

V. DISKUSSION

5.1. Körperliche Belastung

Bei körperlicher Arbeit wird Laktat durch Reduktion des Pyruvats in der anaeroben Glykolyse produziert und durch Oxidation zu Pyruvat in der Gluconeogenese abgebaut (Brooks 1986, Mader und Heck 1991)

Die Laktatproduktion ist ein energieliefernder Prozess des anaeroben Muskelstoffwechsels. Dabei liefert die Reduktion des Pyruvats durch NADH zum Laktat zwei ATP (Stryer 1995). Im kontrahierenden Skelettmuskel übersteigt unter anaeroben Bedingungen die Geschwindigkeit der Pyruvatproduktion in der Glykolyse die Rate der Pyruvatoxidation durch den Citratzyklus. Ferner ist die Geschwindigkeit der NADH-Bildung in der Glykolyse unter diesen Bedingungen größer als die Rate der NADH-Oxidation in der Atmungskette. Die Fortdauer der Glykolyse hängt davon ab, ob genügend NAD^+ zur Oxidation des Glycerinaldehyd-3-phosphats zur Verfügung steht. Die Anhäufung von NADH und Pyruvat wird durch die Laktat-Dehydrogenase unterbunden, die NADH zu NAD^+ oxidiert und Pyruvat zu Laktat reduziert (Stryer 1995). Die Laktatbildung ist im Stoffwechsel ein totes Gleis. Das Laktat muß in Pyruvat zurückverwandelt werden, bevor es metabolisiert werden kann. Die Laktatbildung bringt Zeitgewinn und verlagert einen Teil der Stoffwechsellast von der Muskulatur in die Leber (Stryer 1995). Das in die Leber eintretende Laktat wird zu Pyruvat oxidiert. Das Pyruvat wird dann durch die Gluconeogenese in der Leber in Glucose umgewandelt. Damit versorgt die Leber den kontrahierenden Skelettmuskel mit Glukose, der durch die glykolytische Umwandlung der Glukose in Laktat ATP gewinnt. Glucose wird wiederum in der Leber aus Laktat synthetisiert. Diese Umwandlung bilden den Cori-Zyklus (Stryer 1995). Nicht am Arbeitsprozeß beteiligte Ruhemuskelatur kann während der Fortsetzung der Arbeit anderer Muskelgruppen dem arteriellen Blut Laktat entnehmen und dieses durch Oxidation zu Pyruvat abbauen (Hollmann und Hettinger 2000).

Die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Zelle ist entscheidend, ob die Stoffwechselfvorgänge anaerob oder aerob ablaufen (Hollmann und Hettinger 2000). Die oxidative Phosphorylierung (aerober Stoffwechsel) besitzt gegenüber der Glykolyse Vorrang (Pasteur-Effekt). Bei ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff unter körperlicher Belastung besteht ein Fließgleichgewicht zwischen Laktatbildung und -abbau (Laktat steady state). Ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff relativ zur

Belastungsintensität nicht mehr ausreichend steigt die Blutlaktatkonzentration kontinuierlich an (Beneke 1999). Die Blutlaktatkonzentration ist somit von der Belastungsintensität abhängig. Ab einer individuell festgelegten Belastungsintensität übersteigt die Pyruvatbildungsrate der Glykolyse die oxidative Pyruvatabbaurrate (Mader 1984), d.h. die Energiebereitstellung ist partiell anaerob (Mader und Heck 1986). Die Blutlaktatkonzentration kann somit als Funktion der Glykolyse- und der Pyruvatoxidationsraten in gegebenen Verteilungsräumen beschrieben werden. Ausdauerleistungsfähige Personen weisen bei einer gegebenen Belastung niedrigere Blutlaktatkonzentrationen als Untrainierte auf (Keul et al. 1966). Diese Befunde bewirkten, daß Laktat als wesentlicher Meßwert zur Beurteilung der metabolischen Beanspruchung bei körperlicher Arbeit Bedeutung erlangte (Mader 1991).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Belastung durch Fahrradergometrie in der ersten Versuchsserie einem steady state entsprechen, in der zweiten Serie deutlich über dem steady state liegen. Zur Abschätzung der individuellen Belastung wurden $\dot{V}O_2$, HF und SBE bestimmt. Überschreiten des steady state wurde mit einem Laktatanstieg von mehr als 1mmol/l zwischen der 10. und 30. Minute des Versuchs definiert. Die niedrige Belastung sollte ca. 50-60 %, die hohe Belastung ca. 70 - 80 % der maximalen Leistung entsprechen. Diese Vorgaben wurden erreicht. Die Versuche bei niedriger Belastung erfüllten die Definition steady state, die Versuche bei hoher Belastung überschritten mit Durchschnittswerten von $\Delta 3,33 \pm 1,05$ mmol/l deutlich das steady state. Unter steady state Bedingungen beendeten alle Probanden die Versuche. Bei hoher Belastung brachen 80 % der Probanden aus Erschöpfung den Versuch zwischen der 10. und 30. Minute ab. Die hohe Abbruchrate ist verständlich, da bei einem deutlichen Überschreiten des maximalen Laktat steady state Laktat kumuliert und eine metabolische Acidose entsteht. Geringe Abweichungen des pH-Wertes beeinflussen die meisten Enzymsysteme nachhaltig (Relman 1972). Acidosen führen zu entgegengesetzten K^+ und H^+ Ionenverschiebungen über Zellmembranen (Lawin 1994). Die Glykolyse wird durch Acidose gehemmt (Lawin 1994). Durch die Acidose, Störung des Zellmilieus, Elektrolytverschiebungen und Substratmangel tritt Ermüdung auf (Hollmann und Hettinger 2000).

Während in der vorliegenden Arbeit bei einer steady state Belastung (Δ Laktat > 1 mmol/l, aerober Metabolismus, $58,7 \pm 4,2$ % $\dot{V}O_{2max}$) keine Änderung der MDA

Konzentration auftrat und die Erythrozytenmembranproteine in der Gelelektrophorese keine Veränderungen zeigten, stieg bei einer Belastung oberhalb des maximalen steady state (Δ Laktat $3,3 \pm 1,0$ mmol/l, teilweiser anaerober Metabolismus, $73,3 \pm 4,2$ % $\dot{V}O_{2max}$) die Konzentration von MDA um $5,7 \pm 6,5$ % an und die Gelelektrophorese der Erythrozytenmembranproteine wies Verluste oder Reduktion der Spectrinbande auf und es zeigten sich niedermolekulare Fragmente am Gelende und quervernetzte hochmolekulare Proteine an der Auftragsstelle. Weiterhin war unter steady state Belastung keine Korrelation der MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende zu beobachten, während bei Belastung oberhalb des maximalen steady state die MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende korrelierten. Dieser Befund stützt die Annahme, dass der MDA Konzentrationsanstieg unter intensiver Belastung abhängig von der Intensität der Belastung und Folge einer Membranschädigung durch Lipidperoxidation ist. Bei intensiver Belastung waren die MDA Konzentrationsanstiege der Proben mit Spectrinveränderungen signifikant höher ($7,2 \pm 6,9$ %), der für Proben ohne Spectrinveränderungen ($3,3 \pm 7,2$ %).

Die oxidative Schädigung von Membranlipiden- und proteinen ist demnach abhängig von der Intensität der Belastung. Die erbrachte Leistung der Ergometrierversuche oberhalb des maximalen steady state lag $18,9 \pm 9,7$ % über der Leistung der steady state Versuche. Das Ausmaß der oxidativen Schäden ist nicht abhängig von der geleisteten Arbeit. Die geleistete Arbeit der Versuche oberhalb des maximalen steady state war bedingt durch die Versuchsabbrüche niedriger als unter steady state Bedingungen.

Zwei Modelle zur Beschreibung des Ausmaßes der oxidativen Schäden in Abhängigkeit von der Belastungsintensität sind denkbar. Möglich wäre eine lineare Beziehung. Beim Umsatz von Sauerstoff in den Mitochondrien entsteht eine bestimmte Anzahl von Sauerstoffradikalen. Wenn sich der Sauerstoffumsatz unter körperlicher Belastung erhöht, könnte die Anzahl der erzeugten Radikale proportional ansteigen. Andererseits könnte nach einem linearen Anstieg der oxidativen Schäden bis zum maximalen Laktat steady state durch Azidose, Störung des Zellmyleus, Elektrolytverschiebungen und damit verbundener Beeinträchtigung des primären und sekundären antioxidativen Potentials ein überproportionaler Anstieg der Radikalproduktion und der damit verbundenen Schäden ausgelöst werden.

5.2. Abschätzung des Flüssigkeitsverlustes unter körperlicher Belastung

Das Blutvolumen beträgt beim untrainierten Mann im Mittel 77 ml/kg Körpergewicht, beim ausdauertrainierten Mann 95,4 ml/kg Körpergewicht (Röcker 1977). Es setzt sich aus der Summe des Plasmavolumens und des Zellvolumens zusammen. Das Verhältnis von Erythrozytenvolumen und Gesamtblutvolumen wird als Hämatokrit (HK) bezeichnet. Der durch das Blut gefüllte intravasale Raum steht durch sogenannte Poren in den Kapillarmembranen mit dem interstitiellen Raum in direkter Verbindung. Durch diese Poren findet eine transkapilläre Flüssigkeitszirkulation statt, an der jedoch die korpuskulären Blutbestandteile nicht und die hochmolekularen nur sehr begrenzt teilhaben, da diese Membranporen nur einen Durchmesser von etwa 4 nm (40 Å) haben (Landis und Pappenheimer 1963). Die Gesamtmenge der Erythrozyten bleibt beim Menschen unter körperlicher Belastung (abgesehen von Verluften durch Hämolyse) konstant. Blutreservoir wie bei manchen Tieren existieren nicht (Röcker 1977). Während körperlicher Belastung kommt es auf Kosten des Blutvolumens zu einem Verlust an Plasmawasser (Ohira et al. 1977, Ernst et al. 1988, Biancotti et al. 1992, Balsom et al. 1992, Davis et al. 1992) durch Abatmung, Transpiration und Wassershiffts zwischen dem Intravasal-, Intrazellulär - und Extrazellulärraum. Man kann deshalb annehmen, daß die Konzentrationen der Blutbestandteile, deren Durchmesser größer ist als der Porendurchmesser der Kapillarmembran, genau in dem Maße ansteigen, in dem die Flüssigkeit das Gefäßbett verläßt (Röcker 1977). Dieser Umstand muß beim Vergleich von Konzentrationen bei hämokonzentrationsabhängigen Parametern berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurde KM, TP, Alb und HK bestimmt, um den Flüssigkeitsverlust abzuschätzen und um einen Korrekturfaktor für hämokonzentrationsabhängige Parameter zu berechnen.

5.2.1. Gewicht

Das Körper des Menschen besteht abhängig vom Alter, Geschlecht und Menge des Körperfetts zu 46 bis 75 % aus Wasser (Harth 1995). Die Probanden waren männlich, zwischen 24 und 31 Jahren alt, hatten Normalgewicht (Broca-Index) und waren ausdauertrainiert. Hieraus ergibt sich ein geschätzter Anteil des Körperwassers von ca. 63 % (Harth 1995). Bestimmt über die Gewichtsänderung ergibt sich ein effektiver Wasserverlust von 700 ± 279 g unter niedriger und $870 \pm$

295 g unter hoher Belastung. Die in der Literatur beschriebenen Gewichtsverluste unter körperlicher Belastung von 820 g nach 10 Minuten erschöpfender Fahrradergometrie (Ohira et al. 1977) stehen im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden. Die Gewichtsabnahme ist zum größten Teil mit Wasserverlust gleichzusetzen und Gewichtsverluste durch den Verbrauch von Zuckern, Fetten und Eiweißen unter Belastung sind gering. Berechnet über den Brennwert von Glucose (15,7 kJ/g), einem Wirkungsgrad der Fahrradergometrie von ca. 25% und der mittleren Leistung der Probanden, gehen unter niedriger Belastung etwa 54 g, unter hoher Belastung etwa 48 g Gewichtsverlust auf die Verbrennung von energiereichen Substanzen zurück. Dies entspricht bei niedriger Belastung etwa 7,7 %, bei hoher Belastung etwa 5,6 % des Gewichtsverlustes. Der über KM ermittelte Wasserverlust liegt deutlich über dem aus TP und Alb ermittelten Wert, da der Parameter nicht den intravasalen, sondern den gesamten Verlust an Körperflüssigkeit widerspiegelt. Zwischen dem über KM ermittelten Gesamtwasserverlust und dem über TP/Alb gemittelten intravasalen Wasserverlust besteht bei niedriger Belastung eine Differenz von Δ 387 g, bei hoher Belastung von Δ 500 g. Somit tritt unter körperlicher Belastung ein deutlicher Wassershift zwischen den verschiedenen Kompartimenten des Körpers auf. Aus diesem Grund ist das KM zur Abschätzung des intravasalen Flüssigkeitsverlusts nicht geeignet.

