

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

DISSERTATION

**Der Einfluss einer körperlichen Ausdauerleistung
auf den Eisenstoffwechsel trainierter Frauen
unter besonderer Berücksichtigung des
Hepcidin**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kila Battal
aus Aleppo (Syrien)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Röcker
2. Prof. Dr. med. W. Gassmann
3. Prof. Dr. med. A. Pruß

Promotionsdatum: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Physiologie des Eisenstoffwechsels	6
1.1.1 Eisenhomöostase	8
1.2 Klinisch relevante Laborparameter zur Ermittlung des Eisenstatus	9
1.2.1 Transferrin	10
1.2.2 Ferritin	11
1.2.3 Löslicher Transferrinrezeptor (TfR)	12
1.2.4 TfR-Ferritin-Index	13
1.2.5 Retikulozytensystem	14
1.2.5.1 Morphologische Klassifikation	15
1.2.5.2 Laserstreulichtmessung der Retikulozyten	16
1.2.5.2.1 Retikulozytenindizes	16
1.2.5.2.2 Subklassifikation unterschiedlicher Reifungsstadien mittels Durchflusszytometrie	18
1.2.6 Prozentsatz hypochromer Erythrozyten (% Hypo)	19
1.3 Heparin	19
1.4 Fragestellung	21
2 Methodik	22
2.1 Experimentelle Durchführung	22
2.1.1 Marathonablauf und Rahmenbedingungen des Marathonlaufs	22
2.1.2 Versuchspersonen	22
2.1.3 Blutentnahme	23
2.1.4 Untersuchte Parameter	24
2.2 Analytik	24
2.2.1 Analyse der Eisenstoffwechselfparameter (Ferritin, TfR, TfR-Index)	24
2.2.2 Analyse der zellulären Parameter und der Retikulozytenindizes	25
2.2.2.1 Erythrozytenanalytik	26
2.2.2.2 Retikulozytenanalytik	27
2.2.2.3 Retikulozytenindizes	27
2.2.2.4 Subklassifikation unterschiedlicher Reifungsstadien mittels Durchflusszytometrie	28
2.2.2.5 Heparin	29

2.3	Statistische Auswertung	29
2.3.1	Definition des Medianwertes	29
2.3.2	Definition der Perzentile P25 – P75	30
2.3.3	Signifikanz	30
2.3.4	Friedman-Test	31
2.3.5	Box-Whiskey-Plot (Kastengrafik)	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Ruhewerte	32
3.2	Medianwerte und Perzentile des roten Blutbildes	33
3.3	Medianwerte der Retikulozytenparameter und die Perzentile vor und nach dem Marathonlauf	35
3.4	Mediane und Perzentile der Retikulozyten nach der Fluoreszenzintensität (%) vor und nach dem Marathonlauf	37
3.5	Hepcidin-Ausscheidung im Harn	38
4	Diskussion	39
4.1	Zusammenhang zwischen Ausdauerleistungen und Eisenmangel	39
4.2	Rotes Blutbild (Tabelle 3)	41
4.3	Retikulozyten und Retikulozytenparameter	42
4.3.1	Reifegrad der Retikulozyten	50
4.4	Hepcidin	54
5	Zusammenfassung	57
6	Tabellenverzeichnis	58
7	Abbildungsverzeichnis	59
8	Literaturverzeichnis	60
9	Lebenslauf	70
10	Danksagung	70
11	Erklärung	72

1 Einleitung

Ausdauersport, insbesondere in Form von Langstreckenläufen und Nordic Walking, ist in der heutigen Gesellschaft ein populärer Volkssport geworden. Er führt zu vielfältigen, überwiegend positiven Veränderungen in verschiedenen Organsystemen. Intensive körperliche, vor allem anaerobe Belastungen, können jedoch auch zu negativen Auswirkungen im Körper führen.

Ein vielfach beschriebenes Problem des Ausdauersports ist die Entwicklung eines Eisenmangels bzw. einer Eisenmangelanämie.

Eisenmangel ist weltweit einer der häufigsten und klinisch relevanten Mangelzustände und die häufigste Ursache einer Anämie (Hastka *et al.* 1996; Röcker *et al.* 2002; Suominen *et al.* 1998).

Eisenmangel führt nicht nur zur Dysfunktion der Erythropoese, sondern hat auch negative Auswirkungen auf die Immunkompetenz, Temperaturregulation, den Energie-stoffwechsel sowie auf die körperliche Leistungsfähigkeit (Chandra *et al.* 1975; Cook and Lynch 1986; Hinton *et al.* 2000).

Es gibt viele Risikogruppen, welche anfällig für die Entwicklung eines Eisenmangels oder einer Eisenmangelanämie sind (z.B. Frauen in reproduktivem Alter). Insbesondere gehören weibliche Ausdauersportler zu dieser Risikogruppe (Banister *et al.* 1985; Diel *et al.* 1986; Cook 1994; Hunding *et al.* 1981; Lampe *et al.* 1986; Parr *et al.* 1984, Röcker *et al.* 2002, Zhu YI and Haas 1998).

Als Ursache des Eisenmangels gelten ein erhöhter Eisenbedarf, ein erhöhter Eisenverlust und z.T. eine verminderte Eisenaufnahme. Von Bedeutung für den Ausdauersport ist, dass ein Eisenmangel schon vor dem Auftreten einer Anämie Symptome, wie z.B. eine Leistungsminderung zur Folge haben kann.

Beim Ausdauersportler ist die Beurteilung des Eisenstatus und des peripheren roten Blutbildes besonders schwierig, da diese Parameter sowohl akut als auch chronisch verändert sind.

Ausdauersport führt zu einem Anstieg des Blutvolumens unter Ruhebedingungen (Röcker 1978; Röcker *et al.* 1976; Röcker 1983; Sawka *et al.* 2000).

Dabei ist das Plasmavolumen im Vergleich zum totalen Erythrozytenvolumen (Erythrozytenmenge) überproportional vergrößert. Die Folge ist eine Hämodilution, ablesbar an

subnormalen Hämoglobinkonzentrationen, Hämatokritwerten und Ferritinkonzentrationen. Diese Veränderungen sind bei der Diagnostik des roten Blutbildes und des Eisenstatus zu berücksichtigen.

Bei Vergleichsuntersuchungen zwischen Ausdauertrainierten und Untrainierten wurde eine um ca. 5 g/l verminderte Hämoglobinkonzentration und ein um ca. 2% verminderter Hämatokritwert beobachtet (Eichner *et al.* 1986; Lorenz *et al.* 1992; Röcker *et al.* 1977). Ebenso zeigten sich erniedrigte Ferritinkonzentrationen (Blum *et al.* 1986; Dufaux *et al.* 1981; Green 1991; Lampe *et al.* 1986).

Die üblichen Referenzbereiche können deshalb nicht zur Beurteilung herangezogen werden.

Referenzbereiche für das Blutbild beim Ausdauersportler gibt es noch nicht.

Als Richtgröße für eine klinisch relevante Anämie beim Ausdauersportler sollten daher die von Eichner (1986) angegebenen Werte verwendet werden:

♀ Hämoglobin < 110 g/l

♂ Hämoglobin < 130 g/l

1.1 Physiologie des Eisenstoffwechsels

Eisen, das zweihäufigste Metall der Erde, zählt zu den Übergangselementen. Es kann leicht Elektronen abgeben und aufnehmen (Andrews *et al.* 1999; Thomas und Thomas 2005).

Eisen ist ein für den Menschen lebenswichtiges Element, das mit der Nahrung aufgenommen wird. Der Körper erhält somit seine Speicherkapazität, die zum großen Teil durch Wiedergewinnung aus eisenbindenden Zellen, meist aus abgestorbenen Erythrozyten, entsteht. Eisen ist in geringen Mengen für nahezu alle Lebensprozesse essentiell.

Der Eisengehalt des menschlichen Körpers liegt bei Männern bei ca. 30-40 mg/kg Körpergewicht, bei Frauen bei ca. 35 mg/kg Körpergewicht.

Der Gesamteisenbestand beträgt bei Erwachsenen ca. 3-4 g, davon befinden sich 2,5 g im Hämoglobin der zirkulierenden Erythrozyten im Blut und deren Vorläuferzellen im Knochenmark. Jeder einzelne Erythrozyt enthält etwa 1 Milliarde Eisentome (Andrews *et al.* 1999). Der Rest befindet sich im Myoglobin und in den Eisendepots (ca. 1.000 mg). Der Eisenspeicher liegt in Form von Ferritin und Hämosiderin, besonders in der Leber, der Milz und im Knochenmark vor (Thomas und Thomas 2005).

Der Gesamteisenbestand lässt sich in drei Kompartimente gliedern:

Funktionseisen ca. 70 %

Depoteisen ca. 18 %

Transporteisen und eisenhaltige Enzyme ca. 12 %. (Schmausser *et al.* 1997)

Dem Eisen kommen zwei physiologisch wichtige Funktionen zu:

Als Zentralatom im Porphyringerüst spielt Eisen im Hämoglobin und Myoglobin eine wichtige Rolle beim Sauerstofftransport.

Unter den essentiellen metallischen Spurenelementen nimmt Eisen eine Sonderstellung ein. Während alle anderen metallischen Spurenelemente im Organismus nur mit negativ geladenen Molekülen reagieren, vermag Eisen auch mit neutralen Molekülen, insbesondere mit Sauerstoff zu reagieren. Dieser Funktion dienen etwa zwei Drittel des Körpereisens, die im Hämoglobin gebunden sind. Jedes der vier scheibenförmigen Hämmoleküle enthält eine gebundene Globinkette und ein zweiwertiges Eisenatom, das Sauerstoff zum Transport reversibel bindet.

Myoglobin, dessen Molekülmasse etwa ein Viertel des Hämoglobins beträgt, enthält pro Molekül 1 Atom Eisen. Es stellt das Sauerstoffreservoir für den Muskelmetabolismus dar (Wick *et al.* 2002).

Als Cofaktor ist Eisen für die Funktion zahlreicher Enzyme erforderlich. Von den 10% des so genannten Enzymeisens sind 2% in den Enzymen der Atmungskette gebunden, mit denen der Organismus die Wasserstoffoxidation durchführt. In diesen Enzymen wird das Eisen im Gegensatz zum Eisen im Hämoglobin und Myoglobin oxidiert und reduziert, liegt also einmal in zweiwertiger und einmal in dreiwertiger Form vor.

Die Eisenenzyme können klassifiziert werden in die Hämproteine (Cytochrom, Cytochrom-c-Oxidase, Katalase, Peroxidase, Tryptophan-Pyrrolase, Lipooxidase und Homogenetisinoxidase) und in die Eisenflavoproteine (Cytochrom-c-Reduktase, NADH-Dehydrogenase, Xantinoxidase, Succinatdehydrogenase und Acyl-CoA-Dehydrogenase)(Wick *et al.* 2002).

Als Bestandteil der Cytochrome ist Eisen für den Elektronentransport in der Atmungskette, d.h. für die aerobe Energiegewinnung verantwortlich. Das Eisen im Häm des aktiven Zentrums der Cytochrome unterliegt bei der Elektronenweitergabe einem Valenzwechsel (Fe^{2+} zu Fe^{3+}) und umgekehrt. Die Elektronenübertragung des Eisens, in dieser Form nützlich für die Energiegewinnung des Organismus, kann andererseits auch negative Auswirkungen haben.

Eisen kann mit Sauerstoff unter Bildung von O₂-Radikalen wie das toxische Superoxidanion ($\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^-$) reagieren.

Die wichtigste Quelle des Wasserstoffperoxids ist die Atmungskette, in der bis zu 5 % des bei der mitochondrialen Atmung gebundenen Sauerstoffs in Wasserstoffperoxid umgewandelt wird.

Die Hydroxidradikale und das Superoxidanion oxidieren Makromoleküle und wirken zerstörend auf organische Substanzen, wie Zellmembranen und DNA – Moleküle (Wick *et al.* 2002).

1.1.1 Eisenhomöostase

Die Eisenverluste des Körpers variieren mit Geschlecht und Alter und sind bedeutsam, wenn es zu einem Blutverlust kommt. Da der Eisengehalt des Hämoglobins 3,46 mg/g beträgt, resultiert aus einem Milliliter Blutverlust (Hb 15 g/dl) der Verlust von 0,5 mg Eisen. Beim Mann beträgt der tägliche Eisenverlust etwa 0,9 mg, resultierend aus gastrointestinaler und renaler Ausscheidung.

Bei Frauen im reproduktiven Alter sind die Verluste höher. Der durchschnittliche menstruale Blutverlust beträgt 33 ml pro Periode, das führt zu einem täglichen Verlust von 1,5 mg, der sich bis auf 2,1 mg erhöhen kann (Thomas und Thomas 2005).

Wegen der hohen Toxizität freien Eisens wird im Organismus Eisen ausschließlich an Eiweiß gebunden (z.B. Transferrin) und gespeichert (z.B. Ferritin). Daher kann Eisen nicht über die Niere ausgeschieden werden.

Eisen wird im Duodenum und oberen Jejunum hauptsächlich als Fe^{2+} resorbiert. Da Nahrungseisen jedoch überwiegend in der dreiwertigen Form vorliegt, muss es, abgesehen von dem hämgebundenen Fe^{2+} Anteil, zunächst, z.B. durch eine Ferrireduktase oder Ascorbinsäure reduziert werden. Das erklärt, warum in der Regel nur 10 % des Nahrungseisens resorbiert werden, was 1mg pro Tag entspricht (Wick 2002).

Der divalente Metalltransporter 1 (DMT1) nimmt Fe^{2+} in duodenalen Enterozyten auf, nachdem es durch das Bürstensaumenzym (membranständige Ferrireduktase) reduziert wurde.

Ferroportin 1 transportiert zusammen mit dem membrangebundenen Hepsidin das Eisen aus den Enterozyten in das Körperplasma, wo es an Transferrin gebunden wird.

Die Homöostase des Körpereisens wird durch zwei Mechanismen gewährleistet: zum einen über die Rückgewinnung des freigesetzten Funktionseisens durch die Makrophagen des Retikuloendothelzytensystems und zum anderen durch intestinale Resorption. Hämeisen aus den Erythrozyten wird kontinuierlich kontrolliert, indem die gealterten Erythrozyten durch Makrophagen katabolisiert werden. Auf diesem Wege können pro Tag ungefähr 25 bis 30 mg Eisen gewonnen werden. Das entspricht in etwa der Menge, welche täglich für die Erythropoese benötigt wird. Die intestinale Eisenabsorption hingegen, welche über die

Enterozyten der duodenalen Mikrowilli stattfindet, beträgt nur 1 bis 2 mg/Tag. Dies kompensiert allerdings gerade den Eisenverlust, welcher hauptsächlich über die Abschilferung epithelialer Zellen geschieht. Wie oben beschrieben ist ein Großteil des Eisens im menschlichen Organismus im Hämoglobin gebunden. Die Phagozytose von überalterten Erythrozyten durch Makrophagen und das anschließende Recycling des Hämeisens ist deshalb zur Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase essentiell. Dieser Vorgang findet vor allem in der Milz, im Knochenmark und in kleinerem Ausmaß auch in den Kupfferschen Zellen der Leber statt. Durch biochemische Modifikationen der Erythrozytenmembran im Rahmen eines Alterungsprozesses können die Makrophagen die zu eliminierenden Erythrozyten erkennen. Nach Bindung der Erythrozyten an die Makrophagen werden sie via Phagozytose internalisiert und im Phagosom degradiert. Das Hämoglobin wird über verschiedene Schritte zu Eisen und Bilirubin katabolisiert. Das freiwerdende Eisen kann entweder über Ferroportin ans Plasma abgegeben oder in Ferritin gespeichert werden. Eine Regulation der Eisenbestände des Körpers ist im engeren Sinne nur durch die Resorptionsquote im oberen Dünndarm möglich. Der aktuelle Stand der Forschung besagt, dass der menschliche Organismus unfähig ist, überschüssiges Eisen aktiv auszuscheiden (Kulaksiz *et al.* 2005).

Übergroße Eisenzufuhr führt zu einer Vergrößerung der Eisendepots Ferritin und Hämosiderin. Wird diese Speicherkapazität überschritten, kommt es zur Ablagerung in den parenchymatösen Organen. Die dadurch verursachte Zellschädigung führt zu Zelltod und zu Funktionsstörungen des betroffenen Organs (Thomas und Thomas 2005).

1.2 Klinisch relevante Laborparameter zur Ermittlung des Eisenstatus

Zur Beurteilung des Eisenstatus gilt als Goldstandard die Eisenfärbung des Knochenmarks. Diese Untersuchung ist für Routineuntersuchungen nicht geeignet. Deshalb werden verschiedene Labortests zur Abschätzung des Eisenstatus verwendet, wie z.B. die traditionellen biochemischen Marker Eisen, Transferrin und Ferritin sowie das rote Blutbild.

In den letzten Jahren wurden neue Eisenmarker entwickelt; der lösliche Trans-ferrinrezeptor im Serum, der Prozentanteil von hypochromen Erythrozyten (Hypo %) und verschiedene Retikulozytenindizes, z.B. retikulozytäres Hämoglobin (CHR).

Dabei ist zu beachten, dass kein einziger Test geeignet ist, den gesamten Eisenstatus zu messen. Jeder einzelne Test erfasst lediglich nur verschiedene Phasen des Eisenstatus und mehrere Tests ergänzen sich gegenseitig.

1.2.1 Transferrin

Transferrin ist ein Protein, das in der Leber gebildet wird und an das sich Eisen ankoppelt. Anorganische Elemente werden im Körper häufig an Eiweiße gebunden. Das ionisierte, also geladene Eisen wird an das Protein Transferrin gekoppelt und auf diese Weise in der Blutbahn transportiert. Unter normalen Bedingungen beträgt die Eisensättigung von Transferrin rund 30%. Wenn die Eisenbindungskapazität von Transferrin gesättigt ist, kann Eisen in freier Form im Plasma vorliegen. Dieses nicht gebundene Eisen kann leicht die Zellen penetrieren und dann zu erheblichen Zellschädigungen führen.

Je nach Eisenbedarf und Eisenreserven kann die Synthese des Transferrin in der Leber kompensatorisch reguliert werden. Transferrin ist nicht nur im Blutplasma nachweisbar, sondern auch im Liquor cerebrospinalis und in interstitiellen Flüssigkeiten.

Für jedes Transferrinmolekül erfolgt die Eisenaufnahme in der dreiwertigen Form, für maximal zwei Eisenatome.

1,0 Gramm Transferrin sind in der Lage, 1,4 Milligramm Eisen zu transportieren. Das im Körper vorhandene Transferrin kann insgesamt ca. 3 mg Eisen binden. Der Referenzbereich von Transferrin liegt zwischen 200-360 mg/dl (nach Angaben des Herstellers). Dieser Wert ist niedrig bei Infektionen oder chronischen Entzündungen. Unterernährung führt aufgrund des fehlenden Eiweißumsatzes stets zu einer Erniedrigung des Transferrins.

Der Transferrinwert ist bei Eisenmangel erhöht. Störungen bei der Bildung der roten Blutkörperchen im Knochenmark oder Lebererkrankungen sowie Alkoholismus führen zu einer Überladung an Eisen und Transferrin (Thomas und Thomas 2005).

Bei Erkrankungen, die zu einem erhöhten Verbrauch oder zu einem erniedrigten Umsatz von Funktionseisen führen, wird die Transferrinsättigung untersucht. Die Transferrinsättigung wird durch den Quotienten aus Eisen- und Transferrin-konzentration im Blutserum des nüchternen Patienten bestimmt.

Die alleinige Bestimmung von Transferrin ist weitgehend wertlos, zusätzlich sollte Ferritin gemessen werden.

1.2.2 Ferritin

Ferritin ist ein Protein mit einem vom Eisengehalt abhängigen Molekulargewicht von etwa 440.000 Dalton. Es dient der intrazellulären Speicherung von Eisen, das in freier Form zytotoxisch wirken würde. Die Ferritinkonzentration ist in der Leber (110-552 µg/g Leber) und der Milz (200 µg/g Milz) am höchsten (Heilmann et al. 1983) im Vergleich zum Herzen (40 µg/g Herz) und den Nieren (107 µg/g Niere). Ferritin kommt auch in geringen Mengen im Blutplasma vor.

Durch die Entwicklung einer Bestimmungsmethode für Ferritin im Serum und den gleichzeitigen Nachweis, dass Serumferritin mit dem Speichereisen des Organismus korreliert (Addison *et al.* 1972), erlangte die Bestimmung des Ferritinspiegels im Serum eine entscheidende klinische Bedeutung (Lipschitz *et al.* 1974).

