

B. METHODIK

1. Experimentelle Durchführung

1.1. Studie Halle Triathlon

1.1.1. Versuchspersonen

An dem Versuch nahmen 12 Triathletinnen teil, die alle in deutschen Triathlonvereinen organisiert sind und ein regelmäßiges Training absolvieren. Durch eigenanamnestische Angaben vor dem Experiment am Versuchstag wurden eventuelle Einflüsse von Erkrankungen auf das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System der Probanden ausgeschlossen. Alle Teilnehmerinnen waren Nichtraucherinnen. Drei der Zwölf an der Studie teilnehmenden Athletinnen berichteten über einen gelegentlichen Alkoholkonsum. Sieben Teilnehmerinnen nahmen orale Kontrazeptiva ein. Zwei Teilnehmerinnen konsumierten regelmäßig Multivitaminpräparate, zwei weitere Kandidatinnen nahmen kürzlich andere Medikamente (Antibiotika / NSAR) ein.

Jede Versuchsteilnehmerin wurde über das Protokoll und Ziel der Studie eingehend vor Versuchsbeginn informiert und ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme wurde eingeholt.

Nähere Angaben zu den Versuchspersonen sind in **Tabelle 1** aufgeführt.

Tabelle 1
Charakterisierung der Versuchspersonen Studie Triathlon

Versuchspersonen	(n = 12)	Medianwerte	Spannweiten
Alter	(Jahre)	27,5	20,0 - 42,0
Körpergewicht	(kg)	59,8	54,0 - 67,0
Körpergröße	(cm)	169,5	164,0 - 174,0
Körpertemperatur	(°C)	35,9	35,0 - 36,8
Ruhepuls	(min ⁻¹)	82,0	72,0 - 100,0
Trainingszeit pro Woche	(h)	10,0	3,5 - 20,0

1.1.2. Versuchsablauf

Die Untersuchung fand am 25. Juli 1999 anlässlich eines Wettkampfes der 2. Bundesliga in Halle/Saale (Sportkomplex Osendorfer See) statt. Der Triathlon entsprach dem olympischen Reglement (1.5 km Schwimmen / 40 km Radfahren / 10 km Laufen); Startzeit war um 11.00 Uhr. Alle Probanden wurden zur Standardisierung um Einhaltung folgender Verhaltensregeln gebeten:

- am Vorabend keine zu fettreiche Mahlzeit, ebenso keine anstrengenden körperlichen Betätigungen
- ab 12 Stunden vor Versuchsbeginn keinen Alkohol- und Nikotingenuß (alle Probanden waren Nichtraucher)
- keine Feiern (Exzesse) am Vorabend. Möglichst 8 Stunden lang schlafen.
- am Versuchstag zum Frühstück keine fetthaltigen Nahrungsmittel, keinen Kaffee oder Tee (Brot, Marmelade, Honig, Saft, Mineralwasser ad libitum).

Nähere Angaben zu den klimatischen Bedingungen im Wettkampfzeitraum zwischen 10.00 Uhr und 14.00 Uhr sind in der **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 2
Klimatische Bedingungen im Wettkampfzeitraum (Triathlon)

25.07.1999	10.00-14.00 Uhr	Mittelwerte	Spannweiten
Lufttemperatur	(°C)	23,7	21,5 - 25,5
Relative Luftfeuchte	(%)	62,2	55,0 - 72,0
Luftdruck	(hPa)	1008,5	1007,8 - 1008,9
Windgeschwindigkeit	(m/s)	0,9	0,3 - 1,7

Die Sonnenscheindauer im angegebenen Zeitraum betrug 165 min.; die Bewölkung schwankte zwischen 4/8 und 7/8; der gesamte Zeitraum war niederschlagsfrei.

1.1.3. Blutentnahmen

Das Blut wurde durch Punktion einer peripheren Unterarmvene möglichst ungestaut entnommen. Es wurde ein Vacutainer Blutentnahmesystem verwendet.

Die ersten 10 ml Blut dienten der Analyse von gerinnungs- bzw. fibrinolyse-unabhängigen Laborparametern.

Entnahmezeitpunkte waren:

A: ca. 45 min vor dem Start

B: direkt (5-10 min.) nach dem Zieleinlauf

Alle Blutabnahmen erfolgten im Liegen, um den Einfluß der Orthostase (104) zu vermeiden. Direkt im Anschluß an jede Entnahmereihe (A/B) wurde das Blut gekühlt, von Halle nach Berlin transportiert (Transportdauer ca. 2 Std.), zentrifugiert und das Serum bzw. Plasma in Plastikröhrchen bei –80 °C tiefgefroren.

