and displaying pH and blood gas data. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **203**, 29–45. <https://doi.org/10.3109/00365519009087489> (1990).
- Huber, F. L., Latshang, T. D., Goede, J. S. & Bloch, K. E. Does venous blood gas analysis provide accurate estimates of hemoglobin oxygen affinity?. *Ann. Hematol.* **92**, 517–521. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1667-z> (2013).
- Boning, D., Schwiegar, U., Tibes, U. & Hemmer, B. Influences of exercise and endurance training on the oxygen dissociation curve of blood under in vivo and in vitro conditions. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **34**, 1–10. <https://doi.org/10.1007/bf00999910> (1975).

34. Braumann, K. M., Boning, D. & Trost, F. Oxygen dissociation curves in trained and untrained subjects. *Eur. J Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **42**, 51–60. <https://doi.org/10.1007/bf00421104> (1979).
35. Schmidt, W., Maassen, N., Trost, F. & Boning, D. Training induced effects on blood volume, erythrocyte turnover and haemoglobin oxygen binding properties. *Eur. J Appl. Physiol. Occup. Physiol.* **57**, 490–498. <https://doi.org/10.1007/bf00417998> (1988).
36. Mairbaurl, H., Humpeler, E., Schwaberg, G. & Pessenhofer, H. Training-dependent changes of red cell density and erythrocytic oxygen transport. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **55**, 1403–1407. <https://doi.org/10.1152/jappl.1983.55.5.1403> (1983).
37. Pawlak, A. L. & Szydlowski, E. Increase in cooperativity of oxygen binding as a factor related to high maximal oxygen uptake during physical effort. *Biomed. Biochim. Acta* **49**, S323–326 (1990).
38. Arturson, G. & Robert, M. Oxygen affinity of whole blood in normal human subjects. *Acta Anaesthesiol. Scand. Suppl.* **45**, 22–25. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1971.tb00651.x> (1971).
39. Humpeler, E. & Amor, H. Sex differences in the oxygen affinity of hemoglobin. *Pflugers Arch.* **343**, 151–156. <https://doi.org/10.1007/bf00585710> (1973).
40. Humpeler, E., Vogel, S., Schobersberger, W. & Mairbaurl, H. Red cell oxygen transport in man in relation to gender and age. *Mech. Ageing Dev.* **47**, 229–239. [https://doi.org/10.1016/0047-6374\(89\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0047-6374(89)90035-3) (1989).
41. Bille-Brahe, N. E., Kehlet, H., Madsbad, S. & Rorth, M. Effects of androgens on oxygen affinity in vivo and 2,3-diphosphoglycerate content of red cells in peripheral arterial insufficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **36**, 801–804. <https://doi.org/10.3109/0036517609081940> (1976).
42. Bauer, K., Elger, W., Schneider, B., Krahl, E. & Bauer, R. Effect of estradiol sulfamate (ES-J995) on affinity of hemoglobin for oxygen, cardiovascular function and acid-base balance in ovariectomized rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* **53**, 301–307. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00330> (2003).
43. Haizlip, K. M., Harrison, B. C. & Leinwand, L. A. Sex-based differences in skeletal muscle kinetics and fiber-type composition. *Physiology (Bethesda)* **30**, 30–39. <https://doi.org/10.1152/physiol.00024.2014> (2015).
44. Lundsgaard, A. M. & Kiens, B. Gender differences in skeletal muscle substrate metabolism - molecular mechanisms and insulin sensitivity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **5**, 195. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00195> (2014).
45. Scow, R. O. & Roe, J. H. Jr. Effect of testosterone propionate on the weight and myoglobin content of striated muscles in gonadectomized guinea pigs. *Am. J. Physiol.* **173**, 22–28. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1953.173.1.22> (1953).
46. Oh, T. S. et al. Gender dimorphism in skeletal muscle proteome between lean and diet-induced obese rats. *Cell. Physiol. Biochem.* **28**, 981–996. <https://doi.org/10.1159/000335811> (2011).
47. Huxley, V. H. & Kemp, S. S. Sex-specific characteristics of the microcirculation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1065**, 307–328. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4_20 (2018).
48. Esposito, G., Van Horn, J. D., Weinberger, D. R. & Berman, K. F. Gender differences in cerebral blood flow as a function of cognitive state with PET. *J. Nucl. Med.* **37**, 559–564 (1996).
49. Yudin, J. & Verhovsek, M. How we diagnose and manage altered oxygen affinity hemoglobin variants. *Am. J. Hematol.* **94**, 597–603. <https://doi.org/10.1002/ajh.25425> (2019).
50. Shepherd, J. R. A. et al. Modelling the relationships between haemoglobin oxygen affinity and the oxygen cascade in humans. *J. Physiol.* **597**, 4193–4202. <https://doi.org/10.1113/jp277591> (2019).
51. Li, M. M. et al. The protective role of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) against acute hypobaric hypoxia. *Cell Stress Chaperones* **16**, 529–537. <https://doi.org/10.1007/s12192-011-0264-8> (2011).
52. He, Y. L. et al. Enhanced hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α stability induced by 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) contributes to protection against hypoxia. *Mol. Med.* **20**, 590–600. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00007> (2015).
53. Dufu, K. et al. GBT1118, a potent allosteric modifier of hemoglobin O₂ affinity, increases tolerance to severe hypoxia in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **313**, H1381–H1391. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00772.2016> (2017).
54. Rosa, R., Prehu, M. O., Beuzard, Y. & Rosa, J. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **62**, 907–915. <https://doi.org/10.1172/JCI109218> (1978).
55. Shin, S. Y., Bang, S. M. & Kim, H. J. A novel hemoglobin variant associated with congenital erythrocytosis: Hb Seoul [beta86(P2) Ala \rightarrow Thr] (HBB:c.259G>A). *Ann. Clin. Lab. Sci.* **46**, 312–314 (2016).
56. Lee, J. & Harrison, C. N. Hb Baden: a rare high affinity haemoglobin variant and its management. *J. Clin. Pathol.* **71**, 79–80. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204586> (2018).
57. Hoyer, J. D. et al. Erythrocytosis due to bisphosphoglycerate mutase deficiency with concurrent glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Am. J. Hematol.* **75**, 205–208. <https://doi.org/10.1002/ajh.20014> (2004).
58. Ling, C. H. et al. Accuracy of direct segmental multi-frequency bioimpedance analysis in the assessment of total body and segmental body composition in middle-aged adult population. *Clin. Nutr.* **30**, 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.04.001> (2011).
59. Bruce, R. A., Blackmon, J. R., Jones, J. W. & Strait, G. Exercising testing in adult normal subjects and cardiac patients. *Pediatrics* **32**, 742–756 (1963).
60. Sarma, S. & Levine, B. D. Beyond the Bruce protocol: advanced exercise testing for the sports cardiologist. *Cardiol. Clin.* **34**, 603–608. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.06.009> (2016).
61. Borg, G. A. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med. Sci. Sports Exerc.* **14**, 377–381 (1982).
62. Midgley, A. W., Marchant, D. C. & Levy, A. R. A call to action towards an evidence-based approach to using verbal encouragement during maximal exercise testing. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **38**, 547–553. <https://doi.org/10.1111/cpf.12454> (2018).
63. Atkinson, G. & Reilly, T. Circadian variation in sports performance. *Sports Med.* **21**, 292–312. <https://doi.org/10.2165/00007256-199621040-00005> (1996).
64. Stephens, D. P., Charkoudian, N., Benevento, J. M., Johnson, J. M. & Saumet, J. L. The influence of topical capsaicin on the local thermal control of skin blood flow in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **281**, R894–901. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.3.R894> (2001).
65. Fahling, M. et al. Translational control of collagen prolyl 4-hydroxylase- α (I) gene expression under hypoxia. *J. Biol. Chem.* **281**, 26089–26101. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604939200> (2006).