Die Hauptindikation zur Ferritinbestimmung liegt in der Erfassung eines Eisenmangels. Ein erniedrigter Ferritinspiegel wurde bislang nur bei Eisenmangel beschrieben (hohe analytische Spezifität).

Ferritin besteht aus einer Proteinhülle (Apo ferritin) von 24 Untereinheiten und dem Eisenkern aus Eisenhydroxidphosphat. Pro Molekül Ferritin können bis zu 50000 Eisenatome aufgenommen werden (Weiss 1997).

Es hat sich gezeigt, dass Ferritin eine Neigung zur Bildung von Oligomeren hat, und im Fall von einem Überangebot in den Zellen der Speicherorgane zur Kondensation zu halbkristallinem Hämosiderin in den Lysosomen führt (Wick *et al.* 2002).

Das Serumferritin stellt besonders das im retikuloendothelialen System und den Hepatozyten gespeicherte Eisen dar. Die Änderungen des Eisengehalts werden schnell durch eine Änderung der Ferritinkonzentration im Serum angezeigt. So wird ⁵⁹Fe, das in Form denaturierter Erythrozyten intravenös verabreicht wird, in die Makrophagen des RES aufgenommen und erscheint als ⁵⁹Fe-markiertes Ferritin nach 20-40 min. im Blut (Thomas und Thomas 2005).

Der Ferritingehalt im Serum ist bei einem Eisenmangel vermindert. Die Referenzbereiche des Serumferritin sind bei Frauen vor der Menopause ca. 8-12 µg/l, nach der Menopause ca. 30-300 µg/l. Bei Männern liegen die Werte bei 18-440 µg/l (Sunder-Plasman *et al.* 1996).

Es bestehen während der Kindheit und im hohen Alter keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der Ferritinkonzentration (Jacobs und Worwood 1975).

Ferritin variiert von Tag zu Tag. Frauen weisen einen höheren Variationskoeffizienten auf als Männer.

Die Konzentrationen für Serumferritin sind bei Männern nach der Pubertät bis zum mittleren Lebensalter höher als bei Frauen (Worwood *et al.* 1997).

Während einer Akute-Phase-Reaktion (Entzündungen, Traumata, Tumoren) kommt es zu falsch hohen Ferritinwerten (Birgerad *et al.* 1978, Hazard und Drysdale 1977, Konijn und Hershko 1977, Lustbader *et al.* 1983).

1.2.3 Löslicher Transferrinrezeptor (TfR)

Um Eisen aus dem Plasmatransferrin in die Zellen zu bringen, muss eine Barriere überwunden werden. Dies geschieht mit Hilfe von Transferrinrezeptoren, die sich an den Oberflächen fast aller menschlichen Zellen befinden. Etwa 75% aller Transferrinrezeptoren werden jedoch auf Vorläuferzellen der Erythrozyten, insbesondere auf den Retikulozyten im Knochenmark exprimiert. Die höchste Besetzung zeigen Organe mit hohem Eisenverbrauch wie das Knochenmark, Plazenta und Leber (Huebers und Finch 1987).

Der TfR ist ein Glykoprotein, das aus 760 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von 95 kDa besteht. Der TfR ist zusammengesetzt aus zwei Monomeren, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind und so ein Molekül von 190 kDa bilden (Huebers und Finch 1987). Jede Polypeptiduntereinheit enthält ein transmembranes Segment, das aus 28 Aminosäuren, einer N-terminalen zytoplasmatischen Einheit mit 61 und einer großen C-terminalen Domäne mit 671 Aminosäuren besteht. Die Gene für Transferrin und seinen Rezeptor sind beide auf dem Chromosom 3 lokalisiert. (Miller *et al.* 1983). Jedes von den zwei Monomeren kann bis zu zwei Moleküle Fe³-beladenes Transferrin binden. Die Transferrinsättigung bestimmt, wie hoch die Affinität der TfR ist. Das heißt, dass sie für komplett gesättigtes Transferrin hoch ist (Huebers *et al.* 1987). Entscheidend für die Affinität des TfR ist der pH-Wert. Wenn der pH-Wert neutral ist, ist die Affinität für komplett gesättigtes Transferrin besonders hoch (Huebers *et al.* 1981, Huebers *et al.* 1983).

Der TfR-Transferrin-Eisen-Komplex wird mittels Endozytose über einen pH-Wert-Gradienten in die Zelle geschleust. Beim Wechsel des pH-Werts vom alkalischen Blut- pH zum sauren pH-Wert des Endosoms ändern sich die Bindungsverhältnisse. Eisenionen dissoziieren spontan vom Transferrin, während die Bindung zwischen Transferrin und TfR bestehen bleibt. Erst im Schritt in umgekehrter Richtung zerfällt der TfR-Transferrin-Komplex nach pH-Wechsel im alkalischen Blut-pH und Transferrin steht im Blut für den Eisentransport wieder zur Verfügung. Entzündungen, Infektionen, chronische Erkrankungen oder Akute-Phase-Reaktionen beeinflussen die sTfR-Konzentration nicht (Thomas *et al.* 1999; Thortensen und Romslo 1993), weiterhin wurden keine Alters- oder Geschlechtsunterschiede für die sTfR- Konzentration gefunden (Kohgo *et al.*1986).

Der Referenzbereich des TfR liegt zwischen 0,83 – 1,76 mg/l (nach Angaben der Hersteller des eingesetzten Analysesystems).

1.2.4 TfR-Ferritin-Index

Da Serumferritin das Speichereisen und der sTfR das Funktionseisen reflektieren, kann durch die Kombination beider Parameter der TfR-Ferritin-Index ermittelt werden.

Der TfR-Ferritin-Index wird errechnet aus dem Quotienten TfR (mg/l)/log Ferritin (µg/l).

Über die Bestimmung des TfR-Ferritin-Index wird die diagnostische Sensitivität und Spezifität verbessert (Baynes *et al.* 1996; Punnonen *et al.* 1997, Skikne *et al.* 1990).

Bei Personen, die einen Eisenmangel aufweisen, ist der TfR-Ferritin-Index erhöht.

In Grenzfällen, wenn die Ergebnisse des TfR und des Ferritin einzeln betrachtet unsicher sind, kann der TfR-Ferritin-Index in der Diagnose eines Eisenmangel-zustandes zuverlässiger sein (Suominen *et al.* 1998).

Die Zuverlässigkeit des TfR-Ferritin-Index wurde in mehreren Studien dokumentiert (Baynes *et al.* 1996; Skikne *et al.* 1990; Suominen *et al.* 1998; Punnonen *et al.* 1997).

Zur Bestimmung des Eisenstatus bei Athleten konnte der Vorteil dieses Quotienten nachgewiesen werden (Malezewska *et al.* 2002). Die Kombination gibt ein genaues Bild über den gesamten Eisenstatus, darüber hinaus auch über den zellulären Bedarf.

Allerdings ist bei diesem Index, wie beim isolierten TfR-Wert zu beachten, dass diese Parameter auch von der erythropoetischen Aktivität des Knochenmarks abhängen.

Referenzbereich: 0,41 – 1,25 (nach Angaben des Herstellers, siehe oben).

1.2.5 Retikulozytensystem

1865 entdeckte Erb erstmals die Retikulozyten als Subpopulation der Erythrozyten in hämolysierten Blutproben (Portsmann 1993) Erst nach Jahrzehnten wurde erkannt, dass die Retikulozyten eine direkte Vorstufe der Erythrozyten darstellen.

Der Retikulozyt ist eine rote Blutzelle in den letzten Stadien der Entwicklung (Lowenstein *et al.* 1959). Retikulozyten sind Vorstufen der reifen Erythrozyten, die noch ein oder mehrere Partikel von ribosomaler RNA enthalten, die sich z.B. durch „Methylen Blue“ blau anfärben lassen.

Retikulozyten entstehen im Knochenmark aus Vorläuferzellen über mehrere Zwischenstufen. Sie werden aus dem Knochenmark ca. 18-36 Stunden vor ihrer endgültigen Ausreifung ins periphere Blut abgegeben. Eine Veränderung der Retikulozyten-konzentration im Blut korreliert mit der Freisetzung unreiferer Vorstufen, nicht jedoch mit der eigentlichen Blutzellbildung im Knochenmark (Wick *et al.* 2002).

Die Kontrolle der Retikulozyten im venösen Blut ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung der erythropoetischen Produktionsaktivität des Knochenmarks.

In der Sportmedizin kommt der Analyse der Retikulozyten und Retikulozytenindizes eine besondere Bedeutung nicht nur im Monitoring der professionellen Athleten, u.a. wegen des signifikant erhöhten Risikos für die Ausbildung einer Anämie zu, sondern auch in der Aufdeckung der Anwendung von verbotenen Substanzen (Doping).

Es ist wichtig für Sportmediziner und Kliniker, die Variabilität der Retikulozyten bei Athleten und in der allgemeinen Bevölkerung zu kennen (Banfi *et al.* 2008).

Die Retikulozytenzahl wird entweder als Prozentsatz (Zahl der Retikulozyten / 100 Erythrozyten) oder als absolute Zahl angegeben (Retikulozytenzahl / μl). Besonders bei Anämien mit verminderter Erythrozytenzahl dient die absolute Zahl der Retikulozyten als Bewertungsgrundlage.

Referenzbereich (- ADVIA 120) (Thomas und Thomas 2005):

♀ 0,5 – 1,4 % , 19 – 64 · 10⁹ /l

♂ 0,5 – 1,4 % , 29 – 69 · 10⁹ /l

Der Referenzbereich liegt bei Männern höher als bei Frauen, dieser Unterschied erklärt sich durch den Blutverlust durch die Menstruation, der ersetzt werden muss. Van der Bosche *et al.* stellten 1994 fest, dass die Verteilung einer gesamten Population nicht einer Gauß-Verteilung folgte, sondern eine Schiefe zu höheren Werten aufwies.

In den letzten Jahren wurde zunehmend der lösliche TfR als zuverlässiger Marker für die Feststellung eines Eisenmangels beim Sportler verwendet (Malczewska *et al.* 2001, Röcker *et al.* 2002).

Die Bestimmung dieses Parameters ist allerdings sehr kostenaufwendig, zudem sind die Assays zurzeit nicht standardisiert.

Mit modernen Hämatologie-Analysengeräten, wie dem ADVIA-120 (Bayer) ist es möglich, als direkten Parameter der Eisenversorgung des Knochenmarks den Hämoglobingehalt der Retikulozyten zu bestimmen (CHR), sowie weitere Retikulozyten-Parameter.

Diese neuen Parameter können im Rahmen einer Analyse des roten Blutbildes einfach und wesentlich kostengünstiger mitbestimmt werden.

Mit dem CHR sind z.B. eine differenziertere und aktuellere Eisenmangel- und Anämiediagnostik, sowie auch eine verbesserte Therapiekontrolle möglich.

Der Parameter gilt als Maß für die Hämoglobinisierung der Retikulozyten im Knochenmark und zeigt daher als Momentaufnahme die Eisenversorgung während der Erythropoese an. Er reagiert schnell und sensitiv auf ein bereits beginnendes Eisenversorgungsdefizit im Knochenmark.

Bei einem eintretenden funktionellen Eisenmangel nimmt der zuvor normale Hämoglobingehalt der Retikulozyten innerhalb von 2 Tagen ab.

Für das Monitoring der oralen Eisentherapie von Patienten mit Eisenmangelanämie gilt er ebenfalls als schnellster und sensitivster Marker.

Eine erfolgreiche Eisentherapie bewirkt einen Anstieg des CHR innerhalb von 48 Stunden. Über die weiteren Retikulozytenparameter gibt es kaum Untersuchungen.

1.2.5.1 Morphologische Klassifikation

Die Ausreifung der Retikulozyten wird von morphologischen Veränderungen begleitet, die sich in charakteristischen Zytoplasmastrukturen (substantia retikulo granulofilamentosa) widerspiegelt.

Diese Strukturen werden durch basophile Farbstoffe dargestellt, die sich an die in Retikulozyten noch vorhandene RNA binden und zu deren Vernetzung führen.

Die klassische Definition der Reifungsstadien der Retikulozyten wurde von Heilmeyer und Westhäuser (1932) vorgeschlagen, die sich durch ihren Reifegrad und den altersabhängigen Anteil der substantia retikulo granulofilamentosa unterscheidet.

Die Morphologische Klassifikation des Retikulozyten unterscheidet mehrere Gruppen:

-Gruppe 0: Normoblasten und Megaloblasten, die beide einen Kern und ein dichtes perinukleäres Retikulum enthalten

-Gruppe 1: Retikulozyten mit einem Retikulum in Form dichter Klumpen.

-Gruppe 2: Retikulozyten mit einem kranzförmigen Retikulum.

-Gruppe 3: Retikulozyten mit einem diffus verstreuten Retikulum.

-Gruppe 4: Retikulozyten mit einem Retikulum in Form verstreuter Granula und Fragmente.

Hier ist das Endstadium des Reifungsprozesses erreicht. Der Retikulozyt verliert die Granula und Fragmente nach und nach und wird zum reifen Erythrozyten (Brugnara et al. 2000).

Blut gesunder Personen enthält nur zu einem kleinen Anteil Retikulozyten der Gruppe 1 und 2, etwa 30 % gehören der Gruppe 3 an und >60 % der Gruppe 4.

Bei einer Hyperregeneration der Erythropoese kommt es zu einer Vermehrung von Retikulozyten der Gruppen 1 und 2 und im Blutbild-Ausstrich zu einem polychromatischen Shift der Erythrozyten (Brugnara *et al.* 2000).

1.2.5.2 Laserstreulichtmessung der Retikulozyten

Neben der morphologischen Differenzierung und Zählung der Blutbildparameter einschließlich der Retikulozyten werden seit über 40 Jahren Blutparameter mechanisiert erstellt. Die modernste Entwicklung auf diesem Gebiet ist das ADVIA-120 Hämatologie-System (Kosanke 1999). Dieses System analysiert vollautomatisch neben dem kleinen bzw. großen Blutbild auch die Retikulozyten.

1.2.5.2.1 Retikulozytenindizes

Die durchflusszytometrische Messung der Retikulozytenparameter gewinnt zunehmend an Bedeutung in der klinischen Routine.

MCVr [fl] = mittleres Retikulozyten-Volumen

Das mittlere Volumen der Retikulozyten ist etwa 20% größer als das Volumen der reifen roten Blutzellen. Niedrige MCVr-Werte sieht man bei Eisenmangel, hohe bei Megaloblastenanämie. Bei Eisensubstitution vergrößert sich das MCVr schnell.
Referenzbereich: 92,4 – 120,2 fl (Butarello *et al.* 1995).

Quotient von MCVr/MCV reifer roter Blutzellen

Das MCVr ist um 20% größer als das MCV der reifen roten Blutzellen. Daher liegt der Quotient von $MCVr / MCV \text{ reife RBC} > 1$ (Brugnara *et al.* 2000). Dieser Retikulozytenindex unterscheidet sich zwischen Menschen mit Eisenmangel und Menschen ohne Eisenmangel (Ashenden *et al.* 1999).

CHCMr [g/dl] = mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten

CHCMr ist vermutlich der früheste Index für eine Änderung der Erythropoese (Bhandari *et al.* 1998) Referenzbereich: 26,7 – 33,0 g/dl (Butarello *et al.* 1995).

CHr [pg] = mittlerer Hämoglobingehalt der Retikulozyten.

CHr wird berechnet aus dem direkt gemessenen MCVr und dem direkt gemessenen CHCMr.

$$CHr = MCVr \cdot CHCMr$$

Von den Retikulozyten-Indizes ist bis heute der CHr der am häufigsten untersuchte Parameter. CHr reflektiert direkt die aktuelle Hämoglobinsynthese im Knochenmark und ist damit ein adäquater Indikator des Eisenspeichers. CHr ist dem gefärbten Eisenausstrich im Knochenmark überlegen, welcher so ein grobes Maß für das Eisendepot im RES ist. In vielen Studien wurde die klinische Bedeutung von CHr demonstriert, zum Beispiel zur Feststellung einer gestörten Erythropoese durch Eisenmangel, Eisenmangelanämie und funktionellem Eisenmangel (Butarello *et al.* 2004, Mast *et al.* 2002).

CHr ist ein zuverlässiger und stabiler Indikator von Eisenmangel (Brugnara *et al.* 1997).

CHr ist ein konstanter Wert während der gesamten Lebenszeit der Retikulozyten (Brugnara *et al.* 2000).

Es gibt keinen Unterschied bei CHr zwischen Frauen und Männern (Mast *et al.* 2002).

Referenzbereich: 27,5 – 33,9 pg (Butarello *et al.* 1995).

Ret Hb[g/l] = Hämoglobingehalt der Gesamtretikulozyten

Ret Hb ist eine Größe, die die totale Menge von Hämoglobin in allen Retikulozyten angibt. Eine Stimulation des Knochenmarkes führt zu einem Anstieg von Ret Hb.

Bei Eisenmangel ist dieser Wert erniedrigt.

Der Hämoglobingehalt der Erythrozyten und Retikulozyten ist während der gesamten Lebenszeit dieser Zellen konstant. Er verändert sich nur, wenn Membranveränderungen auftreten.

Referenzbereich: 1,41 – 1,59 g/l.

Quotient von Hämoglobin der reifen roten Blutzellen / ret Hb

Es ist von Interesse, den Hämoglobingehalt des Retikulozytenpools zu erfassen und ihn mit demjenigen der reifen roten Blutzellen zu vergleichen.

Unter normalen Bedingungen sind etwa 1- 2% des gesamten Hämoglobins im Blut in den Retikulozyten enthalten.

Dieser neue Quotient liefert ein Maß für die Überlebenszeit der Erythrozyten, ohne invasive Methoden wie z.B. mit Cr -51 zu verwenden (Brugnara *et al.* 2000).

1.2.5.2.2 Subklassifikation unterschiedlicher Reifungsstadien mittels Durchflusszytometrie

In den letzten Jahren werden vermehrt Fluoreszenzfarbstoffe mit Bindung an RNA verwendet. Die Auswertung erfolgt durchflusszytometrisch (Hueberes *et al.* 1987).

Die Intensität der Fluoreszenz der Retikulozyten ist direkt proportional dem Gehalt an RNA (Watanabe 1994):

HFR = hohe Fluoreszenz

MFR= mittlere Fluoreszenz

LFR = niedrige Fluoreszenz

Bei gesunden Personen findet man überwiegend LFR-Retikulozyten.

Die Referenzbereiche in Prozenten der Gesamtretikulozyten:

LFR: 88,3 – 98,0

MFR: 1,5 - 10,7

HFR: 0 - 2,0 (Van den Bossche *et al.* 2002)

1.2.6 Prozentsatz hypochromer Erythrozyten (% Hypo)

Zur Diagnostik eines frühen erythrozytären Eisenmangels ist die Analyse der traditionellen Blutbildparameter wie Hämoglobinwert, mittleres zelluläres Volumen (MCV) oder mittlerer Hämoglobinwert (MCH) nicht geeignet, weil diese Parameter erst nach Wochen Veränderungen zeigen. Mit den neuen Hämatologieanalysatoren, wie ADVIA 120, ist es möglich, den prozentualen Anteil kleiner oder hämoglobinarmer Erythrozyten (% Hypo) zu bestimmen. Diese Methode erlaubt die Erkennung eines neu aufgetretenen funktionellen Eisenmangels, bevor MCV und MCH verändert sind. Als hypochrome Erythrozyten gelten solche, deren Hämoglobinkonzentration unter 28 g/dl liegt (Brugnara *et al.* 2000, Paterakis *et al.* 1994).

Das Auftreten von hypochromen Erythrozyten in der Zirkulation gilt als sensitiver Marker für das Vorliegen einer eisendefizitären Erythropoese.

Anders als die indirekten biochemischen Marker (Ferritin, TfR) erlaubt der %Hypo eine direkte quantitative Abschätzung, ob eine ausreichende Eisenversorgung des erythrozytären Systems vorliegt.

Referenzbereich: < 2,5 % (Metzgeroth und Haska 2004)

1.3 Hepcidin

Durch die Entdeckung des eisenregulierenden Hormons Hepcidin in den letzten Jahren, ist dieses Bindeglied gefunden worden und das Verständnis für die molekulare Kontrolle des Eisenmetabolismus enorm gewachsen (Ganz 2003, Thomas und Thomas 2005).

Hepcidin ist ein Peptid, das in der Leber gebildet wird.

