

### III. METHODIK

#### 3.1. Probanden

Die Untersuchung wurde an elf freiwilligen gesunden männlichen Triathleten im Alter von 24 bis 31 Jahren durchgeführt. Ein Proband (Nr. 1) führte den Versuch bei hoher Belastung nicht durch und wurde deshalb aus der Studie ausgeschlossen. Die Probanden waren aktive Sportler, die sich in der Wettkampfvorbereitung befanden. Die Probanden durften in den letzten drei Tagen vor dem Versuch keine Vitaminpräparate eingenommen, an keinen Wettkämpfen teilgenommen und nur moderates Training absolviert haben. Über die Risiken einer peripher-venösen Blutentnahme und der Kapillarblutentnahme aus dem Ohrläppchen wurden sie aufgeklärt. Die Probanden wurden über Sinn und Zweck der Untersuchung informiert, über das Gesamtrisiko der Versuche aufgeklärt und erklärten schriftlich ihr Einverständnis. Tabelle 2 enthält die anthropometrischen Daten, Tabelle 3 einen Überblick über den Trainingsumfang der Probanden. Die anthropometrischen Daten wurden vor Versuchsbeginn ermittelt. Der durchschnittliche Trainingsumfang der Probanden wurde mittels eines Fragebogens erhoben.

<b>Proband [Nr]</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Größe [cm]</b>	<b>Körper-masse [kg]</b>
2	31	180	76
3	28	172	80
4	28	188	79
5	30	187	77
6	28	183	83
7	27	184	83
8	24	185	78
9	24	187	68
10	28	187	80
11	28	172	78
<b>M ± SD</b>	<b>27,6 ± 2,2</b>	<b>182,5 ± 6,0</b>	<b>78,2 ± 4,3</b>

Tabelle 2 Anthropometrische Daten (Mittelwert M ± Standardabweichung SD)

<b>Proband [NR]</b>	<b>Laufen [km/Woche]</b>	<b>Schwimmen [km/Woche]</b>	<b>Radfahren [km/Woche]</b>
2	40	6	300
3	40	4	180
4	60	4,5	200
5	30	5	150
6	40	4	180
7	40	4	180
8	30	3	170
9	40	3,5	200
10	35	4	190
11	60	2	120
<b>M ± SD</b>	<b>41,5 ± 10,6</b>	<b>4,0 ± 1,1</b>	<b>187 ± 46,4</b>

Tabelle 3 Wöchentlicher Trainingsumfang

### 3.2. Versuchsdurchführung

#### Stufentest:

Zur Bestimmung der maximalen Leistung und der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}O_{2max}$ ) wurde ein Stufentest mit einem Fahrradergometer (SIEMENS-ELEMA Ergometer, No.E022E, Ergometry System 380 B, Elema Schönander, Schweden) durchgeführt. Das Fahrradergometer war mit Triathlon-Rennlenker, Rennsattel und Rennpedalen ausgerüstet. Als Belastung konnten Leistungen zwischen 20 W und 500 W vorgegeben werden. Die Leistung wurde nach dem Dynamoprinzip geregelt. Bei diesem Prinzip wird der Bremswiderstand für die Kurbelarbeit dadurch erzeugt, daß eine durch die Kurbelarbeit bewegte Spule in einem induzierten Magnetfeld entsprechend der induzierten Feldstärke abgebremst wird. Die Feldstärke des induzierten Magnetfeldes wird so gesteuert, daß das Produkt aus Drehmoment und Drehzahl bei gegebener Leistung konstant bleibt. Bei Leistungen unter 250 W können minimale Belastungsänderungen von 5 W und im Bereich zwischen 250 W und 500 W Änderungen von minimal 10 W manuell eingestellt werden. Der Test entsprach den Empfehlungen des Bundesausschusses für Leistungssport. Die Probanden stellten die Sattelhöhe des Ergometers nach eigenem Empfinden selbst ein. Dieser Wert wurde protokolliert und bei den folgenden Tests beibehalten. Die Kurbelfrequenz betrug 90 bis 110/min. Es wurden Blutlaktatkonzentration, Herzfrequenz und subjektives Belastungsempfinden alle 3 Minuten bestimmt.

Verwendetes Material entsprach dem Hauptversuch und ist dort beschrieben. Zusätzlich wurde mit einem portablen Spirometrie-Telemetrie-System (COSMED K2<sup>®</sup>) Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}O_2$ ) und Ventilation ( $\dot{V}E$ ) gemessen. Nach dem Erheben der Ruhemessungen wurde beginnend mit 100 Watt Belastung bei einer Stufendauer von je 3 Minuten bis zur subjektiven Erschöpfung die Leistung um jeweils 50 Watt erhöht.

### **Hauptversuch:**

Die Probanden wurden je einmal mit ca. 50 - 60 % und ca. 70 - 80 % der maximalen Leistung für 35 Minuten auf einem Ergometer belastet. Hierzu wurde ein elektrodynamisches Ergometer (No.E022E, Ergometry System 380 B, Elema Schönander, Schweden) verwendet. Während des Versuchs tritt durch Transpiration und Abatmung ein Wasserverlust (Ernst et al.1988) und dadurch bedingt eine Hämokonzentration auf. Die Probanden durften während des Versuchs keine Flüssigkeit zu sich nehmen, um für die Bewertung der erwarteten Reduktion des Plasmavolumens und der damit verbundenen Konzentrationsänderungen der zu bestimmenden laborchemischen Größen vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

### **3.3. Probenentnahme**

Unmittelbar vor und nach dem Versuch, wurde dem sitzenden Probanden nach kurzer Stauung Blut (10 ml) aus der Ellenbeugenvene entnommen. Zur Blutentnahme wurden heparinisierte Vacutainer<sup>®</sup> Blutentnahme - Systeme (Becton Dickinson, USA) verwendet. Das Vacutainersystem wurde gewählt, um eine Kontamination der Probe mit Sauerstoff zu vermeiden. Wenn das Vakuumröhrchen nach der Blutentnahme bei noch in der Vene liegender Kanüle aus dem Kanülenenhalter entfernt wird, bleibt die Probe durch den selbstschließenden Gummipfropfen luftdicht verschlossen. Die Proben wurden lichtgeschützt auf Eis gelagert und sofort nach Versuchsende mit einer gekühlten Zentrifuge (DuPont Superspeed Refrigerated Centrifuge RC-5, Bad Homburg, D) bei 5 °C und 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und in einem Spitzröhrchen erneut zentrifugiert. Die Proben wurden auf - 80 °C tiefgefroren und innerhalb eines Monats weiterverarbeitet. Die Kapillarblutentnahme erfolgte nach Hyperämisierung durch Finalgon<sup>®</sup>- extra stark Salbe (Thomae, D) und Punktion aus dem Ohrläppchen über 35 Minuten im Abstand von 2,5 Minuten. Zur Eiweißpräzipitation wurden 20 µl

kapilläres Vollblut in 200 µl Perchlorsäure aufgeschüttelt. Die Probe wurde für 5 Minuten bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Abbildung 4 stellt den Versuchsablauf dar.