1.2. Studie Berlin Marathon

1.2.1. Versuchspersonen

An dem Versuch nahmen 16 gesunde Marathonläuferinnen teil, die in unterschiedlichem Maße sportlich trainiert waren. Erkrankungen mit Auswirkung auf das Hämostasesystem wurden anamnestisch ausgeschlossen. Eine Teilnehmerin gab einen gelegentlichen Nikotinkonsum an. Neun der sechzehn Teilnehmerinnen trinken gelegentlich ein Glas Alkohol. Drei Teilnehmerinnen nahmen orale Kontrazeptiva ein. Zehn Teilnehmerinnen berichteten über die Einnahme von Vitamin- und/oder Mineralpräparaten, sieben weitere Kandidatinnen nahmen zusätzlich andere Medikamente (Schilddrüsenpräparate, NSAR) ein.

Jede Versuchsteilnehmerin wurde über das Protokoll und Ziel der Studie eingehend vor Versuchsbeginn informiert und ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme wurde eingeholt.

Nähere Angaben zu den Versuchspersonen sind in der **Tabelle 3** aufgeführt.

Tabelle 3
Charakterisierung der Versuchspersonen Studie Marathon

Versuchspersonen	(n = 16)	Medianwerte	Spannweiten		
Alter	(Jahre)	40,5	27,0	-	58,0
Körpergewicht	(kg)	58,0	46,0	-	68,8
Körpergröße	(cm)	166,5	158,0	-	175,0
Körpertemperatur	(°C)	36,2	35,5	-	37,1
Ruhepuls	(min ⁻¹)	68,0	45,0	-	100,0
RR systolisch	(mm Hg)	133,5	104,0	-	160,0
RR diastolisch	(mm Hg)	82,5	70,0	-	134,0
Trainingszeit pro Woche	(h)	6,5	3,5	-	14,0

1.2.2. Versuchsablauf

Die Untersuchungen fanden am Wettkampfwochenende des Berlin Marathons 1999 vom 25.09.-27.09.99 statt. Es wurden bei jedem Probanden drei Blutentnahmen vorgenommen:

A: Sa, den 25.09.99 zwischen 10.00-13.00 Uhr anlässlich der Marathonmesse

B: So, den 26.09.99 zwischen 12.00-14.30 Uhr sofort nach Zielankunft

C: Mo, den 27.09.99 zwischen 6.30-13.00 Uhr nach Absprache (zu Hause, Arbeitsplatz)

Der Marathon wurde über eine amtlich vermessene Distanz (42,195 km) ausgetragen. Es nahmen etwa 26 000 Sportler teil. Startzeit war um 9.00 Uhr. Die Teilnehmerinnen der Marathonstudie wurden ebenfalls um die Einhaltung der unter Punkt 1.1.2. beschriebenen Verhaltensregeln gebeten.

Meteorologische Daten zur Festlegung der Rahmenbedingungen im Wettkampfzeitraum zwischen 9.00 Uhr und 15.00 Uhr sind in der **Tabelle 4** aufgeführt.

Tabelle 4
Klimatische Bedingungen im Wettkampfzeitraum (Marathon)

26.09.1999	9.00-15.00 Uhr	Mittelwerte	Spannweiten
Lufttemperatur	(°C)	15,8	14,3 - 16,7
Relative Luftfeuchte	(%)	93,0	87,0 - 96,0
Luftdruck	(hPa)	1006,2	1005,8 - 1007,6
Windgeschwindigkeit	(m/s)	2,9	2,0 - 4,0

Der Himmel war über den gesamten Veranstaltungszeitraum vollständig mit Wolken bedeckt (8/8); die Niederschlagshöhe betrug 0,5 mm.

1.2.3. Blutentnahmen

Das Blut wurde durch Punktion einer peripheren Unterarmvene möglichst ungestaut entnommen. Es wurde ein Vacutainer Blutentnahmesystem verwendet.

Die ersten 10 ml Blut dienten der Analyse von gerinnungs- bzw. fibrinolyse-unabhängigen Laborparametern.

Entnahmezeitpunkte waren:

- A: etwa 24 h vor dem Marathon
- B: direkt (5-10 min.) nach dem Zieleinlauf
- C: etwa 24 h nach dem Marathon

Die Blutentnahmen erfolgten möglichst in liegender Position. Direkt im Anschluß an jede Entnahmereihe (A/B/C) wurde das Blut gekühlt, vom jeweiligen Entnahmeort ins Labor transportiert (Transportdauer ca. 30 Minuten), zentrifugiert und das Serum bzw. Plasma in Plastikröhrchen bei -80°C tiefgefroren.

2. Untersuchungen zum Blutgerinnungssystem

2.1. Blutgerinnungsparameter

Um den Einfluß einer Ausdauerleistung auf die Blutgerinnung zu charakterisieren, wurden folgende Parameter ausgewählt:

- Thromboplastinzeit (TPZ) = Prothrombinzeit nach Quick
- Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)
- Faktor VIII und Faktor XII
- Fibrinmonomere
- Fibrinogen
- Von Willebrand-Faktor (vWF)
- Aktiviertes Protein C Resistenz

2.2. Testprinzipien

2.2.1. Globaltests des plasmatischen Gerinnungssystems

2.2.1.1. Thromboplastinzeit (TPZ) = Prothrombinzeit nach Quick

Die TPZ ist ein Maß für die Aktivität des exogenen Systems. Der verwendete Thromborel®R Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH dient als schneller und empfindlicher Screening-Test für die Faktoren II, V, VII und X.