Zwei Forschergruppen haben 2001 zunächst unabhängig voneinander Hepcidin als ein zirkulierendes antimikrobielles Peptid aus menschlichem Urin und Blut isoliert. Daher stammt der Name Hepcidin (hepatic bactericidal Protein).

Ganz (2003) wies den Zusammenhang zwischen Hepcidin und Eisenstoffwechsel nach.

Hepcidin reguliert die intestinale Eisenaufnahme über den Dünndarm und die Eisenfreisetzung aus dem Retikuloendothelialen System (RES).

Steigt der Bluteisenspiegel im Verhältnis zum Eisenverbrauch, wird von der Leber Hepcidin freigesetzt, um im Darm die Eisenaufnahme herabzusetzen. Liegt der Eisenspiegel niedrig,

hemmt die Leber die Hepcidinproduktion und im Darm steigt die Eisenaufnahme. Heute gilt Hepcidin als der Hauptregulator des Eisenstoffwechsels.

Hepcidin reguliert den einzigen bisher identifizierten Eisenexporter Ferroportin in den duodenalen Enterozyten und Makrophagen durch „down-Regulierung“ in diesen Zellen (Delaby *et al.* 2005; Hugman *et al.* 2006) d.h., der Eisenexporter Ferroportin ist das molekulare Ziel von Hepcidin.

Außerdem spielt Hepcidin bei der Dysregulation der Eisen-Homöostase bei chronischen Entzündungen eine wichtige Rolle.

Eine Up-Regulation von Hepcidin wird durch eine Entzündung bewirkt, was zu einer Verminderung der Eisenadsorption und zu Verminderung der Eisenfreisetzung im Retikuloendothelialen System führt und damit zu einer verminderten Erythropoese mit konsekutiver Anämie (Ganz 2003).

Hepcidin ist auch an der Entwicklung einer Hämochromatose beteiligt. Partieller Hepcidinmangel trägt vermutlich zur Eisenüberladung im Organismus bei. Wenn diese Hypothese zutrifft, ist es in Zukunft möglich, Hämochromatose mit Hepcidintherapie zu behandeln. Weiterhin könnten Hepcidinantagonisten bei der durch chronische Entzündungen bedingten Anämie eine adäquate Therapie sein (Ganz 2003).

1.4 Fragestellung

Bei der sportmedizinischen Untersuchung ist die regelmäßige Bestimmung des Eisenstatus, vor allem bei Frauen, die Ausdauersport betreiben, notwendig. Für diese Diagnostik stehen eine große Anzahl biochemischer und zellulärer Marker zur Verfügung. Von den klassischen Parametern sind jedoch nur wenige geeignet, den tatsächlichen Eisenstatus anzuzeigen, da dieser durch sportliche Aktivitäten per se beeinflusst wird.

In den letzten Jahren wurden neuere Marker des Eisenstoffwechsels entwickelt (z.B. Retikulozytenparameter), die bei Sportlern geeignet erscheinen, Eisenmangel zu diagnostizieren.

Über das Verhalten der neuen Retikulozytenparameter nach körperlichen Leistungen liegen in der Literatur nur wenige Ergebnisse vor.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb mit Hilfe der neuen Generation des Hämatologiegerätes ADVIA – 120 die Auswirkung eines Marathonlaufs auf das rote Blutbild, die Retikulozyten, die Retikulozytenindizes und die Reifungsgrade der Retikulozyten untersucht werden.

Insbesondere wird der Frage nachgegangen, inwiefern die neueren Parameter für die Sportmedizin Vorteile gegenüber der klassischen Kenngröße des Eisenstatus (z.B. Ferritin) aufweisen.

Außerdem wurde in einer Subgruppe das vor kurzem entdeckte Eisenregulatorpeptid Hpcidin analysiert.

Da sich schon nach einer einmaligen Ausdauerleistung viele Parameter des Eisenstatus (z.B. Ferritin) und des roten Blutbildes schon bei einer einmaligen Ausdauerleistung über mehrere Tage verändern, ist eine wesentliche Frage dieser Arbeit, ob dies auch auf die neueren Marker des Eisenstatus (Retikulozytenindizes) zutrifft und ggf. in der Präanalytik beachtet werden muss.

2 Methodik

2.1 Experimentelle Durchführung

2.1.1 Marathonablauf und Rahmenbedingungen des Marathonlaufs

Die Teilnehmer erreichten am Morgen vor dem Berlin-Marathon 2002 das medizinische Zelt zwischen 7:00 und 8:30 Uhr. Der Start begann um 9:00 Uhr, bei einer Umgebungstemperatur zwischen 9,7 und 12,9 C° während des Laufens. Es herrschte eine relative Luftfeuchtigkeit von etwa 80 % mit einzelnen Regenschauern während des Laufes. Die Laufstrecke betrug 42,195 km auf durchgehend ebenem Terrain.

Ähnliche klimatische Verhältnisse herrschten bei dem zweiten Marathonlauf 2004.

2.1.2 Versuchspersonen

Der Probandenpool setzte sich aus 27 gesunden und gut trainierten Marathonläuferinnen zusammen, welche 2002 bzw. 2004 am Berlin-Marathon teilnahmen. Der Medianwert des Alters betrug 35,3 J. Neben dem Geschlecht war ein regelmäßiger und unauffälliger Menstruationszyklus Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie. Eine weitere Voraussetzung war, dass keine Medikation, insbesondere aber keine Eisensubstitution in den Monaten vor dem Marathonlauf erfolgen durfte. Ausschlusskriterien waren des Weiteren hämatologische Veränderungen, insbesondere aber eine Eisenmangelanämie bzw. ein Eisenmangel, welche bei einer Blutentnahme direkt vor dem Marathon diagnostiziert wurden. Mittels Fragebogen wurden anthropometrische und trainingsbezogene Daten aufgenommen, welche in Tabelle 1 neben der erreichten Marathonzeit dargestellt sind.

Tabelle 1: Anthropometrische und trainingsbezogene Daten der Probandinnen (n =27)

Versuchspersonen	Mittelwert	Standardabw.	Median	Minimum	Maximum	Unteres Quartil	Oberes Quartil
Alter (J)	35,3	7,2	37,0	20,0	48,0	28,5	40,0
Körpergewicht (kg)	61,2	7,6	62,0	44,0	75,0	54,5	67,0
Körperhöhe (m)	166,9	5,8	168,0	155,0	176,0	163,0	172,0
Trainingsalter (J)	5,9	5,8	5,0	0,5	27,0	3,0	7,0
Trainingsumfang (km/Wo)	46,9	18,2	45,0	30,0	120,0	35,0	50,0
Trainingsumfang (h/Wo)	4,35	1,98	3,75	2,50	10,00	3,00	5,00
Anteil an intensivem Training (%)	20,2	13,2	19,3	0,0	52,3	13,3	28,6
Marathonzeit (min)	04:18:32	00:26:15	04:18:47	03:25:22	05:22:13	04:06:46	04:29:32

2.1.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus einer möglichst ungestauten peripheren Unterarmvene mittels des BD Vacultainer Blutentnahmesystems.

Zusätzlich erfolgte die Blutentnahme im Liegen, um orthostatische Veränderungen zu vermeiden.

Die Entnahmezeitpunkte waren:

ca. 45 min vor dem Start (Start: 9:00 - 9:30)

direkt (ca. 5-10 min) nach dem Zieleinlauf.

ein Tag nach dem Marathon.

drei Tage nach dem Marathon.

Das entnommene Blut wurde sofort nach der Entnahme zum Labor transportiert.

Für die Analyse aus dem Serum wurde das Blut zentrifugiert und Serum im Plastikröhrchen bei -80°C tiefgefroren.

2.1.4 Untersuchte Parameter

Um die Auswirkung einer mehrstündigen Ausdauerbelastung auf den Eisenstoffwechsel zu untersuchen, wurden die unten aufgelisteten Parameter bestimmt:

- Ferritin
- lösliche Transferrin Rezeptoren (s TfR)
- Hämatokrit (Hkt)
- Hämoglobin (Hb)
- Erythrozyten
- Erythrozyten-Indizes (MCV, MCH, MCHC)
- Retikulozyten
- Retikulozyten-Indizes
- Retikulozytenmorphologie
- Hepcidin im Harn

2.2 Analytik

2.2.1 Analyse der Eisenstoffwechselfparameter (Ferritin, TfR, TfR-Index)

Die Analyse dieser Parameter erfolgte nur unter Ruhebedingungen, um den Eisenstatus der Probanden möglichst vollständig zu erfassen.

Die Serum-Ferritin-Konzentration wurde mit dem Chemilumineszenz-Mikropartikel-Immunoassay am Architekt (Firma Abbott, Wiesbaden, Deutschland) ermittelt. Der Test ist ein Zwei-Schritt-Immunoassay. Im ersten Schritt werden Proben und Mikropartikel vermischt. Der Analyt bindet sich in der Inkubationsphase an die Mikropartikel und bildet einen Immunkomplex. Durch Waschen wird ungebundenes Material entfernt. Im zweiten Schritt wird Konjugat hinzugegeben, welches sich an den Immunkomplex bindet und so den Sandwichkomplex aus Antikörper, Analyt und Konjugat vervollständigt. Durch Zugabe von Prä-Trigger und Triggerlösung wird die

Chemilumineszenzreaktion ausgelöst, die in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen wird. Die Ferritinmenge in der Probe ist dabei den vom optischen System des Gerätes gemessenen RLE direkt proportional. Die Ferritinkonzentration wird durch die Einheit $\mu\text{g/l}$ wiedergegeben.

Der lösliche TfR ist ein abgetrenntes Teilstück des ursprünglichen intakten Rezeptors. Warum eine Abtrennung erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es steht aber fest, dass der Eisenmangel mit einer Erhöhung des löslichen TfR korreliert.

Der lösliche Transferrinrezeptor wurde mit Hilfe mikropartikelverstärkter Nephelometrie am BN II (Firma Dade Behring, Marburg, Deutschland) bestimmt. Hierbei werden Polystyrolpartikel mit Antikörpern markiert, die bei Vorhandensein des Analyten agglutinieren. An den Agglutinaten wird eingestrahltes Licht gestreut, wobei die Intensität von der Konzentration vom Analytgehalt in der Probe abhängt. Die Auswertung erfolgte wiederum durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration. Der lösliche Transferrinrezeptor wird in Mikrogramm/Liter angegeben.

Der TfR-Index wird aus dem Quotienten $\text{TfR (mg/l)} / \log \text{ Ferritin } (\mu\text{g/l})$ berechnet.

3.2.2 Analyse der zellulären Parameter und der Retikulozytenindizes

Die EDTA-Proben wurden mittels des Hämatologieanalyzers ADVIA 120 (Bayer Vital GmbH, Fernwald, Deutschland) analysiert. Hierbei handelt es sich um ein vollautomatisches Hämatologie-System für das kleine und große Blutbild sowie für die Retikulozytenanalytik aus EDTA-Vollblut.

ADVIA® 120 (Beschreibung des Herstellers)

Laserstreulicht-Messtechnologie gewährleistet hohe Auflösung, Sensitivität und Genauigkeit

Leukozytendifferenzierung (5-Part-Diff) über 2 Kanäle (geringe Nachdifferenzierungsrate)

Anämiediagnostik („state of the art“)

Knochenmarksanalytik

Stammzell-Monitoring

2-D Thrombozytenanalytik – exzellente Übereinstimmung mit der Referenzmethode

Liquoranalytik

Retikulozytenanalytik

EPO-Therapie-Kontrolle

Höchste Effizienz (120 Tests/Stunde)



2.2.2.1 Erythrozytenanalytik

Für die Erythrozytenanalytik erfolgt eine Zellpräparation im isotonen Milieu. Die Erythrozyten werden mit Hilfe von Laurylsulfat isovolumetrisch aufgekugelt, mit Glutaraldehyd fixiert und hydrodynamisch fokussiert. Mit einem Doppelwinkel-Laserstreulicht werden anschließend das Volumen und der intrazelluläre Hämoglobingehalt der Erythrozyten gemessen. Diese Kombination ermöglicht eine quantitative Differenzierung der Erythrozytenpopulation. In einer normalen Patientenprobe werden während des Zählvorganges von genau 10 Sekunden etwa 50.000 Einzelerthrozyten gezählt und morphologisch beurteilt. Folgende zelluläre Parameter wurden so gemessen oder berechnet:

Erythrozytenzahl

Hämoglobin-Konzentration

Hämatokrit

Erythrozyten-Indizes

Hypochrome Erythrozyten (% Hypo)

2.2.2.2 Retikulozytenanalytik

Die Retikulozytenparameter werden aus EDTA-Vollblut bestimmt. Hierzu werden auch diese mit speziellen Reagenzien isovolumetrisch aufgekugelt. Anschließend wird die Rest-RNA der Retikulozyten mit Oxazin 750 angefärbt und mit Hilfe der hydrodynamischen Fokussierung jeweils als singuläre Zellen gemessen und validiert. Als Messsignale werden das Vorwärtsstreulicht in zwei unterschiedlichen Winkelbereichen (Niedrigwinkel 2 – 3 Grad und Hochwinkel 5 – 15 Grad) und die Absorption jeder Zelle von Detektoren aufgefangen und in ein Scattergramm (Retigramm) projiziert.

Durch diese Form der Analytik ist sowohl die Angabe der Retikulozytenkonzentration absolut und relativ als auch die Trennung der nicht gefärbten Erythrozyten von den RNA-gefärbten Retikulozyten möglich. Des Weiteren kann eine quantitative Subklassifikation der stark (unreif) absorbierenden Retikulozytenparameter MCVr, CHCMr und CHr vorgenommen werden. Dafür werden jeweils 20.000 Retikulozyten analysiert. In der vorliegenden Studie wurden folgende Retikulozytenparameter bestimmt:

absolute Retikulozytenzahl

relative Retikulozytenzahl.

Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHR)

Mittlere Retikulozytenvolumen (MCVr)

Mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten (CHCMr)

Mittlerer Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHr)

Die Oxazine-750-Färbmethode wird für die Messung von Intensität und Retikulozyten-Index, sowie Retikulozytenvolumen MCVr und Hämoglobin-Konzentration benutzt.

Die Messung des Retikulozyten-Index hat eine ausgezeichnete Genauigkeit, die man sich bei gesunden Probanden und bei Patienten mit Retikulozytose zunutze macht.

2.2.2.3 Retikulozytenindizes

An den gekugelten Retikulozyten werden in einem Arbeitsgang das individuelle Volumen an Einzelzellen (20 000) sowie die intrazelluläre Hämoglobinkonzentration gemessen.

Weitere Indizes werden aus den verschiedenen gemessenen Parametern errechnet.

CHCMr [g/dl] = mittlere Hämoglobinkonzentration der Gesamtretikulozyten

CHCMr wird in den ADVIA-120 Systemen direkt gemessen.

CHr [pg] = mittlerer Hämoglobingehalt der Retikulozyten.

CHr wird berechnet aus dem direkt gemessenen MCVr und dem direkt gemessenen CHCMr.

$$\text{CHr} = \text{MCVr} \cdot \text{CHCMr}$$

Ret Hb[g/l] = Hämoglobingehalt der Gesamtreikulozyten

$$\text{Ret Hämoglobin} = \text{Retikulozytenzahl} \cdot \text{CHr}$$

Quotient von Hämoglobin der reifen roten Blutzellen / ret Hb

Beide Größen werden im ADVIA-System direkt gemessen (Brugnara 2000).

2.2.2.4 Subklassifikation unterschiedlicher Reifungsstadien mittels Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode wird der Reifungsgrad der Retikulozyten durch arbiträre Aufteilung in 3 Fraktionen entsprechend der Fluoreszenzintensität ermittelt (Brugnara *et al.* 2000):

Laserstreulichtmessung der Retikulozyten:

Die Retikulozytenanalytik beruht auf einer Doppelwinkel-Laserstreulicht-Messung an isovolumetrisch gekugelten Retikulozyten in Kombination mit Messung der Absorption, wodurch die Trennung von Erythrozyten von den RNA-gefärbten Retikulozyten erfolgt, sowie eine Subklassifikation unterschiedlicher Reifungsstufen.

Mit der Lasertechnologie ist im ADVIA 120 der Firma Bayer System die gleichzeitige Messung von Volumen und Hämoglobinkonzentration der reifen Blutzellen und der Retikulozyten möglich. Weiterhin hat die Streulichtmessung den Vorteil, dass das Volumen und die Hämoglobinkonzentration individuell gemessen werden und somit in keiner Abhängigkeit voneinander stehen.

Die Messung erfolgt mit Hilfe des Mantelstromprinzips, der so genannten hydrodynamischen Zellfokussierung, indem man die Blutzellen hintereinander, einzeln durch einen Messkanal leitet. Ein auf Partikelgröße fokussierter Laserstrahl verursacht je nach Partikelbeschaffenheit ein charakteristisches Streulicht, welches in bestimmten Winkeln von Detektoren aufgefangen wird.

Über das Kleinwinkelstreulicht werden Informationen über Zellgröße und Volumen getroffen und über das Großwinkelstreulicht werden Aussagen über die interzelluläre Beschaffenheit dargestellt.

2.2.2.5 Heparin

Die Bestimmung von Heparin im Urin wurden im Labor von Prof. T. Ganz und Nemeth (Los Angeles, USA) durchgeführt. Die Proben wurden mit HCl angesäuert und tiefgefroren verschickt. Die Analysen erfolgten mit einem Immunoassay (Nemeth et al. 2004).

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der in der Studie gewonnenen Daten erfolgte in zwei Schritten: Im ersten Schritt werden Verteilungskennwerte und die einzelnen Parameter deskriptiv dargestellt. Hierzu werden der Median (50%-Perzentil), 25%- und 75%-Perzentile angegeben. Im zweiten Schritt werden die Lageunterschiede von Zentralitätsparameter in den einzelnen Stichproben statistisch mit nicht-parametrischen Testverfahren beurteilt. Die Nichtparametrische oder auch die genannte Verteilungsfreie Tests setzen keine Normalverteilung voraus und sind vor allem robuster gegen Varianzheterogenität. Hierzu zählt der Friedman-Test.

2.3.1 Definition des Medianwertes

Der Medianwert (oder Zentralwert) bezeichnet eine Grenze zwischen zwei Werten, da eine Gaußverteilung bei unseren Variablen nicht gegeben war.

Definitionsgemäß ist der Median der mittlere Wert einer nach Größe sortierten Rangreihe von Einzelwerten. D.h. der Medianwert ist der mittlere Wert einer Zahlenreihe, wenn eine ungerade Zahl von Beobachtungen vorliegt, oder das arithmetische Mittel der beiden mittleren Werte, wenn es um eine gerade Anzahl von Beobachtungen handelt, somit entspricht er dem 50 Perzentile.

Im Gegensatz zum arithmetischen Mittel ist der Median robust gegenüber Ausreißern in der Verteilung.

2.3.2 Definition der Perzentile P₂₅ – P₇₅

Wenn eine Gruppe von Messdaten der Größe nach geordnet ist, dann heißen die Werte, die diese Daten in hundert gleiche Teile aufteilen, Perzentile P₂₅ – P₇₅ umfasst demzufolge 50% der Stichproben.

2.3.3 Signifikanz

In der Statistik werden die Unterschiede zwischen Messgrößen oder Variablen als signifikant bezeichnet, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass sie durch Zufall so zustande kommen würden, nur gering ist. Damit weist Signifikanz auf einen möglichen Zusammenhang zwischen den Messgrößen hin.

Da eine Normalverteilung der Daten nicht vorlag, erfolgte die schlussendliche statistische Endauswertung mit Hilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Testes für die Paardifferenzen. Alle Parameter wurden im Vergleich zum Ruhewert gegenüber sofort, einen Tag und 3 Tage nach dem Marathonlauf auf Signifikanz getestet. Der Vergleich zwischen der Subgruppe mit Eisenmangel gegenüber der Subgruppe ohne Eisenmangel erfolgte mittels ANOVA mit Messwiederholung, welche gegenüber der Verletzung der Voraussetzungen insbesondere dem Fehler einer Normalverteilung relativ robust ist.

Folgende Irrtumswahrscheinlichkeiten wurden den Signifikanzniveaus nach Adjustierung des α -Fehlers mittels Bonferroni- Korrektur zugrunde gelegt.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

Nicht signifikant = n.s., wenn $p \geq 0,05$

2.3.4 Friedman-Test

Der Friedman-Test ist ein statistischer Test zur Untersuchung von drei oder mehr gepaarten Stichproben auf Gleichheit des Lageparameters. Er zählt zu den nicht-parametrischen Verfahren, weil er keine Normalverteilung der Daten in den Stichproben voraussetzt.