Acknowledgements

The authors thank Jeannette Schmidt for excellent technical assistance. P.B.P. and M.F. acknowledge financial support by German Research Foundation (SFB1365).

Author contributions

M.F., M.S. and M.A.M. contributed to study conception. B.B., M.S., J.L., M.A.M., P.N.B. and M.F. collected data and performed experiments. B.B., M.S., R.L., H.-C.G., P.B.P. and M.F. analyzed and interpreted data. B.B., M.S. and M.F. wrote the manuscript. All authors provided final approval of the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73560-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.F.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

10. Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Publikationsliste

Publikationen

BALCEREK, B., STEINACH, M., LICHTI, J., MAGGIONI, M. A., BECKER, P. N., LABES, R., GUNGA, H. C., PERSSON, P. B. & FAHLING, M. **2020. A broad diversity in oxygen affinity to haemoglobin. *Scientific Reports*, 10.**
Impactfactor: 4,011

Kongressbeiträge

LABES, R., BRINKMANN, L., MATHIA, S., **BALCEREK, B.**, KULOW, V.A., PERSSON, P.B. ROSENBERGER, C., FÄHLING, M. **2019.** Pharmacological HIF Activation in Cyclosporin-A Mediated Nephrotoxicity.: ***Acta Physiologica*.**

12. Danksagung

Für mein Promotionsverfahren habe ich Rückhalt und Unterstützung von Menschen erhalten, denen die Ausbildung junger Wissenschaftler am Herzen liegt und möchte mich für ihr Engagement zutiefst bedanken.

Allen voran danke ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Fähling, für all die Stunden, die er mit mir über diverse Themen und Problematiken diskutiert hat, um meinen Einblick in die Forschung zu vertiefen und die Unterstützung und Motivation, die er mir über die Jahre hat zukommen lassen. Mit viel Ausdauer und Esprit hat er mich auch durch die schwierigeren Phasen dieses Promotionsvorhabens sicher geleitet.

Des Weiteren geht ein großes Dankeschön an Jeannette Schmidt, Dr. Mumtaz Kasim, Dr. Edgar Benko und Robert Labes, die mich mit viel Geduld und Sorgfalt in sämtliche Labormethodik eingewiesen haben und mir bei meinen Versuchen immer helfend zur Seite standen.

Bei der Planung und Durchführung der Studie waren diverse Menschen beteiligt, denen mein Dank gilt, insbesondere Dr. Mathias Steinach und Dr. Martina Maggioni. Auch bei den vielen motivierten Probandinnen und Probanden bedanke ich mich für ihren großartigen Einsatz bis zur Belastungsgrenze.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie es mir ermöglicht haben, mich auf mein Studium und meine Promotion zu konzentrieren. Ebenso bedanke ich mich bei meiner Familie sowie meinen Freundinnen und Freunden für die viele emotionale Unterstützung. In besonderem Maße danke ich meiner Freundin Léa Gaignebet, die nie den Glauben an mich verloren hat und mir immer unterstützend zur Seite stand.