Dem Probenplasma wird Thromboplastinreagenz zugesetzt, welches Gewebefaktor III (=Thromboplastin) und Calcium enthält und die Zeit bis zum Eintritt der Gerinnung mit einem Koagulometer bestimmt.

Referenzwert: 0,88 – 1,15 INR (Internationale Normalisierte Ratio)

Der TPZ-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.1.2. Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Mit der aPTT wird der gesamte Teil der endogenen Gerinnungskaskade erfasst, also die Faktoren XII, XI, IX, VIII und mit geringerer Empfindlichkeit auch X, V, II und I.

Verwendet wurde der Pathromtin®SL Test der Behring Diagnostics GmbH Marburg. Dem Probenplasma wird PTT-Reagenz zugesetzt, welches eine optimale Menge an Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator enthält. Durch Zugabe von Calciumchloridlösung (Recalcifizierung) wird die Gerinnung in Gang gesetzt und die Zeit bis zum Auftreten erster Fibrinfäden mit Hilfe eines Koagulometers bestimmt.

Referenzbereich: 26 – 36 Sekunden.

Der aPTT-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.2. Faktorenanalyse des plasmatischen Gerinnungssystems

2.2.2.1. Faktor VIII & Faktor XII

Da Ausdauerleistungen in vorangegangenen Untersuchungen bislang zu einer verstärkten Aktivierung des endogenen Systems geführt haben, wurde dieser Weg eingehender untersucht. Dabei liegt der Schwerpunkt der Betrachtungen auf den Faktoren VIII und XII.

Zur Einzelfaktor-Bestimmung wird die PTT einer Mischung des entsprechenden Mangelplasmas mit dem Probandenplasma gemessen. Ein Probandenplasma, dem der betreffende Gerinnungsfaktor fehlt, ist nicht in der Lage, die Abwesenheit dieses Faktors im Mangelplasma auszugleichen, woraus eine Verlängerung der PTT resultiert. Die Aktivität des Gerinnungsfaktors in % der Norm wird über eine Bezugskurve ermittelt, die mit Verdünnungen von Standard-Human-Plasma oder einem Normalplasma-Pool in Mischung mit diesem Mangelplasma erstellt wird. Es wurden Mangelplasmen der Firma Dade Behring Marburg GmbH benutzt.

Referenzwerte: Faktor VIII & XII 70 – 150 %

Der Faktoren-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.2.2. Fibrinogen

Die Bestimmung des Fibrinogenspiegels im Plasma wurde durch den Multifibren®U Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH durchgeführt.

Hierzu wird das Probanden Citrat Plasma mit einem großen Überschuß an Thrombin zur Gerinnung gebracht. Die Gerinnungszeit hängt hierbei weitgehend vom Fibrinogengehalt der Probe ab. Thrombin hemmende Substanzen (Heparin bis 2 U/ml oder Hirudin in therapeutischer Dosis) beeinflussen den Test nicht. Die Berechnung der Analysenergebnisse erfolgt über eine selbst erstellte Bezugskurve, die anhand von Kontrollplasma erstellt wird.

Der Fibrinogen-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.2.3. Von Willebrand Faktor (vWF)

vWF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 1 und 20 Millionen. Nach heutigen Kenntnissen ist er zusammengesetzt aus Oligomeren (MG 0,85-1,2 * 10⁶ Dalton) mit unterschiedlichem Aggregationsgrad. Dieser großmolekulare Bestandteil des Faktor VIII-Komplexes ist Träger der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (von Willebrand-Faktor-Aktivität) und besitzt keine Gerinnungsaktivität. Diese ist auf dem kleineren Komplexbestandteil (Faktor VIII:C) lokalisiert.

Die Bestimmung des vWF wurde durch den ASSERACHROM® Test [Enzymimmunologischer in-vitro Test zur quantitativen Bestimmung des von Willebrand-Faktor (vWF)] der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

Bei der 1. Immunreaktion bindet der auf den Mikrotitrationsstreifen fixierte spezifische Antikörper gegen vWF den von Willebrand-Faktor der Probe.

Der vWF besitzt mehrere antigene Determinanten. Daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit Peroxidase markierte vWF-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet, deren Menge ein Maß für den vWF-Gehalt der Probe darstellt.

Im nachfolgenden Waschschrift (bound-free-separation) wird das nicht gebundene Peroxidase-Konjugat (POD) entfernt. Nach Zusatz von Harnstoffperoxid und Chromogen (o-Phenyldiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bei 492 nm bestimmt. Aufgrund der Proportionalität von gebundener Enzymaktivität und

Antigenkonzentration steigen die gemessenen Extinktionen mit steigender vWF-Konzentration der Probe an.

Die Auswertung erfolgt über eine Bezugskurve, die mit einer Verdünnungsreihe aus vWF-Standard erstellt wird.