5.2.2. Gesamteiweiß und Albumin

Das Plasmaprotein ist der am häufigsten benutzte Parameter zur Abschätzung des intravasalen Flüssigkeitsverlusts unter körperlicher Belastung (Ohira et al. 1977, Kraemer und Brown 1989). Kapillarwände sind für Plasmaproteine mit relativen Molekülmassen zwischen 54 000 und 970 000 Dalton weitgehend impermeabel. Die relative Permeabilität im Verhältnis zu Wasser beträgt z.B. für Albumin $< 0,0001$ (Witzleb 1995).

Das Blutvolumen ausdauertrainierter Männer beträgt 95,4 ml/kg Körpergewicht (Röcker 1977, Hüllemann 1983). Mit den Parametern Blutvolumen und Hämatokrit ist es möglich das Plasmavolumen zu berechnen. Anhand dieses errechneten Plasmavolumens wurden über die Gesamteiweiß- und Albuminanstiege intravasale Flüssigkeitsverluste berechnet.

Der Konzentrationsanstieg von TP liegt signifikant über dem Alb Anstieg. Wird die Alb Konzentration vom TP subtrahiert und nur der nicht-Alb Anteil vom TP betrachtet,

ergibt sich ein Konzentrationsanstieg bei niedriger Belastung von $12,2 \pm 16,3$ %, bei hoher Belastung von $11,5 \pm 8,1$ %. Der Anteil des Plasmaalbumins an der Gesamteiweißkonzentration entspricht mit Werten zwischen 62,5 und 64,8 % in den Versuchsserien dem in der Literatur beschriebenen Verhältnis (Linnemann und Kühl 1995). Der Alb Anteil am TP im Vergleich vor und nach Versuch nimmt signifikant ab. Die Differenz zwischen den TP und Alb Veränderungen wird demnach durch deutliche über dem Alb Niveau liegende Konzentrationsanstiege einzelner nicht aus Albumin bestehenden Komponenten vom TP verursacht. Zur Erklärung dieser Befunde müssen zusätzlich zur intravasalen Hämokonzentration weitere, die Konzentration der beiden Parameter beeinflussende, Faktoren angenommen werden. In geringem Maße werden Teile von Alb und TP unter akuter körperlicher Belastung leistungsabhängig verstoffwechselt und verlassen über eine Änderung der Kapillarmembranpermeabilität den intravasalen Raum (Usami 1957, Yoshimura et al. 1980, Linnemann und Kühl 1995). Die leichte Abnahme des Alb Anteils an TP unter den Versuchen könnte mit einer Destruktion eines kleinen Teils des Alb und Änderungen in der Kapillarmembranpermeabilität für Alb unter Belastung erklärt werden. Andererseits könnten auch nicht hämokonzentrationsbedingte Veränderungen in der nicht-Alb Komponente des TP für die beschriebenen Differenzen verantwortlich sein. Die nicht-Alb Komponente von TP besteht aus einer Vielzahl verschiedener Proteine, wie z.B. Haptoglobin, Fibrinogen, Coeruloplasmin, Plasminogen, Transferrin, C-reaktives Protein, Antikörper und Prothrombin. Haptoglobin und Fibrinogen wurden vor und nach der Belastung bestimmt. Haptoglobin zeigte unter hoher Belastung einen deutlichen Abfall. Fibrinogen zeigte unter niedriger Belastung einen deutlichen Anstieg und blieb unter hoher Belastung unverändert. Zunahme spezifischer Gerinnungsfaktoren unter Belastung, wie Faktor VIII (Rizza 1961, Egeberg 1963, Iatrides et al. 1963, Ikkada et al. 1963), Faktor V (Crowell und Houston 1961), Faktor VII (Iatrides et al. 1961) und Fibrinogen (Hawkey et al. 1974) sind in der Literatur vielfach beschrieben. Nach körperlicher Belastung kommt es zu einem Anstieg der Akute-Phase-Proteine, Prothrombin, Hp, Plasminogen, C-reaktives Protein, Fibrinogen, Transferrin und der γ -Globuline (Greiling und Gressner 1989, Linnemann und Kühl 1995).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß es unter körperlicher Belastung zu nicht hämokonzentrationsabhängigen Veränderungen der Plasmaeiweißkonzentrationen kommen kann. Leichte Alb und Hp Abfälle und

Anstiege im Bereich der nicht-Alb Fraktion des TP sind zu erwarten. Dies steht im Einklang mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden.

5.2.3. Hämatokrit

Der Hämatokrit, als prozentualer Anteil des Erythrozytenvolumens am gesamten intravasalen Volumen, nimmt unter körperlicher Belastung durch Wasserverlust zu (Duthie et al. 1990). Der Hämatokrit wurde mit einer Zentrifuge ermittelt und mit einer Auswertscheibe als Verhältnis der roten Zellmasse zur Gesamthöhe der Blutsäule abgelesen. Da das Ablesen der Werte mit der Auswertscheibe relativ ungenau ist, wurden von jeder Probe jeweils vier Werte bestimmt und gemittelt. Die Rohwerte streuten mit einer Standardabweichung von $\pm 0,265$ um die ermittelten Mittelwerte, VC betrug 4,8%.

In der Literatur werden nach akuter Belastung Hämatokritanstiege und -abfälle (Aiger 1986) beschrieben. So stieg während eines Stadtmarathons der HK um 19 % an (Göbel 1991), nach einem Halbmarathon fiel der HK nach 72h um 3% ab (Duthie et al. 1990) oder zeigte während eines Marathons keine signifikante Veränderung (Ernst et al. 1988). Im Überblick scheint der Zeitpunkt der Blutentnahme für die Hämatokritveränderung von Bedeutung. Anlässlich eines Marathons wurde der Hämatokrit von 48h vor bis 120h nach dem Wettkampf verfolgt (Duthie et al. 1990). Es zeigte sich ein initialer Anstieg ausgehend von 42,6% auf ein Maximum von 44,7% bei 5 Minuten nach Versuchsende, ein folgender Abfall mit Minimum von 41,8% bei 72 h und eine Normalisierung nach 120 h. Somit steigt der Hämatokrit unmittelbar nach akuter Belastung durch Dehydration auf Maximalwerte, fällt durch überschießende regulative Mechanismen in der Folge unter den Ausgangswert, um dann später zum Ausgangswert zurückzukehren. Beim vorliegenden Versuchsaufbau wurde unmittelbar nach der Ergometrie Blut entnommen und damit der Hämatokrit in der Anstiegsphase bestimmt. Der Hämatokrit müsste bei zugrundeliegender gleicher Ursache im selben Ausmaß steigen wie Albumin und Gesamteiweiß, liegt jedoch bei niedriger Belastung um 44,6 %, bei hoher Belastung um 47,6 % unter der aus den Proteinen ermittelten Hämokonzentration. Ein möglicher Mechanismus zur Erklärung dieser Diskrepanz könnte eine osmotische Wasserverschiebung vom intraerythrozytären in den intravasalen Raum, verursacht durch steigenden kolloidosmotischen Druck im Plasma bei Dehydration, sein (Yoshimura et al. 1980). Unter Ausdauerbelastung verringert sich das mittlere

Erythrozytenvolumen (MCV) durch Flüssigkeitsverschiebung vom intraerythrozytären in den intravasalen Raum um bis zu 4,5 % (Röcker 1977). Ein effektiver Erythrozytenverlust durch oxidative Schädigung und Destruktion der Erythrozyten in diesem Umfang kann ausgeschlossen werden, da dies zu einem deutlichen Anstieg der Hämolyseparameter und langfristig zu klinisch relevanten Anämien führen würde. Der über HK ermittelte Wasserverlust lag deutlich unter den über TP und Alb ermittelten Werten. Diese Differenz entspricht bei vermutetem Wassershift aus dem intraerythrozytären Raum einer Reduktion des Erythrozytenvolumens von $4,1 \pm 1,7$ % bzw. $5,3 \pm 2,5$ %. Die in der Literatur angegebene Reduktion des MCV um 4,5 % (Röcker 1977) steht mit diesen Befunden im Einklang. Der Hämatokrit ist durch diese osmotische Reduktion des Erythrozytenvolumens zur Abschätzung des intravasalen Flüssigkeitsverlustes weniger geeignet.

5.2.4. Hämokonzentration und Korrekturfaktor

Da KM und HK den intravasalen Wasserverlust nicht widerspiegeln und zwischen TP und Alb ein signifikanter Unterschied im Konzentrationsanstieg besteht, wurde als Korrekturfaktor für die dehydrationsabhängigen Parameter der Mittelwert der individuellen TP und Alb Anstiege verwendet.

Aus den Alb und TP-Werten gemittelt ergibt sich eine Hämokonzentration bei niedriger Belastung von 7,8 % und bei hoher von 9,0 %. In der Literatur werden unter akuter körperlicher Belastung Plasmavolumenabnahmen von 6 bis 13% (Myhre et al. 1982, Wells et al., 1982, Walter et al. 1983, Hüllemann 1983, Maughan et al. 1985, Schmidt et al. 1989, Göbel 1991, Lochner 1994) beschrieben.

5.3. Hämolyse und Zellschädigung

Hämolyse unter körperlicher Ausdauerbelastung sind in der Literatur vielfach dokumentiert (Gilligan et al. 1943, Gehrmann 1966, Hornbostel et al. 1975, Siegel et al. 1979, Yamada et al. 1980, Ernst et al. 1988). Ziel der Arbeit war es, mögliche Zusammenhänge zwischen intravasaler Hämolyse und oxidativen Schäden an Membranlipiden und Proteinen aufzuzeigen. Zur Abschätzung möglicher Hämolyse während der Versuche wurden Haptoglobin und Bilirubin bestimmt. Zusätzlich wurde als Indikator für mögliche Plasmamembranschäden Kreatinkinase bestimmt. Zur Abschätzung des Verhaltens der Akuten-Phase Proteine unter dem Versuchsaufbau wurde Fibrinogen bestimmt.

5.3.1. Haptoglobin

Haptoglobin ist ein Trägerprotein für Hämoglobin. Haptoglobin-Hämoglobinkomplexe werden schnell durch Aufnahme in die Leberzellen aus der Zirkulation entfernt, wodurch bei Hämoglobinanfall eine Erniedrigung des Haptoglobins resultiert (Greiling und Gressner 1989, Thomas 1992). Aus diesem Grund kann die Haptoglobinbestimmung in der Hämolyse diagnostik eingesetzt werden. Erniedrigte Werte sind ein Indikator für intravaskuläre Hämolyse (Selby und Eichner 1986). Nach Hämolyse dissoziiert das freiwerdende Hb-Tetramer. An Hp werden bevorzugt die Dimeren Strukturen ($\alpha\beta$, $\alpha\delta$, $\alpha\gamma$) gebunden. Der Hb-Hp-Komplex wird von Leberparenchymzellen pinozytiert. Wenn nur wenig Hb aus Erythrozyten freigesetzt wird, beträgt die Halbwertszeit ca. 20 Minuten. Bei verstärkter Hämolyse erreicht das Clearance-System einen Sättigungspunkt, bei dem konstant etwa 130 mg Hb/l/h aus dem Plasma eliminiert werden. Das Hb wird dann auch ungebunden von Leberparenchymzellen aufgenommen oder bei einer Konzentration des freien Hb > 250 mg/l über die Nieren als Dimer ausgeschieden (Abarbanel et al. 1990). Ein Teil des freien Hb wird nach glomerulärer Filtration von den Tubulusepithelien reabsorbiert und abgebaut (Kleesiek 1989). Nur bei ausgeprägten Hämolyse kann demzufolge eine Hämoglobinurie auftreten. Im Rahmen des Leistungssports reicht die Clearance-Kapazität in den meisten Fällen aus, um eine Hämoglobinurie zu verhindern. Die Hämoglobinbestimmung im Urin ist aus diesem Grund ein schlechter Parameter zur Quantifizierung von Erythrozytenschädigungen unter körperlicher Belastung.