Er ist eine Erweiterung des Vorzeichen-tests auf die Anwendung für mehr als zwei Stichproben und eine parameterfreie Alternative zur ANOVA mit wiederholten Messungen. Benannt wurde der Test nach dem amerikanischen Wirtschaftswissenschaftler Milton Friedman, der ihn entwickelt hat und 1937 in der Fachzeitschrift Journal of the American Statistical Association veröffentlichte.

2.3.5 Box-Whiskey-Plot (Kastengrafik)

Ist ein Diagramm, das zur graphischen Darlegung einer Reihe numerischer Daten verwendet wird.

Er fasst dabei verschiedene robuste Streuungs-, Lagemaße und Schiefe in einem Diagramm zusammen. Das Diagramm wird in Form eines Rechtecks und zweier Linien dargestellt (Whisker oder Antennen), das durch einen Strich durchzogen ist. Folgende Werte kann man von dem Diagramm ablesen: Median, die zwei Quartile und die beiden Extremwerte, die auch als Fünf-Punkte-Zusammenfassung bezeichnet werden.

Hierbei stellt die „Box“ den Bereich zwischen dem 25- und 75-Perzentile dar. Der innerhalb des Kastens durchgezogene Strich ist der Medianwert. Die Antennen (Whisker) sind der Bereich zwischen der 5- und 95-Perzentile.

3 Ergebnisse

3.1 Ruhewerte

Tabelle 2: Hämatologische Parameter im Ruhezustand der Marathon-Läuferinnen (n =27)

Variable	RBC	HKT	Hb	MCH	MCV	MCHC	Ferritin	s TfR	s TfR-Index
Einheit	T/l	%	g/l	pg	fl	g/dl	µg/l	mg/l	
Referenzwerte	3,74-4,80	0,34-0,44	113-145	27,3-33,0	83,2-99,8	31,8-34,9	10-280	0,81-1,75	0,41-1,25
1	4,44	38,5	12,8	28,8	86,8	33,2	35	1,45	0,94
2	4,34	39,8	13,3	30,7	91,9	33,4	18	0,99	0,79
3	4,31	39	13,1	30,4	90,6	33,6	28	1,41	0,97
4	4,25	39,7	13,5	31,7	93,4	33,9	41	1,16	0,72
5	4,19	35,9	12,4	29,7	85,7	34,6	19	1,05	0,82
6	4,31	41	14,1	32,6	95,1	33,9	18	0,95	0,76
7	4,45	41,4	13,7	30,9	93,2	33,9	52	1,3	0,76
8	4,44	39,3	13,2	29,7	88,4	33,9	17	1,28	1,04
9	4,55	38,3	13,5	29,7	84,1	33,9	16	1,2	1
10	4,25	35,3	12,8	30,2	88,2	33,9	18	1,29	1,03
11	4,7	36,6	13,9	29,5	84,7	33,9	24	1,05	0,76
12	4,04	37,6	12,1	30	90,4	33,9	29	1,16	0,79
13	3,92	37,3	12,4	31,7	95,9	33,9	26	1,45	1,02
14	4,26	38,7	12,6	29,7	87,7	33,9	22	1,2	0,89
15	4,28	37,6	13	30,3	90,4	33,9	17	1,34	1,09
16	4,04	38,2	12,8	31,7	93,1	33,9	14	1,16	1,01
17	4,23	41,9	12,6	29,8	90,3	33,9	16	1,25	1,04
18	4,75	41,9	14,2	29,9	88,2	33,9	23	1,15	0,84
n ohne Fe-Mangel	18	18	18	18	18	18	18	18	18
Median	4,3	38,6	13,1	30,1	90,4	33,7	21	1,2	0,92
25-Perzentile	4,23	37,6	12,6	29,7	87,7	33,2	17	1,15	0,79
75-Perzentile	4,44	39,8	13,5	30,9	93,1	34,2	28	1,3	1,02
19	4,35	37,8	12,8	29,3	86,9	33,8	13	1,68	1,51
20	4,73	40,3	13,3	28,1	85,2	33	7	1,35	1,6
21	4,55	37,1	12,1	26,6	81,5	32,6	5	1,81	2,59
22	3,83	36,9	12,3	32,1	96,2	33,3	17	1,8	1,46
23	4,21	38,4	13	30,9	91,7	33,9	16	1,75	1,45
24	4,47	37,9	12,7	28,4	84,8	33,5	10	1,91	1,91
25	4,03	36,9	12	29,8	91,7	32,5	5	1,41	2,02
26	4,48	40,2	13,3	29,7	89,7	33,1	7	1,76	2,08
27	4,8	41,6	14,1	29,4	86,7	33,9	10	1,84	1,84
n mit Fe-Mangel	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Median	4,47	37,9	12,8	29,4	86,9	33,3	10	1,76	1,84
25-Perzentile	4,21	37,1	12,3	28,4	85,2	33	7	1,68	1,51
75-Perzentile	4,55	40,2	13,3	29,8	91,2	33,8	13	1,81	2,02
n Gesamt	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Median	4,31	38,4	13	29,8	89,7	33,6	17	1,3	1,02
25-Perzentile	4,21	37,5	12	29,5	86,7	33,1	13	1,16	0,82

75-Perzentile	4,48	39,5	13,5	30	91,9	33,9	24	1,68	1,51
----------------------	------	------	------	----	------	------	----	------	------

Im oberen Teil der Tabelle sind die Einzelwerte der Läuferinnen (n=1-18) ohne Eisenmangel dargestellt. Im unteren Teil der Tabelle finden sich die Einzelwerte der Läuferinnen (n=19-27) mit Eisenmangel. Als Kriterium für einen Eisenmangel galt ein TfR-Index von > 1,25.

3. 2 Medianwerte und Perzentile des roten Blutbildes

(Messungen vor, sofort, 1 Tag nach und 3 Tage nach dem Marathon)

Tabelle 3: Medianwerte und Perzentile des roten Blutbildes

	Mess-zeitpunkt	Gesamtgruppe				FE-Mangel			Kein FE-Mangel		
		Median	25%	75%		Median	25%	75%	Median	25%	75%
1	Erys T/I	vor	4,31	4,21	4,48	4,47	4,21	4,55	4,30	4,23	4,44
		sofort nach	4,35	4,21	4,64	4,49	4,28	4,79	4,34	4,15	4,52
		1 Tag nach	4,25**	3,98	4,36	4,36	4,02	4,53	4,22	3,98	4,34
		3 Tage nach	4,11***	3,93	4,31	4,20	4,05	4,37	4,05	3,93	4,27
2	Hb g/dl	vor	13,3	12,9	13,8	13,2	12,9	13,4	13,4	12,9	13,9
		sofort nach	13,4	12,7	14,2	12,8	12,7	14,2	13,4	12,7	14,1
		1 Tag nach	12,9**	12,3	13,7	13,0	12,1	13,2	12,9	12,4	13,7
		3 Tage nach	12,8***	12,1	13,4	12,8	12,5	13,2	12,8	12,1	13,6
3	Hkt %	vor	38,4	37,5	39,9	37,9	37,1	40,2	38,6	37,6	39,8
		sofort nach	38,4	36,8	41,4	38,4	37,0	41,4	38,4	36,5	40,8
		1 Tag nach	37,6**	36,8	39,5	37,1	36,7	39,7	37,7	37,1	38,9
		3 Tage nach	37,7**	35,6	38,4	37,8	37,2	38,1	37,4	35,4	38,4
4	MCV fl	vor	89,7	86,7	91,9	86,9	85,2	91,2	90,4	87,7	93,1
		sofort nach	88,8**	85,9	91,1	87,8	83,2	90,0	88,9	87,4	91,4
		1 Tag nach	90,0*	85,8	92,9	88,3	84,4	91,5	91,1	88,6	93,3
		3 Tage nach	89,3	87,2	93,8	88,3	86,3	93,1	89,8	88,1	93,8
5	MCH pg	vor	29,8	29,5	30,9	29,4	28,4	29,8	30,1	29,7	30,9
		sofort nach	30,0	29,2	30,6	29,1	27,7	30,0	30,3	29,5	30,8
		1 Tag nach	30,0	29,2	30,8	29,2	28,0	30,0	30,3	29,7	30,9
		3 Tage nach	30,7	29,4	31,4	29,7	28,1	30,8	30,7	30,1	31,4
6	MCHC g/dl	vor	33,6	33,1	33,9	33,3	33,0	33,8	33,7	33,2	34,2
		sofort nach	33,7	33,2	34,4	33,3	33,0	33,9	34,0	33,4	34,7
		1 Tag nach	33,3	32,8	34,1	33,6	32,6	34,0	33,3	32,8	34,1
		3 Tage nach	34,0	33,1	34,5	33,3	33,1	34,1	34,5	33,8	34,8
7	CHCM g/dl	vor	34,3	33,7	35,0	34,2	33,7	34,9	34,4	33,8	35,2
		sofort nach	34,4*	33,4	35,0	34,1	33,3	34,4	34,7	33,5	35,3
		1 Tag nach	34,0*	33,3	34,8	34,3	33,1	34,7	34,0	33,4	34,8
		3 Tage nach	34,2	33,6	35,2	33,6	33,2	34,9	34,4	33,9	35,2
8	% Hypochrome Erys	vor	0,20	0,10	0,30	0,50	0,20	0,50	0,10	0,10	0,20
		sofort nach	0,20	0,10	0,60	0,70	0,10	0,90	0,20	0,10	0,30
		1 Tag nach	0,20	0,10	0,40	0,30	0,20	0,80	0,20	0,10	0,30

	3 Tage nach	0,20	0,10	0,50	0,50	0,20	1,10	0,20	0,10	0,30
--	-------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Erythrozytenzahl: Der Median der Erythrozytenzahl lag vor dem Marathon bei 4,31 T/l, sofort nach der Belastung stieg er auf 4,35 T/l, ein Tag danach fiel der Median auf 4,25 T/l ab ($p < 0,01$) und drei Tage nach dem Marathon fiel er weiter auf 4,11 T/l ab ($p < 0,001$).

Hämoglobin: Die Hämoglobinwerte der Athletinnen lagen im Median vor dem Marathon bei 13,3 g/dl, sofort nach Belastung bei 13,4 g/dl. Der Median des Hämoglobin fiel am ersten Tag nach dem Marathon auf 12,9 g/dl ($p < 0,01$) und drei Tage danach auf 12,8 g/dl ab ($p < 0,001$).

Hämatokrit: Der Median der Hämatokritwerte betrug vor Beginn des Marathons 38,4%, bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon stagnierte der Median bei 38,4%, ein Tag nach dem Marathon fiel der Median auf 37,6 % ab ($p < 0,01$) und drei Tage danach zeigte der Median auf 37,7% ($p < 0,01$).

MCV= Das mittlere Zellvolumen: Der Median der MCV betrug vor Beginn des Marathons 89,7 fl, bei der Blutentnahme sofort nach dem Marathon betrug der Median 88,8 fl ($p < 0,01$), ein Tag nach Belastung stieg der Median auf 90,0 fl ($p < 0,05$) und bei der vierten Blutentnahme am 3. Tag nach dem Marathon fiel er auf 89,9 fl ab.

MCH= Das mittlere Hämoglobingewicht: Der Median der MCH betrug vor Beginn des Marathons 29,8 pg, sofort danach stieg er auf 30,0 pg ($p < 0,05$), ein Tag nach dem Marathon stagnierte der Median bei 30,0 pg und drei Tage nach dem Marathon stieg der Median auf 30,7 pg auf.

MCHC= Die mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten: Der Median der MCHC betrug vor Beginn des Marathons 33,6 g/dl. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon lag der Median bei 33,7 g/dl, bei der Blutentnahme am ersten Tag nach der Marathon fiel der Median auf 33,3 g/dl ab und bei der Entnahme drei Tage nach dem Marathon stieg der Median auf 34,0 g/dl auf.

CHCM= Mittelwert Hämoglobingehalt der Erythrozyten: Der Median der CHCM lag vor dem Marathon bei 34,3 g/dl, sofort nach dem Marathon lag der Median bei 34,4 g/dl ($p < 0,05$), ein Tag nach dem Marathon fiel der Median auf 34,0 g/dl ($p < 0,05$) ab und drei Tage danach lag er bei 34,2 g/dl.

% Hypochrome Erythrozyten: Der Median der hypochromen Erythrozyten in % betrug vor Beginn des Marathons 0,20% und im Laufe der Messungen sofort nach dem Marathon, ein Tag und drei Tage danach stagnierte der Wert bei 0,20%.

3.3 Medianwerte der Retikulozytenparameter und die Perzentile vor und nach dem Marathonlauf

Tabelle 4: Medianwerte der Retikulozytenparameter und die Perzentile vor und nach dem Marathonlauf

9	Retikulozyten (absolut) G/l	vor	58,2	53,8	69,4	62,9	57,2	69,4	57,7	49,8	66,2
		sofort nach	64,8*	59,2	78,3	66,4	61,3	79,5	63,7	59,2	76,1
		1 Tag nach	62,9	51,9	70,6	56,1	46,8	67,9	64,8	53,6	70,6
		3 Tage nach	58,3	47,2	71,2	55,9	46,2	60,7	61,5	47,8	71,8
10	MCVr fl	vor	105	103,3	106,9	105	103	107	105,3	103,4	106,8
		sofort nach	104,5*	102,2	105,4	104,7	103	105	104,3	102,1	105,4
		1 Tag nach	105,8	104,4	108,4	105,8	104	108	106	104,7	108,3
		3 Tage nach	104,6	103,8	106,5	104,9	104	110	104,5	103,9	106,4
11	CHCMr g/dl	vor	31,1	29,7	32,7	29,7	29,5	31,1	31,5	30,5	32,7
		sofort nach	31,4	30,7	32,6	30,8	30	31,4	31,8	31,3	33,1
		1 Tag nach	30,6*	30,3	32	30,3	29,1	30,6	31,3	30,4	32,3
		3 Tage nach	30,8*	29,8	32,1	29,8	28,8	30,8	31,2	30,3	32,1
12	CHr pg	vor	32,7	31,9	34	32,4	30,8	33,2	33	32,4	34,3
		sofort nach	32,7	32,1	34	32,4	30,8	33,8	33,2	32,4	34,1
		1 Tag nach	32,7	31,5	33,9	32,4	30,8	33,4	32,8	32,3	33,9
		3 Tage nach	32,6	31,5	33,9	32,5	30,6	32,7	32,7	32,2	33,9
13	retHb g/l	vor	1,97	1,69	2,28	2,06	1,85	2,28	1,86	1,64	2,22
		sofort nach	2,1*	1,97	2,56	2,24	1,97	2,41	2,08	2,02	2,56
		1 Tag nach	2,09*	1,67	2,29	1,86	1,54	2,2	2,13	1,76	2,29
		3 Tage nach	1,89	1,52	2,33	1,73	1,41	2,08	2,01	1,57	2,34
14	Ratio MCVr / MCV mature Celles	vor	1,17	1,16	1,19	1,18	1,17	1,19	1,17	1,16	1,19
		sofort nach	1,18	1,16	1,2	1,2	1,17	1,23	1,17	1,16	1,19
		1 Tag nach	1,18	1,16	1,2	1,2	1,18	1,22	1,18	1,15	1,19
		3 Tage nach	1,17	1,16	1,19	1,18	1,17	1,2	1,16	1,15	1,18
15	Ratio rbcHb / retHb	vor	66,5	57,8	77,3	61,2	57,8	68,1	69,3	59,7	79,0
		sofort nach	60,4*	51,6	66,2	58,8	51,6	61,6	61,3	53,2	66,2
		1 Tag nach	61,1	51,3	73,1	66,8	51,3	86,9	60,4	55,5	71,8
		3 Tage nach	63,4	56,2	81,2	70	61	95,6	62,1	56,2	79,8

Retikulozyten (absolut): die absolute Retikulozytenzahl: Der Median der Retikulozytenzahl betrug vor Beginn des Marathons 58,2 G/l. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon stieg die Absolute Retikulozytenzahl auf 64,8 G/l ($p < 0,05$). Bei der dritten Blutentnahme ein Tag nach dem Marathon fiel Sie auf 62,9 G/l ab und der vierten Blutentnahme drei Tage danach fiel sie weiter auf 58,3G/l, wobei er den Ausgang Wert entspricht. was dem Ausgangswert entsprach.

MCV r = Das mittlere Retikulozytenvolumen: Der Median des mittleren Zellvolumens der Retikulozyten betrug vor Beginn des Marathons 105,0 fl. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon fiel das MCVr auf 104,5 fl ab ($p < 0,05$). Ein Tag nach dem Marathon stieg der Wert auf 105,8 fl und drei Tage danach fiel er wieder auf 104,4 ab.

CHCMr = Die mittlere Zellhämoglobinkonzentration der Retikulozyten: Der Median der MCHMr betrug vor Beginn des Marathons 31,1 g/dl, sofort danach 31,4 g/dl, ein Tag nach dem Marathon fiel der Median auf 30,6 g/dl ($p < 0,05$) ab und drei Tage danach zeigte er den Wert von 30,8 g/dl ($p < p, 05$) gezeigt.

CHr = Der mittlere Hämoglobingehalt der Retikulozyten (pg): Der Median der CHr veränderte sich von vor dem Marathon bis drei Tage danach nicht. Er blieb bei 32,7 pg.

ret Hb = Hämoglobingehalt der Gesamtrekulozyten: Die Hämoglobinwerte der Retikulozyten der Athletinnen lag im Median vor dem Marathon bei 1,97 g/l, sofort nach Belastung stieg der Wert auf 2,10 g/l ($p < 0,05$). Ein Tag nach dem Marathon verändert sich der Median nicht und er betrug den Wert von 2,09 g/l ($p < 0,05$). Bei der letzten Blutentnahme drei Tage nach dem Marathon fiel der Median auf 1,89 g/l ab.

Ratio MCVr/MCV = Das Verhältnis MCVr zu MCV: Der Median der Ratio MCVr/MCV betrug vor Beginn des Marathons 1,17. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon betrug der Median 1,18. Ein Tag nach dem Marathon stagnierte der Median bei 1,18 und drei Tage danach betrug er wieder 1,17.

Ratio rbcHb/ret Hb = Das Verhältnis rbcHb zu ret Hb: Der Median der Ratio rbcHb/ret Hb betrug vor dem Marathon 66,5. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon fiel der Median auf 60,4 ab ($p < 0,05$). Ein Tag nach dem Marathon zeigte der Median den Wert von 61, ein und drei Tage danach stieg der Median auf 63,4.

3.4 Mediane und Perzentile der Retikulozyten nach der Floureszenzintensität (%) vor und nach dem Marathonlauf

Tabelle 5: Mediane und Perzentile der Retikulozyten nach der Floureszenzintensität (%) vor und nach dem Marathonlauf

16	LFR %	Vor	88,8	85	90,3	89,1	84,5	90,3	88,7	86,7	89,8
		sofort nach	85,4***	80,7	88	86,3	80,3	87,1	85,3	81,3	88,1
		1 Tag nach	85,9***	82,8	89,7	87,5	80,3	89,8	85,9	85,1	88,3
		3 Tage nach	83,8***	81,5	88,6	81,5	80,7	88,1	85,7	83,2	88,6
17	MFR %	Vor	10	9	12,2	9,5	8,5	12,7	10,1	9,0	11,3
		sofort nach	12,3***	10,3	15,8	10,5	10,4	15,8	12,5	10,3	15,5
		1 Tag nach	11,9***	8,6	13,4	9,6	7,8	13,6	12	9,8	13,2
		3 Tage nach	13,3***	10,1	14,7	13,9	10,9	14,7	12,3	10,1	14,4
18	HFR %	Vor	1,3	1	1,9	1,3	1	1,9	1,4	1,0	1,9
		sofort nach	2,4***	1,5	3,3	2,6	2,4	3,4	2,1	1,2	3,2
		1 Tag nach	2,0*	1,2	3,3	3,3	1,4	5,5	1,9	1,2	2,4
		3 Tage nach	2,2*	1,1	3,6	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8

LFR % = niedrig absorbierende Retikulozyten: Der Median der niedrig absorbierenden Retikulozyten betrug vor dem Marathon 88,8%. Bei der zweiten und dritten Blutentnahme sofort und ein Tag nach dem Marathon fiel der Median auf 85,4% und 85,9 ($p < 0,001$). Drei Tage nach dem Marathon fiel der Median auf 83,8% ($p < 0,001$) ab.