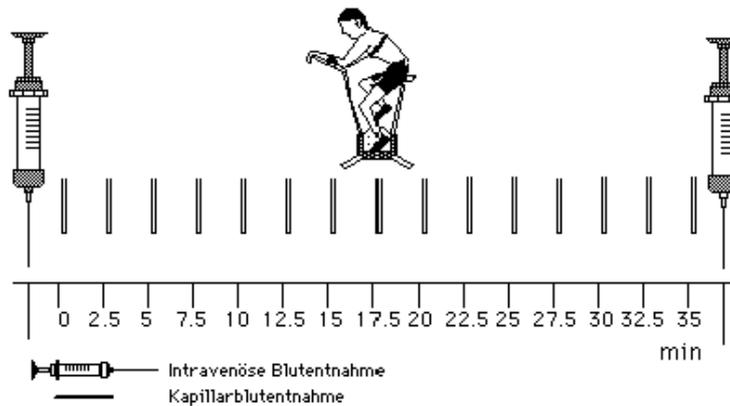


Abbildung 4 Versuchsablauf-Schema

### 3.4. Meßgrößen

Aus dem venös entnommenen heparinisierten Blut wurden Gesamteiweißkonzentration, Albuminkonzentration, Hämatokrit, Gesamtantioxidative Kapazität,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Chemolumineszenz, Malondialdehydkonzentration, Haptoglobinkonzentration, Fibrinogenkonzentration und Kreatinkinase bestimmt und eine Elektrophorese der Erythrozytenmembranproteine durchgeführt. Die Kapillarblutentnahme aus dem Ohrläppchen diente zur Bestimmung von Blutlaktatkonzentration. Zusätzlich wurde das Gewicht der Probanden gemessen. Zu den Zeitpunkten der Kapillarblutentnahme wurde die Herzfrequenz bestimmt und das subjektive Belastungsempfinden anhand einer Skala protokolliert.

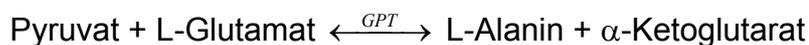
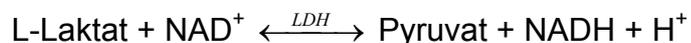
### 3.5. Sauerstoffaufnahme

Die Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}\text{O}_2$ ) wurde mit einem portablen Spirometrie-Telemetrie-System (COSMED K2<sup>®</sup>) gemessen. Das COSMED K2 besteht aus Gesichtsmaske, Gasanalysator mit Sender und Empfänger mit direkter Datenauswertung. Gasanalysator und Sender haben einschließlich Batterie eine Masse von ca. 0,8 kg und können mit einem Gurtsystem am Körper getragen werden. Luftdruck, Atemfrequenz (AF), Atemzeitvolumen ( $\dot{V}\text{E}$ ) und Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}\text{O}_2$ ) werden bestimmt. Zusätzlich wurde durch Kombination mit dem Sender des Sporttesters PE 3000<sup>®</sup> (Polar Electro, D) die Herzfrequenz direkt registriert. AF und  $\dot{V}\text{E}$  werden mit

einer Turbine an der Maske gemessen. Die Turbine wird durch Inspirations- und Expirationsluftstrom betrieben. Die Umdrehungszahl der Turbine ist proportional zur ventilerten Gasmenge. Die Umdrehungszahl wird mittels Photozelle gemessen. Aus der Expirationsluft wird nahe der Turbine eine Probe entnommen. Die Probenentnahme erfolgt mit einer Mikropumpe, deren Aspirationskapazität proportional zum Expirationsfluß ist. Hierdurch wird eine vergleichbare Zusammensetzung von Expirationsluft und Gasprobe gewährleistet. Die Gasprobe wird über einen Schlauch mit Dissektor einer Mikro-Mischzelle mit einem Volumen von 2 ml zugeführt. In dieser Mikro-Mischzelle wird die Sauerstoffkonzentration der Probe mit einer polarographischen Elektrode gemessen. Die ( $\dot{V}O_2$ ) wird aus Ventilation und der Differenz der Sauerstoffkonzentrationen zwischen Inspirations- und Expirationsluft errechnet. Zu Beginn einer Messung wird der Sauerstoffsensord auf die gegebene Sauerstoffkonzentration der Inspirationsluft und die Turbine zur Atemzeitvolumenmessung mittels 3.0 l Syringe kalibriert. (Frizzera et al. 1991, Beneke et al. 1995, Beneke 1999).

### 3.6. Laktat-Bestimmung

Das zugrundeliegende Prinzip ist die enzymatische Oxidation von Laktat zu Pyruvat mittels Laktatdehydrogenase (LDH). Bei dieser Reaktion wird  $NAD^+$  in  $NADH_2$  umgewandelt. Das entstehende Pyruvat wird mit dem im Reaktionsgemisch befindlichen L-Glutamat durch das Enzym Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zu L-Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt. Grundlage der Messung ist die photometrische Bestimmung der NADH-Konzentration (Thomas 1992). Die NADH Zunahme ist der Laktatkonzentration proportional.



Die Laktat-Bestimmung erfolgte mit dem vollenzymatischen Monotest<sup>®</sup> Lactat (Boehringer Mannheim, Mannheim, D). Verwendet wurde die Laktatbestimmungsvorschrift für die Sportmedizin mit der modifizierten Methode nach Noll (Bergmeyer 1974). Es wurde darauf geachtet, daß das entnommene Blut nicht mit Schweiß verunreinigt wurde, da in diesem beträchtliche Mengen Laktat enthalten sind. Zur Eiweißpräzipitation wurden 20 µl kapilläres Vollblut in 200 µl 0,6 molarer eiskalter Perchlorsäure aufgeschüttelt. Die Probe wurde für fünf Minuten bei

10 000U/min mit einer Eppendorf Zentrifuge E 3200 (EPPENDORF, D) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Aus dem Überstand wurden 50 µl entnommen und mit 500 µl der Reagenzlösung, bestehend aus Carbonatpuffer (0,5 mol/l, pH 10,0), L-Glutamat (63 mmol/l) und NAD (4,6 mmol/l), vermischt. Anschließend wurde die Lösung mit 10 µl einer LDH (1632 U/l) und GPT (102 U/l) enthaltenden Suspension versetzt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die NADH Konzentration wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm (Schichtdicke 1,0 cm) gegen einen Leerwert (500 µl Reagenzlösung mit 50 µl Perchlorsäure und 10 µl Ammoniumsulfat) gemessen (Digitalphotometer 6114 S, EPPENDORF, D). Die Blutlaktatkonzentration wurde aus der Differenz der Extinktion des Probenleerwerts ( $E_{pl}$ ) und der Probe ( $E_p$ ), multipliziert mit einem Extinktionskoeffizienten, errechnet.

$$E_p - E_{pl} = \Delta E$$

$$\Delta E \times 35,7 = C_{\text{Laktat}} \text{ mmol/l}$$

### 3.7. Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wurde mit dem Sporttester PE 4000 (Polar Electro, D) ermittelt und alle 2,5 Minuten dokumentiert. Das Gerät besteht aus einem Sender, der mit einem Brustgurt über dem vorderen unteren Thorax befestigt wird. Der Empfänger kann als Uhr am Körper getragen oder bei stationärer Messung in unmittelbarer Nähe des Probanden (maximale Entfernung ca. 1.0 m) angebracht werden. Messwerte können direkt abgelesen und / oder gespeichert werden.

### 3.8. Subjektives Belastungsempfinden

Zur Bestimmung der subjektiv empfundenen Belastung (SBE) wurde die Anstrengungsskala nach Borg (Borg 1962) verwendet. Die Probanden wurden aufgefordert alle 2,5 Minuten die Belastung anhand der vorgelegten Skala (Tabelle 4) einzuschätzen.

6	sehr, sehr leicht
7	
8	
9	sehr leicht
10	
11	mäßig leicht
12	
13	etwas schwer
14	
15	schwer
16	
17	sehr schwer
18	
19	sehr, sehr schwer
20	

Tabelle 4 Skala zur Abschätzung der subjektiv empfundenen Belastung (SBE) (Borg 1962)

### 3.9. Körpermasse

Die Körpermasse (KM) wurde unmittelbar vor und nach dem Versuch mit einer elektronischen Waage am entkleideten Probanden gemessen. Die Probanden durften zwischen den beiden Messungen keine Flüssigkeit zu sich nehmen oder urinieren, um nur den Flüssigkeitsverlust durch Transpiration und Abatmung zu erfassen. Zum Gewicht nach dem Versuch wurde das Gewicht der entnommenen Proben addiert. Die Berechnung erfolgte nach folgenden Formel:

$$\text{Körperflüssigkeitsverlust } \Delta_{KM} = KM_{prä} - (KM_{post} + \text{Gewicht der Proben})$$

### 3.10. Gesamteiweißkonzentration

Die Gesamteiweißkonzentration (TP) wurde mit einem Automatic Analyser 747 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestimmt. Verwendet wurde die Biuret - Methode mit Leerwertkorrektur. Das Testprinzip beruht auf der Bildung von rotem Komplex aus Proteinen und Kupferionen in alkalischem Medium (Witt und Trendlenburg 1982). Als Reagenz wurde das Testkit Total Protein 1127705 R1 und 1127713 R2 (Boeringer Mannheim, Mannheim, D) verwendet. Der effektive intravasale Wasserverlust berechnet über TP erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{intravasaler Flüssigkeitsverlust }_{TP} = \left( KM_{prä} \times 0,09 \times \left( \frac{100 - HK_{prä}}{100} \right) \right) \times (1 - (TP_{prä} \div TP_{post}))$$

### 3.11. Albuminkonzentration

Die Albuminkonzentration (Alb) wurde mit einem Automatic Analyser 747 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestimmt. Verwendet wurde die Bromcresolgrün Methode. Das Testprinzip beruht auf der photometrischen Absorptionsmessung eines Bromcresolgrün/Albumin Komplexes (Tietz 1986). Als Reagenz wurde das Testkit Albumin 1127446 (Boeringer Mannheim, Mannheim, D) verwendet. Der effektive intravasale Wasserverlust berechnet über Alb erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{intravasaler Flüssigkeitsverlust}_{Alb} = \left( KM_{prä} \times 0,09 \times \left( \frac{100 - HK_{prä}}{100} \right) \right) \times (1 - (Alb_{prä} \div Alb_{post}))$$

### 3.12. Hämatokrit

Der Hämatokrit (HK) wurde mit der Zentrifuge HÄMATOKRIT 2010<sup>®</sup> (HETTICH, D) ermittelt. Heparinisiertes Vollblut wurde venös mit einem Vacutainer<sup>®</sup>-Röhrchen (Becton Dickinson, USA) entnommen und in Glaskapillaren für fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Hämatokrit wurde mit der Auswertscheibe der Firma HETTICH als Verhältnis der roten Zellmasse zur Gesamthöhe der Blutsäule abgelesen. Die Berechnung des Flüssigkeitsverlust über HK erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{intravasaler Flüssigkeitsverlust}_{HK} = \left( KM_{prä} \times 0,09 \times \left( \frac{100 - HK_{prä}}{100} \right) \right) \times (1 - (HK_{prä} \div HK_{post}))$$

### 3.13. Korrekturfaktor für hämokonzentrationsabhängige Parameter

Bei hämokonzentrationsabhängigen Parametern wurde zur Korrektur des intravasalen Flüssigkeitsverlusts während des Versuchs ein Korrekturfaktor berechnet. Der Korrekturfaktor wurde vom post Wert der hämokonzentrationsabhängigen Parameter subtrahiert. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Wert}_{post}(\text{korrigiert}) = \text{Wert}_{post} - \left( \text{Wert}_{post} \times \frac{(1 - (Alb_{prä} \div Alb_{post})) + (1 - (TP_{prä} \div TP_{post}))}{2} \right)$$

### 3.14. Haptoglobinkonzentration

Die Bestimmung der Haptoglobinkonzentration (Hp) erfolgte mit dem NORPARTIGEN<sup>®</sup> NR OSL 02 (BEHRING, Marburg, D). Der Test arbeitet nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion. Die Testplatten enthalten in einer

Agarosegelschicht monospezifisches Antiserum gegen Haptoglobin. Aus dem aufgetragenen Plasma diffundiert das Haptoglobin in die Gelschicht und präzipitiert mit den monospezifischen Antikörpern. Die Größe des entstehenden Präzipitationshofs ist abhängig von der Haptoglobinkonzentration im Plasma. Der Test wurde nach der Vorschrift des Herstellers (Vorschrift 431, Behring 1990) durchgeführt. Das Plasma wurde unverdünnt aufgetragen. Das Einfüllvolumen pro Auftragstelle betrug 5 µl. Hierzu wurde der BEHRING-Dispenser 5 ml (BEHRING, Marburg, D) verwendet. Nach Ablauf einer Diffusionszeit von 2 Tagen wurden die Durchmesser der Präzipitate mit dem Meßprojektor für Immunanalysen (BEHRING, Marburg, D) ausgemessen. Über die abgelesenen Präzipitatringdurchmesser wurden die zugehörigen Analyseergebnisse auf der dem Test beiliegenden Bezugswerte-Tabelle ermittelt. Die Durchmesser können in 0,1 mm Schritten abgelesen werden. Dies führt beim Ablesen der Werte aus der Tabelle zu Konzentrationssprüngen ohne Zwischenwerte. Der Fehler der Methode wird mit  $\pm 0,4$  mm angegeben, dies entspricht 4,5 mg/dl.

### **3.15. Fibrinogenkonzentration**

Die Bestimmung der Fibrinogenkonzentration (Fib) erfolgte mit dem NORPARTIGEN® NR OSLH 02 (BEHRING, Marburg, D). Der Test arbeitet nach dem Prinzip der einfachen radialen Immundiffusion. Die Testplatten enthalten in einer Agarosegelschicht monospezifisches Antiserum gegen Fibrinogen. Aus dem aufgetragenen Plasma diffundiert das Fibrinogen in die Gelschicht und präzipitiert mit den monospezifischen Antikörpern. Die Größe des entstehenden Präzipitationshofs ist abhängig von der Fibrinogenkonzentration im Plasma. Der Test wurde nach der Vorschrift des Herstellers (Vorschrift 276, Behring 1990) durchgeführt. Das Plasma wurde unverdünnt aufgetragen. Das Einfüllvolumen pro Auftragstelle betrug 5 µl. Hierzu wurde der BEHRING-Dispenser 5 ml (BEHRING, Marburg, D) verwendet. Nach Ablauf einer Diffusionszeit von 2 Tagen wurden die Durchmesser der Präzipitate mit dem Meßprojektor (BEHRING, Marburg, D) ausgemessen. Über die abgelesenen Präzipitatringdurchmesser wurden die zugehörigen Analyseergebnisse auf der dem Test beiliegenden Bezugswerte-Tabelle ermittelt.

### **3.16. Kreatinkinaseaktivität**

Kreatinkinase (CK) wurde mit einem Automatic Analyser 747 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestimmt. Verwendet wurde die „optimierte Standard - Methode der deutschen Gesellschaft für klinische Chemie“, NAC aktiviert (Gruber 1978). Als Reagenz wurde das Testkit MPR 1 CK NAC aktiviert 1087533 (Boehringer Mannheim, Mannheim, D) verwendet. Die Einheit katal (kat) gibt den Umsatz von 1 mol Substrat je Sekunde an (Rapoport 1987).

### 3.17. Bilirubinkonzentration

Die Bilirubinkonzentration (BR) wurde mit einem Automatic Analyser 747 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) bestimmt. Verwendet wurde die DPD Methode zur Bestimmung von direktem Bilirubin (Wahlefeld et al. 1972). Das Testprinzip beruht auf der Reaktion von Bilirubin mit Diazonium zu Azobilirubin. Als Reagenz wurde das Testkit 1127535 R1 und 1383019 R2 (Boeringer Mannheim, D) verwendet.

### 3.18. Malondialdehydkonzentration

Die Malondialdehyd (MDA) Messung ist eine häufig benutzte Methode zum Nachweis der Lipidperoxidation (Kappus 1981, Otting und Hellmann 1990). MDA reagiert mit zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) zu einem roten Farbstoff (Schiffsche Base), dessen Konzentration fluoreszenzphotometrisch bestimmt werden kann. Die Struktur des MDA - TBA Addukts ist in Abbildung 5 dargestellt (Nair und Tuner 1984).

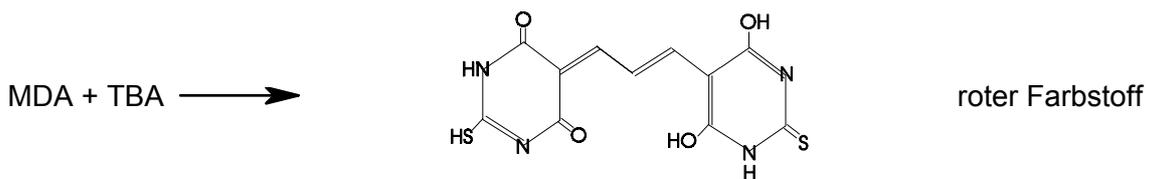


Abbildung 5 Struktur des MDA - TBA Addukts nach Nair und Tuner (Nair und Tuner 1984).

Die Exzitations- und Emmissionsspektren des entstandenen Reaktionsprodukts sind in Abbildung 6 dargestellt (Yagi 1982).

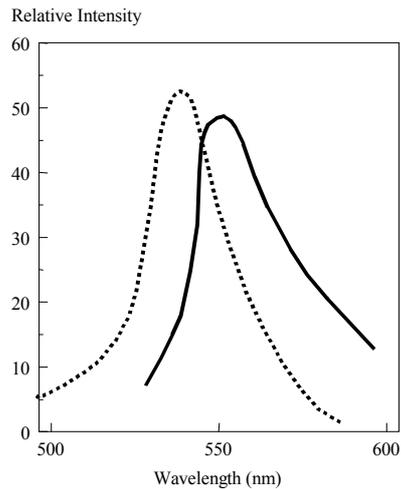


Abbildung 6 Exzitations- und Emissionsspektrum des entstandenen Reaktionsprodukts.  
Gestrichelte Linie: Exzitation; durchgezogene Linie: Emission (Yagi 1982).

Verwendet wurde eine modifizierte Methode (Schimke und Papies 1986) in Anlehnung an die von Yagi (1982) und Takeda et al. (1984). 50 µl Plasma wurden mit 100 µl Aqua dest. verdünnt. Von der Verdünnung wurden 50 µl entnommen und mit 720 µl Aqua dest., 80 µl (70 mg/ml) Natriumdodecylsulfat (SDS, SERVA, Heidelberg, D), 120 µl 10% (100 mg/ml) Phosphorwolframsäure (MERCK, Darmstadt, D), 400 µl (5 g/l) Thiobarbitursäure (SERVA, Heidelberg, D) und 80 µl 1-molarer Salzsäure versetzt und gut geschüttelt. Die Lösung wurde 60 Minuten bei 90 C° (Wasserbad MLW Typ 76, VEB Medizingeräte, Berlin, D) inkubiert und dann in Eiswasser abgekühlt. Es wurden 2 ml n-Butanol hinzugegeben und für 20 Minuten (Rüttler MLW THYS, VEB Medizintechnik, Ilmenau/Thür., D) geschüttelt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 3000 U/min (Zentrifuge MLW K23D, VEB Medizintechnik Leipzig) zentrifugiert. Vom lipophilen Überstand wurde 1ml abpipettiert und mit dem Fluoreszenzspektrometer 3000 (PERKIN-ELMER, Schweden) bei einer Exzitation von 514 nm und einer Emission von 554 nm gemessen. Für die Standardlösungen wurde 10 µl Tetraethioxypropan (SCHUCHARDT, Hohenbrunn, D) mit 50 ml Eisessig verdünnt. Von dieser Lösung wurden 1,25 ml mit Eisessig auf 50 ml aufgefüllt. Von der Stammlösung wurden für die vier Standards 10 µl (0,24 nmol), 20 µl (0,48 nmol), 30 µl (0,72 nmol) und 40 µl (0,96 nmol) dem Ansatz (ohne Serum) zugegeben. Der Leerwert wurde mit dem Ansatz ohne Serum gemessen. Die einzelne Probe wurde abhängig vom verfügbaren Probenvolumen bis zu viermal aufgearbeitet und gemessen. Für die Berechnung wurden die Mittelwerte verwendet. Mit dem Leerwert und den vier Standards wurde eine Eichgerade errechnet. Die MDA - Konzentrationen wurden aus den Meßwerten und der Formel der Eichgeraden berechnet.

### 3.19. Spectrin

Nach der Abtrennung des Plasmas wurden die VACUTAINER<sup>®</sup>-Röhrchen mit isotonischem Phosphatpuffer (310mOsm, pH 7,4) aufgefüllt und mit 1000 U/min für 10 Minuten bei 4 °C in einer RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge (DuPont, Bad Homburg) mit einem SM 24 Rotor zentrifugiert. Der Überstand, einschließlich des Leukozytenfilms, wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt, das Sediment mit Phosphatpuffer aufgeschüttelt und mit gleicher Geschwindigkeit erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Die Erythrozyten wurden in 30 ml hypotonem Hepes-Puffer (10 mOsm, pH 8,8) unter Zusatz von 1 mM EDTA und 0.1 mM PMSF lysiert. Die Puffer wurden unmittelbar vor dem Versuch angesetzt. Nach 20 Minuten wurde die Lösung mit 30.000 U/min bei 4 °C für 20 Minuten mit einem SS 34 Rotor zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde komplett abgegossen. Das Sediment wurde in 30 ml des Hepes-Puffers aufgewirbelt und erneut zentrifugiert. Falls nach dem dritten Waschvorgang noch eine Rotfärbung (Hämoglobin) des Sediments zu erkennen war, wurde ein weiterer Waschzyklus durchgeführt. Der Niederschlag wurde mit 250 ml Probenpuffer und einer Spatelspitze Dithioerythrit versetzt. Tabelle 5 zeigt die Zusammensetzung des Probenpuffers.

<b>SDS-Probenpuffer</b>	
1,6 ml	10% Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,4 ml	b-Mercaptoethanol
0,8 ml	Glycerin
0,2 ml	0,1 % Bromphenolblau
1,0 ml	0,2 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (TRIS)
4,0 ml	Aqua dest.

Tabelle 5                      Zusammensetzung des SDS-Probenpuffers

Die Proteine wurden bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert und 30 Minuten gut geschüttelt. Unlösliche Partikel wurden mit einer Eppendorf Zentrifuge E 3200 bei 15.000 U/min sedimentiert. Die Proben wurden bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für die horizontale Proteinelektrophorese wurden die Fertiggele ExcelGel<sup>™</sup> SDS gradient 8-18 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und ExcelGel<sup>™</sup> SDS buffer stripes (Pharmacia, Uppsala, Schweden) unter Verwendung der MULTIPHOR II Elektrophoresis Unit (LKB, Instrument GmbH, Gräfelfing, D) benutzt (Heukeshoven and Dernick 1986). Das direkt auf das Gel pipettierte Probenvolumen betrug 3 µl. Die Elektrophorese (600 V, 50 mA, 30 W, 15 °C) wurde

mit einer Laufzeit von 75 Minuten durchgeführt. Als Standard wurde SDS Page Low Molekular Weight Standard (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) verwendet. Zur Färbung (Merril et al. 1981 und Bio-Rad Bulletin 1089 1987) wurde der Bio-Rad Silver Stain Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) verwendet. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Färbelösungen, Tabelle 7 über die Färbegänge. Die Auswertung erfolgte anhand von drei Kriterien:

1. Hauptkriterium: Veränderung, Verlust und Reduktion der  $\alpha$  - und  $\beta$  - Spectrinbande (Bande 1 und 2) (Behn et al. 1991, Wüst 1993)

2. Bestätigungskriterium: Auftreten von niedermolekularen Fragmenten am Gelende (Corry et al. 1980, Pacifici und Davies 1990, Behn et al. 1991) oder Auftreten von quervernetzten hochmolekularen Proteinen an der Auftragsstelle (Deuticke et al. 1984, Behn et al. 1991).

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.

<b>Färbelösungen</b>		
Lösung 1	Fixierlösung	80 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 100 ml Aqua dest.
Lösung 2	Fixierlösung	40 ml Ethanol, 20 ml Essigsäure, 340 ml Aqua dest.
Lösung 3	Oxidatio	20 ml Oxidizer Solution (Bio-Rad, München, D), 180 ml Aqua dest.
Lösung 4	Silberlösung	20 ml Silver Stain (Bio-Rad, München, D), 180 ml Aqua dest.
Lösung 5	Entwickler	32 g Developer (Bio-Rad, München, D), 1 l Aqua dest.
Lösung 6	Stopbad	10 ml Essigsäure, 190 ml Aqua dest.
Lösung 7	Konservierung	20 ml Glycerin, 180 ml Aqua dest

Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Färbelösungen

<b>Färbegänge</b>		
30 Minuten	Lösung 1	Fixation
15 Minuten	Lösung 2	Fixation
5 Minuten	Lösung 3	Oxidation
3 mal 5 Minuten	Aqua dest.	Wässerung
20 Minuten	Lösung 4	Färbung
30 Sekunden.	Aqua dest.	Wässerung
30 Sekunden.	Lösung 5	Entwickeln bis zur Bildung eines braunen Niederschlags
5 Minuten	Lösung 5	Entwickeln
15 Minuten	Lösung 6	Entwicklungsstop
30 Minuten	Lösung 7	Konservierung

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Färbegänge.

Abbildung 7 stellt ein SDS-Polyarylamide Gel gefärbt mit Coomassie Blue stain und drei Excel Gradientengele gefärbt mit Silver stain mit Standard, negativem und positivem Testergebnis dar.

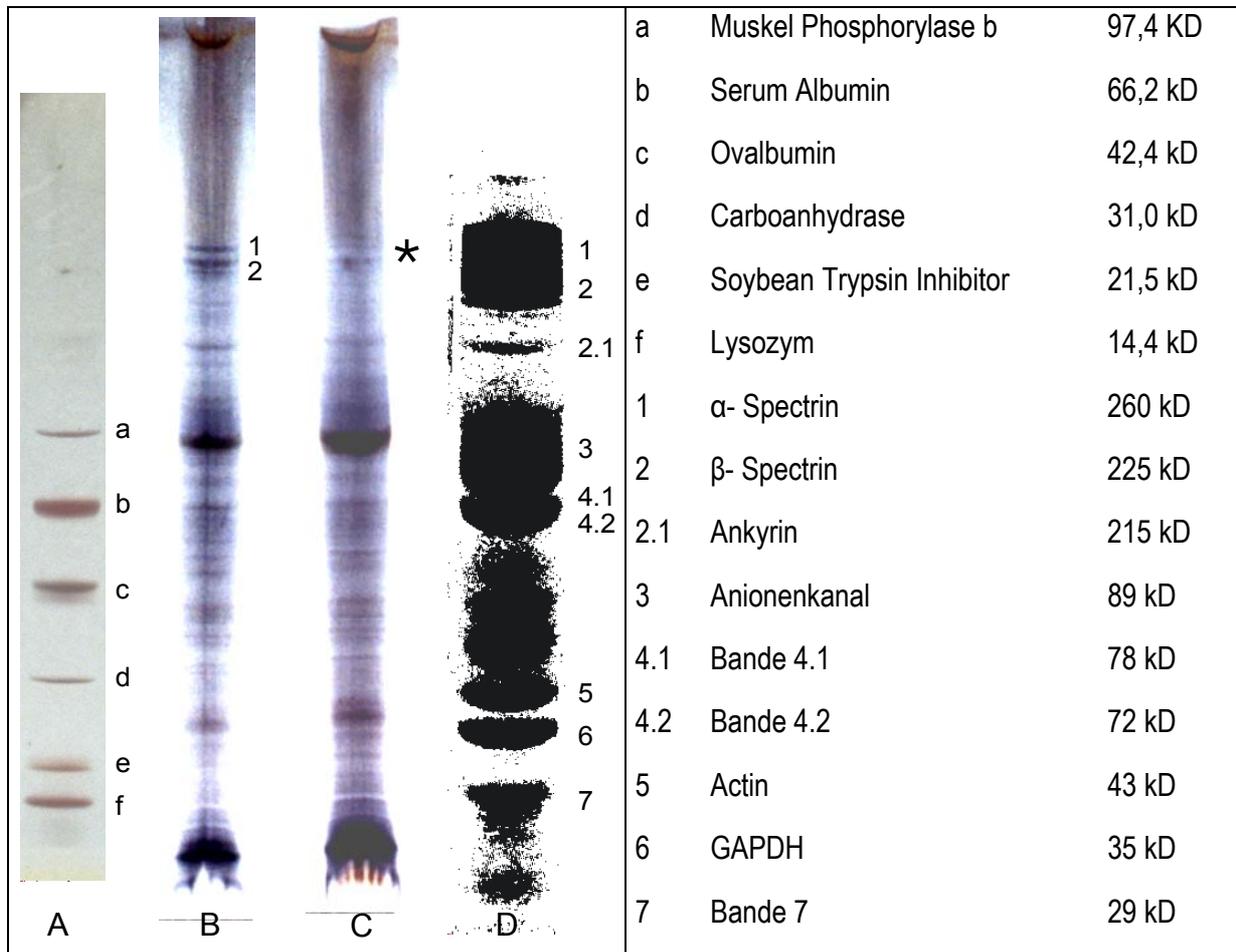


Abbildung 7(A) Kontrollgel (Low Molekular Weight Standard, BioRad), (B) negatives Gel aus der Versuchsreihe und (C) positives Gel aus der Versuchsreihe gefärbt mit Silver stain (BioRad) SDS-Polyacrylamide (D) Erythrozytenmembranproteine gefärbt mit Coomassie Blue stain (Stryer 1996)

### 3.20. $H_2O_2$ - induzierte Chemolumineszenz

Die Grundlage für die Chemolumineszenz (CL) biologischer Objekte bilden nichtenzymatische Oxydationsreaktionen (Popov und Lewin 1998). Oxidative Denaturierung und Modifikation von Proteinen werden von einem Anstieg der  $H_2O_2$ -induzierten Chemolumineszenz (Lewin et al. 1997) begleitet. Die spontane CL hat eine schwache Intensität ( $10$  bis  $1000$  Photonen  $s^{-1} cm^{-2}$ ) und kann deshalb nur unter besonderen technischen Voraussetzungen registriert werden (Popov und Lewin 1989). Durch Hinzusetzen von  $H_2O_2$  ist eine Verstärkung bzw. Aktivierung der CL möglich. Verwendet wurde ein Chemiluminometer nach Lewin und Popov (1992). Gemessen wurde der zeitliche Verlauf der  $H_2O_2$ -induzierten Chemolumineszenz.

Das Gerät mißt mit seinem Sekundärelektronenvervielfacher Photonen in einer 2 ml Küvette. Die Küvette wird vor dem Einspritzen von Plasma vollständig mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefüllt. Danach erfolgt mittels einer halbautomatischen Spritze die Zugabe von 0,4 ml Blutplasma. Der Zeitverlauf der abgestrahlten Lichtintensität wird über 3 min gemessen. Als Registriereinheit wurde ein bis 900 nm Spektralbereich umfassender Sekundärelektronenvervielfacher vom Typ M11 FVC 520 (VEB WF, Berlin, D) mit einem angeschlossenen hochohmigen Kompensationsbandschreiber K 200 (Carl Zeiss, Jena, D) verwendet. Als Kühlflüssigkeit diente Aqua dest. Die Hochspannung lieferte ein Gleichspannungsregler vom Typ Statron 4213 (VEB Statron Fürstenwalde, D). Abbildung 8 zeigt eine Darstellung des verwendeten Chemoluminometers.

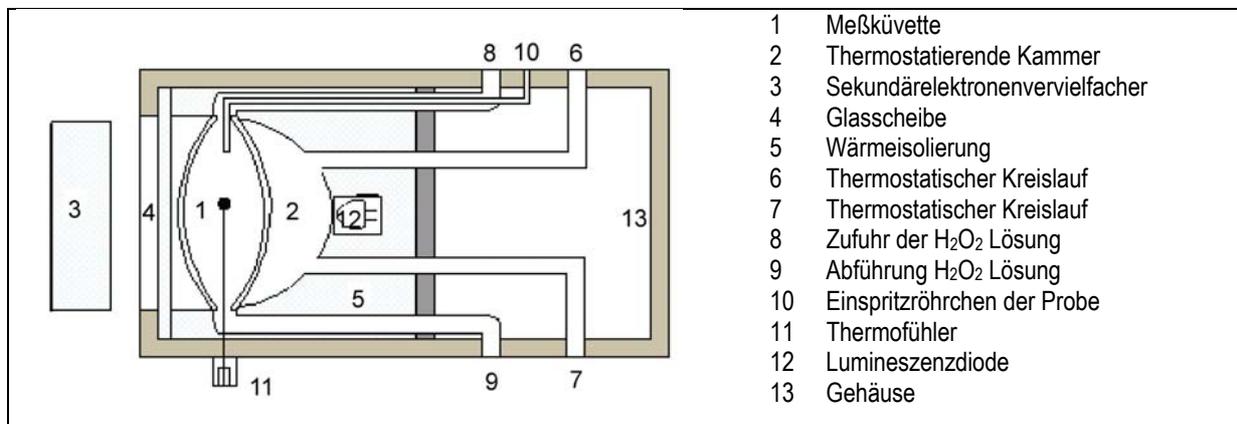


Abbildung 8 Chemiluminometer nach I. Popow und G. Lewin zur Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Chemolumineszenz

Der analysierte Parameter ist die Lichtproduktion der Messprobe innerhalb des Messintervalls, berechnet als Integral unter der CL-Messkurve.

$$CL = \int_{T_0}^{T_1} \text{Intensitätskurve}$$

Abbildung 9 zeigt ein typisches Messsignal und veranschaulicht die Berechnung des Integrals.

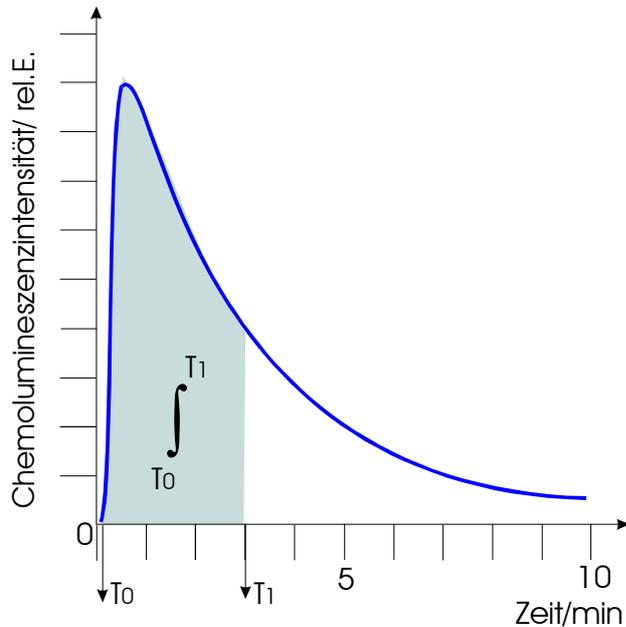


Abbildung 9  
Zeitverlauf der in relativen Einheiten gemessenen  $H_2O_2$ -induzierten Chemolumineszenz (Popov und Lewin 1998):

■ - Integral unter der Messkurve zwischen Messbeginn ( $T_0$ ) und 3 min ( $T_1$ )

### 3.21. Gesamtantioxidative Kapazität

Die Bestimmung der Antioxidativen Kapazität (AK) 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 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 1985, Robert 1996). Verwendet wurde ein Photochemiluminometer nach Albrecht, Hodgson, Lewin, Popov und White (Popov und Lewin 1992). Gemessen wurde der zeitliche Verlauf der photoinduzierten Chemolumineszenz. Das Gerät mißt mit seinem Sekundärelektronenvervielfacher Photonen in einer 20  $\mu$ l Durchflußküvette, die räumlich von der Bestrahlungsküvette getrennt ist. Die Verbindung zwischen beiden Küvetten übernimmt ein Zu- und Rückführungssystem mit einer Schlauchpumpe. Vom Gesamtvolumen (2,5 ml) befinden sich 1,5 ml außerhalb der

Bestrahlungsküvette. Die Zeitverzögerung der Chemolumineszenzmessung nach Bestrahlung beträgt 0,2 Sekunden. Die Bestrahlung wurde mit UVA-Licht (Transmissionsmaximum des Farbglasfilters  $\lambda_{\max} = 368 \text{ nm}$ ) durch eine Quecksilberdampfampe HQE-40 mit einer Leistung von 40 Watt und einem Abstand von 15 cm durchgeführt. Als Registriereinheit wurde ein bis 900 nm Spektralbereich umfassender Sekundärelektronenvervielfacher vom Typ M11 FVC 520 (VEB WF, Berlin, D) mit einem angeschlossenen hochohmigen Kompensationsbandschreiber K 200 (Carl Zeiss, Jena, D) verwendet (Tanzmann 1987). Abbildung 10 zeigt eine Darstellung des verwendeten Chemiluminometer. Da die Intensität der CL sehr gering ist, muß der Probe eine Verstärkersubstanz

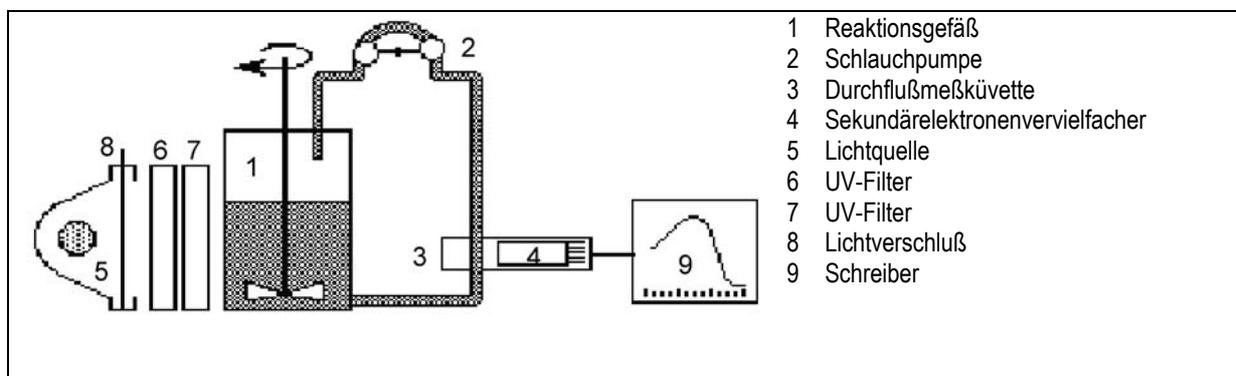


Abbildung 10 Chemiluminometer nach I. Popow und G. Lewin (Tanzmann 1978)

zugefügt werden. Bei der verwendeten Methode wird der Probenlösung Luminol (Aminophthalsäurehydrazid) zugesetzt. Luminol fördert die Entstehung von Radikalen während der UV Bestrahlung und verstärkt die radikalinduzierte Chemolumineszenz. Luminol zeigt Chemolumineszenz nach Reaktion mit Superoxid, Wasserstoffsuperoxid und Hypohalogeniden in Gegenwart von katalytisch aktiven Metallionen. Abbildung 11 zeigt den Reaktionsmechanismus der  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten CL des Luminols.

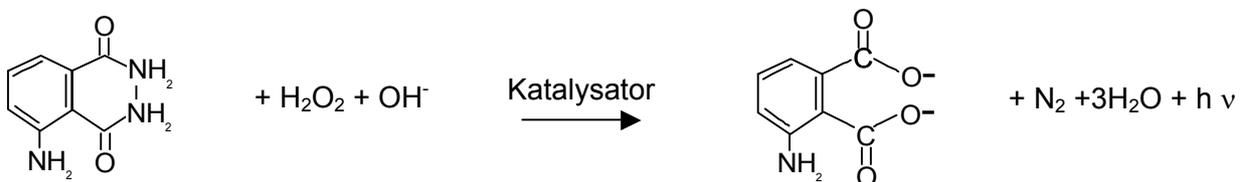


Abbildung 11 Mechanismus der Wasserstoffsuperoxid induzierten Chemolumineszenz des Luminols (Meyers 1996)

Zur Messung der Plasma AK wurden 3  $\mu\text{l}$  Plasma zu 2,5 ml Reagenzansatz mit 0,1 mmol/l EDTA, 10  $\mu\text{mol/l}$  Luminol und 0,1 mmol/l Karbonatpuffer (pH 11,4) gegeben. Die Latenzdauer (L) bis zum Anstieg des CL-Signals dient als Maß für die

antioxidative Kapazität. Die Latenzdauer des Probenansatzes ( $L_0$ ) ohne Zusatz wird von der Latenzdauer der Messlösung ( $L_1$ ) subtrahiert.

$$L = (L_1) - (L_0)$$

Abbildung 12 zeigt typische Meßsignale. Aufgrund der chemischen Inhomogenität der antioxidativen Substanzen im Plasma wurde die AK in Einheiten äquivalenter Ascorbinsäurekonzentration ausgedrückt (Tanzmann 1987, Popov und Lewin 1993). Der Referenzbereich für den Parameter L des Blutplasmas beträgt in Millimetern des Registrierpapiers  $23,6 \pm 1,2$ . Dies entspricht einer 0,41 mmol/l Ascorbinsäurelösung.

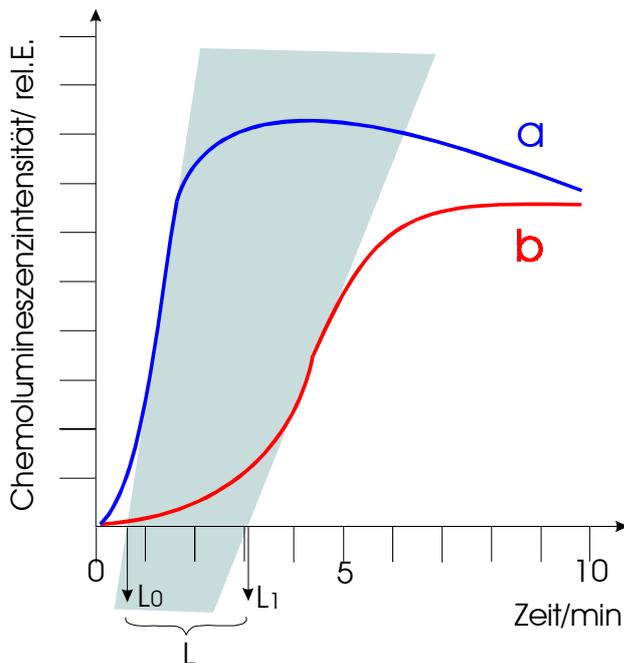
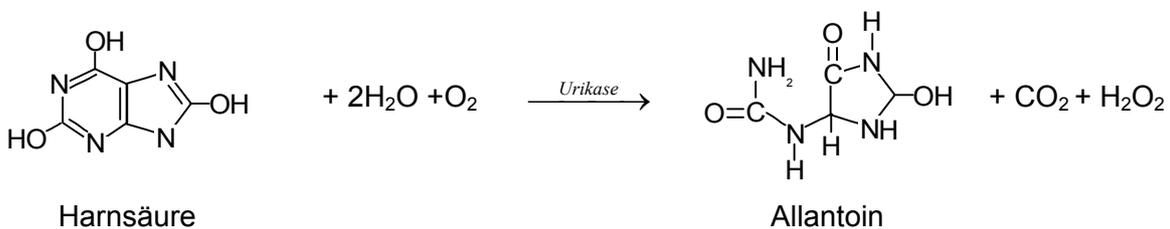


Abbildung 12  
Zeitablauf der photoinduzierten Chemolumineszenz der Luminolhaltigen Lösung (Popov und Lewin 1998):

a - ohne Zusatz  
b - mit Blutplasma

### 3.22. Harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität

Die Harnsäure stellt einen wichtigen Teil der antioxidativen Kapazität dar. Durch den Zusatz von Urikase wird die Harnsäure zu Allantoin oxidiert. Allantoin hat keine antioxidative Wirkung.



Die von der Harnsäure unabhängigen antioxidativen Substanzen können nun selektiv gemessen werden. Die harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität (AKU) wurde analog dem oben beschriebenen Verfahren der AK Bestimmung unter Zusatz von Urikase gemessen. Zur Messung der Plasma AKU wurden 3  $\mu\text{l}$  Plasma zu 2,5 ml Reagenzansatz mit 0,1 mmol/l EDTA, 10  $\mu\text{mol/l}$  Luminol, 0,1 mmol/l Karbonatpuffer

(pH 11,4) und 1µl Urikase gegeben. Die Latenzdauer (L) bis zum Anstieg des CL-Signals dient als Maß für die antioxidative Kapazität. Die antioxidative Wirkung der Harnsäure kann über die Differenz AK - AKU abgeschätzt werden.

$$\text{Antioxidative Kapazität der Harnsäure} = \text{AK} - \text{AKU}$$

### **3.23. Ascorbinsäure**

Ascorbinsäure (AA) kann mit Hilfe eines Photochemiluminometers selektiv gemessen werden. Das Plasma wurde mit hochauflösender Gelfiltration, Polyacrylamidgel in einer Trennsäule (Bio-Gel P-6DG<sup>®</sup>, 10 ml, Econo - Pac 10DG<sup>®</sup> Disposable Desalting Column, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D) aufgetrennt. Es wurden 1 ml Plasma in die Säule gegeben. Danach wurde 10 mal mit PBS - Pufferlösung gespült. Von den aufgefangenen Fraktionen wurden die ersten 5 verworfen. AA ist in Fraktion 6 bis 10 enthalten. Diese wurden zur Messung gemischt und jeweils 100 µl der Fraktion mit 1,5 ml Methanol, 500 µl PBS-Puffer (pH 7,2) und 25 µl Luminol (10 µmol/l) zugesetzt. Die Meßapparatur und die Berechnung der Meßwerte entsprach der bereits beschriebenen AK-Messung

### **3.24. Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS/PC+ <sup>®</sup> Version 3.0 (SPSS Inc., Illinois, USA) durchgeführt. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die Stichproben auf ihre Verteilungsform untersucht. Mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Variablen im Falle der nicht normal verteilten Stichproben wurde ein Vergleich der Parameter vor und nach der Belastung auf signifikante Unterschiede durchgeführt. Bei Normalverteilung der Stichprobe wurde der Student-T-Test für abhängige Variablen angewendet. Die Daten wurden als Mittelwerte (M) der Standardabweichung (SD) berechnet. Zusammenhänge zwischen Variablen wurden mit Hilfe von Korrelationskoeffizienten überprüft. Als statistisch signifikant wurde das Erreichen eines Vertrauensniveaus von  $p = 0.05$  gewertet.