Bei niedriger Belastung zeigte Hp einen signifikanten Anstieg, unter hoher Belastung einen signifikanten Abfall. Haptoglobin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 100 000 Dalton (Greiling und Gressner 1989). Eine Diffusion über die Kapillarmembran ist wegen der Molekülgröße auszuschließen. Aus diesem Grund müssen die Hp Konzentrationen wegen der Hämokonzentration während der Versuche korrigiert werden. Nach Korrektur zeigt sich bei niedriger Belastung eine nicht signifikante Anstiegstendenz, unter hoher Belastung ein signifikanter Abfall. In der Literatur wurden nach körperlicher Ausdauerbelastung Hp Abfälle von 10 bis 41% (Schmidt et al. 1988, Göbel 1991, Nagel et al. 1992, Lochner 1994) beschrieben.

Hp unterliegt einem genetischen Polymorphismus. Im wesentlichen werden drei Typen unterschieden, Hp 1-1, Hp 2-1 und Hp 2-2. Die Hp Werte im Serum sind abhängig vom jeweiligen Hp Typ der Person (Thomas 1992). Dies führt zu Fehlern beim interindividuellen Vergleich von Hp Konzentrationen. In der vorliegenden Studie wurden Hp Werte nur intraindividuell verglichen. Ein Einfluß verschiedener Hp Typen auf die Ergebnisse ist somit nicht möglich.

Bei niedriger Belastung wurde eine nicht signifikante Tendenz zum Hp Anstieg beobachtet. Hp gehört zu einer Proteingruppe, die im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion (Greiling und Gressner 1989, Linnemann und Kühl 1995), d. h. auch unter akuter körperlicher Belastung, einen Anstieg zeigen. Allerdings erfolgt der Konzentrationsanstieg erst 6-12 h nach der Belastung und erreicht innerhalb von 24-36 h Maximalwerte (Greiling und Gressner 1989). Da die Blutentnahme 35 Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte, ist ein Einfluß der Akute-Phase-Reaktion auf die Hp Konzentration wahrscheinlich auszuschließen. Um den Einfluß der Akute-Phase-Reaktion genauer zu ermitteln, müßte Hämopexin (Hx) und C-reaktives-Protein (CRP) bestimmt werden. Hx ist ebenfalls ein Hg Transportprotein und zeigt wie Hp eine Erniedrigung bei intravasaler Hämolyse, bleibt aber im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion unverändert. Allerdings reagiert Hx im Vergleich mit Hp erst bei stärkeren Hämolysen. Das C-reaktive-Protein steigt während der Akute-Phase-Reaktion an, bleibt aber von Hämolysen unbeeinflusst (Thomas 1992).

Unter hoher Belastung trat im Gegensatz zur niedrigen Belastung eine Destruktion von Erythrozyten auf, die zu einem deutlichen Haptoglobinabfall führte. Die Gesamtmenge des im Blut vorhandenen Hp kann ca. 3 g Hämoglobin binden (Greiling und Gressner 1989). Bei einem Hp Abfall von 16% entspricht dies ca. 480

mg gebundenes Hb aus destruierten Erythrozyten. Bei einem durchschnittlichen Hb Gehalt des einzelnen Erythrozyten (MCH) von 31×10^{-12} g ergibt sich ein Verlust von ca. $1,54 \times 10^{10}$ Erythrozyten. Bei einer Gesamtzahl von 25×10^{12} Erythrozyten kann der Verlust mit 0,06 % geschätzt werden. In der Literatur wird die Menge der zerstörten Erythrozyten, geschätzt über den Hp-Abfall, nach einem Marathonlauf mit 0,08 bis 0,5 % angegeben (Schmidt et al. 1989, Göbel 1991). Blutbildveränderungen sind demnach nicht zu erwarten. Rund 0,8 % der Erythrozyten werden normalerweise täglich durch Erythropoese ersetzt (Schmidt und Thews 1985). Der geringe zusätzliche Verlust kann leicht durch Erythropoesesteigerung ausgeglichen werden, so daß auch bei wiederholter Trainingsbelastung keine Blutbildveränderungen zu erwarten sind.

Die Haptoglobinwerte vor Versuch lagen mit 143 ± 84 mg/dl im unteren Referenzbereich. Dies könnte auf kontinuierliche Hp Verluste während des Trainings hindeuten. Niedrige Hp Konzentrationen bei Ausdauersportlern als Ausdruck chronischer Hämolysen wurden in der Literatur häufig beschrieben (Magnusson et al. 1984, Selby und Eichner 1986, Schmidt et al. 1989, Lochner 1993). Bei einem Hp Abfall von 16% unter hoher Belastung und einer abgeschätzten mittleren Gesamtmenge von 480 mg gebundenen Hb ist eine Hämoglobinurie wahrscheinlich bei keinem der Probanden aufgetreten.

5.3.2. Bilirubin

Bilirubin (BR) ist ein Produkt des Hb-Katabolismus in den Makrophagen des Retikuloendothelialen Systems (Milz, Knochenmark, Leber). Beim Abbau des Hämoglobins wird Bilirubin durch enzymatische Reduktion des Biliverdins gebildet (Buddecke 1995). Bilirubin kann als Hämolyse Marker benutzt werden. Ein leichter Anstieg des nicht konjugierten Bilirubins wird häufig bei hämolytischen Anämien gefunden. Das Fehlen dieses Befundes schließt allerdings eine Hämolyse nicht aus (Greiling und Gressner 1989). Es wurde nur das totale BR bestimmt, d. h. es wurde nicht zwischen konjugiertem und nichtkonjugiertem BR differenziert. Neben dem Stellenwert im Abbau und Ausscheidung von Hämoglobin besitzt BR antioxidative Eigenschaften. Bilirubin kann zwei Hydroperoxidradikale einfangen und wird dabei zu Biliverdin oxidiert (Strayer 1996). Das antioxytative System Bilirubin/Biliverdin besitzt etwa 1/10 der Wirksamkeit der Ascorbinsäure bezogen auf molare Verhältnisse (Stryer 1996).

Bilirubin wurde mit einem Automatic Analyser bestimmt. Als wichtigste Störfaktoren der BR-Bestimmung gelten Lichtexposition (Licht führt zu einer raschen Zerstörung des BR, Sonnenexposition führt zu einer Erniedrigung der BR-Konzentration um 50 %/h), stärkere Hämolyse (Erniedrigung der BR-Werte) und einige Medikamente (falsch hohe Werte). Lichtexposition wurde durch den Einsatz von lichtdichten Behältern ausgeschlossen. Es wurde eine Medikamentenanamnese erhoben und die Probanden durften in den letzten 3 Tagen vor Versuch keine Medikamente zu sich nehmen.

Da BR im Blut an Albumin gebunden transportiert wird (Linnemann und Kühl 1995), ist ein Konzentrationsausgleich über die Kapillarmembran nicht zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die Werte nach den Versuchen hämokonzentrationskorrigiert. Unter niedriger Belastung konnte nach Hämokonzentrationskorrektur eine nicht signifikante BR Abfallstendenz beobachtet werden. Unter hoher Belastung war keine Konzentrationsänderung feststellbar. Die Höhe der BR-Werte korreliert weder mit dem Hp-Abfall, noch mit Parametern der Lipidperoxidation. Die BR Anstiege korrelieren unter hoher Belastung gut mit den Parametern der Hämokonzentration. Unter niedriger Belastung ergibt sich keine Korrelation mit den Parametern der Hämokonzentration. Körperliche Belastung kann zu einer Erhöhung des BR führen (Greiling und Gressner 1989, Thomas 1992). In der Literatur wurden unter körperlicher Belastung BR Konzentrationen von 4,4 bis 5,1 mol/l beschrieben (Lindemann et al. 1978, Bell und Cowan 1978, Clement und Amundson 1982, Göbel 1991, Stansbie und Begley 1991). Die in der Literatur beschriebenen BR Veränderungen wurden bei Marathon- und Langstreckenläufen bzw. bei mehrstündigen Ausdauerbelastungen beobachtet. Im Gegensatz hierzu konnte beim vorliegendem 35-minütigen Versuchsaufbau, trotz deutlicher Hp Reduktion, keine BR Veränderung beobachtet werden. Nach der Destruktion von Erythrozyten wird das freiwerdende Hb an Hp gebunden und zum Knochenmark, Milz, retikuloendotheliales System und Leber transportiert. Hier erfolgt aus Hb über die Häm-Oxygenase die Bildung von Biliverdin und aus Biliverdin über die Biliverdin-Reduktase die Bildung von Bilirubin. Extrahepatisch gebildetes BR gelangt anschließend in den Blutkreislauf und wird dort wegen der Wasserunlöslichkeit an Albumin gebunden (Buddecke 1985, Linnemann und Kühl 1995).

Da die Proben unmittelbar nach Versuchsende entnommen wurden, könnte trotz eingetretener Hämolyse die Zeit zum Auftreten einer signifikanten BR Erhöhung nicht

ausgereicht haben. Die Korrelation unter hoher Belastung zwischen BR und den Parametern der Hämokonzentration und die fehlende Korrelation zu den Parametern der Zellschädigung und Hämolyse unterstützt die Vermutung, daß die BR Veränderungen nur hämokoncentrationsbedingt sind. Die fehlende Korrelation von BR zu den Parametern der Hämokonzentration unter niedriger Belastung und die nicht signifikante rechnerische Veränderung um - 3,6 % passen allerdings nicht in dieses Bild. Zur Erklärung dieses Befundes wäre ein zusätzlicher Faktor, der unter körperlicher Belastung zu einer Reduktion von BR beiträgt, anzunehmen. Möglich wäre ein schnellerer Transport und Abbau bedingt durch das erhöhte Herzzeitvolumen.

Bei einem Probanden lag der BR Wert mit 36,0 $\mu\text{mol/l}$ deutlich außerhalb des Referenzbereichs (Proband 9). Dieser Wert wurde von der Berechnung ausgeschlossen. Da das BR der vor dem Versuch entnommenen Blutprobe ebenfalls erhöht war und die Konzentrationsänderung während des Versuchs dem Gesamtkollektiv entsprach, kann der geplante Versuchsablauf als Grund für die Erhöhung ausgeschlossen werden. Das paarweise Auftreten der Erhöhungen läßt sich mit Fehlern bei der Aufarbeitung der Proben im Labor nicht erklären, da das Plasma unmittelbar nach Entnahme tiefgefroren und gesammelt und alle BR-Werte dann gemeinsam zum gleichen Zeitpunkt bestimmt wurden. Die BR-Werte korrelieren nicht mit der Lagerungsdauer der Proben. Hämolyse durch die Blutentnahme sind eher unwahrscheinlich, da die BR-Erhöhung bei Wertepaaren (prä und post Wert) übereinstimmend auftrat. Als Ursache für die erhöhten BR-Werte scheint Training und Wettkampf in der Zeit vor dem Versuch am wahrscheinlichsten. Spätere Kontrollen lagen innerhalb des Referenzbereichs.

5.3.3. Kreatinkinase

Die hauptsächlich in Skelettmuskulatur, Myokard und Gehirn vorkommende Kreatinkinase (CK) ist für die Diagnostik pathochemischer Veränderungen der Muskulatur wegen ihrer diagnostischen Sensitivität und Spezifität bedeutend. Die CK ist relativ instabil, deshalb sollten Proben innerhalb von 12 h aufgearbeitet werden (Thomas 1992). Durch Kühlung ändert sich die CK Aktivität allerdings bei 4 C° während drei Tagen und bei -20 C° während vier Wochen nicht (Thomas 1992). Durch lichtgeschützten Transport und Lagerung bei - 80 C° konnte eine Veränderung der CK Aktivität wahrscheinlich ausgeschlossen werden. Es wurde nur die Gesamt-CK-

Aktivität bestimmt, eine Differenzierung nach Herkunftsort ist nicht möglich. Die CK wurde mit einem Automatic Analyser bestimmt.