MFR % = mittelstark absorbierende Retikulozyten: Der Median der mittelstark absorbierenden Retikulozyten betrug vor dem Marathon 10%. Bei der zweiten Blutentnahme sofort nach dem Marathon stieg der Median auf 12,3% ($p < 0,001$). Bei der dritten Blutentnahme einen Tag nach dem Marathon betrug der Median 11,9% ($p < 0,001$). Drei Tage nach dem Marathon stieg der Median auf 13,3% ($p < 0,001$).

HFR % = stark absorbierende Retikulozyten: Der Median der stark absorbierenden Retikulozyten betrug vor dem Marathon 1,3%. Bei der zweiten Blutentnahme stieg der Median auf 2,4% ($p < 0,001$). Einen Tag nach dem Marathon fiel der Median auf 2% ($p < 0,05$) ab. Drei Tage nach dem Marathon stieg der Median auf 2,2% ($p < 0,05$).

In den rechten 6 Spalten wurden dieselben statistischen Methoden wie beim Gesamt-kollektiv (n=27) angewandt.

Dabei wurde differenziert die Gruppe der Läuferinnen mit und ohne Eisenmangel getestet.

Unter diesen Gruppen gab es keinen Unterschied zwischen der Gruppe mit und der ohne Eisenmangel bei allen in dieser Tabelle getesteten Parametern.

3.5 Hepcidin-Ausscheidung im Harn

Tabelle 6: Hepcidin-Ausscheidung im Harn vor und nach dem Marathonlauf

		Median	25 Perzentile	75-Perzentile	
Hepcidin ng/mg Kreatinin	Vor	24	9	58	N=14
	sofort nach	39	19	82	N=12
	1 Tag nach	61***	31	123	N=14
	3 Tage nach	27	11	53	N=13

Der Hepcidinwert der Athletinnen lag im Median vor dem Marathon (2004) bei 24 ng/mg Kreatinin (N=14). Sofort nach dem Marathon stieg der Median von 24 auf 39 (n=12) an.

Ein Tag nach dem Marathon stieg der Wert weiter auf 61 ($p < 0,001$)(N=14) und drei Tage nach dem Marathon fiel der Median auf 27 (N=13) ab.

4 Diskussion

4.1 Zusammenhang zwischen Ausdauerleistungen und Eisenmangel

Sportliche Aktivitäten spielen in der heutigen Gesellschaft in industrialisierten Ländern für einen steigenden Anteil der Durchschnittsbevölkerung eine zunehmend wichtigere Rolle.

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Studien damit beschäftigt, die Auswirkung von physischer Belastung auf die Stoffwechselfvorgänge des menschlichen Körpers zu durchleuchten. Im Hinblick auf den Eisenstoffwechsel sind bereits diverse Veränderungen bekannt.

Eisen zählt zu den lebenswichtigen essentiellen Elementen des Menschen, dem im menschlichen Organismus beim Sauerstofftransport und in vielen weiteren biochemischen Prozessen (Thomas 2005, Wick *et al.* 2002), bedeutsame Funktionen zukommen.

Eisenstoffwechselstörungen, vor allem Eisenmangel zählt zu den häufigsten Nährstoffmängeln bei Menschen (Wick *et al.* 2002). Frauen sind häufiger betroffen als Männer. Breit angelegte Untersuchungen wiesen in den USA für 11% der jungen Frauen einen Eisenmangel nach, bei 5% eine Eisenmangelanämie (Looker *et al.* 1997).

Eisenmangelsymptome äußern sich in allgemeinen und in spezifischen Symptomen. Zu den allgemeinen Symptomen zählen Müdigkeit, Schwäche, Kopfschmerzen und Schwindel, wogegen sich die spezifischen in Form von Stomatitis, Glossitis, chronischer Gastritis, Haarausfall und anderem manifestieren (Cook *et al.* 1986).

Der Eisenstoffwechsel ist ein wichtiger Faktor für die Gehirnfunktion, Lernen und das Erinnern (Gerlach *et al.* 1994). Brunner *et al.* untersuchten 1996 in einer Placebo-Doppelblindstudie den Einfluss einer Eisentherapie auf kognitive Funktionen bei nicht anämischen Probanden mit Eisenmangel. Durch die Eisentherapie verbesserten sich die Lern- und Gedächtnisleistungen. Weiterhin ist es wichtig, die besondere Wirkung des Eisenstoffwechsels auf die Immunität zu erwähnen, denn man findet bei Patienten mit Eisenmangel sehr oft einen Defekt in der Zellvermittelten Immunität, was häufig zu Durchfallserkrankung und Erkältung und Angriff von Krankheitserregern führt (Cook *et al.* 1986).

Die Interaktion von Eisenstoffwechsel und Immunsystem/Infektionen wurde ebenfalls von Weiss G. 2005 genauer beschrieben:

„Des Weiteren besitzt Eisen katalytische Funktion für die Bildung von hochtoxischen Hydroxylradikalen, die sowohl in der Immunantwort eine Rolle spielen, aber auch mit Gewebeschädigung im Rahmen chronisch inflammatorischer Prozesse assoziiert sind.

Eine stringente Kontrolle der Eisenhomöostase ist auch von zentraler Bedeutung in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten, zumal eine erhöhte Eisenverfügbarkeit bzw. eine Eisenüberladung des Immunsystems mit einer erhöhten Infektanfälligkeit und einem ungünstigen klinischen Verlauf von Infektionen assoziiert ist.

Die Kontrolle über die Eisenverfügbarkeit ist eines der entschiedensten Kriterien, die den Verlauf einer Infektion determinieren, weshalb Untersuchungen zu diesem komplexen Netzwerk zwischen Eisenhomöostase, Immunantwort und Mikroben nicht nur für das Verständnis der Zusammenhänge der Host-Pathogen-Interaktion optimieren, sondern auch für die Entwicklung neuer therapeutischer Optionen von größtem Interesse sind.“ (Weiß 2005).

Die körperliche Aktivität der Menschen wird durch Eisenmangelanämie beeinträchtigt (Cook *et al.* 1994).

Diverse Studien haben gezeigt, dass es durch Eisenmangelanämie selbst bei einer leichten Form zu einer Beeinträchtigung der Leistung kommt (Brownlie *et al.* 2002, Brownlie *et al.* 2004). Aus diesem Grunde neigen Sportler dazu, Eisen über Nahrungsergänzungsmittel zu supplementieren (Viteri *et al.* 1974).

Bei Ausdauersportlern wird sehr oft ein Eisenmangel (-anämie) beobachtet (Clement *et al.* 1984). Ein Eisenmangel tritt häufiger bei sportlichen Frauen als bei Männern auf (Clement *et al.* 1982). Die Hauptursachen des Eisenmangels bei Ausdauersportlern sind der erhöhte Eisenbedarf, der erhöhte Eisenverlust und die verminderte Eisenaufnahme (Clement *et al.* 1982). Es scheint, dass Ausdauersportler im Vergleich zu untrainierten Menschen über eine sehr beschleunigte Eiseneliminierung verfügen (Ehn *et al.* 1980). Außerdem gibt es diverse Hinweise auf vermehrte gastrointestinale Blutungen bei Langstreckenläufern, was zu Eisenmangel bei einigen Läufern führt (Nachtigall *et al.* 1996; Stewart *et al.* 1984).

Der im Sprachgebrauch von Laien verwendete Begriff „Sportanämie“ beschreibt einen im unteren Referenzbereich liegenden Hämoglobinwert (Casoni *et al.* 1985; Magnusson *et al.* 1984; Newhous und Clement 1988;). Dabei handelt es sich hier um eine Pseudoanämie, die durch ein überproportional vergrößertes Plasmavolumen des Athleten im Vergleich zum

gesamten Erythrozytenvolumen zustande kommt (Röcker 1978). Dies führt zu einer verminderten Konzentration der Erythrozyten und des Hämoglobins (Röcker *et al.* 1999), ist aber keine Anämie im eigentlichen Sinne. Die Veränderungen im Blutbild resultieren nicht aus dem Mangel an Körpereisen und die Sauerstofftransport, im Gegenteil, sie zeigt sogar eine Erhöhung (Magnusson *et al.* 1984). Die so genannte Sportanämie ist sehr schwer von dem Eisenmangel zu unterscheiden. Zur gesicherten Differenzialdiagnose der Ursache eines Eisenmangels sind daher weitere Parameter des Eisenstoffwechsels (z.B. Transferrinrezeptor ...etc.) immer heranzuziehen.

4.2 Rotes Blutbild (Tabelle 3)

Ein Routineparameter in der Sporthämatologie ist nach wie vor die Erythrozytenzahl. Deren Erhöhung oder Erniedrigung liefert wertvolle Hinweise zur Diagnostik.

Aber nicht nur die Erythrozytenzahl ist wichtig, sondern erst ihre Kombination mit den Hämatokrit- und Hämoglobinwerten und den Erythrozytenindizes gibt Aufschlüsse über die Art einer eventuell vorliegenden Anämie.

Der Flüssigkeitsaustausch zwischen Intravasalraum und Interstitium erfolgt durch Poren im Kapillarbereich, die einen Durchmesser von etwa 4 nm haben. Sie sind für Wasser und kleinmolekulare Substanzen durchgängig. Hochmolekulare Bestandteile, wie z. B. Proteine, oder korpuskuläre Bestandteile wie z. B. Erythrozyten, können den Intravasalraum durch diese Poren nicht verlassen. Im Ruhezustand sind der Flüssigkeitseinstrom und -ausstrom gleich hoch, folglich das Blutvolumen konstant.

Körperliche Aktivität bewirkt im Allgemeinen eine Erhöhung des Kapillardrucks und der Kapillarfläche und damit eine Filtration von Flüssigkeit in das Interstitium, bis ein neues Gleichgewicht erreicht ist. In diesem Falle kommt es zu einer Hämokonzentration, besonders bei kurzfristigen anaeroben körperlichen Leistungen.

Diese Verhältnisse können sich unter den Bedingungen bei und nach einem Marathonlauf auch so verändern, dass die Flüssigkeitsaufnahme in den Intravasalraum überwiegt und eine Hämodilution resultiert (Röcker 1978).

Die absolute Menge der im Blut zirkulierenden Erythrozyten wird durch die Erythropoese und den Erythrozytenabbau bestimmt. Beide Prozesse verlaufen so langsam, dass sie akut nicht wesentlich zu beeinflussen sind. Deshalb kann man kurzfristig die absolute Erythrozytenmenge als konstant annehmen. Blutspeicher, die sich, wie bei manchen Tieren (Pferd, Hund) bei körperlicher Leistung entleeren können, existieren beim Menschen nicht, sodass die

Veränderungen des roten Blutbilds hauptsächlich durch eine Hämokonzentration bzw. Hämodilution bedingt sind.

Bei kurzfristigen Leistungen (200-m-Lauf) z.B. stieg die Hämoglobinkonzentration um etwa 10-30 Prozent. Die Erythrozyten-Indizes verändern sich bei kurzfristigen Leistungen nicht. Eine Normalisierung erfolgt innerhalb von 30 Minuten.

Ausdauerleistungen haben einen anderen Effekt auf das rote Blutbild (Röcker 1978).

Von den in Tabelle 3 angegebenen Parametern des roten Blutbildes zeigte sich bis auf ein erniedrigtes MCV ($p < 0,05$) keine statistisch nachweisbare Veränderung direkt nach dem Marathonlauf.

Das verminderte MCV ist dabei ein Hinweis auf einen intraerythrozytären Wasserverlust.

An Tag 1 und Tag 3 nach dem Marathon zeigten sich erniedrigte Erythrozytenwerte ($p < 0,01$ bei Tag 1 und $p < 0,001$ bei Tag 3 nach dem Marathon), Hämoglobin ($p < 0,01$ bei Tag 1 und $p < 0,001$ bei Tag 3 nach dem Marathon) und Hämatokrit ($p < 0,01$).

Das spricht für eine Hämodilution, wie sie immer nach Ausdauerleistungen auftritt (Röcker 1978).

Diese Hämodilution ist auch noch eine Woche nach einem Marathon nachweisbar (Sawka *et al.* 2000). Erwartungsgemäß veränderten sich % Hypochrome Erythrozyten nicht.

4.3 Retikulozyten und Retikulozytenparameter

Im Gegensatz zum roten Blutbild wurde das Retikulozytensystem bei körperlichen Leistungen bisher weniger intensiv untersucht, zudem mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Analyse der Retikulozyten und Retikulozytenparameter sollte in der Sportmedizin vermehrt angewendet werden, nicht nur aus „Antidopinggründen“, sondern auch um den aktuellen Zustand der Sportler zu erfassen. Denn das Knochenmark von Athleten wird kontinuierlich stimuliert durch den gesteigerten Eisenmetabolismus infolge Hämolyse, inadäquate Ernährung etc., wie oben beschrieben. Der Organismus von Ausdauersportlern weist die Neigung zu funktionellem und echtem Eisenmangel auf. Die Analyse des Retikulozytensystems ist wichtig für die Diagnose, aber auch für das Monitoring nach einer Ernährungsumstellung oder einer Eisensubstitution (Banfi *et al.* 2006).

Bei einem Vergleich der Retikulozytenkonzentration zwischen Athleten und Nicht-Athleten wurden ähnliche Werte gefunden (Banfi *et al.* 2006; Paresotto *et al.* 2000), aber die Studien sind nicht aussagekräftig genug, um eine endgültige Entscheidung zu treffen. Myer *et al.* 2006

fanden Makroretikulozyten (MCVr größer 120 fl) häufiger bei Athleten als bei Nicht-Athleten. Diese Änderungen sind assoziiert mit einer erhöhten Erythropoese.

In der vorliegenden Studie stieg die Zahl der Retikulozyten in Bezug auf den Ruhewert von 58,2 G/l auf 64,8 G/l ($p < 0,05$) direkt nach dem Marathon. Einen Tag und drei Tage nach dem Marathon zeigten sich statistisch keine Veränderungen mehr. In einer Untersuchung bei Marathonläufern wurde zwar eine Erythropoetinerhöhung gefunden, jedoch keine Retikulozytenerhöhung bis 31 Stunden nach dem Marathon (Schwandt *et al.* 1991). Ebenso fanden Londorce und Allaire 1969 keine Veränderungen der Retikulozyten bei trainierten und untrainierten Personen nach körperlichen Leistungen. Über ähnliche Ergebnisse berichten Reinhardt *et al.* (1989). Selbst nach einem Ultra-Marathon über 6 Tage wurden keinerlei signifikante Veränderungen der absoluten bzw. prozentualen Retikulozyten gefunden (Fallon *et al.* 2002). Der Stichprobenumfang ($n=7$) war bei dieser Untersuchung allerdings sehr klein. Dagegen fanden Schmidt *et al.* 1989 erheblich erhöhte Retikulozytenwerte zwei Tage nach einer körperlichen Leistung.

Bei einem Ultra-Marathon über 1600 km wurden erhöhte Retikulozytenzahlen am Tag 4, Tag 11 und am Ende des Laufes gefunden (Fallon *et al.* 1999).

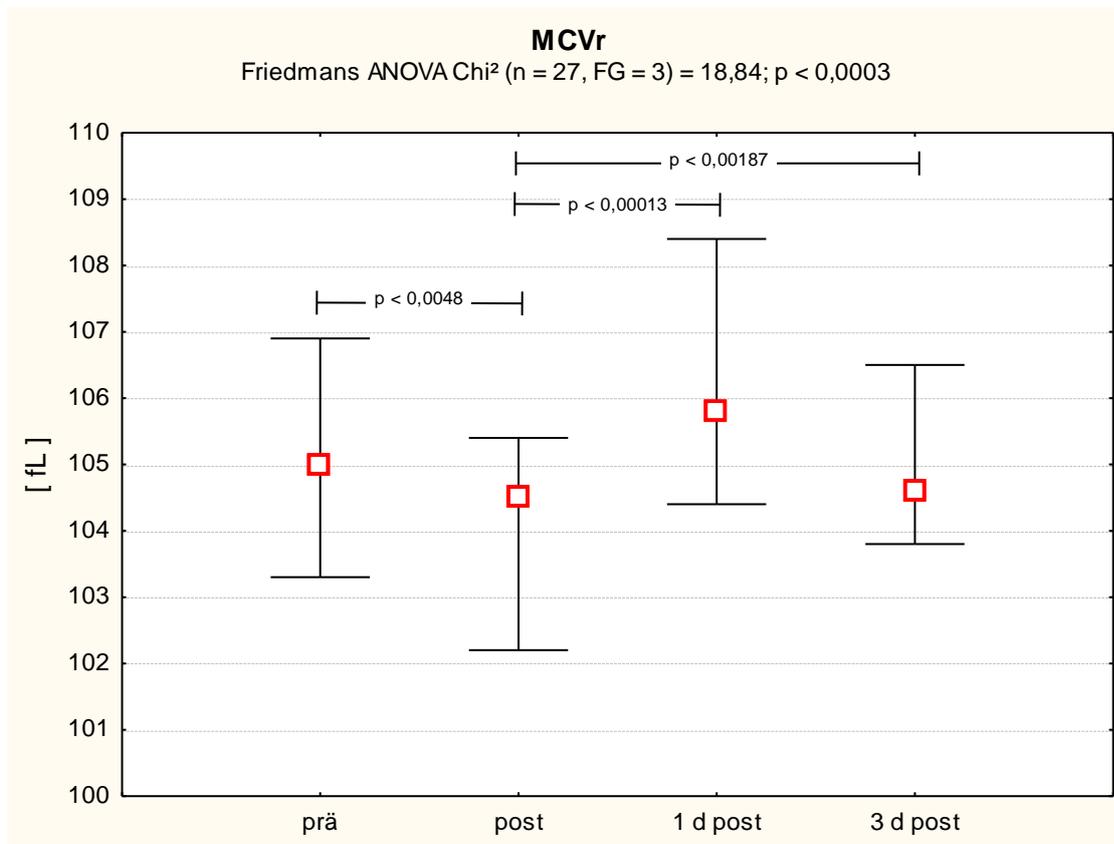
Seit Einführung der neueren Hämatologieanalysengeräte (z. B. ADVIA 120) können neben den Gesamretikulozyten zahlreiche Retikulozytenparameter analysiert bzw. berechnet werden. In der vorliegenden Studie wurden diese Parameter vor und nach dem Marathon bestimmt.

MCVr (mean cell volume Reticulocytes)

Das MCVr ist mit einem mittleren Volumen von 106 fl im Vergleich zum mittleren MCV der reifen Erythrozyten um etwa 20% größer. Das MCVr unserer Marathonläuferinnen lag vor dem Lauf mit 105 fl im Referenzbereich für ausdauertrainierte Frauen: 99,6 – 125,0 fl (Ashenden *et al.* 1999). Direkt nach dem Marathon wurde eine geringe Verminderung des MCVr ($p < 0,05$) gefunden, ein bis drei Tage nach einem Ultra-Marathon (Fallon *et al.* 2002) war das MCVr zu allen Zeitpunkten während 6 Tagen und bis nach dem Ultra-Marathon erniedrigt ($p < 0,005$).

Die Verminderung des MCVr spricht gegen die erwartete Hypothese, dass jüngere Zellen aus dem Knochenmark freigesetzt werden.

Abbildung 1: Das mittlere Retikulozytenvolumen



CHCMr (corpuscular hemoglobin concentration mean, g/dl)

Der Ruhewert unseres Kollektivs lag mit 31,1 g/dl oberhalb des von Ashenden (1999) angegebenen Referenzbereiches für trainierte Frauen (24,3-29,8 g/dl). 1 und 3 Tage nach dem Marathon zeigte sich eine geringe Erniedrigung ($p < 0,005$). Dagegen wurden nach einem Ultra-Marathon leichte Anstiege ($p < 0,005$) gefunden (Fallon 2002).

CHr (MCVr x CHCMr)

CHr gibt den mittleren Hämoglobingehalt des einzelnen Retikulozyten in pg an.

Der mediane Kontrollwert vor dem Marathon lag in der vorliegenden Studie mit 32,7 pg im Referenzbereich von 27,5-33,9 pg (Butarella et al.1995). CHr ist ein Marker zur Indikation für den Eisenbedarf der Erythropoese.