Der vWF-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.3. Indikator der Thrombinwirkung

2.2.3.1. Fibrinmonomere

Die Bestimmung löslicher Fibrinmonomere, die mit Hilfe des Enzymun-Test[®]FM der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt wurde, beruht exakt auf den selben Testprinzip wie der vorangehend beschriebene ELISA.

Der verwendete Antikörper ist spezifisch für den N-Terminus der Fibrin- α -Kette. Es besteht keine Kreuzreaktion mit Fibrinogen Fragment D und Fragment E.

Der Fibrinmonomer-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

2.2.4. Thrombophilieparameter

2.2.4.1. Aktiviertes Protein C Resistenz (APCR)

Das Protein C-System ist ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der Gerinnungsaktivität. Dies geschieht durch das Zusammenwirken des aktivierten Protein C (APC) und seines Kofaktors Protein S, die die prokoagulatorischen Kofaktoren Faktor VIIIa und Faktor Va inaktivieren. Die Bestimmung der APC-Sensitivität dient daher der Identifizierung von Personen mit einem verringerten antikoagulatorischen Potential des Protein C-Systems, die dadurch ein erhöhtes thromboembolisches Risiko tragen.

Die Bestimmung des APC wurde mit dem ProC[®] APC-Test der Firma Dade Behring Marburg GmbH durchgeführt.

Hierzu wurde das Patientenplasma auf gleiche Art und Weise wie bei der Bestimmung der aPTT behandelt und dadurch die Faktoren der intrinsischen

Gerinnungskaskade aktiviert. Durch das gleichzeitig mit dem Calciumchlorid zugegebene aktivierte Protein C werden die prokoagulatorischen Faktoren VIIIa und Va inaktiviert. Dadurch wird die Entstehung eines Gerinnsels verzögert. Die Gerinnungszeit bis zur Bildung eines Gerinnsels wird bestimmt. In Plasmen mit einer verringerten APC-Sensitivität ist die Gerinnungszeit weniger stark verlängert. Ein Mangel an prokoagulatorischen Faktoren sollte ausgeschlossen sein, da dies zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit führt und dadurch eine verringerte APC-Sensitivität kompensiert werden könnte.

Das Verhältnis aus der Gerinnungszeit in Anwesenheit (APCT) und in Abwesenheit (aPTT) von aktiviertem Protein C wird berechnet und als APC-Ratio ($APC-R = APCT/aPTT$) bezeichnet.

Der APCR-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

3. Untersuchungen zum Fibrinolyse-System

3.1. Kenngrößen der Fibrinolyseaktivität

Um während körperlicher Leistung auftretende Veränderungen im fibrinolytischen System feststellen, bzw. verfolgen zu können, wurden folgende Kenngrößen zu allen Entnahmezeitpunkten ermittelt:

- Tissue-Plasminogenaktivator (t-PA: Konzentration)
- Plasminogenaktivator Inhibitor (PAI)
- D-Dimere

3.2. Testprinzipien

3.2.1. Tissue-Plasminogenaktivator (t-PA)

t-PA ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von ca. 70 000 D. Er ist der wichtigste Plasminogenaktivator. Er bildet mit Plasminogen auf der Oberfläche des Fibringerinnsels einen ternären Komplex. Plasminogen wird durch tPA proteolytisch

gespalten und in Plasmin umgewandelt. Die basale tPA Konzentration im Blut ist sehr niedrig.

Die Bestimmung wurde mit dem ASSERACHROM[®] Test [Enzymimmunologischer in-vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Tissue Plasminogen Activator (t-PA)] der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

An der Wand der Mikrotiterstreifen im Überschuß fixierte, t-PA spezifische monoklonale Antikörper (F(ab')₂-Fragmente) reagieren in einer ersten Immunreaktion mit dem Antigen (freies und komplexgebundenes t-PA) des Plasmas. Anschließend werden Plasmabestandteile und Störfaktoren ausgewaschen. In einer zweiten Immunreaktion gibt man im Überschuß als Tracer enzymmarkierte (Peroxidase) t-PA Antikörper. Da das Antigen mehrere antigene Determinanten besitzt, bilden sich Sandwichkomplexe, in denen das Antigen beidseitig von Antikörpern umgeben ist. Die Trennung des freien Enzym markierten Antigens vom Antikörper gebundenen erfolgt durch die Solid-Phase-Technik, d.h., der Antikörper ist an eine unlösliche Phase (hier Wand der Mikrotiterstreifen) gekoppelt. Nach der Trennung wird die Enzymreaktion durch die Zugabe von Substrat (o-Phenylendiamin/H₂O₂) gestartet und das entstehende Reaktionsprodukt photometrisch gemessen. Aufgrund der Proportionalität von gebundener Enzymaktivität und Antigenkonzentration sind die gemessenen Extinktionen umso höher, je höher die t-PA-Konzentration in den Proben ist. Die Auswertung erfolgt über eine Bezugskurve, die mit einer geometrischen Verdünnungsreihe aus tPA – Standard erstellt wird.

Der t-PA-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

3.2.2. Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI-1)

Die Wirkung des t-PA wird nicht allein durch dessen „Fibrinabhängigkeit“ limitiert, sondern auch durch spezifische Inhibitoren, von denen der wichtigste der sogenannte PAI sein dürfte. Dieses Glykoprotein bildet sofort mit äquimolaren Mengen an freiem t-PA einen inaktiven Komplex. Überhöhte PAI-Plasmakonzentrationen führen auch bei normalen t-PA-Konzentrationen zu einem relativen t-PA-Mangel mit entsprechend erhöhtem Thromboserisiko. Deshalb ist neben der t-PA- auch die PAI-Bestimmung von großem Interesse.

Die Bestimmung wurde mit dem PAI-Chromogen Test (kolorimetrischer Test zur Bestimmung von PAI mit einem synthetischen chromogenen Substrat) der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt. Dazu wird zunächst das unverdünnte Probandenplasma mit überschüssiger Urokinase inkubiert. Diese bildet einen Komplex mit dem Plasminogenaktivator Inhibitor und vermindert damit die Plasminbildung aus Plasminogen. Die nicht von dem PAI komplexierte Urokinase bildet aus zugefügtem Plasminogen Plasmin. α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin werden durch Inhibitoren gehemmt. Die amydotische (Spaltung einer Aminogruppe) Aktivität des Plasmins wird anhand der aus dem chromogenen Substrat CBS 10.65 (Lyophilisat) freigesetzten Menge des p-Nitroanilin im Photometer bei 405 nm gemessen. Die Menge des gebildeten Plasmins verhält sich umgekehrt proportional zur PAI-Konzentration der Probe und ist anhand von Bezugskurven direkt abzulesen.

Der PAI-Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

3.2.3. Das Fibrinfragment D-Dimer

Bei der Aktivierung des Fibrinolysesystems kommt es zur Konversion des Plasminogens zur aktiven Protease Plasmin. Diese spaltet Fibrinogen und Fibrin u.a. in die Fragmente D und E. Aufgrund der Quervernetzungen zwischen den D-Domänen im Fibringerinnsel werden nach Einwirkung von Plasmin hier vor allem D-Dimere freigesetzt. Das Vorhandensein von D-Dimeren im Plasma deutet somit auf eine reaktive Fibrinolyse hin (21,46,117). Die Anwendung monoklonaler Antikörper gegen das spezifische D-Dimer ermöglicht es, direkte Aussagen über eine eventuell stattfindende sekundäre Fibrinolyse zu machen. Eine möglich eintretende Kreuzreaktivität mit dem Fragment D, welches auch bei der Fibrinogenolyse entsteht, ist vernachlässigbar gering.

Die Bedeutung der Bestimmung von D-Dimer liegt vor allem in der Ausschlussdiagnostik thrombotischer Ereignisse. Bis zu einer bestimmten Konzentration ist das D-Dimer im Plasma physiologischerweise nachweisbar. Erhöhte Konzentrationen weisen auf das Vorliegen eines Gerinnsels hin. Die Bestimmung wurde mit dem Turbiquant® D-Dimer Test (In-vitro-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung des Fibrinabbauproduktes D-Dimer in Human-Plasma mit dem Behring Turbitimer) der Firma Dade Behring Marburg GmbH durchgeführt.

In einer immunchemischen Reaktion reagieren mit monoklonalen Antikörpern gegen Human-D-Dimer beladene Partikel, mit dem im menschlichen Plasma enthaltenen D-Dimer, unter Ausbildung eines Agglutinates, welches die Probe trübt. Diese Trübung des Reagenzes wird photometrisch gemessen. Die quantitative Erfassung der vorhandenen D-Dimer-Konzentrationen erfolgt durch die gleichzeitige Messung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ und der Zeit ($t_{v_{\max}}$), die bis zum Erreichen von $v_{\max}$ benötigt wird. Die Messung der Reaktionsparameter sowie die Auswertung über den Vergleich der Reaktionsparameter, mit den für ein Referenzpräparat erhaltenen Werten, geschieht automatisch durch den Behring Turbitimer.

Der D-Dimer Test wurde im Labor für med. Chemie und Serologie GmbH in Berlin durchgeführt.

4. Weitere durchgeführte Untersuchungen

4.1. Untersuchte Hormone

Um ein vermeintliches Zusammenspiel zwischen angiogenen Faktoren und dem Hämostasesystem beobachten zu können, wurde bei beiden Studien zusätzlich die Konzentration des Hormons VEGF (vascular endothelial growth factor) mituntersucht.

4.2. Testprinzipien

4.2.1. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF ist ein Heparin bindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 34-42 kDA. Es besitzt angiogene und mitogene Aktivität. Ebenfalls steigert es die Gefäßpermeabilität der Endothelzellen.

Physiologischerweise wird VEGF von diversen Zellen, wie aktivierten Makrophagen, Hepatozyten, glatten Muskelzellen u.a. ausgeschüttet. Als mögliche Trigger für die Ausschüttung gelten Phorbol Ester, TGF- β sowie hypoxische Gewebszustände. Ebenso kommt es bei diversen Tumorzellen (z.B. Adenokarzinom der Lunge, Blasen CA, Fibrosarkom) zu einer verstärkten Ausschüttung von VEGF.

Demnach spielt VEGF zum einen eine große Rolle bei Entzündungsreaktionen und Angiogenesevorgängen – zum anderen trägt es zum Wachstum und zur Metastasierung solider Tumore bei.

Die Bestimmung wurde mit dem Quantikine® Test der Firma RRD Systems GmbH mittels ELISA Technik durchgeführt. Das Prinzip entspricht dem bereits beschriebenen t-PA-ELISA.

Ein speziell gegen VEGF gerichteter monoklonaler Antikörper befindet sich an der Wand der Mikrotiterstreifen. Nach Zugabe der Serumproben sowie der Standardlösung kommt es zur Bildung eines Ag-Ak-Komplexes. Dem weiteren Hinzufügen eines Enzym markierten polyklonalen Antikörpers (Konjugat Peroxidase) geht ein Waschvorgang voraus. Nach abschließender Zugabe des Substrates wird die Farbentwicklung photometrisch bei 450 nm gemessen und die Konzentration anhand einer Bezugskurve ermittelt.

Der VEGF-Test wurde im Labor des Institutes für Physiologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

5. Bestimmung der relativen Plasmavolumenveränderung

Bei sportlicher Betätigung, besonders im Ausdauerbereich, sorgen verschiedene Mechanismen, insbesondere eine vermehrte Filtration im Kapillargebiet, für eine Abnahme des Plasmavolumens und führen damit zur Hämokonzentration (96,101). Um die Hämokonzentration und den damit verbundenen Konzentrationseffekt auf die analysierten Blutparameter abschätzen zu können, werden die Plasmavolumenveränderungen (jeweils in Bezug auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt A) ermittelt.

Dies ist annäherungsweise möglich durch die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokritwertes und Berechnung nach folgender Gleichung (119):

$$\% \Delta PV = \left[100 \frac{Hb [g \cdot l^{-1}]_A}{Hb [g \cdot l^{-1}]_B} \times \frac{1 - Hkt [l \cdot l^{-1}]_B}{1 - Hkt [l \cdot l^{-1}]_A} \right] - 100$$

Wobei	%ΔPV	= prozentuale Veränderung des Plasmavolumens
	Hb _{A,B}	= Hämoglobinkonzentration zum Zeitpunkt A bzw. B
	Hkt _{A,B}	= Hämatokrit zum Zeitpunkt A bzw. B

Die Hämoglobinbestimmung erfolgte mit der Natriumlaurylsulfat-Hämoglobin-Methode, kurz SLS-HGB. Diese Methode wandelt das Hämoglobin schnell genug um, ist ungiftig und berücksichtigt alle Hämoglobinderivate.

Der Hämatokrit wurde durch kumulative Impulshöhensummierung (Aufsummierung der volumenproportionalen Einzelimpulse eines Erythrozyten) ermittelt.

6. Zuverlässigkeit der angewendeten Labormethoden

Die wichtigsten Zuverlässigkeitskriterien einer Labormethode sind Spezifität, Richtigkeit, Präzision und Empfindlichkeit (108,124)

A. **SPEZIFITÄT:** „Erfassung einer bestimmten chemischen Substanz unter Ausschluß anderer“ (108) und ohne dass andere Stoffe störend wirken.

Dieses Kriterium erfüllen im besonderen die Analysen, welche auf immunologischen Methoden mit spezifisch verwendeten Antikörpern basieren (vWF, Fibrinmonomere, t-PA, D-Dimer, VEGF).

B. **RICHTIGKEIT:** Sie beschreibt die exakte quantitative Erfassung der tatsächlich im Untersuchungsmaterial vorliegenden Menge und ist damit Kenngröße für den systematischen Fehler. Sie wurde durch das Mitführen von Richtigkeitskontrollen überprüft.

C. **PRÄZISION** (= Reproduzierbarkeit oder Genauigkeit): Unter der Präzision versteht man eine Reproduzierbarkeit der Labormethode, die 1. durch verschiedene LaborantInnen, 2. mit verschiedenen Laborgeräten und 3. an verschiedenen Tagen durchgeführt wird. Sie ist Kenngröße des zufälligen Fehlers. Maß der Präzision ist der Variationskoeffizient VK. Er gibt an wieviel Prozent (%) die Standardabweichung (s) der Vielfachbestimmungen vom arithmetischen Mittelwert ($\bar{x}$) beträgt:

$$\%VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Die Präzision betrug bei den folgenden Untersuchungen:

vWF:	<= 6% in der Serie
Fibrinmonomere:	7,1% in der Serie
Fibrinogen:	1,5-5% in der Serie
TPZ:	< 2,5% von Tag zu Tag
aPTT:	0,3-2,5% in der Serie
Faktor VIII:	2-14% von Tag zu Tag
Faktor XII:	2-14% von Tag zu Tag
APCR:	1,8-2,9% in der Serie
t-PA:	<= 6% in der Serie
PAI-1:	5,5% (Normal-Plasma)
D-Dimere:	1,6-4,7% in der Serie
VEGF:	4,5% in der Serie
Hämoglobin:	2,0%
Hämatokrit:	1,9%

D. **SENSITIVITÄT** (Empfindlichkeit, Nachweisgrenze): Sie entspricht dem geringsten auffindbaren Betrag, der sich signifikant von 0 unterscheidet.

Die Sensitivität betrug bei den folgenden Untersuchungen:

vWF:	0,5ng/ml
Fibrinmonomere:	0,17µg/ml
Fibrinogen:	0,8g/l bei empfindlich messenden Geräten auch tiefer
Faktor VIII:	1-100(200)%
Faktor XII:	1-100(200)%
APCR:	86-100% (heterozygote/homozygote F V Leidensträger)
t-PA:	0,1ng/ml
PAI-1:	1ng/ml
D-Dimere:	200µg/l (Triathlon)
VEGF:	<5,0pg/ml

7. Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit angewendete Statistik wird im folgenden erläutert.

7.1. Univariate Statistik: Statistische Kennwerte

Statistische Kennwerte haben die Funktion über spezielle Eigenschaften der Merkmalsverteilung summarisch Auskunft zu geben (12). Man unterscheidet hierbei zwischen Maßen der zentralen Tendenz und Dispersionsmaßen. Zu den Maßen der zentralen Tendenz gehören u.a. der Median sowie der Mittelwert. Über die Streuung um die zentrale Tendenz einer Verteilung (Dispersion) geben die Varianz bzw. die Standardabweichung Auskunft.

7.1.1. Maße der zentralen Tendenz

Bei den Maßen der zentralen Tendenz geht es allgemein um die Frage, durch welchen Wert die gesamte Verteilung am besten repräsentiert wird (12).

Definition des arithmetischen Mittels:

Der **arithmetische Mittelwert** $\bar{x}$ der singulären Meßwerte $x_1, x_2, \dots, x_n$ ist die Summe dieser Werte geteilt durch deren Anzahl (26). Bei der Berechnung gilt es zu beachten, dass der Mittelwert empfindlich gegenüber außergewöhnlichen Werten, sogenannten Ausreißern, ist (50). Streng genommen ist das arithmetische Mittel nur anwendbar, wenn die Häufigkeitsverteilung des Merkmals a) nur einen Gipfel und b) nicht allzu schief ist.

Definition des Medianwertes:

Ordnet man die beobachteten Werte nach ihrer Größe, so teilt der **Median** (MD) die geordnete Reihe in zwei gleichgroße Teile, d.h. unterhalb und oberhalb des Medians liegen genau 50% aller Beobachtungen (50). Bei einer ungeraden Anzahl von Fällen wird genau der mittlere Wert angegeben, während bei gerader Fallzahl der Mittelwert aus beiden mittleren Werten gebildet wird. Im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert $\bar{x}$ hat der Median (MD) den Vorteil, dass er von außergewöhnlichen Werten

(Ausreißern) praktisch nicht beeinflusst wird (er ist resistent), weshalb er sich besonders als Lagemaß bei unsymmetrischen oder mehrgipfligen Häufigkeitsverteilungen eignet (50).

Spezielle Ordnungsstatistiken:

Maßzahlen, die auf Ordnungsstatistiken (sortierten Daten) beruhen, sind als Positionsmerkmale zu verstehen, das heißt, sie geben an, wieviele Werte der geordneten Datenmenge unter- bzw. oberhalb der gewählten Position vorhanden sind (50).

Hierbei bezeichnet der kleinste Wert der geordneten Beobachtungsreihe das **Minimum** (kein Wert liegt darunter), während der größte Wert das **Maximum** (alle Beobachtungen liegen darunter) bezeichnet.

Das z -te Perzentil (P_z) ist der Wert der geordneten Reihe, unterhalb dessen gerade $z\%$ und oberhalb $(100-z)\%$ aller Beobachtungen liegen (50). Damit liegen $\frac{1}{4}$ aller Beobachtungen unterhalb des **25%-Perzentils** sowie $\frac{3}{4}$ aller Beobachtungen darüber. Analog dazu befinden sich unterhalb des **75%-Perzentils** $\frac{3}{4}$ aller Beobachtungen bzw. $\frac{1}{4}$ aller Beobachtungen darüber. Der Median bezeichnet in diesem Zusammenhang das 50%-Perzentil.

7.1.2. Streuungsmaßzahlen: Varianz und Standardabweichung

Die gebräuchlichsten Maße zur Kennzeichnung der Variabilität bzw. Dispersion einer Verteilung sind die Varianz (s^2) und die Standardabweichung (s) (12).

Die **Varianz (s^2)** einer empirischen Verteilung ist definiert als Summe der quadrierten Abweichungen aller Meßwerte vom arithmetischen Mittelwert, dividiert durch die Anzahl aller Meßwerte (12). Aufgrund der Quadrierung der Einzelabstände erhält man mit der Varianz s^2 ein Maß, dem das Quadrat der ursprünglichen Einheit der Meßwerte zugrunde liegt und folglich schwer zu interpretieren ist.

Die Quadratwurzel der Varianz wird als die empirische **Standardabweichung (s)** bezeichnet (12). Durch die Berechnung der Wurzel besitzt die Standardabweichung die gleiche Dimension wie die ursprünglichen Meßwerte. Von daher kann man die Standardabweichung als die durchschnittliche Abweichung vom arithmetischen Mittelwert interpretieren. Ist die Variabilität des Merkmals groß, so wird auch s groß ausfallen, kleine Variabilität schlägt sich in kleinen Werten von s nieder (50).

7.2. Grafische Darstellung der statistischen Kennwerte

Die dem Anhang beigefügten Boxplots repräsentieren grafisch die Verteilung und die Lage der Beobachtungswerte. Sie stellen den Median, das 25%-Perzentil und das 75%-Perzentil, extreme Werte und Ausreißer, sowie den größten und den kleinsten nicht extremen Wert dar. Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegt. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder (17). Ein Wert wird als "extremer Wert" bezeichnet, wenn der Abstand dieses Wertes vom 25%- oder dem 75%-Perzentil mehr als das 3fache der Boxhöhe beträgt.

7.3. Statistische Auswertung: Nichtparametrische Testverfahren

Die Anwendung nichtparametrischer Testverfahren erfolgt, wenn a) sich die Annahme der Normalverteilung nicht aufrecht erhalten läßt und b) kleine Stichprobenumfänge vorliegen (50). Da sowohl die Beobachtungswerte der Triathlonstudie (N=12), als auch die der Marathonstudie (N=16) obengenannte Charakteristika aufweisen, kommen die unten erläuterten Verfahren zur Anwendung. Nichtparametrische Tests verarbeiten nicht die Meßwerte selbst, sondern deren Rangplätze.

7.3.1. Zweistichprobenvergleich bei abhängigen Stichproben

Liegen für 2 abhängige Stichproben die Größe der Veränderung vor, so wendet man den Vorzeichenrangtest nach Wilcoxon an (13). Die Prüfgröße des Wilcoxon-Tests beruht auf einer Rangreihe der absoluten Wertepaaredifferenzen bzw. auf deren Rangplatzsummen.

Es wird die Hypothese geprüft:

H_0 : Beide Stichproben stammen aus Grundgesamtheiten mit gleicher Verteilung.

7.3.2. Friedman-Test für k abhängige Stichproben

Der Friedman-Test wird eingesetzt, wenn man mehr als 2 abhängige Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenz vergleichen möchte. Der Friedman-Test wird auch als Rangvarianzanalyse bezeichnet und stellt eine Erweiterung des Wilcoxon-

Tests für 2 abhängige Stichproben dar. Im Sinne eines Globalvergleichs testet der Friedman-Test, ob die Stichproben 1 bis k aus Populationen mit gleicher zentraler Tendenz stammen (H_0) oder nicht (H_1) (13).

Es wird die Hypothese geprüft:

H_0 : Die k Stichproben stammen aus der gleichen Grundgesamtheit.

7.3.3. Multiple Vergleiche

Im Rahmen der Marathonstudie sind die Verläufe verschiedener Laborparameter von Interesse. Die Blutentnahme erfolgte zu drei Zeitpunkten. Es gilt, folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Alternativhypothese: „Es gibt generell Veränderungen zwischen den drei Blutentnahmen?“ (Globalhypothese)
 Nullhypothese: $H_1 : (\mu_1 = \mu_2 = \mu_3)$
 Statistisches Verfahren: Friedman-Test für k=3 abhängige Stichproben
2. Alternativhypothese: „Es gibt Veränderungen zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme?“ (Einzelhypothese)
 Nullhypothese: $H_2 : (\mu_1 = \mu_2)$
 Statistisches Verfahren: Wilcoxon-Test für k=2 abhängige Stichproben
3. Alternativhypothese: „Es gibt Veränderungen zwischen der ersten und dritten Blutentnahme?“ (Einzelhypothese)
 Nullhypothese: $H_3 : (\mu_1 = \mu_3)$
 Statistisches Verfahren: Wilcoxon-Test für k=2 abhängige Stichproben

Die durchgeführte Vorgehensweise entspricht dem Verfahren für den multiplen Vergleich von k=3 Gruppen von Hecker (54,55) und erklärt sich wie folgt:

Im ersten Analyseschritt wird zunächst ein Globaltest mit Hilfe des Friedman-Tests auf dem Signifikanzniveau α ($\alpha=0.05$) durchgeführt.

Ist der p-Wert des Friedman-Tests größer als 0.05 wird die Testprozedur beendet, d.h. sowohl die Globalhypothese (keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten), als

auch beide Einzelhypothesen (Veränderungen zur zweiten bzw. dritten Blutentnahme gegenüber dem Baselinewert) müssen angenommen werden.

Ist der p-Wert des Friedman-Tests kleiner oder gleich 0.05, schließt sich ein Einzelvergleich mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ($\alpha=0.05$) an.