Bei beiden Versuchsreihen stieg die CK signifikant an. Nach Korrektur der Hämokonzentration zeigten sich allerdings keine signifikanten Konzentrationsänderungen. Unter niedriger Belastung korreliert die CK Änderung mit den Parametern der Hämokonzentration, unter hoher Belastung besteht keine Korrelation. Mit den Parametern der Lipidperoxidation bestehen keine Korrelationen. Da die CK erst mit einer Latenzzeit von 3-6 Stunden nach Traumatisierung der Muskulatur einen Anstieg verzeichnet (Greiling und Gressner 1989) und die Blutentnahme maximal 35 Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte, war ein Anstieg nicht zu erwarten. Eine Blutentnahme zu einem späteren optimierten Zeitpunkt war aus organisatorischen Gründen nicht durchführbar. Trotzdem ist eine leichte Anstiegstendenz mit höheren Werten bei den Versuchen unter hoher Belastung zu verzeichnen. Diese kann auf eine Traumatisierung von Muskelzellen hindeuten.

Nach körperlicher Belastung ist ein Anstieg der Plasmakonzentrationen von CK und LDH gut dokumentiert (Apple et al. 1985, Diamond et al. 1983, Hagerman et al. 1984, Jaffe et al. 1984, Kaman et al. 1977, Siegal et al. 1983). Spitzenbelastungen führen zu Gewebsschädigung und Zelluntergang und können Ursache für den Anstieg von intrazellulären Enzymen wie CK und LDH sein. Körperliche Aktivitäten ohne Spitzenbelastung und Zelluntergänge können allerdings ebenfalls zum Anstieg intrazellulärer Enzyme führen (Janssen et al. 1986). Dieser Anstieg wird mit Schäden in der Plasmamembran und einer hieraus resultierenden Permeabilitätsänderung für intrazelluläre Proteine erklärt (Kanter et al. 1988). Der Enzymkonzentrationsanstieg nach Belastung wurde als Indikator für Permeabilitätserhöhung der geschädigten Membran benutzt (Armstrong 1984). Nach Marathonläufen wurde eine Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationsanstiegen von MDA, CK und LDH beschrieben (Kanter et al. 1988). Diese Beobachtungen lassen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Belastung, Lipid - und Proteinoxidation und Zellmembranschädigung vermuten (Davies et al. 1982, Kanter et al. 1988).

Bei 11 Versuchen lag die CK über dem Referenzwert. Da die CK der vor den Versuchen entnommenen Blutprobe ebenfalls erhöht war und die Konzentrationsänderung während des Versuchs dem Gesamtkollektiv entsprach, kann der geplante Versuchsaufbau als Grund für die Erhöhung ausgeschlossen werden. Starke Hämolysen (freies Hämoglobin > 2g/l), Chylomikronen, alkalische

Phosphatase, Gesamtprotein, Harnstoff und Harnsäure stören die CK-Bestimmung (Neumeier 1989). Fehler bei der Aufarbeitung der Proben im Labor sind unwahrscheinlich, da das Plasma unmittelbar nach Entnahme tiefgefroren und gesammelt wurde. Alle CK-Werte wurden dann gemeinsam zum gleichen Zeitpunkt bestimmt. Die CK-Werte korrelieren nicht mit der Lagerungsdauer der Proben. Hämolyse durch die Blutentnahme sind eher unwahrscheinlich, da die CK-Erhöhungen grundsätzlich bei Wertepaaren (prä und post Wert) übereinstimmend auftreten. Die Höhe der CK-Werte korreliert nicht mit dem Hp-Abfall. Körperliche Belastung bis 7 Tage zurückliegend kann die CK-Aktivität im Serum stark erhöhen (Neumeier 1989). Als Ursache für die erhöhten CK-Werte ist Training und Wettkampf in der Zeit vor dem Versuch anzunehmen.

Da die CK erst mit einer Latenzzeit von 3-6 Stunden nach Traumatisierung der Muskulatur einen Anstieg verzeichnet (Greiling und Gressner 1989), war ein ausgeprägter Anstieg bei dem vorliegenden Versuchsaufbau eher unwahrscheinlich. Die fehlende Korrelation der CK Veränderung unter hoher Belastung zusammen mit der nicht signifikanten Anstiegstendenz von 1,2 % könnte aber auf einen beginnenden CK Anstieg durch Zellschädigung hindeuten.

5.3.4. Fibrinogen

Fibrinogen (Fib) ist ein wasserlösliches Plasmaprotein, das in der Endphase der Blutgerinnung durch die Protease Thrombin in das unlösliche Fibrin umgewandelt wird. Fib gehört wie Hp zu einer Proteingruppe, die im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion (Greiling und Gressner 1998) ansteigen. Unter niedriger Belastung zeigte sich ein signifikanter Anstieg, unter hoher Belastung eine nicht signifikante Anstiegstendenz. Fibrinogen ist ein großes Plasmaprotein mit einem Molekulargewicht von 340 000 (Greiling und Gressner 1989). Eine Diffusion über die Kapillarmembran ist wegen der Molekülgröße auszuschließen. Aus diesem Grund müssen die Fibrinogenkonzentrationen wegen der Hämokonzentration während des Versuchs korrigiert werden (El-Sayed et al. 1999). Nach Korrektur zeigte sich unter niedriger Belastung ein signifikanter Anstieg. Unter hoher Belastung war keine Konzentrationsänderung zu verzeichnen.

Körperliche Aktivität führt zu Veränderungen der Gerinnungsbereitschaft des Blutes (Hüllemann 1983). Art und Intensität des Trainingsreizes beeinflussen die gemessenen Veränderungen. Eine akute körperliche Belastung erhöht die

Gerinnungsbereitschaft (Palmer und Goldberg 1979). Veränderte Membranpermeabilität und direkte Gewebeschädigung führen zu einer verstärkten Gewebsthromboplastinfreisetzung und somit zu einer Aktivierung des extrinsischen Gerinnungssystems (Fowler et al. 1962). Dieser Mechanismus könnte pathomechanisch im Zusammenhang mit oxidativer Membranschädigung unter Belastung stehen.

Zunahme spezifischer Gerinnungsfaktoren unter Belastung, wie Faktor VIII (Rizza 1961, Egeberg 1963, Iatrides et al. 1963, Ikkada et al. 1963, El-Sayed et al. 1999), Faktor V (Crowell and Houston 1961), Faktor VII (Iatrides et al. 1963) und Fibrinogen (Hawkey et al. 1974, Rankien et al. 1995) sind in der Literatur vielfach beschrieben.

Der Fibrinogenanstieg unter niedriger Belastung ist in diesem Zusammenhang gut erklärbar. Unter gleichen pathomechanischen Bedingungen wäre unter hoher Belastung ein noch deutlicherer Anstieg zu erwarten. Statt dessen bleibt ein signifikanter Anstieg aus.

Neben der gesteigerten Blutgerinnung unter körperlicher Belastung wird das fibrinolytische System aktiviert. Die Konzentration des Gewebe-Plasminogenaktivators (tPA) nimmt zu (Rankinen, 1995). Plasminogen wird durch tPA zu Plasmin aktiviert und spaltet Fibrin (Stryer 1996). Gleichzeitig nimmt die Konzentration des Plasminogen-Activator-Inhibitors (PAI) ab (El-Sayed 2000). Der Anstieg von tPA und der Abfall von PAI sind leistungsabhängig (Rankinen 1995). Zwischen Gerinnung und Fibrinolyse besteht unter körperlicher Belastung ein dynamisches Gleichgewicht auf einem im Vergleich zur Ruhe höheren Niveau (El-Sayed et al. 2000).

Im Vergleich der beiden Belastungsintensitäten ist der ausbleibende Fibrinogenanstieg unter hoher Belastung mit einer gesteigerten Aktivierung des fibrinolytischen Systems und hierdurch bedingtem erhöhten Fibrinogenverbrauch erklärbar.

5.4. Indikatoren für oxidativen Streß

Ziel der Arbeit war es einen möglichen Zusammenhang zwischen den in der Literatur vielfach dokumentierten Zellschäden unter körperlicher Belastung und belastungsabhängig zunehmender Lipidperoxidation als pathogenem Faktor aufzudecken. Hierzu wurde Malondialdehyd (MDA) als Abbauprodukt peroxidierter Membranlipide, Spectrinveränderungen (Sp) als Hinweis oxidativ beschädigter

Membranstützproteine und Chemolumineszenz (Cl) als allgemeiner indirekter Lipidperoxidationsmarker bestimmt.

5.4.1. Malondialdehyd

Die Malondialdehyd (MDA) Messung ist die am häufigsten benutzte Methode zum Studium der Lipidperoxidation (Nair und Tuner 1984, Kappus 1985, Alessio 1992, Leaf et al. 1999).

Die Methode beruht auf dem Zerfall peroxidativ geschädigter, mehrfach ungesättigter Fettsäuren aus Lipoproteinen der Zellmembran, bei dem in einer Kettenreaktion als Endprodukte MDA, Ethan und n-Pentan entstehen (Leaf et al. 1997). Der Mechanismus der MDA Entstehung während der Lipidperoxidation ist in Kapitel II in Abbildung 2 dargestellt. Zur laborchemischen Analyse wurde eine modifizierte Methode (Schimke und Papies 1986) in Anlehnung an die Methode von Yagi (1983) und Takeda et al. (1984) verwendet. MDA reagiert mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) zu einem roten Farbstoff (Schiffsche Base), dessen Konzentration fluoreszenzphotometrisch bestimmt werden kann (Kappus 1981, Conti et al. 1991). Da eine Vielzahl anderer Verbindungen, wie z.B. Sialinsäure, Prostaglandine, Thromboxan, und Desoxyribose mit TBA reagieren (Buege und Aust 1978, Gutteridge 1982, Terao und Matsuhita 1981, Kappus 1985, Frankel 1987), wird häufig der Begriff thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) benutzt. Ein weiterer kritischer Punkt der Methode ist, daß beim einstündigen Erhitzen der Proben in Gegenwart von Sauerstoff eine Autooxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren nicht auszuschließen ist. Die Methode ist einfach und sensitiv und ein guter Hinweis für oxidativen Stress in biologischen Systemen (Alessio 1992, Kappus 1985, Ohkawa et al. 1978), hat allerdings wegen der Vielzahl der gemessenen Stoffe eine geringe Spezifität (Lochner 1994). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode hat den Vorteil, daß die Lipidperoxide zusammen mit den Plasmaproteinen durch ein Wolframsäure-Schwefelsäuresystem aus dem Plasma ausgefällt werden und der Überstand verworfen wird. Dadurch werden die wasserlöslichen TBARS, die nicht von der Lipidperoxidation stammen, von der Reaktion ausgeschlossen (Lochner 1994). Ebenso ausgeschlossen werden die TBARS, die durch Aggregation von Thrombozyten bei der Blutentnahme freigesetzt werden (Yagi 1982), ferner die Eisenionen im Plasma. Sialinsäure wird durch Essigsäure von der Reaktion ausgeschlossen, da sie im sauren Milieu nicht mehr TBA-reaktiv ist (Yagi 1982).

Auch BR reagiert mit TBA. Das Reaktionsprodukt hat aber ein anderes Fluoreszenzspektrum als MDA und beeinflusst deshalb die Messung nicht (Yagi 1982). Bei der in der Studie verwendeten Methode nach Schimke und Papies wird ein Referenzwert für Plasma in der Altersgruppe 20-40 Jahre mit $3,6 \pm 0,7$ nmol/ml (Schimke und Papies 1986) angegeben.

Die MDA Ausgangswerte lagen im Mittel mit $2,9 \pm 0,4$ nmol/ml im unteren Referenzbereich. Nach den Versuchen mit niedriger Belastung stieg die MDA Konzentration signifikant um $10,5 \pm 8,4$ % ($p = 0,003$), nach hoher Belastung um $14,3 \pm 4,4$ % ($p = 0,005$) an.