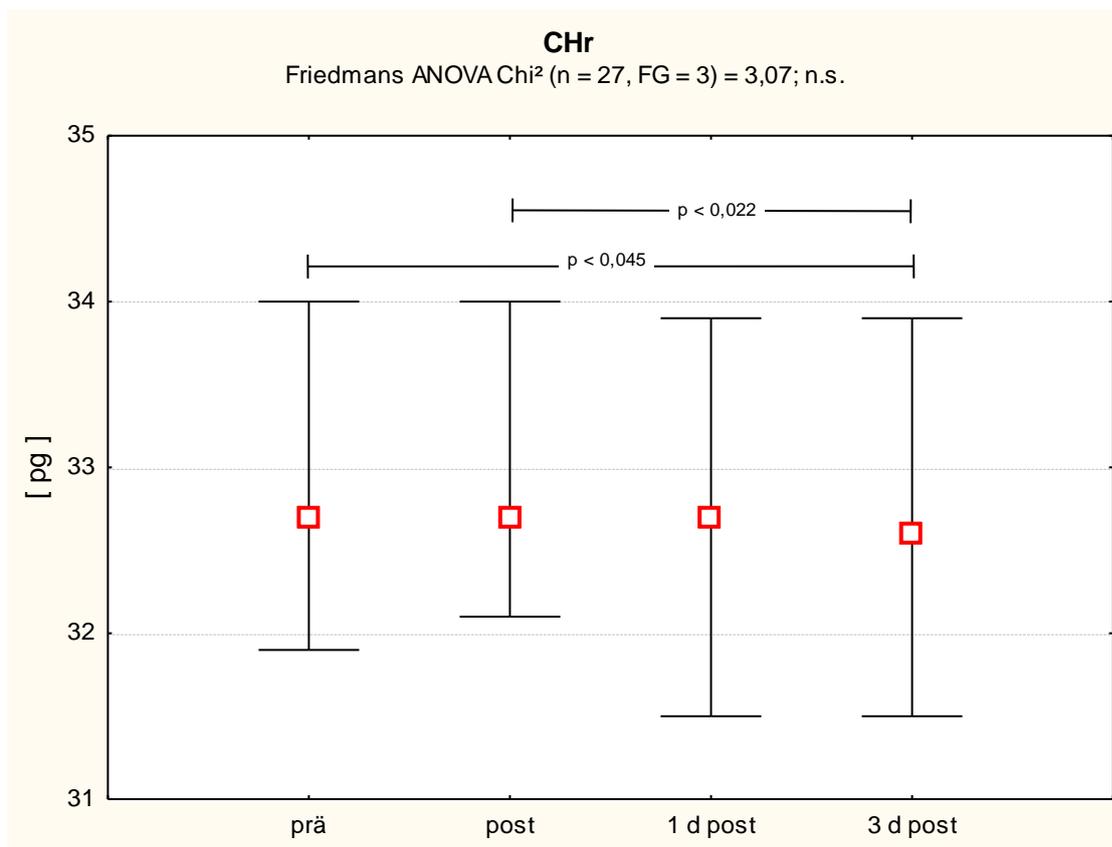
CHr blieb zu allen Zeitpunkten unverändert. Auch nach einem Ultra-Marathon blieb der CHr-Wert konstant (Fallon et al 2002).

Dies entspricht unseren Erwartungen, da der zelluläre Hämoglobingehalt (CHr) während der gesamten Lebenszeit der Retikulozyten konstant bleibt. Er verändert sich nur, wenn Membranschäden auftreten.

Ein besonderer Vorteil des CHr für die Analytik ist, dass CHr nicht durch inflammatorische Zustände beeinflusst wird, dies zeigt u. a. die Studie vom Markovic *et al.* 2007. Bei Patienten mit einer Anämie infolge chronischer Erkrankungen waren die Werte des CHrs identisch zu denen von Kontrollpersonen. Die Messung des CHr bleibt als quantitative Bestimmung des tatsächlichen für die Hämoglobinsation verwendeten Eisen bei Erkrankungen mit Akute-Phase-Reaktion oder bei anderen Grundkrankheiten unbeeinflusst. Die aktuelle Qualität der Erythropoese kann somit immer zeitnah verfolgt werden. Aus diesem Grunde wird der CHr als zuverlässiger Parameter im Rahmen der Eisenstoffwechselfdiagnostik und der Therapieüberwachung in der klinischen Praxis bestimmt. Wenn Patienten mit einem MCV > 100 fl ausgeschlossen werden, zeigt CHr im Vergleich zu Ferritin, Transferrinsättigung und MCV die höchste Sensitivität und Spezifität für die Vorhersage leerer Eisenspeicher im KM (Mast *et al.* 2002).

Die Stabilität des CHr hat sich bei unseren Untersuchungen auch nach Ausdauerleistung bestätigt. Zumindest bis zu drei Tagen nach der Belastung scheint der Eiseneinbau in die Retikulozyten nicht gestört zu sein.

Abbildung 2: Der mittlere Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHr)



Ret Hb (CHr x abs. Retikulozytenzahl, g/l)

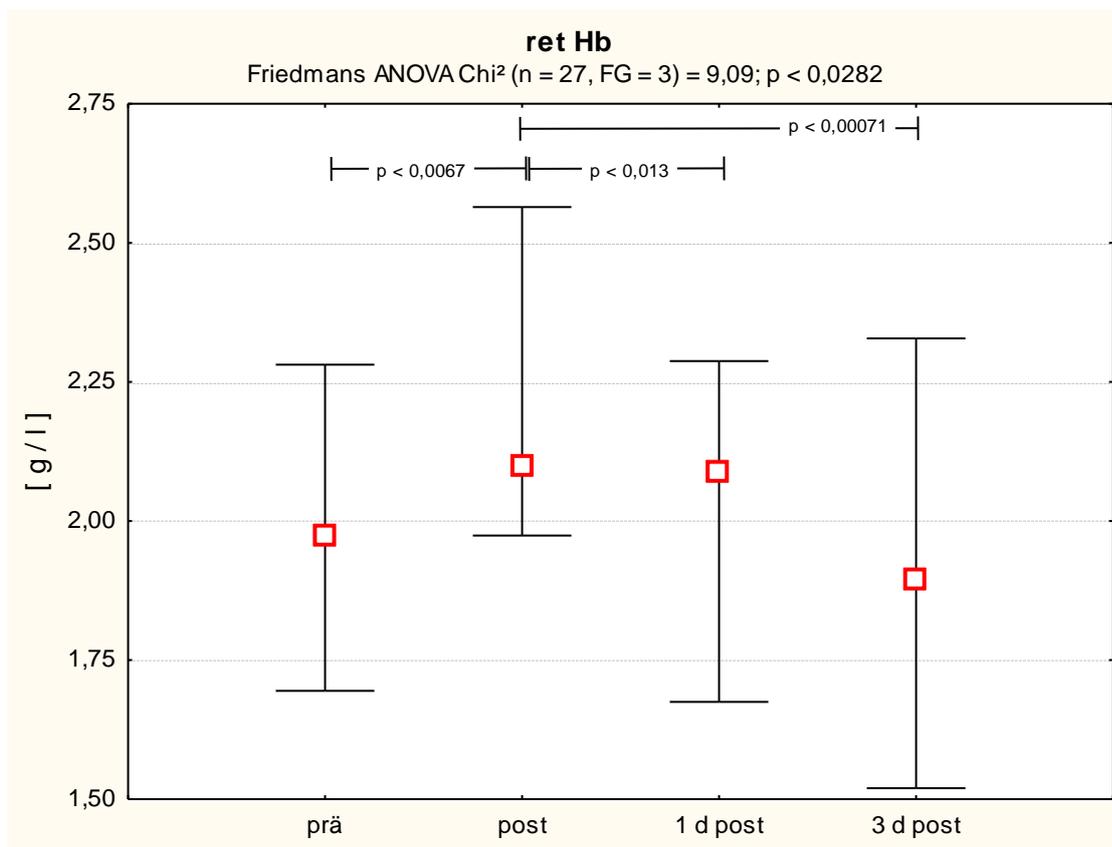
Ret Hb ist ein neuer Indikator der Knochenmarkaktivität basierend auf der Messung von CHr und der absoluten Retikulozytenzahl. Das Ret Hb gibt das Hämoglobin an, das in allen zirkulierenden Retikulozyten enthalten ist. Dieser Wert erlaubt es, den Gesamthämoglobingehalt des Blutes in zwei pathophysiologisch relevante Komponenten aufzuteilen, erstens das Ret Hb und zweitens das Hämoglobin der reifen Erythrozyten.

Ret Hb zeigt eine Veränderung der erythropoetischen Aktivität frühzeitig an (Brugnara *et al.* 1997).

Für Ret Hb wird ein Referenzbereich von 1,41 – 1,59 g/l bei Athleten angegeben (Parisotto *et al.* 2000), für Nicht-Athleten lag dieser Bereich bei 1,24 – 1,61 g/l. In der Höhe steigt das Ret Hb an.

Besonders stark ist der Anstieg nach EPO-Gabe, dabei wurden Werte bis zu 4,2 g/l gefunden. Bei den hier untersuchten Sportlerinnen stieg der Wert nach dem Marathon und ein Tag danach an ($p < 0,05$). Das spricht für eine erhöhte erythropoetische Aktivität infolge des Marathons.

Abbildung 3: Hämoglobingehalt der Gesamtrekulozyten



MCVr/MCV-Ratio

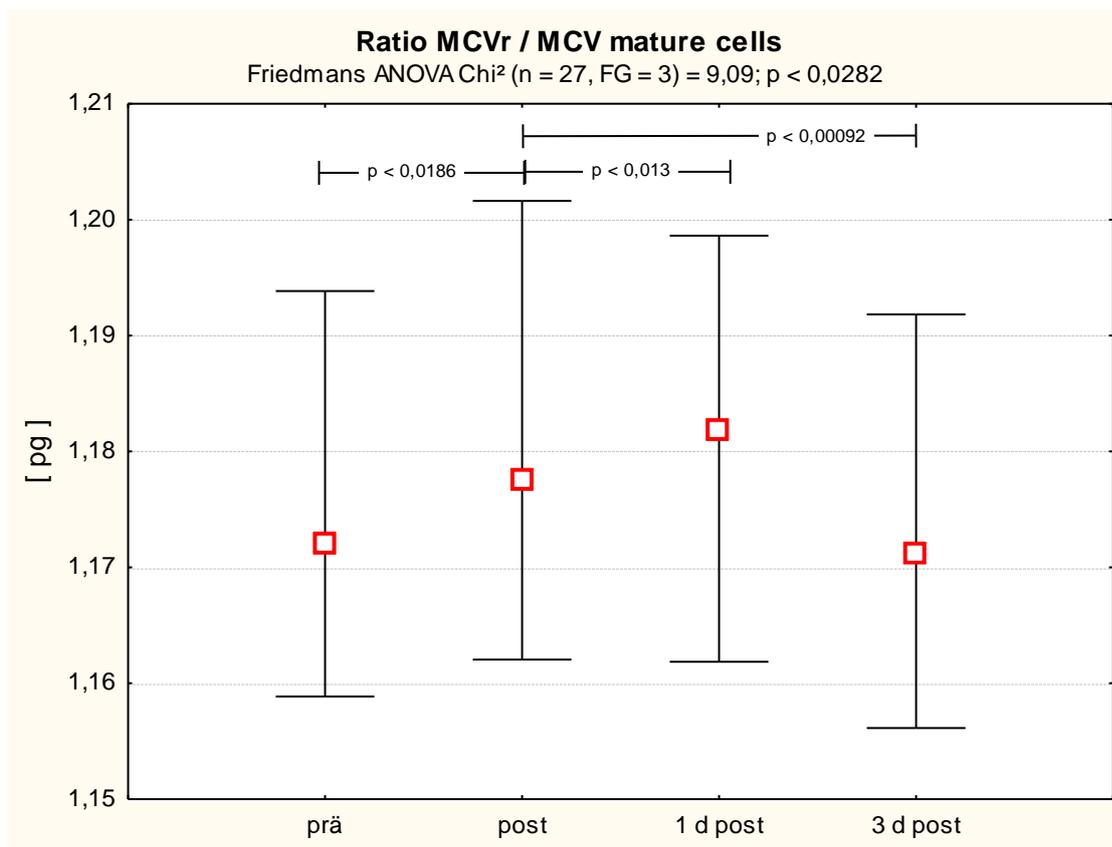
Diese Ratio wurde bereits klinisch angewendet. Da Retikulozyten größer als reife Erythrozyten sind, ist diese Ratio größer als 1, der normale Bereich für gesunde Personen liegt bei $1,24 \pm 0,06$, während Personen mit Eisenmangel im Mittel Werte von $1,35 \pm 0,08$ haben. Die Ratio ist < 1 bei der Behandlung von Megaloblastenanämie oder dem Beginn eines funktionellen Eisenmangels (Fallon *et al.* 2002).

Diese Ratio blieb in der vorliegenden Untersuchung zu allen Zeitpunkten konstant zwischen 1,17 bzw. 1,18, zeigte dagegen nach einem Ultra-Marathon eine Verminderung von 1,35 auf 1,28 ($p < 0,005$) gegenüber dem Ausgangswert (Fallon *et al.* 2002).

Bei diesem Ultra-Marathon verminderten sich, wie auch bei unserer Untersuchung sowohl das MCV der reifen Erythrozyten als auch das MCV der Retikulozyten. Allerdings zeigte das MCVr eine stärkere Verminderung.

Das könnte ein Hinweis auf eine Verminderung der Eisenverfügbarkeit für die Erythropoese nach sehr langen Ausdauerleistungen sein.

Abbildung 4: Das Verhältnis MCVr zu MCV



Ratio RBC-Hb / Ret Hb

Bei dieser Ratio war nach dem Marathonlauf eine deutliche Verminderung von 66,8 auf 60,4 ($p < 0,005$) abzulesen. Die Ratio RBC-Hb / Ret Hb ist ein Marker für die Überlebenszeit der Erythrozyten und den Grad der Hämolyse.

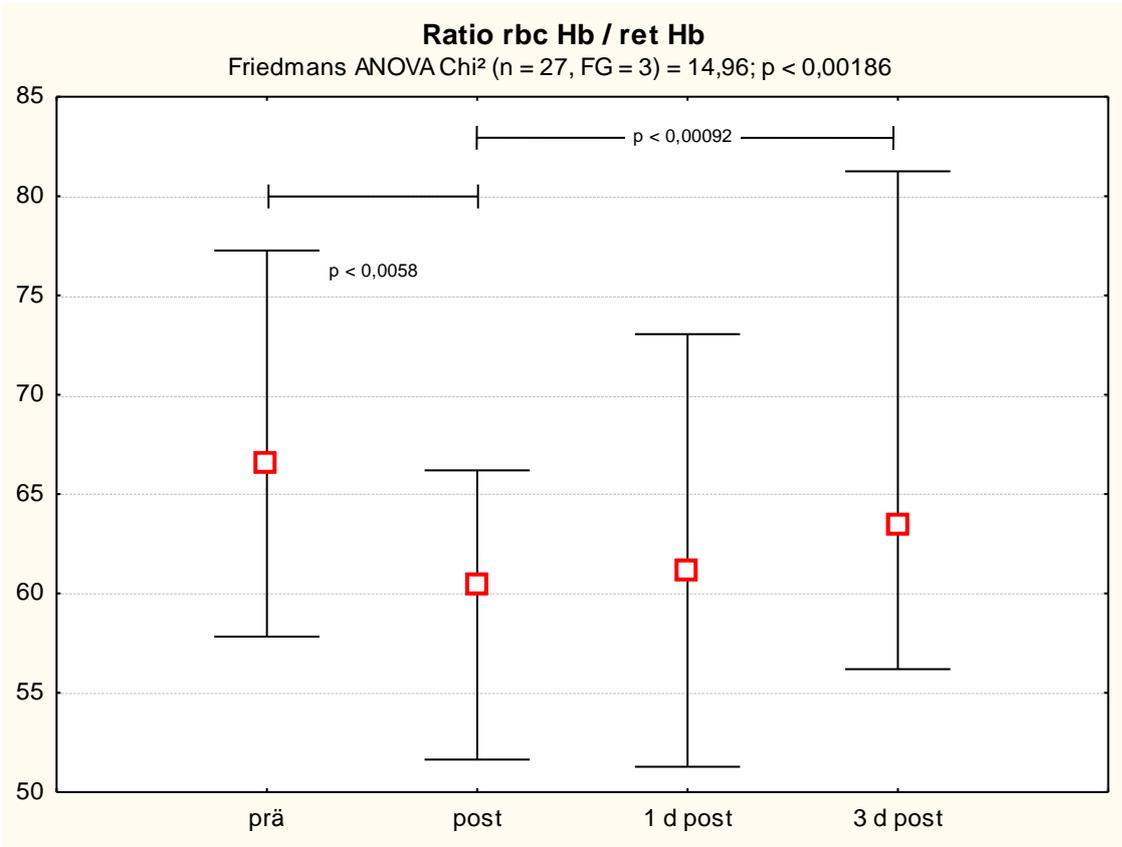
Der Referenzbereich für diese Ratio wird mit $76,6 \pm 21,9$ angegeben (Fallon *et al.* 2002).

Die Abnahme dieser Ratio zeigte für unsere Marathonläuferinnen eine Hämolyse bzw. eine verkürzte Überlebenszeit der Erythrozyten an. Solche Befunde sind schon früher beschrieben worden (Clement und Sawchuk 1984; Dufaux *et al.* 1981 und Yoshimura *et al.* 1980).

Auch nach einem Ultra-Marathon wurden ähnliche Veränderungen gefunden (Fallon *et al.* 2002).

Die Ratio von RBC-Hb/Ret Hb wird von Parisotto *et al.* 2000 mit 94 - 105 für Hochleistungssportler angegeben und ist deutlich höher als bei unseren Kontrollwerten.

Abbildung 5: Das Verhältnis rbcHb zu ret Hb



4.3.1 Reifegrad der Retikulozyten

Mittels Flow-Zytometrie kann man seit kurzem die Zahl der RNA-reichen unreifen Retikulozyten bestimmen, da die Intensität der Fluoreszenz direkt proportional zum RNA Gehalt ist (Watanabe et al.1994).

Abnormale Profile der unreifen Retikulozyten weisen auf eine Veränderung der Erythropoese hin.

Die Retikulozyten wurden in drei Kategorien klassifiziert, entsprechend der Fluoreszenzintensität.

LFR (= low fluorescence ratio)

MFR (= medium fluorescence ratio) und

HFR (= high fluorescence ratio).

Mit dieser Methode wurden von einigen Autoren der klinische Benefit der Bestimmung des Reifegrades der Retikulozyten gezeigt (Watanabe *et al.* 1994). Diese Studien zeigten, dass abnormale Profile der Retikulozytenreifeung aus quantitativen Änderungen der Erythropoese resultieren. Ein Anstieg der unreifen Retikulozyten kann eine ineffektive Erythropoese anzeigen. Unreife Retikulozyten sind erhöht, wenn die Erythropoese stimuliert wird. Dieser Anstieg könnte durch Erythropoetinwirkung auf das Knochenmark zustande kommen.

Bei unseren Ergebnissen zeigten sich prozentuale Erhöhungen, die besonders bei den unreifen Retikulozyten (MFR und HFR) auf eine höhere Aktivität des Knochenmarks nach einem Marathon hinweisen.

Dagegen nahmen die unreiferen Retikulozyten auf Kosten der reiferen Retikulozyten ab.

Die Vermutung von Wells *et al.* 1982 und Watanabe *et al.* 1994, dass die unreifen Retikulozyten vom Eisenstatus abhängen, konnten wir bei unseren Sportlerinnen nicht bestätigen.

Supramaximale körperliche Leistungen führten zu einem Anstieg der Retikulozyten von 62,9 G/l auf 81,9 G/l ($p < 0,05$). Dabei stiegen besonders die unreifen Formen (MFR und HFR) an, wohingegen die LFR-Retikulozyten abnahmen (Morici *et al.* 2005).

Bedingt durch eine kontinuierliche Stimulation des Knochenmarks ist der Wert der unreifen Retikulozyten bei Athleten relativ hoch.

Die Zahl der unreifen Retikulozyten war bei Athleten höher als bei Nicht-Athleten und überstieg den Referenzbereich für die allgemeine Bevölkerung (Banfi *et al.* 2004).

Auch die allgemeine Hämatopoese wird durch Ausdauerleistungen beeinflusst.

Bonsignore *et al.* 2002 untersuchten die zirkulierenden CD34+ Zellen bei Sportlern und Nicht-Sportlern. CD34+ Zellen sind multipotente Vorläuferzellen, die als indirektes Maß für die Aktivität der Hämatopoese angesehen werden. Verglichen mit Untrainierten zeigten gut trainierte Athleten eine 4-fach erhöhte Konzentration von CD34+Zellen, welche einige Stunden nach einem Marathonlauf wieder zurückgingen.

Abbildung 6: Prozentualer Anteil Low Fluorescence Reticulocytes

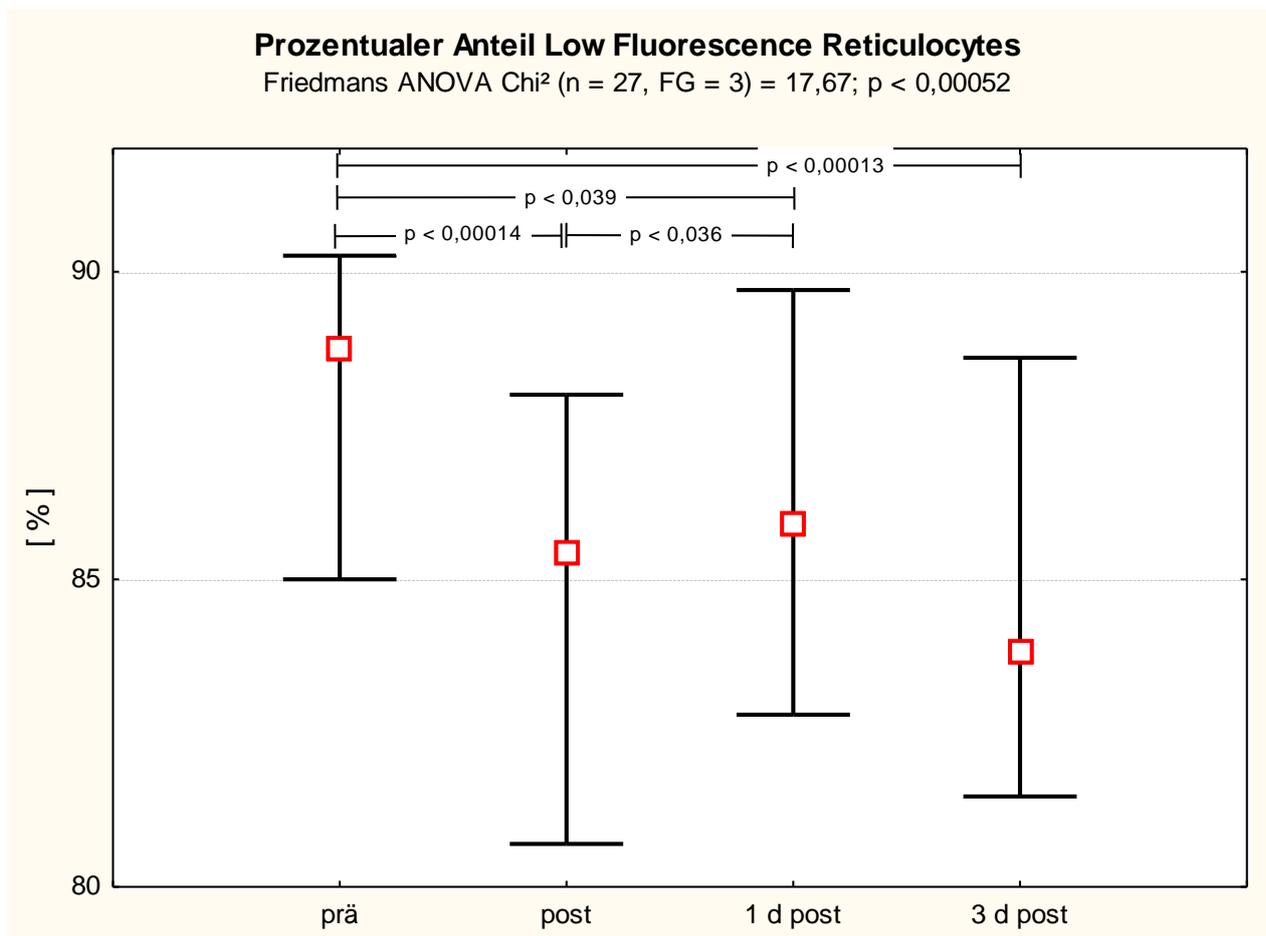


Abbildung 7: Prozentualer Anteil Medium Fluorescence Reticulocytes

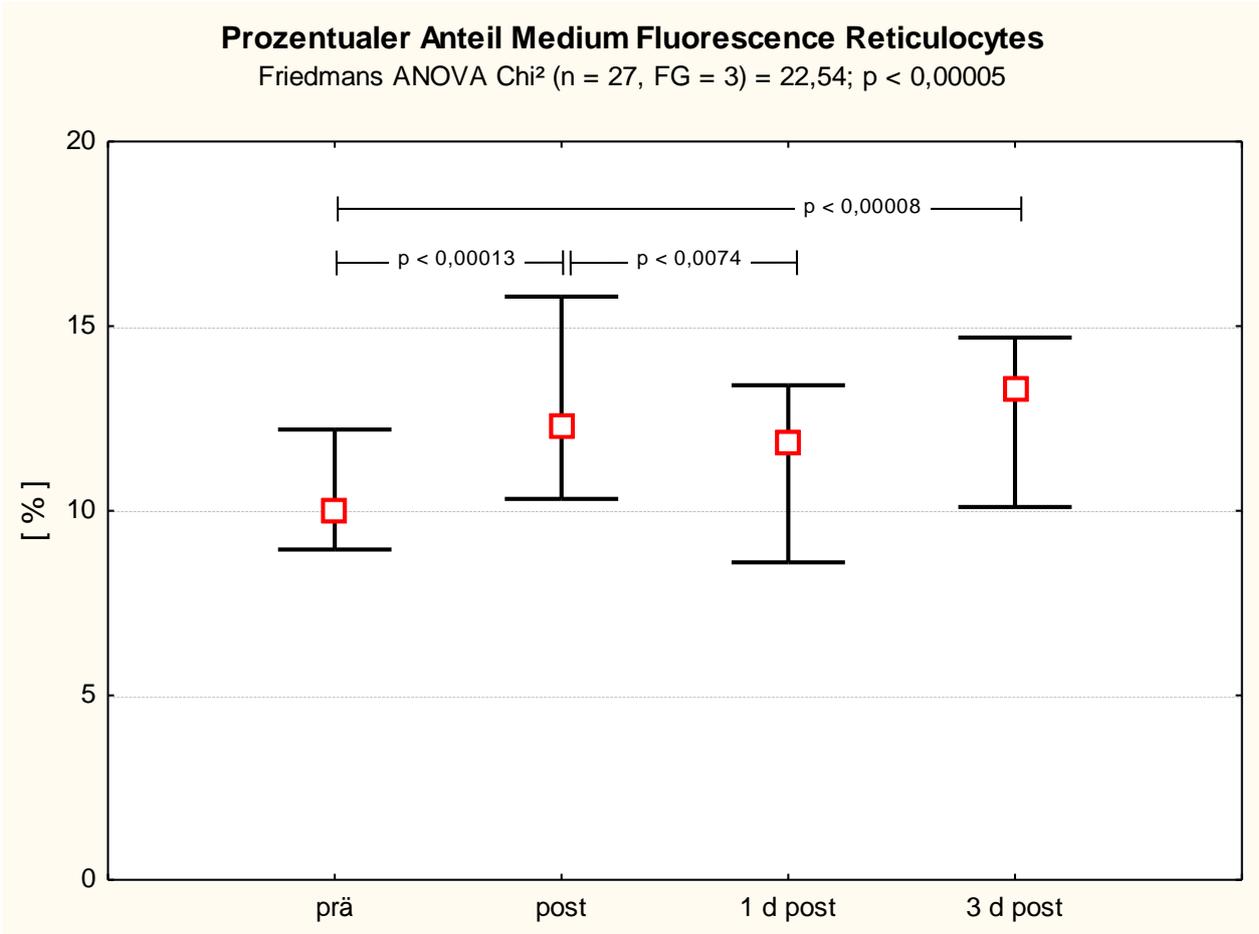
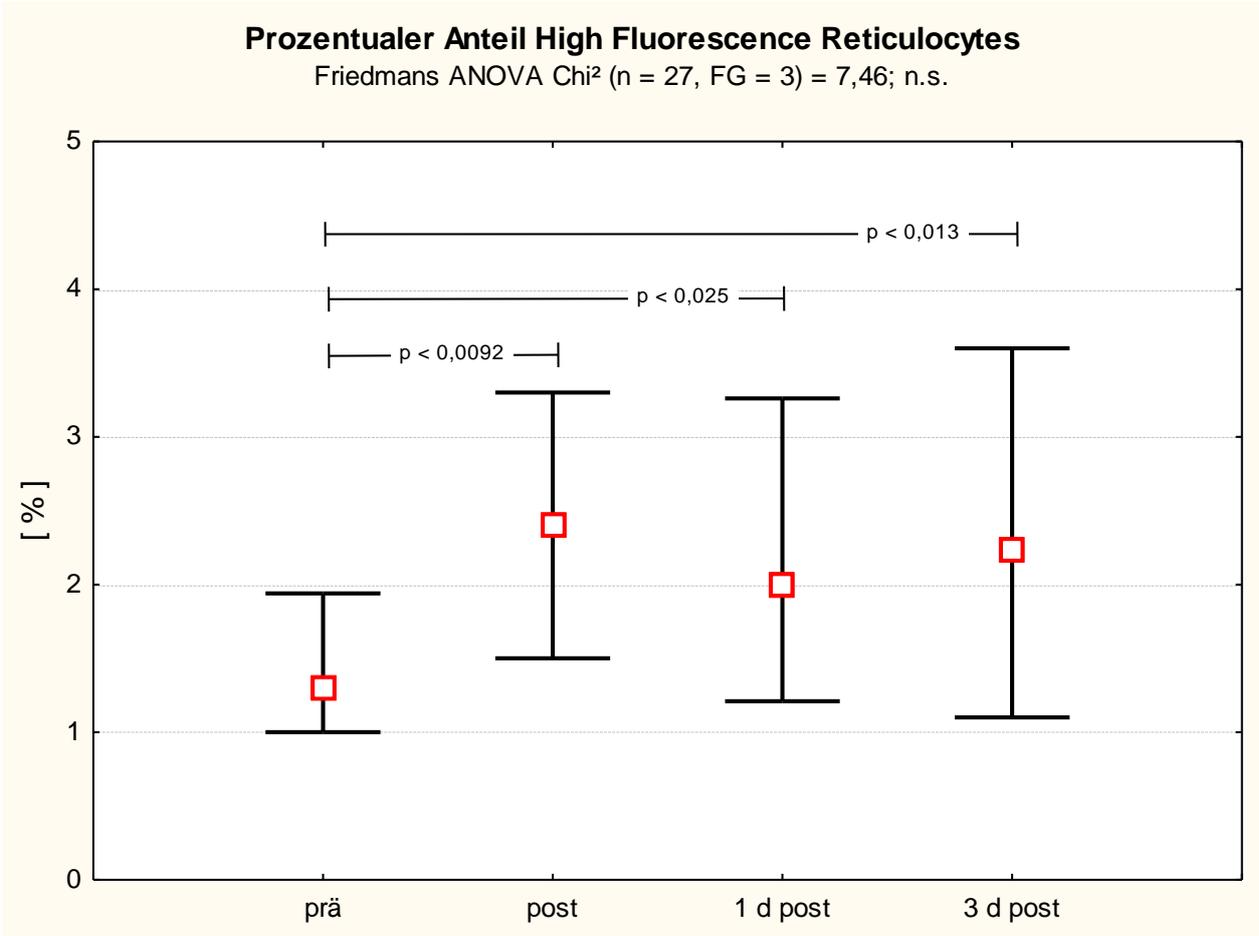


Abbildung 8: Prozentualer Anteil High Fluorescence Reticulocytes



4.4 Heparin

Heparin, der neu entdeckte Hauptregulator des Eisenstoffwechsels, wurde erstmalig in der vorliegenden Studie vor und bis zu drei Tage nach einem Marathonlauf bestimmt.

Heparin im Harn war vorübergehend bei 10 von 14 Frauen nach dem Marathonlauf erhöht (Tabelle 6) (Röcker *et al.* 2005).

Der maximale Anstieg wurde einen Tag nach dem Lauf ermittelt. Bei 8 Frauen („responders“) fand sich ein starker Anstieg auf 4- bis 27 fache Werte im Vergleich zum Ausgangswert. Diese Veränderungen gleichen der Antwort auf Entzündungen. Es ist bekannt, dass extreme körperliche Leistungen zu einer starken Freisetzung von Interleukin-6 und anderen Zytokinen führen. (Ali *et al.* 1999; Helge *et al.* 2003; Northoff und Berg 1991).

Die durch Infektion oder Entzündung freigesetzten Zytokine führen zu einer vermehrten Heparinproduktion (Nemeth *et al.* 2003).

In der vorliegenden Studie könnte die erhöhte Heparinausscheidung durch die bekannte Interleukin-6-Vermehrung nach einem Marathon bedingt sein. Die großen inter-individuellen Schwankungen der Heparinausscheidung unter Ruhebedingungen und nach körperlichen Ausdauerleistungen könnten auf unbekannte Regulations-mechanismen bei trainierten Personen zurückzuführen sein.

Die Intensität des Trainings oder Ernährungsfaktoren könnten für die relativ hohen Ruhewerte von Heparin in „nonresponders“ im Vergleich mit „responders“ sprechen.

Diese Resultate lassen vermuten, dass bei einigen Ausdauerläuferinnen die chronische Heparinerhöhung zu der Entwicklung eines Eisenmangels beiträgt, ähnlich wie bei der Anämie bei chronischen Entzündungen.

Bei der entzündungsbedingten Anämie inhibiert Heparin die intestinale Eisenresorption und die Freisetzung von Eisen aus den Makrophagen (Nemeth *et al.* 2004).

In der Zwischenzeit sind mehrere Arbeiten über Heparin und körperliche Leistungen erschienen, die den oben beschriebenen Sachverhalt als potentiellen neuen Mechanismus für den häufigen Eisenmangel bei Sportlern weiter untersuchten (Peeling *et al.* 2009, Peeling *et al.* 2007, Troadec *et al.* 2009).

Von den verschiedenen Mechanismen, die für den Eisenmangel bei Sportlern verantwortlich gemacht werden, liegt die Aufmerksamkeit heute auf der durch Sport induzierten Entzündungserscheinung, die zu einer erhöhten Heparidinproduktion führen kann.

Sport führt zur vermehrten Produktion von inflammatorischen Zytokinen, besonders Interleukin 6 (Pedersen *et al.* 2007; Peeling *et al.* 2009). Interleukin 6 ist ein inflammatorisches Signal, welches die Synthese von Heparidin induziert (Nemeth *et al.* 2003, Nemeth *et al.* 2004), was zu Hypoferremia und erhöhter Eisenspeicherung im RES führt (Nicolas *et al.* 2002).

Troadec *et al.* 2009 demonstrierten, dass eine submaximale Ergometerleistung keinen Effekt auf die Heparidinkonzentration im Urin und im Serum hat. CRP und IL-6 blieben bei dieser Studie unverändert.

Nach einem intensiven Intervalltraining ließ sich eine Heparidinerhöhung im Urin drei Stunden nach der Leistung feststellen. Es wurde gezeigt, dass die maximalen Heparidinwerte im Urin drei Stunden nach der maximalen IL-6 Aktivität auftraten (Kemna *et al.* 2005). Somit erscheint der geeignetste Zeitpunkt für den Nachweis von Heparidinveränderungen etwa drei Stunden nach dem Ende der sportlichen Leistung zu sein.

Einige Forschungsergebnisse haben veranschaulicht, dass Gewebshypoxie zur Bildung von zellulären reaktiven Sauerstoffradikalen führt, die wiederum von der Freisetzung von IL-6 gefolgt wird (Ali *et al.* 1999). Diese Radikale können die Zellmembran der Erythrozyten durchdringen und dadurch zur schnelleren Alterung der Zellen beitragen (Santos-Silva *et al.* 2002). Die Hämolyse beim Sport könnte teilweise über diesen oxidativen Mechanismus erklärt werden. Drei Stunden nach der sport-induzierten Hämolyse und dem Anstieg von IL-6 zeigte sich Heparidin erhöht.

Ausdauersport resultiert in einer „Akute-Phase-Reaktion“ nach Beendigung der Leistung, die vergleichbar ist mit einer bakteriellen Infektion, einem chirurgischen Eingriff, einer Verbrennung oder einer inflammatorischen Erkrankung (Fallon *et al.* 2001; Margeli *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass anstrengende körperliche Leistungen zu einem 2-3fachen Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β führen (Ostrowski *et al.* 1999) und zu einem dramatischen Anstieg von IL-6 (Pedersen und Hoffmann 2000). Dabei ist IL-6 am stärksten beteiligt, mit einem bis zu 100fachen Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert (Helge *et al.* 2003).

Die durch sportliche Leistung induzierte „Akute-Phase-Reaktion“, wurde in letzter Zeit in mehreren Studien untersucht.

Ostrowski *et al.* (1998) zeigte, dass nach einem Marathon ein 63facher Anstieg von IL-6 auftrat. Muskelbiopsien ergaben, dass IL-6 lokal in der Skelettmuskulatur durch die körperliche Leistung gebildet wurde. Die Ergebnisse von Helge *et al.* (2003) belegen, dass IL-6 aus der arbeitenden Muskulatur in Abhängigkeit von der Intensität der Leistung freigesetzt wird.

Außerdem wurde aufgezeigt, dass die IL-6 Produktion in den kontrahierenden Muskeln ansteigt, wenn die Glykogenreserven aufgebraucht sind (Steensberg *et al.* 2001). Man kann aufgrund der oben erwähnten Studien annehmen, dass der Anstieg von IL-6 einen Effekt auf die Up-Regulation von Hepcidin hat.

Wenn das der Fall ist, wird die Absorption von Eisen nach einer körperlichen Leistung für eine längere Zeit limitiert durch einen hemmenden Effekt auf duodenale Enterozyten und die verminderte Freisetzung von Eisen aus den Makrophagen in RES.

Diese sport-induzierte Up-Regulation von Hepcidin scheint ein neu entdeckter Mechanismus für den häufigen Eisenmangel bei Athleten zu sein. Unsere Ergebnisse sind die ersten, die eine erhöhte Expression von Hepcidin nach einer körperlichen Leistung nachgewiesen haben.

(Siehe Tabelle 6: Hepcidin)

5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden der Einfluss eines Marathonlaufs auf die zellulären (Retikulozytensystem) Parameter des Eisenstoffwechsels bei trainierten Frauen untersucht.

Weiterhin wurde der Einfluss auf den neu entdeckten Eisenregulator Heparin analysiert.

Die Untersuchungen wurden an 27 bzw. 14 ausdauertrainierten Frauen im Alter von 20-48 Jahren durchgeführt.

Die Blut- bzw. Urinproben wurden im Rahmen von zwei Marathonläufen des Berlin-Marathons (2002 und 2004) gewonnen.

Die Entnahmezeitpunkte waren ca. 45 min vor dem Start, direkt (5-10 min) nach dem Zieleinlauf sowie einen und drei Tage nach dem Marathonlauf.

Die absolute Retikulozytenzahl stieg nach dem Laufende von 58,2 G/l auf 64,8 G/l ($p < 0,05$) an.

Ein und drei Tage nach dem Lauf fielen die Werte wieder auf den Kontrollwert zurück.

Weitere Retikulozytenindices (MCVr, CHCMr, CHr, ret Hb, Ratio MCVr/MCV- Erythrozyten) zeigten keine oder nur geringfügige Veränderungen.

Die Ratio rbc Hb/ret Hb zeigte direkt nach dem Lauf einen deutlichen Abfall von 66,5 auf 60,4 ($p < 0,05$).

Der Reifegrad der Retikulozyten wies deutliche Veränderungen in Richtung unreife Retikulozyten bis drei Tage nach dem Lauf auf Kosten der reiferen Zellen auf.

Der Wert für Heparin stieg einen Tag nach dem Lauf von 24 ng/mg Kreatinin auf 61 ng/mg Kreatinin an.

Insgesamt waren bei den zellulären Parameter keine oder nur kurzfristige Veränderungen festzustellen.