In der Literatur wird die MDA Konzentration teilweise wegen der Hämokonzentration unter Belastung korrigiert (Duthie et al. 1990). Da keine Daten vorliegen wie sich MDA bei einsetzender Hämokonzentration verhält, d.h. ob MDA durch die Kapillarmembran zurückgehalten wird und es durch den Wasserverlust zu einem relativen Anstieg kommt, oder ob MDA membrangängig ist und somit ein Konzentrationsausgleich stattfindet, kann über die Notwendigkeit einer Korrektur der Werte anhand der Hämokonzentration keine endgültige Aussage getroffen werden. Der MDA Anstieg im steady state korreliert gut mit dem Gesamteiweißanstieg, während unter hoher Belastung keine Korrelation der beiden Parameter zu verzeichnen ist. Aus diesem Grund kann angenommen werden, daß im steady state weitestgehend hämodynamische Gründe für den Anstieg verantwortlich sind und nach hoher Belastung zunehmend die Lipidperoxidation Auswirkung zeigt. Nach Korrektur der Hämokonzentration ergibt sich bei niedriger Belastung keine signifikante Veränderung, bei hoher Belastung ein signifikanter Anstieg.

Nach maximaler körperlicher Belastung (bis zur Erschöpfung) von trainierten Probanden auf einem Fahrradergometer wurde ein MDA Anstieg von 26 % gemessen, der gut mit der Höhe der Laktatanstiege korrelierte (Lovlin et al. 1987). Nach einem 80 km Rennen mit trainierten Probanden wurde ein MDA Anstieg von 77% (Kanter et al. 1988) beschrieben. Ein ähnlich hoher Anstieg von 81% konnte mit untrainierten Ratten nach erschöpfender Belastung (Davies et al. 1992) beobachtet werden. Nach einem Halbmarathon (21,1 km) mit trainierten Probanden konnte kein MDA Anstieg gemessen werden (Duthie et al. 1990). In Muskel- und Leberproben im Tiermodell war nach akuter Belastung ebenfalls kein MDA Anstieg zu verzeichnen (Ji et al. 1988, Salminen und Vikko 1983). Nach 60 min Schwimmen fand sich im Rattenmodell ein Anstieg des in verschiedenen Muskelgruppen enthaltenen MDA um

16 % bis 35 % (Koz et al. 1992). Stärkere Anstiege nach Belastungen von 90 und 120 min Dauer wiesen auf eine Belastungsabhängigkeit der MDA-Bildung hin. Bei weitgehender Übereinstimmung über das Auftreten von Lipidperoxidation nach starker körperlicher Beanspruchung herrscht bezüglich des Ausmaßes der erforderlichen Beanspruchung noch keine Klarheit.

Die uneinheitlichen Daten in der Literatur lassen sich mit der Hypothese der Abhängigkeit des oxidativen Stress und dem damit verbundenen MDA Anstiegs von der Belastung erklären. In der vorliegenden Arbeit steigt MDA bei hoher Belastung deutlich stärker an, als im steady state. Im Tiermodell konnte diese Belastungsabhängigkeit ebenfalls gezeigt werden. Nach moderater Belastung stieg MDA in Muskelbiopsien um 68%, nach starker prolongierter Belastung um 120% an (Alessio et al. 1988). Die Aussage, das MDA bei niedriger Belastung abfällt (bei 40 und 70 % $\dot{V}O_{2max}$) und erst bei Maximalbelastung (100 % $\dot{V}O_{2max}$) ansteigt, (Lovlin et al. 1987) konnte nicht bestätigt werden.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß das antioxidative System durch Training verbessert werden konnte und der MDA Anstieg unter körperlicher Belastung nach einer Trainingsphase geringer ausfällt (Alessio und Goldfarb 1988, Somani et al. 1995, Gonenc et al. 2000). Aus diesem Grund ist bei weniger trainierten Probanden bei gleicher Belastung ein höherer MDA Anstieg zu erwarten. Da in der vorliegenden Arbeit die Belastung individuell auf 50-60 % bzw. 70 - 80 % der maximalen Leistung eingestellt war, konnte keine Korrelation zwischen $\dot{V}O_{2max}$ x kg^{-1} und dem MDA Anstieg beobachtet werden.

Unter niedriger Belastung war keine Korrelation der MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende (Δ Laktat < 1 mmol/l, aerober Metabolismus) zu beobachten, während bei hoher Belastung die MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende (Δ Laktat $3,3 \pm 1,0$ mmol/l, teilweiser anaerober Metabolismus) korreliert. Dieser Befund stützt die Annahme, daß der MDA Konzentrationsanstieg unter hoher Belastung abhängig von der Intensität der Belastung und möglicherweise Folge einer Membranschädigung durch Lipidperoxidation ist, während die MDA Konzentrationsveränderungen unter niedriger Belastung durch Hämokonzentration bedingt sind.

Obwohl im Vergleich zu untrainierten Sportlern vor den Versuchen eine deutlich erhöhte gesamtantioxidative Kapazität und Plasmaascorbinsäure gemessen wurde, konnten anhand des MDA Anstiegs unter hoher Belastung oxidative Schäden belegt

werden. Dieser Befund wird gestützt von einem Vitamin C und Vitamin E Interventionsversuch. Zwei Gruppen junger Männer erhielten vor einem 30 minütigen Laufbandversuch hoher Intensität entweder Vitamin C, Vitamin E und Vitamin A oder Placebo. Die Vitaminsupplementation konnte die Pentankonzentration in der Ausatemluft und die MDA Konzentration während des Versuchs nicht senken, reduzierte aber beide Parameter in Ruhe und nach der Belastung (Kanter et al. 1993).

5.4.2. Spectrin

Spectrin ist eines der Hauptstrukturproteine des Erythrozytenmembranskeletts. Die Erythrozytenmembranproteine können gelelektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt werden (Stryer 1996, Voet 1990, Giuliani et al. 1999). Spectrin besteht aus einer 260 kDa α -Kette und einer 225 kDa β -Kette. Jeweils eine α -Kette und eine β -Kette lagern sich parallel aneinander und bilden eine 100 nm lange flexible Helix. Zwei der $\alpha\beta$ -Einheiten sind End-zu-End verbunden und bilden ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer mit einer Länge von 200 nm. Spectrin bindet nicht direkt an die Plasmamembran. Die Bindung erfolgt über Ankyrin und Protein 4.1. Das Protein 4.1 vermittelt die Bindung von Aktinfilamenten an das Carboxylende beider Spectrinketten und die Bindung des Spectrin-Actin-Komplexes an die Zytosolseite von Glykophorin (Transmembranprotein). Über Ankyrin erfolgt die Bindung an ein als Anionenkanal dienendes Membranprotein. Mehrere Spectrintetramere binden an einen Protein 4.1-Komplex und bilden ein kontinuierliches Netzwerk unter der Plasmamembran (Bennet et al. 1988, Stryer 1996, Voet 1990). Die Bedeutung von Spectrin wird am Beispiel eines Gendefektes bei Mäusen, eine hämolytische Anämie auslösend, deutlich. Die Erythrozyten dieser homozygoten spherozytären (sph) Mäuse enthalten nur etwa 5% der normalen Menge von Spectrin. Die Erythrozyten sind kugelig, sind extem instabil und verlieren spontan Membranvesikel (Stryer 1996).

Bei der hereditären Sphärozytose (Kugelzellanämie) liegt ein ähnlicher Gendefekt zu Grunde. Es wird abnormes Spectrin gebildet, mit einer im Vergleich zur Normalform wesentlich geringeren Bindungsaffinität zu Protein 4.1. Die Patienten leiden unter einer hämolytischen Anämie meistens seit frühester Kindheit (Agre 1982, Siegentaler 1987, Voet 1990, Tse und Lux 1999, Giuliani et al. 1999, Straface 2000, Bichis und Huber 2000). Die Fanconis Anämie ist gekennzeichnet durch eine aplastische Anämie mit Spectinveränderungen (Straface et al. 2000) und genetischer Defekte,

die die enzymatische antioxidative Kapazität reduzieren (Bessho 2000), hiermit verbundener Hypersensitivität der DNS gegenüber cross-linking Reagenzien und defekten DNS Reperatur Mechanismen (Mathur et al. 2000). Die pathobiochemischen Veränderungen des Erythrozytenmembranskelettes werden möglicherweise durch oxidative Schäden der Membranskelettproteine ausgelöst, die durch genetisch bedingte Defekte der antioxidativen Kapazität verursacht werden (Bessho 2000). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der reduzierten mechanischen Belastbarkeit und den ähnlichen morphologischen Veränderungen der Erythrozyten unter körperlicher Belastung bzw. als Kennzeichen der oben beschriebenen Anämien möglicherweise vergleichbare pathobiochemischen Veränderungen des Erythrozytenmembranskelettes zu Grunde liegen.

Die während sportlicher Belastung entstehenden Radikale können mit Membranproteinen reagieren und diese quervernetzen und fragmentieren (Deuticke et al. 1984, Wolff et al. 1986). Nach einem Marathonlauf waren elektronenmikroskopische Veränderungen des Erythrozytenmembranskelettes nachweisbar. Das Membranskelettmaterial war reduziert und grobschollig verändert, die Erythrozyten vergrößert (Jordan et al. 1998). Wenn der Spectrin-Komplex unter körperlicher Belastung durch Radikale quervernetzt und in seiner Funktion beeinträchtigt wird, könnte dies der Grund für die kürzere Erythrozytenlebensdauer und Hämolysen bei Sportlern sein.

Von allen Probanden wurden aus Blutproben von vor und nach dem Versuch die Erythrozytenmembranen aufgearbeitet und mit Excel Gelelektrophorese und Silberfärbung ausgewertet. Die Silberfärbung wurde wegen der höheren Empfindlichkeit gegenüber der Commassie Blue Färbung verwendet (Switzer et al. 1979, Merrill et al. 1981, Bio-Rad Bulletin 1987, Heukeshoven und Dernick 1988). Die Auswertung erfolgte anhand von drei Kriterien: 1. Veränderung der Spectrinbanden (Bande 1 und 2), d.h. Verlust oder Verringerung der Spectrinbanden nach der Belastung. 2. Auftreten von niedermolekularen Fragmenten am Gelende. Im niedermolekularen Bereich sind nach Oxidation neue Banden nachweisbar (Koster und Slee 1983, Shinar et al. 1989). Diese Banden entstehen durch direkte Spaltung der Proteine durch Sauerstoffradikale und durch die gesteigerte Anfälligkeit von geschädigten Proteinen gegenüber proteolytischen Enzymen (Pacifci und Davies 1990). 3. Auftreten von quervernetzten hochmolekularen Proteinen an der Auftragsstelle (Deuticke et al. 1984). Reduktion oder Verlust der Spectrinbanden (

Bande 1 und 2) nach Versuch wurde als positives Testergebnis beurteilt. Das Auftreten von niedermolekularen Spaltprodukten am Gelende und hochmolekularen vernetzten Proteinen an der Auftragsstelle wurde als Bestätigung gewertet.

Während der steady state Versuche blieben die Banden in Gelelektrophorese unverändert. Ein Versuch war wegen Hämoglobinüberlagerung nicht auswertbar (n.a.). Während der Versuche unter hoher Belastung zeigten 4 Gele keine Veränderungen. Bei 5 Gelen war eine deutliche Reduktion bzw. Verlust der Spectrinbanden (Bande 1 und 2) zu beobachten. Unter hoher Belastung war ebenfalls ein Versuch wegen Hämoglobinüberlagerung nicht auswertbar. Im steady state waren 100% der auswertbaren Gele unverändert, unter hoher Belastung in 55% der auswertbaren Gele Spectrinveränderungen zu verzeichnen. Bei hoher Belastung waren die MDA Konzentrationsanstiege für Proben mit Spectrinveränderungen signifikant höher ($7,2 \pm 6,9 \%$), als für Proben ohne Spectrinveränderungen ($3,3 \pm 7,2 \%$). Die Befunde deuten darauf hin, daß den Spectrinveränderungen und der MDA Bildung gleiche pathochemische Mechanismen zugrunde liegen können und das bei steigender körperlicher Belastung Membranveränderungen stattfinden, die auf die schädigende Wirkung von Sauerstoffradikalen zurückzuführen sein können.

Das spectringestützte Membranskelett ist keine Eigenart der Erythrozytenmembran. In verschiedenen anderen Zelltypen, z.B Gehirn und Niere, wurden ähnliche Spectrin enthaltende Membranstrukturen beschrieben (Bennett et al. 1988). Es ist zu vermuten, daß die Erythrozytenmembran ein hochspezialisierter Typ eines allgemeinen Modells der Organisation spectringestützter Membranskelette humaner Zellen darstellt (Bennett et al. 1988). Deshalb kann vermutet werden, daß unter körperlicher Belastung nicht nur erythrozytäres Spectrin, sondern auch das Stützskelett anderer Zelltypen geschädigt wird.

5.4.3. H₂O₂-induzierte Chemilumineszenz

Unter Chemolumineszenz versteht man allgemein die Ausstrahlung von Photonen aufgrund chemischer Prozesse. Zwei Arten der Chemolumineszenz sind unterscheidbar. Unter Biolumineszenz versteht man auf enzymatischem Wege erzeugtes sichtbares Licht, wie z. B. die durch das Enzym Luciferase katalysierte Lichtreaktion (Lehninger et al. 1998). Neben dieser relativ starken Lichtausstrahlung gibt es die schwache Chemolumineszenz, die als allgemeine Begleiterscheinung

biologischer Prozesse beobachtet werden kann (Lissi et al. 1988) und der Relaxation von angeregten Elektronen, erzeugt unter anderem durch freie Radikale, zugeschrieben wird (Lissi et al. 1992). Die schwache Chemolumineszenz wird zur Untersuchung von radikalinduzierten oxidativen Vorgängen zum einen als spontane CL, zum anderen als H₂O₂-induzierte Chemolumineszenz eingesetzt (Videla et al. 1984, Lissi et al. 1992, Murphy und Sies 1990). Bei der Messung der spontanen CL werden die während radikalbedingter chemischer Reaktionen entstehenden Photonen aufgezeichnet.

Die direkte Messung von Sauerstoffradikalen in biologischem Gewebe ist schwierig, da die Radikale nur eine Halbwertszeit von wenigen Millisekunden haben (Freeman 1984, Grisham und McCord 1986).

Die H₂O₂-induzierte Chemolumineszenz stellt ein indirekteres Verfahren zum Nachweis von radikalbedingten chemischen Reaktionen dar. Es werden hierbei Organhomogenisate, Serum, Plasma oder Urin mit einer Wasserstoffperoxidlösung in Verbindung gebracht und die anschliessend entstehenden Photonen aufgezeichnet (Popov et al. 1990). Gleichzeitig mit dem Abbau von Lipidperoxiden kann eine ultraweiche Chemolumineszenz beobachtet werden, welche hauptsächlich der Bildung von Singulett-Sauerstoff zugeschrieben wird (Arudi et al. 1984, Kappus 1981, Lissi et al. 1992). Es wird vermutet, daß Lipidperoxidationsmetabolite in der Probe zerfallen und Moleküle mit angeregten Elektronen entstehen, die dann nach Relaxation Licht emittieren. Biomoleküle, die Radikalwirkungen ausgesetzt waren, zeigen längere Zeit eine erhöhte H₂O₂-induzierte Chemolumineszenz. Erhöhte Chemolumineszenz der Probe könnte damit oxidativen Stress *in vivo* reflektieren (Lissi et al. 1992).

Obwohl die Chemolumineszenz nicht spezifisch für die Lipidperoxidation ist, korreliert sie gut mit anderen Peroxidationsparametern (Kappus 1981). Ein eindeutiger Zusammenhang wurde zwischen der spontanen CL und dem MDA festgestellt. Die *in vitro* durchgeführte Lipidperoxidation von Rattenleber-Mikrosomen (Noll et al. 1986) sowie von Erythrozyten (Videla et al. 1984) führte zu einem gleichsinnigen Anstieg der spontanen CL und des MDA bzw. der thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen. Aus sportmedizinischer Sicht wurde die CL in die Erforschung radikalbedingter Effekte bisher kaum eingebunden.

Die Zeitspanne, in der diese Veränderungen nachweisbar sind, hängt von der Effizienz mit der ein weiterer Metabolismus unterdrückt wird sowie der Lagerung der

Proben ab. Von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der H_2O_2 -induzierten Chemolumineszenz ist die Menge der antioxidativ wirksamen Radikalfänger. Die gemessene Intensität wird durch Zusatz von Radikalfängern vermindert. Die im Urin gemessene CL ließ sich durch 3-tägige (Rose 1976) bzw. einmalige (Gisler et al. 1982) orale Gabe der antioxidativ wirkenden Ascorbinsäure unterdrücken. Die Einbeziehung der Ergebnisse der Bestimmung der gesamten antioxidativen Kapazität ist somit erforderlich.

Die gesamtantioxidative Kapazität und die Ascorbinsäure zeigten unter niedriger Belastung einen Anstieg als Hinweis der vermehrten Bereitstellung von antioxidativen Substanzen, unter hoher Belastung war keine signifikante Veränderung möglicherweise als Hinweis auf einen erhöhten Verbrauch bzw. erschöpfte Speicher zu beobachten.

Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse war ein Abfall der CL bei niedriger Belastung und ein Anstieg bei hoher Belastung zu erwarten. Weiterhin sollte bei erwarteter höherer Konzentration von Lipidperoxidationsmetaboliten unter hoher Belastung, im Vergleich zum steady state, ein gesteigertes CL Signal gefordert werden. Bei dem geringen Datenumfang ist die CL Messung nur bedingt statistisch auswertbar und eingeschränkt interpretierbar. Die auswertbaren Proben zeigten eine Abfallstendenz unter niedriger Belastung ($n = 5$) und einen signifikanten Anstieg unter hoher Belastung ($n = 5$). Die Daten stimmen mit den Vorhersagen und der Hypothese der Belastungsabhängigkeit der Lipidperoxidation überein. Es fanden sich weder negative noch positive Korrelationen der H_2O_2 -induzierten CL mit der MDA Konzentration oder den Spectrinveränderungen.

Nach einem Marathonlauf konnten im Urin deutlich erhöhte Werte der H_2O_2 -induzierten CL und der MDA Konzentration (Lochner 1994) gemessen werden. Ergometrierversuche (36 Minuten, Abbruchlaktat $4,9 \pm 1,0$ mmol/l) führten zu einem statistisch nicht signifikanten Abfall der H_2O_2 -induzierten CL um 17,5 % beziehungsweise 22,8 % nach Korrektur der Hämokonzentration (Tavakolian, nicht publiziert).

Untersuchungen zum chemischen Korrelat der Urin-CL zeigten, daß die Substanzen *in vivo* nur schlecht eingrenzbar waren. Durch Ultrafiltration ließen sich die Substanzen als kleiner als 500 Dalton identifizieren (Rose 1976). Bedeutsame Quellen der H_2O_2 -induzierten CL des Blutplasmas sind Lipide und Proteine: Die *in-vitro* Oxidation von Albumin führte zu einem Anstieg der CL, jedoch auch die

Oxidation von einzelnen Aminosäuren wie Tryptophan oder Tyrosin ergab signifikante Anstiege (Barnard et al. 1993). *In vitro* oxidierte LDL-Lipoproteine führten zu einer erhöhten H₂O₂-induzierten CL (Wieland et al. 1989, Cominacini et al. 1993). Hieraus folgt, daß die H₂O₂-induzierte CL sowohl von oxidativ veränderten Makromolekülen als auch von niedermolekularen Substanzen stammt. Über das Verhalten dieses Parameters im Rahmen der Hämokonzentration kann folglich keine eindeutige Aussage getroffen werden. Zusammenfassend erscheint die H₂O₂-induzierte CL des Plasmas zur Untersuchung von oxidativen Schäden unter Belastung nur bedingt geeignet. Es erfolgt im Gegensatz zur spontanen CL *in vitro*, im Rahmen der in der vorliegenden Untersuchung angewandten Verfahren, nur ein indirekter Nachweis der Radikalreaktionen. Prinzipielle Nachteile der Methode liegen in der Tatsache, daß sich weder Ort noch biochemisches Substrat der Radikalreaktion genauer eingrenzen lassen. Die theoretisch überlegene direkte Beobachtung von Radikalreaktionen mittels der spontanen CL ist zur Zeit im Rahmen sportmedizinischer Untersuchungen mit menschlichen Probanden aufgrund des invasiven und apparativ aufwendigen Versuchsaufbaus nicht durchführbar.

5.5. Antioxidatives System

Die Aufgabe des komplexen antioxidativen Systems ist die Reduktion der ROS Bildung und die Neutralisation gebildeter schädlicher Radikale (Burton et al. 1985). Als Parameter der protektiven Mechanismen wurden antioxidative Kapazität, harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität und Ascorbinsäure bestimmt.

5.5.1. Gesamtantioxidative Kapazität

Die antioxidative Kapazität besteht aus einem enzymatischen und einem nichtenzymatischen Teil. Der enzymatische Teil bestehend aus den antioxidativen Enzymen Superoxiddismutase (Fridovich 1974), Katalase (Kappus und Sies 1981) und Glutathionperoxidase (Kappus und Sies 1981, Deneke et al. 1985, Michiels und Remacle 1988). Der nichtenzymatische Teil wird von den Vitaminen A, C, E (Halliwell 1981, Burton und Ingold 1983, Fukuzawa et al. 1981, Hornsby und Crivello 1983, Wispé et al. 1986, Duthie et al. 1990, Goldfarb 1992, Kanter et al. 1993) und Plasmabestandteilen wie Harnsäure (Burton und Ingold 1983), Transferrin, Ferritin, Lactoferrin, Coeruloplasmin, Steroiden, Katecholaminen (Lewin und Popov 1988) u.ä. gebildet. Die antioxidative Kapazität des Plasmas setzt sich aus einer Vielzahl

von Stoffen zusammen. Selbst gemeinhin als Einzelsubstanzen angesehene Komponenten der AK wie z. B. das Vitamin E bestehen tatsächlich aus einer Gruppe von ähnlichen Tocopherolen (Elstner 1991). Prinzipiell kann jedes Molekül, welches ohne Entstehung von Folgeradikalen von einem Sauerstoffradikal oxidiert wird, als ein Radikalfänger angesehen werden. Unter Verwendung einer vergleichbaren Bestimmungsmethode wie bei der vorliegenden Untersuchung, fand sich als bedeutenstes niedermolekulares Antioxidans im Serum Harnsäure, gefolgt von Vitamin C und erst an dritter Stelle Vitamin E (Maxwell et al. 1993, Tse et al. 1994, Huang et al. 2000)

Aufgrund der großen chemischen Inhomogenität der Antioxidantien bietet sich für ihre Erfassung die Photochemilumineszenz als Meßgröße an. Hierbei erfolgt die Quantifizierung analog zu der betrachteten Substanzfunktion aufgrund der antioxidativen Wirksamkeit. Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität des Blutplasmas wurde in einem O_2 -produzierenden photochemischen System durchgeführt. Bei der UVA-Bestrahlung einer luminolhaltigen Testlösung entstehen Sauerstoffradikale (Luminol dient dabei als Photosensibilisator), deren Konzentration mittels eines Chemolumineszenzmeßsystems wiederum unter Beteiligung des Luminols (als Chemolumineszenzverstärker) erfaßt wird. Die spezifischen Veränderungen des Meßsignals in Anwesenheit von Superoxidradikalscavenger bzw. -trapper ermöglichen eine Quantifizierung der antiradikalischen Eigenschaften des Plasmas und können als indirekter Ausdruck der systemimmanenten antioxidativen Kapazität, bestehend aus der enzymatischen und der nichtenzymatischen Komponente gewertet werden (Tanzmann 1987, Popov et al. 1988). Die Chemolumineszenzmessung ist unspezifisch, korreliert aber gut mit Parametern der Lipidperoxidation (Kappus 1981).

Zahlreiche Untersuchungen wurden zu einzelnen Antioxidantien in Zusammenhang mit körperlicher Leistung durchgeführt. Zumeist wurde der Einfluß von oraler Substitution oder alimentärer Deprivierung von Vitamin C oder Vitamin E auf körperliche Leistungsfähigkeit und Meßgrößen der Lipidperoxidation untersucht. In einer Vitaminsupplementierungsstudie erhielten die Probanden Vitamin C, Vitamin E oder Placebo vor einem einstündigen Belastungsversuch (Maxwell et al. 1993). Es wurden AK Anstiege in den Vitaminsupplementierungsgruppen beobachtet, aber in keiner Gruppe MDA Veränderungen. Ein Mangel an Vitamin E kann den oxidativen Streß bei Ausdauerleistung verstärken (Dillard et al. 1978, Gohil et al. 1986). Durch

eine alimentäre Substitution von Vitamin E ließ sich eine Lipidperoxidation unterdrücken (Sumida et al. 1989, Meydani et al. 1993, Goldfarb 1993). Vitamin C hat in Zusammenarbeit mit Vitamin E einen protektiven Effekt (Kanter et al. 1993), jedoch sind die Ergebnisse von Studien zu der isolierten Bedeutung des Vitamin C nicht eindeutig (Gerstner 1989).

Aerobes Training verstärkt das antioxidative Abwehrsystem durch Erhöhung der Aktivität des enzymatische Teils der AK (Dekkers et al. 1996, Evans 2000). In Versuchen mit Hamsterfibroblasten (Sullivan et al. 1992) konnte gezeigt werden, daß Zellen, die 18 Monate lang mit steigenden O₂ Konzentrationen inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigerte Resistenz gegen Lipidperoxidation entwickelten. Die mit O₂ inkubierten Zelllinien zeigten erhöhte Aktivitäten der ROS inaktivierenden Enzyme Katalase (CAT), Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase (GPx). In einigen anderen Zellkultursystemen und Tiermodellen (Frank et al. 1978, Van der Valk et al. 1985, Crapo et al. 1980, Anuradha und Balakrishnan 1998) konnte ebenfalls ein Anstieg der Aktivitäten von CAT, SOD und GPx unter adaptiver O₂ Belastung festgestellt werden. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß nach Training bei gleich hoher Belastung der MDA Anstieg geringer ist als ohne Training (Alessio und Goldfarb 1988, Somani et al. 1995). Sportler mit einer $\dot{V}O_{2max} \times kg^{-1} = 64,6 \pm 1,7 \text{ ml} \times kg^{-1} \times \text{min}^{-1}$ hatten in einem Experiment höhere SOD und Katalase Aktivität als die Kontrollgruppe mit einer $\dot{V}O_{2max} \times kg^{-1} = 50,5 \pm 1,9 \text{ ml} \times kg^{-1} \times \text{min}^{-1}$ (Jenkins et al. 1984). Nach 4 wöchigem Schwimmtraining waren die SOD und GPx Aktivitäten deutlich erhöht und die MAD Konzentrationen erniedrigt (Gonenc 2000). Die Plasmakonzentrationen der wasserlöslichen Vitamine sind bei Athleten im Vergleich zu einer untrainierten Kontrollgruppe deutlich höher. Die Konzentration der fettlöslichen Vitamine war in beiden Gruppen gleich (Rokitzki et.al. 1989).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche mit ausdauertrainierten Sportlern mit einer $\dot{V}O_{2max} \times kg^{-1} = 61,0 \pm 6,4 \text{ ml} \times kg^{-1} \times \text{min}^{-1}$ durchgeführt. Es war ein trainiertes antioxidatives System mit hohen AK Werten vor den Versuchen zu erwarten. Die gesamtantioxidative Kapazität vor den Versuchen betrug $1315,0 \pm 974,8 \text{ } \mu\text{mol/ml}$, während unter der Verwendung der gleichen Bestimmungsmethode bei wenig trainierten Freizeitsportlern (Tavakolian, nicht publiziert) vor Versuchsbeginn nur $782 \pm 272 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ gemessen wurde. Es bestand keine Korrelation zwischen $\dot{V}O_{2max} \times kg$

⁻¹ und der AK. Eine Korrelation war nicht zu erwarten, da die AK nicht nur durch Training sondern auch durch alimentäre Faktoren vor dem Versuch beeinflusst wird. Aufgrund der prinzipiellen Inhomogenität des Parameters, zum einen mit kleinen membrangängigen Molekülen, zum anderen aber mit großen Molekülen, die den Plasmaraum kaum verlassen können, läßt sich der Einfluß der Hämokonzentration auf die Meßwerte nur grob abschätzen. Die Harnsäure verliert bei physiologischem pH ein Proton und liegt fast vollständig als Uratanion vor (Stryer 1996). Für hydrophile polare Moleküle ist die Lipidmembran schlecht permeabel (Streyer 1996). Experimentelle Studien an Kapillargefäßendothelien im Tiermodell zeigen eine schlechte Membranpermeabilität für Urat (Kroll et al. 1992). Da die nicht membrangängige Harnsäure den größten Anteil der AK stellt, berechnet über alle Versuche mit 89,9 %, und der Anteil der Harnsäure sich während der Versuche nicht ändert, ist der Effekt der Hämokonzentration auf die AK relativ groß.

Unter niedriger Belastung zeigte die AK einen signifikanten Anstieg. Dieser Befund verdeutlicht eine Aktivierung des antioxidativen Systems unter der körperlichen Belastung durch Enzyminduktion (z.B. CAT, SOD und GPx) und Mobilisation von nichtenzymatischen Antioxidantien. Während der körperlichen Belastung kommt es zu Mobilisation von Vitamin C und Vitamin E aus dem Muskelgewebe in das Plasma (Poulson et al. 1999). Da sich unter hoher Belastung kein signifikanter Anstieg fand, deutet dies auf eine vermehrte Inanspruchnahme der antioxidativen Mechanismen, mit beginnender Erschöpfung des antioxidativen Systems beim Erreichen der maximalen Enzyminduktion und Verbrauch der verfügbaren Antioxidantien, hin.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer Autoren ist nicht unproblematisch, da von diesen in der Regel nur einzelne Komponenten der AK betrachtet werden. Nach einem Halbmarathon fanden sich keine signifikanten Veränderungen von Vitamin E. Deutliche Anstiege fanden sich bei Vitamin C, Vitamin A und Harnsäure, so daß von einem Anstieg der antioxidativen Kapazität auszugehen ist (Duthie et al. 1990). Nach 45-minütiger Laufbandergometrie bei 75 % der maximalen Herzfrequenz fanden sich Anstiege des Vitamin E, Vitamin C, sowie der Harnsäure (Meydani et al. 1993). Unter Einbeziehung der Hämokonzentration waren diese Veränderungen jedoch nicht signifikant. Nach einem Marathonlauf fand sich ein Anstieg des Vitamin C, jedoch keine signifikante Veränderung des Vitamin E (Rokitzki et al. 1994). Wenn unter intensiver Belastung der Verbrauch antioxidativer Substanzen die Mobilisationsfähigkeit und die Regenerationskapazität übersteigt, scheint auch ein

Abfall der AK möglich zu sein. Diese Annahme würde das Ausbleiben eines Anstiegs der AK Konzentration unter hoher Belastung erklären

5.5.2. Harnsäure und harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität

Harnsäure (HS) stellt den größten Anteil des antioxidativen Potentials des Plasmas (Ames et al. 1981, Tse et al. 1994, Mikami et al. 2000, Huang et al. 2000). HS ist das Endprodukt des Purinabbaus, einer Reaktion, die bei erhöhter ATP-Regeneration vermehrt auftritt (Nasrallah und Al-Khalidi 1964). Insbesondere bei anaerober ATP-Regeneration fällt vermehrt Harnsäure an (Yamanaka et al. 1992). Harnsäure hat eine antioxidative Wirkung (Mikami et al. 2000). Hydroxylradikale, Superoxid und Singulett Sauerstoff werden zerstört, indem sie mit HS reagieren und diese zu Allantoin oxidieren (Robert 1996, Stryer 1996). Allerdings kann bei der Reaktion der HS mit Radikalen auch ein HS Radikal entstehen. Das HS Radikal wird durch Ascorbinsäure reduziert und HS wird regeneriert (Halliwell and Gutteridge 1990). Auf äquimolarer Basis ist Harnsäure in ihrer antioxidativen Wirksamkeit der Ascorbinsäure gleichzusetzen. Aufgrund der höheren Konzentration im menschlichen Organismus stellt sie jedoch ein bedeutenderes Antioxidans dar (Elstner 1991, Benzie 2000, Mikami et al. 2000). In vitro fand sich eine Verminderung von DNA-Strangbrüchen um 60-80 % bei Harnsäurekonzentrationen von 100-200 $\mu\text{mol/l}$ (Cohen 1984). Die Lipidperoxidation an Rattenerthrozytenmembranen in vitro ließ sich durch Anwesenheit von 120 $\mu\text{mol/l}$ Harnsäure in der Lösung um 90% reduzieren (Ames et al. 1981). Die Bestimmung von Allantoin in Plasma und Urin kann als Indikator für oxidativen Streß unter körperlicher Belastung dienen (Mikami et al. 2000). Nach Ergometrieversuchen war unter einer Belastung von 100 % $\dot{V}O_{2\text{max}}$ das Verhältnis Allantoin/Harnsäure im Serum unmittelbar nach dem Versuch und im Urin nach 60 min erhöht, während sich unter einer Belastung von 40 % $\dot{V}O_{2\text{max}}$ keine Veränderungen zeigten (Mikami et al. 2000). Nach erschöpfender Ergometrie war Allantoin im Plasma und in Muskelbiopsien um das doppelte erhöht (Hellstein et al. 1997). Die Bedeutung der Harnsäure als Antioxidans wird bei Patienten mit Hypouricämie (genetisch bedingte erhöhten HS Ausscheidung durch verminderte Reabsorption) und belastungsinduziertem akutem Nierenversagen (ANV) deutlich. Nach körperlicher Belastung kommt es bei bestehender Hypouricämie zu einem ANV mit tubulärer Nekrose, Verdickung der Basalmembran und interstitieller Fibrose wahrscheinlich bedingt durch oxidative Schäden. Unter

körperlicher Ruhe tritt eine Erholung der Nierenfunktion ein (Ninomiya et al. 1996, Tazawa 1996, Sato 1998, Kikuchi et al. 2000, Watanabe 2000).

Zur Differenzierung der Bestandteile der AK wurde die harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität (AKU) nach Elimination der Harnsäure aus dem Plasma durch Zusatz von Urikase gemessen. (Tanzmann 1978, Popov et al. 1988, Popov und Lewin 1993). Die antioxidative Wirkung der Harnsäure wurde über die Differenz $AK - AKU$ berechnet.

Dabei wurde deutlich, daß Harnsäure mit Abstand den größten Anteil der AK ausmacht. Das Verhältnis Harnsäure zu AK blieb berechnet über alle Versuche mit $89,9 \pm 3,9$ % konstant. Der Anteil der Harnsäure an der AK, berechnet aus AK und AKU, zeigt weder unter niedriger noch unter hoher Belastung eine signifikante Änderung.

Nach Läufen von 5 und 42 km fanden sich Anstiege der Harnsäure von 21,6 bzw 27,4 % (Sutton et al. 1979). Ein kürzerer Ergometrieversuch zeigte keine Veränderung der Harnsäure (Sutton et al. 1979). In einer anderen Untersuchung fanden sich bei Laufbelastungen von 100 m, 800 m, 5 km und 42 km jeweils signifikante Anstiege der Plasma-Harnsäure von 36, 66, 54 und 34 % (Hellsten-Westing et al. 1991). Diese deutlichen Anstiege waren nach 45-60 min aufgetreten. Die direkt im Anschluß an die Belastung erhobenen Werte wurden nicht publiziert. Eine andere Untersuchung (Priest et al. 1982) verglich die Harnsäure vor einem 21 km Lauf mit den sofort im Anschluß daran erhobenen Werten. Es kam zu einem Anstieg um 17,5 %. Die durchschnittliche Belastungszeit wird nicht angegeben, sämtliche Probanden beendeten den Lauf innerhalb von 90 min. Beim Vergleich einer Fahrradergometrie von 2 h kontinuierlicher Belastung bei 60 % $\dot{V}O_{2max}$ mit 2 h intermittierender Belastung von 120 % $\dot{V}O_{2max}$ (1 min Ergometrie und 4 min Ruhe alternierend) fand sich unmittelbar bei Versuchsende bei der supramaximal belasteten Gruppe ein Anstieg der Harnsäure um 40 %, während in der submaximal belasteten Gruppe keine Veränderung auftrat (Green und Fraser 1988).

In Zusammenfassung der Literaturdaten wird deutlich, daß Harnsäure erst nach einem bestimmten Zeitintervall belastungs- und leistungsabhängig ansteigt. Mehrere Faktoren beeinflussen die HS Konzentration. Bei zunehmender Erschöpfung werden vermehrt energiereiche Nucleosidphosphate zu Inosinphosphat (IMP) abgebaut (Sahlin et al. 1999). IMP wird über Hypoxantin und Xantin zu Harnsäure verstoffwechselt. Die HS Konzentration steigt an (Sahlin et al. 1999). Andererseits

wird Harnsäure als Antioxidans verbraucht. Dieser Mechanismus nimmt zu, wenn der Ascorbinsäurepool erschöpft ist und nicht mehr zur Regeneration beiträgt. Die Tatsache, daß bei der vorliegenden Untersuchung bei beiden Versuchserien kein Anstieg des Harnsäureanteils der AK (AK – AKU) zu verzeichnen war, läßt sich am ehesten auf die im Vergleich mit den Literaturdaten verhältnismäßig kürzere Belastungszeit zurückführen.

Die harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität besteht aus dem enzymatischen und dem nichtenzymatischen Teil der AK, abzüglich der Harnsäure. Da ein Teil der AKU aus nicht membrangebunden Enzymen (z.B. SOD, CAT, GPx) und großen Proteinen (z.B. Transferrin, Coeruloplasmin, Ferritin, Lactoferrin) besteht, muß ein relativer Effekt der Hämokonzentration auf die AKU in Betracht gezogen werden. Allerdings besteht keine Korrelation der AKU mit den Parametern der Hämokonzentration. Dieser Befund läßt sich mit einer relativen Unabhängigkeit des Parameters von der Hämokonzentration erklären. Aufgrund der prinzipiellen Inhomogenität des Parameters läßt sich der Einfluß der Hämokonzentration auf die Meßwerte nur grob abschätzen. Die AKU zeigte sowohl bei niedriger als auch bei hoher Belastung eine nicht signifikante Anstiegstendenz. Nach Ausgleich der Hämokonzentration zeigte sich weder bei niedriger noch bei hoher Belastung eine AKU Konzentrationsänderung.

Die Anteile der AKU und Ascorbinsäure (AA) an der AK unterscheiden sich nicht signifikant. Der Anteil der AA und AKU korrelieren mit $p < 0,01$. Hieraus kann geschlossen werden, daß ein großer Anteil der durch die AKU gemessene antioxidative Wirkung durch Ascorbinsäure hervorgerufen wird. Dieser Befund steht im Einklang mit der Tatsache, daß der größte Anteil der antioxidativen Wirkung des Plasmas durch Harnsäure und Vitamin C hervorgerufen wird (Maxwell et al. 1993, Tse et al. 1994, Huang et al. 2000) und die Harnsäure bei der AKU Bestimmung zerstört wurde.

5.5.3. Ascorbinsäure

Ascorbinsäure (AA) ist eines der bedeutendsten Antioxidantien (Lehninger et al. 1998, Maxwell et al. 1993, Tse et al. 1994, Huang et al. 2000) und besitzt eine stark reduzierende Wirkung. Dabei wird L-Ascorbinsäure über L-Monodehydroascorbinsäure (MDHA) zur Dehydroascorbinsäure (DHA) unter Abgabe jeweils eines Elektrons oxidiert (Buddeke 1985, Henschler und Rummel 1987).

Ascorbinsäure ist hydrophil und erreicht deshalb in Lipidmembranen keine Wirkkonzentration. Sie kann aber oxidiertes Tocopherol reduzieren und damit regenerieren (Elstner 1991, Kagan et al. 1992, Hamilton 2000). Menschen können durch einen genetisch bedingten Mangel an L-Gulonolaktonoxidase AA nicht selbst synthetisieren und sind auf deren exogene Zufuhr angewiesen (Buddeke 1985). Intrazelluläre AA steht mit extrazellulärer AA im Austausch. Die Passage der Zellmembran erfolgt in Form der lipophilen membrangängigen DHA, die in einem Redox Gleichgewicht mit AA vorliegt. Zusätzlich besitzen Zellmembranen Transportkanäle für DHA. Der Transport durch die Membran erfolgt über die Hexose Transporter GLUT 1, GLUT 3 und GLUT 4 (Rumsey et al. 1997, Rumsey et al. 2000). Weiterhin vermag intrazelluläre AA extrazelluläre DHA in konzentrationsabhängiger Rate über ein plasmamembrangebundenes Redox System zu reduzieren. Durch dieses transmembranöse Redox System wird unter den Bedingungen eines oxidativen Stresses ein Absinken der extrazellulären AA Konzentration verhindert (Van Duijn et al. 2000). Das radikalische Zwischenprodukt des AA/DHA Gleichgewichts, die Monodehydroascorbinsäure kann intrazellulär durch eine mikrosomale NADH₂-abhängige Monodehydroascorbinsäure-Reduktase zu AA rückgebildet werden (Buddeke 1985). Die Glutathion –abhängige Dehydroascorbatreduktase bildet DHA zu AA zurück (Biesalski 2000).

Der Anteil der AA an der AK wurde durch Auftrennung des Plasmas mittels einer Trennsäule und selektiver Messung der ausschließlich AA enthaltenden Fraktionen bestimmt. Hierbei erfolgt die Quantifizierung aufgrund der antioxidativen Wirksamkeit. Der Test erfasst demnach AA (1 Elektron Donatoren) und MDAH (1 Elektron Donatoren und 1 Elektron Akzeptor), aber nicht DHA (1 Elektron Akzeptor). Da AA und DHA in einem Redox Gleichgewicht vorliegen und ein Austausch mit dem Intrazellulärraum besteht, wurde keine Hämokonzentrationskorrektur durchgeführt. Weder unter niedriger noch unter hoher Belastung korrelierte die Konzentrationsänderung der AA mit den Parametern der Hämokonzentration.

Die AA Konzentration vor den Versuchen betrug $85,5 \pm 36,4$ $\mu\text{mol/ml}$, während unter der Verwendung der gleichen Bestimmungsmethode bei wenig trainierten Freizeitsportlern (Tavakolian, nicht publiziert) vor Versuchsbeginn nur $46,8 \pm 18,4$ $\mu\text{mol/ml}$ gemessen wurde. Der oxidative Stress durch kontinuierliches Training führt zu einer Adaptation des antioxidativen Systems mit erhöhten Spiegeln von antioxidativen Substanzen. Im Vergleich von Fußballspielern in einer kontinuierlichen

Trainingsphase mit einer untrainierten Kontrollgruppe konnten bei den Sportlern deutlich erhöhte AA Werte gemessen werden (Brites et al. 1999).

Die AA Konzentration stieg während der Versuche unter niedriger Belastung signifikant an. Unter hoher Belastung war keine Veränderung zu beobachten. Dies könnte darauf hinweisen, daß unter Belastung bei steigender ROS Produktion zum Ausgleich vermehrt AA bereitgestellt wird. Unmittelbar im Anschluß an körperliche Beanspruchung finden sich beim Menschen im Plasma erhöhte Ascorbinsäurekonzentrationen (Garry und Appenzeller 1983). Während körperlicher Belastung kommt es zu Mobilisation von Vitamin C aus dem Muskelgewebe in das Plasma (Poulson et al. 1999). Weiterhin wird als Ursprung des Plasmaascorbinsäureanstiegs unter körperlicher Belastung die Nebennierenrinde angesehen, in der sich über 150-mal höhere Konzentrationen als im Plasma finden (Sayer et al. 1945, Sayer et al. 1946, Arad et al. 1985, Gleeson et al. 1987). Unterstützend fand sich eine positive Korrelation des Anstiegs von Ascorbinsäure und Plasmacortisol nach Belastung (Gleeson et al. 1987), sowie ein Anstieg der Plasmaascorbinsäure durch Gabe des die Cortisolausschüttung der Nebennierenrinde anregenden Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) (Sayers et al. 1946). Untersuchungen mit Ratten zeigten eine Abnahme des Ascorbinsäuregehalts der Nebennieren nach körperlicher Belastung (Stojan und Tittel 1966). Einschränkend für den Vergleich solcher Tierversuche ist jedoch die Tatsache, daß höhere Primaten, Menschen sowie Meerschweinchen die Ascorbinsäure im Gegensatz zur Ratte nicht selbständig synthetisieren können. Daraus resultieren andere Mechanismen unter Belastung. So ließ sich bei Ratten als Reaktion auf erhöhten Streß durch körperliche Anstrengung eine Erhöhung der Aktivität der AA synthetisierenden L-Gulonolaktoneoxidase nachweisen (Akamatsu et al. 1986). Beim Menschen kommt als Ursache für einen Ascorbinsäureanstieg lediglich die Freisetzung aus den Speichern in Betracht.

Das Ausmaß des Anstieges ist von der Länge der Belastung abhängig (Senger und Israel 1975). Nach einem 21-km-Lauf von 9 Freizeitsportlern fand sich eine Zunahme der Ascorbinsäure im Plasma um 24,9% in Verbindung mit einem ACTH Anstieg (Gleeson et al. 1987). Nach einem 21-km-Lauf fand sich ein Anstieg des Vitamin C um 34% (Duthie et al. 1990). Ergometrieversuche (12 Minuten Aufwärmphase, 12 Minuten niedrige Belastung, 12 Minuten hohe Belastung, Abbruchlaktat $4,9 \pm 1,0$ mmol/l) führten zu einem Anstieg der AA Konzentration um 15,6% (Tavakolian, nicht

publiziert). Im Vergleich von Rennen bergab (35 min, 60 % $\dot{V}O_{2max}$) mit Gehen bergauf (35 min, 60 % $\dot{V}O_{2max}$) wurden beim Rennen Abfälle der AA Konzentration beobachtet, während beim Gehen die AA Konzentration unverändert blieb (Camus et al. 1994). In einem Schwimmemperiment mit Ratten unter intensiver hoher Belastung fand sich eine Abnahme der AA Konzentration unmittelbar nach dem Versuch (Koz et al. 1992). Zusammenfassend führt körperliche Belastung zur einer Mobilisation von antioxidativen Substanzen mit einem Anstieg der AA Konzentration im Plasma. Das Ausmaß des Anstieges scheint abhängig von der Dauer und der Intensität der Belastung. Wenn unter intensiver Belastung der Verbrauch der AA die Mobilisationsfähigkeit und die Regenerationskapazität der oxidierten Form übersteigt, scheint auch ein Abfall der AA Konzentration möglich zu sein. Diese Annahme würde das Ausbleiben eines Anstiegs der AA Konzentration unter hoher Belastung erklären.

5.6. Schlußfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß oxidative Schäden an Membranlipiden und -proteinen bereits bei relativ kurzer, intensiver Belastung auftreten können.

Während bei einer moderaten körperlichen Belastung, gekennzeichnet durch Laktat steady state und aeroben Stoffwechsel, keine Änderung der MDA Konzentration auftrat und die Erythrozytenmembranproteine in der Gelelektrophorese keine Veränderungen zeigten, stieg bei einer intensiven körperlichen Belastung, gekennzeichnet durch deutliches Überschreiten des maximalen Laktat steady state und teilweisen anaeroben Stoffwechsel, die MDA Konzentration an und die Gelelektrophorese der Erythrozytenmembranproteine wies Verluste oder Reduktion der Spectrinbande auf. Unter moderater Belastung war keine Korrelation der MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende zu beobachten, während bei intensiver Belastung die MDA Konzentration mit den Laktatwerten bei Versuchsende korrelieren. Die Befunde zeigen eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Schädigung von Membranlipiden- und proteinen von der Intensität der körperlichen Belastung. Das Überschreiten des maximalen Laktat steady state könnte eine Schwelle mit deutlicher Zunahme der oxidativen Schäden darstellen. Bei intensiver Belastung waren die MDA Konzentrationsanstiege für Proben mit Spectrinveränderungen signifikant höher als für Proben ohne Spectrinveränderungen. Die Befunde deuten

darauf hin, daß den Spectrinveränderungen und der MDA Bildung gleiche pathochemische Mechanismen zugrunde liegen können.