Heparin zeigt insgesamt einen deutlichen Anstieg besonders bei einzelnen Läuferinnen, was zu der Hypothese führt, dass hohe Heparinexpressionen zu einem funktionellen Eisenmangel bei Ausdauersportlern beitragen können.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anthropometrische und trainingsbezogene Daten der Probandinnen (n =27)	23
Tabelle 2: Hämatologische Parameter im Ruhezustand der Marathon-Läuferinnen (n =27)	32
Tabelle 3: Medianwerte und Perzentile des roten Blutbildes.....	33
Tabelle 4: Medianwerte der Retikulozytenparameter und die Perzentile vor und nach dem Marathonlauf	35
Tabelle 5: Mediane und Perzentile der Retikulozyten nach der Fluoreszenzintensität (%) vor und nach dem Marathonlauf	37
Tabelle 6: Hepcidin-Ausscheidung im Harn vor und nach dem Marathonlauf	38

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das mittlere Retikulozytenvolumen	44
Abbildung 2: Der mittlere Hämoglobingehalt der Retikulozyten (CHR).....	45
Abbildung 3: Hämoglobingehalt der Gesamtrekulozyten.....	46
Abbildung 4: Das Verhältnis MCVr zu MCV	47
Abbildung 5: Das Verhältnis rbcHb zu ret Hb.....	48
Abbildung 6: Prozentualer Anteil Low Fluorescence Reticulocytes	51
Abbildung 7: Prozentualer Anteil Medium Fluorescence Reticulocytes.....	52
Abbildung 8: Prozentualer Anteil High Fluorescence Reticulocytes	53

8 Literaturverzeichnis

Addison GM, Beamish MR, Hales CN, et al.
An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload
J Clin Path 1972; 25: 326-329

Ali MH, Schlidt SA, Chandel NS, et al.
Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction.
Am J Physiol. 1999; 277: 1057-1065

Andrews NC.
Disorders of iron metabolism.
N Engl J Med. 1999; 341: 1986-1995

Ashenden MJ, Gore CJ, Martin DT, et al.
Effects of a 12- day „live high, train low “camp on reticulocyte production and haemoglobin mass in elite female road cyclists.
Eur J Appl Physiol 1999; 80: 472-478

Banfi
Reticulocytes in Sports Medicine
Sports Med 2008; 38:187-211

Banfi G, Del Fabbro M, Mauri C, et al.
Haematological parameters in elite rugby players during a competitive season.
Clin Lab Haematol 2006; 28: 183-188

Banister EW, Hamilton CL.
Variations in iron status with fatigue modelled from training in femal distance runners.
Eur J Appl Physiol 1985; 54: 16 -23

Baynes RD
Assesment of iron Status
Clin Biochem 1996; 29: 209-215

Beard JL.
Iron Biology in immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning
American Society for Nutritional Sciences 2001; 131:568-580

Bhandari S, Turney JH, Brownjohn AM, et al.
Reticulocyte indices in patients with end stage renal disease on hemodialysis.
J Nephrol. 1998; 11: 78-82

Birgegrad G, Hällgren R, Killander A et al.
Serum ferritin during infection. A longitudinal study in renal transplant patients
Scand j. Haematol. 1978; 21: 333-343

Blum SM, Sherman AR, Boileu RA, et al.
The effects of fitness-type exercise on iron status in adult women.
J Clin Nutr. 1986; 43: 456-463

Bonsignore MR, Morici G, Santoro A, et al.
Circulating hematopoietic progenitor cells in runners.
J App Physiol 2002; 93: 1691-1697

Brugnara C, Zelmanovic D, Sorette M, et al.
Reticulocyte hemoglobin - An integrated parameter for evaluation of erythropoietic activity.
Am J Clin Pathol 1997; 108: 133-142

Brugnara C.
Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function.
Crit Rev Clin Lab Sci 2000; 37: 93-130

Brunner AB, Joffe A, Duggan AK, et al.
Randomised study of cognitive effects of iron supplementation in non-anaemic iron-deficient adolescent girls
Lancet 1996; 348: 992-996

Buttarelo M, Bulian P, Venudo A, et al.
Laboratory evaluation of the Miles H*3 automated reticulocyte counter. A comparative study with manual reference method and Sysmex R-1000.
Arch Pathol Lab Med. 1995; 119: 1141-1148

Buttarelo M, Temporin V, Ceravolo R, et al.
The New Reticulocyte Parameter (Ret-Y) of the Sysmex XE 2100: its use in the diagnosis and monitoring of posttreatment sideropenic anemia.
Am J Clin Pathol. 2004; 121: 489-495

Casoni I, Borsetto C, Cavicchi A, et al.
Reduced hemoglobin concentration and red cell hemoglobinization in Italian marathon and ultramarathon runners.
Int J Sports Med. 1985 Jun; 6:176-179

Chandra RK, Saraya AK
Impaired immunocompetence associated with iron deficiency.
J Pediatr 1975; 86:899-902

Clement DB, Taunton JE, Poskitt K
Iron Deficiency anaemia in a Distance Runner
Can Fam Physician 1982; 28:1010-1012

Clement DB and Asmundson RC
Nutritional Intake And Haematological Parameters in endurance Runners
Physician and Sportsmedicine 1982; 10: 37-43

Clement DB and Sawchuk LL
Iron Status and Sports Performance
Sports Medicine 1984; 1: 65-74

Cook JD, Lynch SR
The Liabilities of Iron Deficiency.
Blood 1986; 68: 803-809

Cook JD
The Effect of Endurance Training on Iron Metabolism
Seminars in Hematology 1994; 31: 146-154

Delaby C, Pilard N, Goncalves AS, et al.
Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin.
Blood 2005; 106: 3979-3984

Diel DM, Lohman TG, Smith SC, et al.
Effects of Physical Training and Competition on the Iron Status of Female Field Hockey Players
Int J Sports Med 1986; 7: 264-270

Dufaux B, Hoederath A, Streitberger I, et al.
Serum Ferritin, Tranferin, Haptoglobin, and Iron in Middle- and Long Distance Runners, Elite Rowers, and Professional Cyclists
Int J Sports Med 1981; 2: 43-46

Eichner ER.
The anemias of athletes
The Physician and Sportsmedicine 1986; 14: 122-130

Ehn L, Carlmark B, Hoglund S,
Iron status in athletes involved in intense physical activity
Med Sci Sport Exers 1980; 12:61-64

Erb W
Zur Entwicklungsgeschichte der roten Blutkörperchen
Virchows Arch. path anat. Physiol. 1865; 34:138-193

Fallon KE, Sivyer G, Dare A
Changes in haematological parameters and iron metabolism associated with a 1600 kilometre ultramarathon
Br J Sport Med 1999; 33: 27-32

Fallon KE and Bishop G
Changes in Erythropoiesis Assessed by Reticulocyte Parameters During Ultra Distance Running
Clin J sports Med 2002; 12:172-178

Ganz T
Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation.

Blood 2003; 102: 783-788

Gerlach M, Ben-Schachar, Rieder P. et al.
Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases
J Neurochem. 1994; 63: 793-807

Green R.
Disorders of inadequate iron. In: Herbert V. Diagnosis and Treatment of Iron Disorders
Hosp Pract 1991; 26: 25-29

Hastka J, Lasserre JJ, Schwarzbeck A, et al.
Laboratory test of iron status: correlation or common sense?
Clinical Chemistry 1996; 42: 718-724

Hazard JT and Drysdale JW
Ferritinaemia in cancer
Nature 1977; 265: 755-756

Heilmann E
Serumferritin und seine klinische Bedeutung
Lab Med 1983; 7: 36-38

Heilmeyer L und Westhäuser R.
Reifungsstudien an überlebenden Reticulocyten in vitro und ihre Bedeutung für die
Schätzung der täglichen Haemoglobinproduktion in vivo
Klin Med 1932; 121: 361-365

Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK et al
The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human
skeletal muscle.
J Physiol 2003; 546: 299–305

Hinton PS, Giordano C, Brownlie T, et al.
Iron supplementation improves endurance after training in iron-depleted, nonanemic women.
J Appl Physiol 2000; 88: 1103-1111

Hueberes HA, Csiba E, Josephson B, et al.
Interaction of human diferric transferrin with reticulocytes
Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 621-265

Hueberes HA, Csiba E, Huebers E, et al.
Competitive advantage of diferric transferrin in delivering iron to reticulocytes
Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 300-304

Hueberes HA, Finch CA
The Physiology of Transferrin and Transferrin Receptors
Physiol Rev 1987; 67: 520-582

Hugman A.
Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis
Clin Lab Haematol 2006; 28:75-83

Hunding A, Jordal R, Paulev P.-E, et al.
Runners anemia and Iron Deficiency.

Acta Med Scand 1981; 209: 315-318

Jacobs A, Worwood M
Ferritin in serum-Clinical and biochemical implications
N Engl J Med 1975: 951-956

Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, et al
Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS.
Blood 2005;106: 1864-1866

Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, et al.
Circulating transferrin receptor in human serum
British Journal of Haematology 1986; 64: 277-281

Konijn AM and Hershko C
Ferritin synthesis in inflammation: pathogenesis of impaired iron release
Br J Haematol 1977; 37: 7-16

Kosanke W
Laserstreulicht und Peroxidasefärbung als Grundlagen zur Erstellung des Blutbildes und der Retikulozytenanalytik. In: Bruhn HD, Fölsch UR, Hrsg.
Lehrbuch der Labormedizin.
Stuttgart: Schattauer, 1999: 403-410

Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, et al.
The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney.
J Endocrinology 2005; 184: 361-370

Lampe JW, Slavin JL, Apple FS
Poor Iron Status of Woman Runners Training for a Marathon
Int J Sports Med 1986; 7: 111-114

Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA
A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores.
N Engl J Med 1974; 290: 1213-1216

Londoree, BR. and Allaire T
Reticulocyte counts before and after exercise: trained vs. sedentary
Int. Z. Angew. Physiol. 1969; 27: 226-229

Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, et al.
Prevalence of Iron Deficiency in the United States
JAMA 1997; 277: 973-976

Lorenz R, Jachmann C, Jeschke D
Betreuung von Eisenstoffwechsel-Parameter in der Sportmedizin
Praktische Sport-Traumatologie und Sportmedizin 1992, 1: 22-27

Lowenstein LM
The Mammalian Reticulozyte
Int Rev Cytol. 1959; 8: 135-174

Lustbader ED, Hann HW, Blumberg BS
Serum ferritin as a predictor of host response to hepatitis B virus infection
Science 1983; 220: 423-425

Magnusson B, Hallberg L, Rossander et al.
Iron Metabolism and Sport Anemia
Acta Med Scand 1984; 216: 157-164

Malczewska J, Blach W & Stupnicki R.
The Effect of Physical Exercise on the Concentrations of Ferritin and Transferrin Receptor in Plasma of Female Judoists.
Int J Sports Med 2002; 21: 175-179

Malczewska J, Szczepanska B, Stupicki R, et al.
The assessment of frequency of iron deficiency in athletes from the transferrin receptor-ferritin index.
Int J Sport Nutrition and Exercise Metabolisms 2001; 11: 42-52

Margeli A, Skenderi K, Tsironi M et al
Dramatic elevations of interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise.
J Clin Endocrinol Metab 2005; 90: 3914–3918

Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, et al.
Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation.
Int J Lab Hematol 2007; 29: 341-34

Mast AE, Blinder MA, Lu Q et al.
Clinical utility of reticulocyte hemoglobin content in the diagnosis of iron deficiency
Blood . 2002; 99: 1489-1491

Metzgeroth G and Hastka J.
Diagnostic work-up of iron deficiency
J Lab Med 2004; 28: 391-399

Miller YE, Jones, C, Scoggin C, et al
Chromosome 3q (22-ter) encodes the human transferrin receptor
Am J Hum Genet. 1983; 35: 573-583

Morici G, Zangla D, Santoro A, et al.
Supramaximal exercise mobilizes haematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes.
Am J Physiol 2005; 289: 1496-1503

Nachtigall D, Nielsen P, Fischer R, et al.
Iron deficiency in distance runners. A reinvestigation using Fe-labelling and non-invasive liver iron quantification
Int J Sports Med. 1996; 17: 473-479

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al.
Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization.

- Science. 2004; 306: 2090-2093
Nemeth E, Valore EV, Territo M, et al
Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein.
Blood. 2003; 101: 2461–2463
- Newhous IJ and Clement DB
Iron Status in Athletes. An Update
Sports Medicine 1988; 5: 337-352
- Nicolas G, Viatte L, Bennoun M et al
Hepcidin, a new iron regulatory peptide.
Blood Cells Mol Dis 2002; 29:327–335
- Northoff H und Berg A
Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise.
Int J Sports Med 1991; 12: 9-15
- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, et al.
Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running
J Physiology 1998; 508: 949-953
- Ostrowski K, Rohde T, Asp S, et al.
Pro- and anti-inflammatory cytokine balance strenuous exercise in humans
J Physiology 1999; 515: 287-291
- Paterakis GS, Laoutaris NP, Alexia SV et al.
The effect of red cell shape on the measurement of red cell volume
A proposed method for the comparative assessment of this effect among various
haematology analysers
Clin. Lab. Haemat. 1994, 16: 235-245
- Parr RB, Bachmann LA, Moss RA.
Iron deficiency in female athletes.
Physician and Sports Medicine 1984; 12: 81-86
- Parisotto R, Gore JC, Hahn AG et al.
Reticulocyte Parameters as Potential Discriminators of Recombinant Human Erythropoietin
Abuse in Elite Athletes
Int J Sports Med 2000; 21: 471-479
- Pedersen BK. and Hoffman-Goetz L.
Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation.
Physiological Reviews 2000. 80, 1055-1081
- Pedersen BK.
Exercise and Cytokines
Immunol Cell Biol 2000; 78: 532-535
- Peeling P, Dawson B, Goodman C et al.
Training Surface and Intensity: Inflammation, Hemolysis, and Hepcidin Expression
Sci Sport Exerc 2009; 41: 1138-1145
- Peeling P, Blee T, Goodman C et al
Effect of iron injections on aerobic exercise performance of iron depleted female athletes.

Int J Sport Nutr Ex Metab 2007; 17: 221–231

Portsmann B.

Retikulozyten, Reifung, Analytik, klinische Bedeutung. Verlag D.E. Wachholz K.G. Nürnberg, 1993.

Punnonen, K., Irjala, K., Rajamäki, A.

Serum Transferrin Receptor and its Ratio to Serum Ferritin in the Diagnosis of Iron Deficiency

Blood 1997; 89: 1052-1057

Reinhart WH, Stäubli M, Straub PW.

Impaired red cell filterability with elimination of old red blood cells during a 100 km race.

J Appl Physiol 1989; 54: 827-830

Röcker L, Meier-Buttermilch R, Brechtel L et al

Iron-regulatory protein hepcidin is increased in female athletes after a marathon.

Eur J Appl Physiol 2005; 95: 569–571

Röcker, L., Hinz, K., Holland, K. et al.

Influence of Endurance Exercise (Triathlon) on Circulating Transferrin Receptors and Other Indicators of Iron Status in Female Athletes.

Clin. Lab. 2002; 48: 307-312

Röcker, L.

Der Einfluss körperlicher Leistungen auf Laborbefunde

Kassenarzt 1983; 23: 35-44

Röcker L.

Das Verhalten von Plasmavolumen und Plasmaproteinen nach körperlichen Leistungen, Körperlichem Training und Hitzeeinwirkung

Habilitationsschrift, Berlin 1978

Röcker L.

Der Einfluß körperlicher Aktivität auf das Blut.

Auflage. In: Hollmann W, editor. Zentrale Themen der Sportmedizin. Berlin (DE):

Springer Verlag 1977; 91-111

Röcker L, Kirsch KA, Stoboy H. et al.

Plasma volume, albumin and globulin concentration and their intravascular masses. A Comparative study in endurance athletes and sedentary subjects.

Eur J Appl Physiol 1976; 36: 57-64

Santos-Silva A, Rebelo I, Castro E. et al.

Erythrocyte damage and leukocyte activation in ischemic stroke.

Clin Chim Acta 2002; 320: 29-35

Sawka MN, Convertino VA, Eichner ER, et al.

J. Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stress, and trauma/sickness.

Med Sci Sports Exerc 2000; 32: 332-348

Schmausser B.

Labordiagnostik bei Eisenmangelanämie

Fortschritte der Medizin 1997; 115, 34-35

Schmidt W, Maassen U, Tegtbur et al.
Changes in plasma volume and red cell formation after a marathon competition
Eur J Appl Physiol 1989; 58: 453-458

Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D et al
Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances.
Med Sci Sports Exerc 2002; 34: 869–875

Schwandt HA, Heyduck B, Gunga HC et al
Influenca of Prolonged physical exercise on erythropoietin concentration in blood
Eur J Appl Physiol 1991; 63: 463-466

Skikne BS, Flowers CH, Cook JD.
Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency.
Blood 1990; 75: 1870–1876

Steensberg A, Hall GV, Osada T, et al.
Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6.
J Physiol 2000; 529: 237-242

Stewart JG, Ahlquist DA, McGill DB et al.
Gastrointestinal Blood Loss and Anemia in Runners
Annals of Internal Medicine 1984; 101: 843-845

Sunder-Plasman G, Hörl WH et al.
Iron and erythropoietin.
Review Clin Lab 1996; 42: 269-277

Suominen, P., Punnonen, K. Rajamäki et al.
Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits.
Blood 1998; 92: 2934 – 2939

Thomas, L. Labor und Diagnose
TH-Books Verlagsgesellschaft mbH
Frankfurt/Main, 2005, 379-411, 6. Auflage.

Thomas, L.
Anämie chronischer Erkrankungen
Views and Reviews; 6/1999

Thomas, L., Thomas, C., Heimpel, H
Neue Parameter zur Diagnostik von Eisenmangelzuständen.
Deutsches Ärzteblatt, 2005; 102, 580-586

Thortensen K and Romslo I.
The Transferrin Receptor. Its Diagnostic Value and its Potential as Therapeutic Target
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1993; 53: 113-120

- Troadec MB, Laine F, Daniel V et al
Daily regulation of serum and urinary hepcidin is not influenced by submaximal cycling exercise in humans with normal iron metabolism.
Eur J Appl Physiol 2009; 106: 435-443
- Viteri FE and Torun B.
Anaemia and physical work capacity
Clin Haematol 1974; 3: 609-626
- Van den Bossche J, Devereese K, Malfait R. et al.
Reference Intervals for a Complete Blood Count Determined on different Automated Haematology Analysers: Abx Pentra 120 Retic, Counter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120
Clin. Chem. Lab. Med. 2002; 40: 69-73
- Watanabe K, Kawai Y, Takeuchi K, et al.
Reticulocyte maturity as an indicator for estimating qualitative abnormality of erythropoiesis
J Clin Pathol 1994; 47: 736-739
- Weimann A, Lun A, Lun S, et al.
Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run.
J Lab Med 2010; 34: 53-59
- Weiss G, Houston T, Kastner S, et al.
Regulation of cellular Iron metabolism by erythropoietin: activation of iron regulatory protein and upregulation of transferrin receptor expression erythroid cells
Blood 1997; 89: 680-687
- Wei, G.
Eisen und Infektionen
Antibiotika Monitor 2005; 21; 130-135
- Wells CL, Stern JR and Hecht LH
Hematological Changes Following a Marathon Race in Male and Female Runners
Euro J Appl Physiol 1982; 48: 41- 49
- Wick M, Pinggera W, Lehmann P.
Klinik und Labor, Eisenstoffwechsel und Anmien siebte Auflage 2002.
- Worwood, M.
The laboratory assessment of iron status- an update
Clinica Chimica Acta 1997; 259: 3-23
- Zhu YI, Haas JD.
Altered metabolic response of iron-depleted nonanemic women during a 15-km time trial.
J Appl Physiol 1998; 84: 1768-1775

9 Lebenslauf

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

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders und sehr herzlich bei meinem Professor Dr. med. L. Röcker für die Überlassung des Themas bedanken, der mich während meiner Doktorarbeit betreut, mich menschlich und fachlich umfangreich unterstützt hat.

Mein ganz besonderer Dank geht aber an Herrn Jörg Müller, der mir bei vielen Formulierungen und auch bei der Korrektur der Doktorarbeit sehr hilfreich zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei den Mitarbeitern des Labors 28 und besonders Frau R. Meier-Buttermilch bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Lars Brechtel, Werner Hopfenmüller und all denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geholfen haben. Ganz gleich wie, ohne Euch hätte ich das niemals geschafft.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, denn ohne sie wäre dieses Studium niemals möglich gewesen.

11 Erklärung

„Ich, **Kila Battal**, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

<< Der Einfluss einer körperlichen Ausdauerleistung auf dem Eisenstoffwechsel trainierter Frauen unter besonderer Berücksichtigung des Heparidin >>

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift