

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Probanden

An der Untersuchung nahmen 14 ausdauertrainierte Radsportler im Alter von 21 bis 30 Jahren teil. Sieben Probanden waren Radprofis und sieben Probanden gehörten der Amateurklasse an. Die Profiradsportler starteten für eine GS II (Union Cycliste International, UCI) Profimannschaft. Die Amateurradsportler fuhren in der höchsten deutschen Amateurklasse und stammten aus verschiedenen Vereinsmannschaften.

Der Weltradsportverband UCI teilt alle Profimannschaften in drei Kategorien ein ([www.uci.ch](http://www.uci.ch)). Die ersten 15 Mannschaften der Weltrangliste zählen zu den GS I Teams, alle weiteren bis Platz 50 zu den GS II Teams (GS/Groupe Sportif). Bei den GS III Teams handelt es sich um die Teams ab Platz 50 der Mannschaftsweltrangliste. Die Probanden waren Angestellte eines GS II Teams und bestritten ihren Lebensunterhalt durch den Radsport.

Die Amateurrennklasse ist in Deutschland in drei Kategorien (A – B – C) eingeteilt. Zum Aufstieg in die nächsthöhere Kategorie benötigt ein Fahrer einen Sieg oder fünf Platzierungen auf den Plätzen zwei bis zehn in einem vom Bund Deutscher Radfahrer ausgerichteten Rennen mit einer Mindestdistanz von 60 km (Sportordnung, BDR 2001). Die Probanden der Amateurgruppe gehörten der A-Klasse an und bestritten ihren Lebensunterhalt zum Teil durch den Radsport. Ein Teil der Probanden studierte, ein Proband arbeitete halbtags.

Das durchschnittliche Alter der Probanden betrug 25,57 Jahre ( $\pm 2,95$ ), die Körpergröße 1,82 m ( $\pm 0,05$ ), das Gewicht 74,79 kg ( $\pm 6,27$ ) und der Body Mass Index (BMI) 22,52 ( $\pm 1,03$ ). Die genauen anthropometrischen Probandendaten sind in Abb. 3.1 aufgeführt.

Amateurradsportler (n=7)				
Proband	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI
1	25	1,81	77	23,50
2	27	1,77	65	20,75
3	23	1,83	76	22,69
4	27	1,73	64	21,38
6	23	1,87	81	23,16
8	28	1,87	80	22,88
13	28	1,80	72	22,22
m	25,86	1,81	73,57	22,37
s	2,03	0,05	6,34	0,92

Profiradsportler (n=7)				
Proband	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI
5	24	1,85	82	23,96
7	29	1,78	75	23,67
9	22	1,90	78	21,61
10	29	1,90	82	22,71
11	22	1,84	77	22,74
12	30	1,75	63	20,57
14	21	1,79	75	23,41
m	25,29	1,83	76,00	22,67
s	3,61	0,05	5,95	1,12

Gesamtgruppe (n=14)				
	Alter (Jahre)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI
m	25,57	1,82	74,79	22,52
s	2,95	0,05	6,27	1,03

**Abb. 3.1:** Darstellung der anthropometrischen Daten der Amateur- und Profiradsportler und der Gesamtgruppe (m: Mittelwert, s: Standardabweichung)

Trainingshäufigkeiten von fünf bis sieben Radeinheiten pro Woche und eine Kilometerleistung, in Abhängigkeit von der jeweiligen Trainingsperiode, von 400 bis 1.200 km pro Woche (15 - 40 h) wurden protokolliert.

Die Jahrestrainingsumfänge der Probanden auf dem Rad reichten von 15.000 km bis 36.000 km (zuzüglich dem nicht dokumentierten allgemeinen Training). Die genauen Daten finden sich in Abb. 3.2.

Amateurradsportler (n=7)		
Proband	Rennzahl	Jahreskilo- meter
1	45	20000
2	39	16000
3	68	26000
4	70	28000
6	38	15000
8	42	16000
13	45	17000
m	49,57	19714,29
s	12,55	4861,34

Profiradsportler (n=7)		
Proband	Rennzahl	Jahreskilo- meter
5	87	36000
7	75	29000
9	66	25000
10	71	30000
11	79	35000
12	82	35000
14	69	28000
m	74,29	31142,86
s	5,39	3907,08

Gesamtgruppe (n=14)		
Proband	Rennzahl	Jahreskilo- meter
m	61,93	25428,57
s	15,68	7218,17

**Abb. 3.2:** Darstellung der Trainingskilometer und Rennzahlen der Probanden (m: Mittelwert, s: Standardabweichung)

Die Anzahl der Rennen der Probanden reichten von 38 bis 87 Rennen. Die Probanden nahmen durchschnittlich an 61,93 ( $\pm 15,68$ ) Rennen teil.

### 3.2 Untersuchungszeitraum

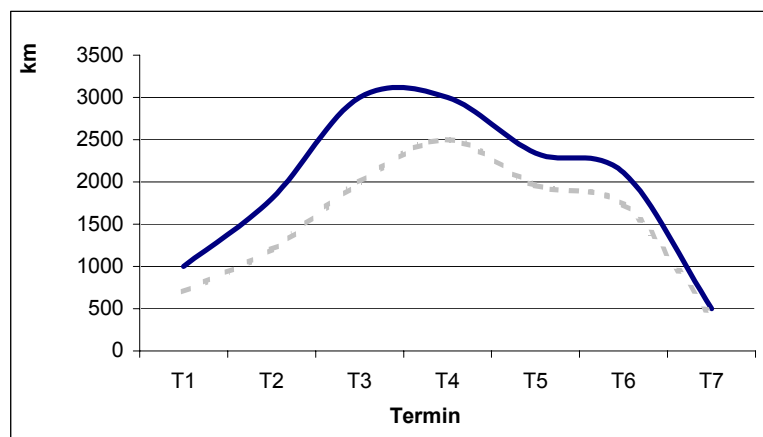
Die Untersuchung wurde von Dezember 1997 bis November 1998 durchgeführt. Durch die Wahl des Zeitraumes konnte die Radsaison 1998 von den Vorbereitungsperioden (Dezember bis März) über die Wettkampfperiode

(März bis Ende September) bis zur Übergangsperiode (Oktober und November) beobachtet werden. Die Untersuchungstermine wurden nach Absprache mit den Probanden so datiert, dass alle Trainingsperioden berücksichtigt werden konnten.

Termin	Zeitpunkt	Trainingsperiode
T1	12/1997	VP I
T2	1/1998	VP II
T3	3/1998	WP
T4	5/1998	WP
T5	7/1998	WP
T6	9/1998	WP
T7	11/1998	ÜP

**Abb. 3.3:** Untersuchungstermine (T1-T7) von Dezember 1997 bis November 1998 und ihre Zuordnung zu den Trainingsperioden (nach SCHMIDT, 1998)

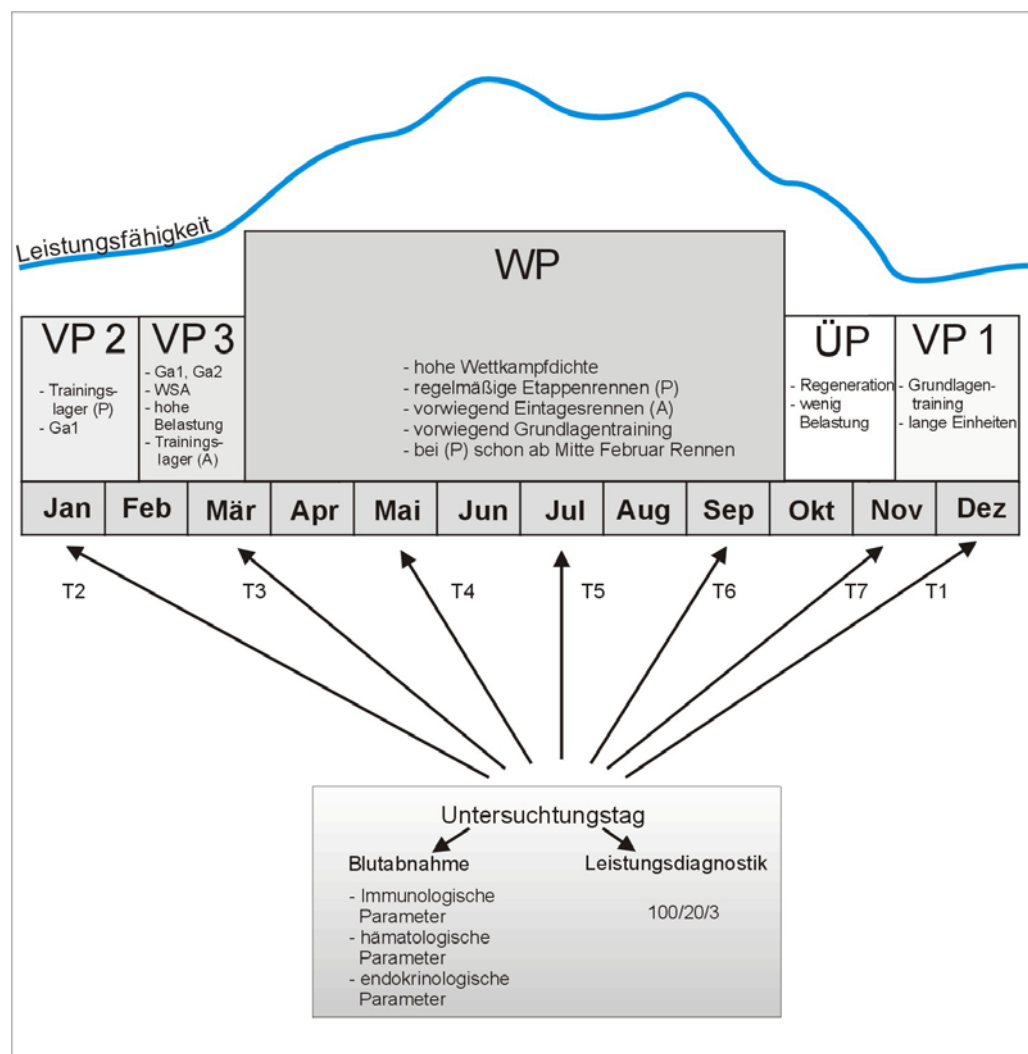
VP I: Vorbereitungsperiode I  
 VP II: Vorbereitungsperiode II  
 WP: Wettkampfperiode  
 ÜP: Übergangsperiode



**Abb. 3.4:** Darstellung der durchschnittlich zurückgelegten Monatskilometer im Verlauf des Trainingsjahres (→Profis, →Amateure)

Hinsichtlich des Saisonaufbaus bestehen zwischen der Probandengruppe der Amateure und der der Profis erhebliche Unterschiede. Die Wettkampfsaison der Profis begann bereits im Februar bei einzelnen Rennen und Rundfahrten in

Südeuropa, während die der Amateure erst Ende März mit einzelnen Rennen in Deutschland begann. Für die Amateure ist das Risiko, bei kalten, ungünstigen Witterungsverhältnissen an Rennen teilnehmen zu müssen, deutlich größer, da sie in der Regel nicht bei Rennen in südeuropäischen Ländern starten. Die erwähnte zeitliche Verschiebung macht bei den Profis größere Trainingsumfänge bereits im Dezember und Januar notwendig. Einen Überblick über die Untersuchungstermine und Kilometerumfänge verschaffen die Abbildungen 3.4 und 3.5.



**Abb. 3.5:** Untersuchungsdesign mit Zuordnung der Trainingsperioden und ihrer Inhalte (nach SCHMIDT, 2000). VP I: Vorbereitungsperiode I, VP II: Vorbereitungsperiode II, WP: Wettkampfperiode, ÜP: Übergangsperiode, Ga1: Grundlagenausdauer 1, Ga2: Grundlagenausdauer 2, WSA: Wettkampfspezifische Ausdauer, P: Profis, A: Amateure, T1-T7: Untersuchungstermine

### 3.3 Immunologische und hämatologische Untersuchungen

Zur Bestimmung der immunologischen und hämatologischen Parameter unterzogen sich die Probanden an den Untersuchungsterminen einer Blutabnahme. Diese erfolgte jeweils morgens zwischen 8.00 Uhr und 8.30 Uhr im nüchternen Zustand. Zur Blutabnahme wurde das Blutabnahmesystem der Firma Sarstedt (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Pro Abnahme wurden 5 ml und 10 ml Blut (1. EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 2. Heparin und Natrium) aus einer kurzzeitig gestauten Cubitalvene im Liegen entnommen. Um die Vergleichbarkeit der Blutproben zu gewährleisten, sollten die Probanden am Vortag ein maximal 2 stündiges regeneratives Training mit dem Rad absolvieren. Am Morgen der Untersuchung sollte körperliche Anstrengung bewusst vermieden werden.

Mit der Verarbeitung des Blutes und der Untersuchung der immunologischen und hämatologischen Parameter konnte unmittelbar im Anschluss an die Blutabnahme im „*Institut für Morphologie und Tumorforschung*“ der Deutschen Sporthochschule Köln begonnen werden.

#### 3.3.1 Hämatologie

Zur Bestimmung der hämatologischen Parameter wurden die Blutproben mit dem Hämatologieautomaten COULTER MD 18 (Firma COULTER Electronics GmbH, Krefeld) untersucht. Das Gerät saugt zur Analyse 12 µl EDTA Blut an und differenziert im Single-Pass-Verfahren unter Zugabe von Verdünnungs- und Lysereagenzien die in Tabelle 3.6 dargestellten Parameter. Vor Inbetriebnahme des Hämatologieautomaten wurde dieser mit vom Hersteller geliefertem Kontrollblut geeicht. Das stabilisierte 4C-Plus Kontrollblut (Firma COULTER Electronics GmbH, Krefeld) besteht aus speziell behandelten, stabilisierten humanen Erythrozyten in einem isotonischen, bakteriostatischen Medium. Daneben sind stabilisierte Thrombozytenbestandteile und fixierte Erythrozyten zur Simulation von Leukozyten enthalten. Absolute und relative Normwerte sind in Abbildung 3.6 dargestellt.

Parameter	Normwerte absolut pro $\mu\text{l}$	Normwerte relativ in %
Erythrozyten (RBC)	$4,6-6,2 \times 10^6/\mu\text{l}$	
Hämoglobin (HB)	14,0-18,0 g/dl	
Hämatokrit (HKT)		43,2-49,2 %
Mittleres Erythrozyteneinzelvolumen (MCV)	82,0-92,0 fl	
Mittleres Erythrozytenhämoglobin (MCH)	27,0-34,0 pg	
Mittlere Erythrozytenhämoglobinkonzentration (MCHC)	32,0-36,0 g/dl	
Thrombozyten (THR)	$200-300 \times 10^3/\mu\text{l}$	
Mittleres Thrombozytenvolumen (MTV)	7,4-10,4 fl	
Leukozyten	$5,0-8,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	
Lymphozyten	$1,3-3,2 \times 10^3/\mu\text{l}$	25,0-40,0 %
Monozyten	$0,1-0,5 \times 10^3/\mu\text{l}$	2,0-6,0 %
Granulozyten	$2,6-6,0 \times 10^3/\mu\text{l}$	52,0-75,0 %

**Abb. 3.6 :** Hämatologische Normwerte (absolut und relativ) für Männer (BEGEMANN u. RASTSTETTER 1986)

### 3.3.2 Lymphozytensubpopulationen

Die Differenzierung der Lymphozyten wurde an einem Durchflusszytometer (Epics profile II) der Firma COULTER durchgeführt. Bei einer durchflusszytometrischen Bestimmung von Leukozyten können diese aufgrund ihrer Zellgröße und Zellgranularität sowie der Antikörpermarkierung unterschieden werden.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt. Jeweils 10  $\mu\text{l}$  der bereits mit Phycoerythrin bzw. Fluoreszein-Isothiocyanat markierten Antikörper (siehe Abb.3.7) wurden in Kunststoffeströhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  antikoaguliertem EDTA Blut inkubierten die Ansätze 10 Minuten. Danach wurden die Ansätze mit dem COULTER Immunoprep Epics System in einem 35 Sekunden Zyklus automatisch mit drei verschiedenen Lösungen in vorgeschriebenen Volumina und Konzentrationen versetzt. Im Einzelnen wurden zunächst 600  $\mu\text{l}$  Immunoprep A (Ameisensäure 1,2 ml, Stabilisator) zur Erythrozytenlyse zugesetzt. Im Anschluß daran folgte die Zugabe von 265  $\mu\text{l}$  Immunoprep B (0,6% Natriumbikarbonat, 1,45% Natriumchlorid, 3,13% Natriumsulfat, Stabilisator) zur Stabilisierung der Leukozyten und zu-

letzt die Zugabe von 100 µl Immunoprep C (1% Paraformaldehyd, Puffer) zur Fixation der Leukozytenmembran (alle Reagenzien Fa. COULTER Electronics). Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde jeweils gemischt (Vortex). Die Präparation des Probandenblutes mit dem Immunoprep-System bietet gegenüber herkömmlichen Methoden zur Leukozytenpräparation entscheidende Vorteile bezüglich der Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Methode.

Im unmittelbaren Anschluss an die Vorbereitung der Proben begann die Messung der Proben am Durchflusszytometer (Argonlaser 488 nm). Um die kontinuierliche Vergleichbarkeit der verschiedenen Analysen zu gewährleisten, wurde das Gerät zu Beginn der Messungen mit Latexbeads (Immuno-Chek, COULTER Electronics) kalibriert.

Zur Differenzierung der Zellen wurden die Merkmale Zellgröße und Zellgranularität herangezogen. Es wurden die Lymphozytensubpopulationen mit den CD-Kennzeichnungen CD 2, CD 3, CD 4, CD 8, CD 19 und CD 56/CD 16 und deren Aktivierungsmarker mit Hilfe von Antikörpern der Firma COULTER-IMMUNOTECH (Krefeld) bestimmt.

Immunotech Antikörper	CD-	Zellmarkierung	Normbereich	
			Zellen/ µl Blut	Relativ % Zellen
MSIgG1-PE/ MSIgG1-FITC	Mauskontrolle		-	-
CD3-FITC CD19-PE	CD 2 / CD 19	T-Zellen / B-Zellen	800-2130 25-285	75-93 3-12
CD4-FITC CD8-PE	CD 4 / CD 8	T4-Zellen T8-Zellen	430-1185 180-865	31-53 17-35
CD3-FITC CD16+CD56-PE	CD 3 / CD 56 / CD 16	T-Zellen NK-Zellen	760-2130 25-450	63-86 3-21
MSIgG1-PE/ MSIgG2a-FITC	Mauskontrolle		-	-
CD3-FITC HLA-DR-PE	CD 3 / HLA-DR+	T-Zellen Aktivierungsmarker	760-2130 50-380	63-86
IL-2R1-FITC	CD 25	IL-2-Rezeptor	0-210	4

**Abb. 3.7:** Verwendete monoklonale Antikörper, ihre CD-Kennzeichnung, repräsentierende Zelltypen und deren Normbereiche (BEGEMANN u. RASTETTER 1986, ECKHARDT 1991)



### 3.3.3 Quantitative Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten

Ein Phagozytostest dient der quantitativen Analyse der Leukozytenphagozytose. Mittels der Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie kann der prozentuale Anteil der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten ermittelt werden (Aufnahme eines oder mehrerer Bakterien pro Zelle) sowie die Phagozytoseaktivität der untersuchten Zellgruppen (Anzahl phagozytierter Bakterien pro Zelle) bestimmt werden.

Die Untersuchung wurde mit dem Testkit Phagotest<sup>®</sup> (Firma Orpegen Pharma, Heidelberg) durchgeführt. Entscheidende Vorteile des Phagotest<sup>®</sup> sind die Verwendung von Vollblut und der Einsatz von Bakterien als physiologische Phagozytose targets.

Frisch entnommenes heparinisieretes Vollblut wurde gemischt (Vortex) und mit Hilfe von Phosphat Buffered Solution (PBS) auf die festgelegte Mono- und Granulozytenzahl von 3.000 Zellen/ $\mu$ l verdünnt. Das Verdünnungsverhältnis konnte mit Hilfe der zuvor durchgeführten hämatologischen Untersuchung (Hämatologieautomat, COULTER MD 18) errechnet werden. Damit konnte die Vergleichbarkeit der Testergebnisse gewährleistet werden.

Jeweils 100  $\mu$ l des verdünnten Bluts eines Probanden wurden auf die Böden von zwei 4 ml Polypropylenröhrchen (Fa. Saarestedt, Nümbrecht) aliquotiert. Ein Ansatz diente zur Kontrolle. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Blutreste an den Seitenwänden der Kunststoffröhrchen verblieben. Danach wurden die Blutproben 15 Minuten im Eisbad auf 0°C abgekühlt. Die ebenfalls auf 0°C gekühlten und vom Hersteller auf eine Konzentration von  $1 \times 10^9$ /ml verdünnten E.coli Bakterien wurden gemischt (Vortex) und mit PBS (Phosphate Buffered Solution) um den Faktor vier verdünnt. Darauf wurde die Bakteriensuspension in einer Menge von 20  $\mu$ l pro Ansatz zum verdünnten Vollblut pipettiert. Wie in Abbildung 4.8 ersichtlich wurde die vom Hersteller angegebene Bakterienkonzentration verdünnt, um deutlichere Ergebnisse zu erzielen.

Zur Inkubation wurden die Röhrchen nochmals gemischt (Vortex). Während die Kontrollröhrchen im Eisbad verblieben, wurden die Phagozytoseansätze 10 Minuten bei 37°C im geschlossenen und exakt temperierten Wasserbad unter Schütteln mit einer Frequenz von 60 Hz inkubiert.

Zum Ende der Inkubationszeit wurden alle Röhrchen gleichzeitig (im Ständer) aus dem Schüttelwasserbad genommen und zum Stoppen der Inkubation in Eiswasser getaucht. Sofort im Anschluss daran wurden zu den Proben 100  $\mu\text{l}$  eiskalte Quenchl sung ( $0^\circ\text{C}$ ) des Herstellers pipettiert und die Proben wiederum gut gemischt (Vortex).

Zum Waschen der Proben wurde je Ansatz 3 ml Waschlösung des Herstellers zugegeben, kurz gemischt (Vortex) und 5 Minuten mit 250 g bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand in den Röhrchen wurde nach dem Zentrifugieren dekantiert. An den ersten Waschdurchgang schloss sich ein zweiter Waschdurchgang an, der nach dem gleichen Schema durchgeführt wurde. Das Waschen dient dem Entfernen nicht phagozytierter Bakterien aus der Probensuspension. Nach dem zweiten Waschdurchgang wurden die Proben abermals zentrifugiert (5 min, 250g,  $4^\circ\text{C}$ ). Zur Lyse und Fixierung wurde das Vollblut mit 2 ml vorgewärmter Lysing-Solution (Raumtemperatur) des Herstellers bei Raumtemperatur lysiert und fixiert und nach 20 Minuten Inkubationszeit 5 Minuten mit 250g bei  $4^\circ\text{C}$  in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Danach erfolgte ein abschließendes Waschen der Proben mit 3 ml kalter Waschlösung und ein Zentrifugieren (5 min, 250 g,  $4^\circ\text{C}$ ).

Zur Färbung der Proben wurde je Ansatz 200  $\mu\text{l}$  DNA-Färbelösung pipettiert, gemischt (Vortex) und 10 Minuten im lichtgeschützten Eiswasserbad bei  $0^\circ\text{C}$  inkubiert.

Die Messung der Proben am Durchflusszytometer erfolgte innerhalb von 30 Minuten. Zur durchflusszytometrischen Messung wurde ein Epics Profile II mit blaugrüner Lichtanregung (Argonlaser mit 488 nm) verwendet. Bei den Kontrollansätzen durfte keine Phagozytoseaktivität messbar sein.

Zellpopulation	% phagozytierende Zellen Zellen:Bakterien 1:25 (Hersteller-Standard)	% phagozytierende Zellen Zellen:Bakterien 1:10 (Instituts-Standard)
<b>Monozyten</b>	65-95	30-60
<b>Granulozyten</b>	95-99	30-60

**Abb.3.8:** Normalbereich der Phagozytoseaktivität gemessen am Blut gesunder Probanden (Arbeitsanweisung Phagotest und Instituts-Standard)

### 3.3.4 Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen wurde der NK-Test der Firma Orpegen Pharma (Heidelberg) verwendet. Im NK-Test werden spezielle mit einem lipophilen, grünfluoreszierenden Membranfarbstoff angefärbte K562 Targetzellen eingesetzt, die eine durchflusszytometrische Abgrenzung zu den Effektorzellen, in diesem Fall NK-Zellen ermöglichen. K562 Zellen sind humane erythromyelozytäre Leukämiezellen. Sie stellen die sensitivste Zelllinie zur Bestimmung der Aktivität von menschlichen NK-Zellen dar. Auf der Membran von K562 Zellen fehlen MHC Klasse I- und II-Antigene. Nach der Inkubationszeit werden die abgetöteten Targetzellen durch einen rotfluoreszierenden DNA-Farbstoff eingefärbt. Dieser DNA-Farbstoff koloriert die Kerne der membrangeschädigten, abgetöteten Zellen an. Somit kann der Prozentsatz der abgetöteten Targetzellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt werden. Der Test ermöglicht die Bestimmung der zytotoxischen NK-Aktivität zur weiterführenden Diagnose und Einschätzung von verschiedenen Krankheiten und zur Bewertung von Medikamenteneffekten.

Im Einzelnen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt. Zur Durchführung des NK-Tests wurden 5 ml Heparin-Blut benötigt. Aus diesem Blut wurden die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) nach dem Ficoll-Hypaque-Verfahren (Dichte 1,077) isoliert. Dazu wurde ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Ficoll-Lösung gefüllt und das Heparin Blut 1:2 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde die verdünnte Blutprobe vorsichtig auf das Ficoll-Kissen gegeben. Nach dem zwanzigminütigen Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 700 g (ohne Bremse) wurde die oberste Schicht dekantiert und die mononukleäre Zellschicht aus der Interphase mit einer Einmalpipette entnommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 12 ml PBS vermischt (Vortex). Anschließend wurde die Suspension bei Raumtemperatur zehn Minuten bei 250 g abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen, ohne das Zellpellet zu verwirbeln. Das in einem Milliliter Kompletmedium (Orpegen Pharma) resuspendierte Zellpellet wurde anschließend einer Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer unterzogen. Die Zellkonzentration war mit Kompletmedium auf  $5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

In ein vorbereitetes 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 50 ml vorgewärmtes (37°C) Komplettmedium gegeben. Innerhalb von 20 bis 60 Sekunden wurde danach ein Einfrierröhrchen mit kryokonservierten K562 Zellen unter Schwenken aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann mit einer Pipette in das 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und gut gemischt. Nach dem fünfminütigen Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 120 g wurde der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter Komplettmedium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Mit Hilfe von Komplettmedium wurde die Zellzahl auf  $1 \times 10^5/\text{ml}$  eingestellt. Anschließend wurden die Effektorzellen der Probanden mit den Targetzellen im Verhältnis 25:1 vermischt. Dazu wurden 50  $\mu\text{l}$  Effektorzellsuspension mit 100  $\mu\text{l}$  Targetzellsuspension und 75  $\mu\text{l}$  Komplettmedium vermischt. Ein Kontrollröhrchen wurde ausschließlich mit K562 Targetzellen versehen, um daran den spontanen Zelltod bestimmen zu können. Den Testansätzen wurde zur Stimulierung der NK-Zellaktivität jeweils 30  $\mu\text{l}$  Interleukin-2 zugegeben und vermischt (Vortex). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 3 min bei 120g und Raumtemperatur wurden die Röhrchen für 120 min im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden alle Röhrchen bis zur durchflusszytometrischen Analyse in ein Eiswasserbad gestellt. Unmittelbar vor der Analyse wurden je Probe 50  $\mu\text{l}$  DNA-Färbelösung zugegeben. Nach dem Mischen verbrachten die Proben weitere fünf Inkubationsminuten im lichtgeschützten Eiswasserbad.

Die Analyse im Durchflusszytometer erfolgte bei blaugrüner Lichtanregung (488 nm Argonlaser). Während der Analyse am Zytometer wurde zur Abgrenzung der Targetzellen von den Effektorzellen im Histogramm der Grünfluoreszenz ein Gate auf die grünfluoreszierenden Targetzellen gesetzt. Das Gate wurde mit Hilfe eines Kontrollröhrchens gesetzt, welches nur Targetzellen enthielt.

Effektor:Target Verhältnis	% spezifische Aktivität	% spezifische Aktivität nach Zugabe von IL-2
25:1	9,9 – 26,1 (Ø 18,0)	14,8 – 33,4 (Ø 24,1)

**Abb.3.9:** Normalbereich der NK-Aktivität bei einer Inkubationszeit von 120 min, gemessen am Blut gesunder Probanden (Arbeitsanweisung NK-Test, Orpegen Pharma).

### 3.4 Bestimmung der Hormonkonzentrationen

Neben den Parametern des weißen und roten Blutes wurden verschiedene Hormone aus dem Plasma von EDTA Vollblut bestimmt. Dazu wurden 3 ml des EDTA Vollbluts bei 0°C und 4.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Anschließend wurde das somit gewonnene Plasma auf Portionen von 200 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen verteilt und diese bei –70°C bis zur Weiterverarbeitung tiefgekühlt. Die Bestimmung von Kortisol erfolgte mittels eines Radioimmunassays (RIA) und für die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC).

Die Hormonbestimmungen wurden im Institut für Tierphysiologie der Universidad de Extremadura in Badajoz (Spanien) von Prof. Dr. E. Ortega durchgeführt.

#### 3.4.1 Plasma-Katecholaminmessung

Die Bestimmung der Katecholaminkonzentration aus Plasma erfolgt seit einigen Jahren mittels der „High Performance Liquid Chromatographie“ (HPLC). Die HPLC ist eine leistungsfähige Trennmethode zur quantitativen Bestimmung von Katecholaminen. Die Katechol-Ring-Struktur der Katecholamine lässt sich spontan unter dem Einfluss von Licht und Luft (Sauerstoff) oxidativ zur Quinon-Form umwandeln. Dieser Elektronentransfer kann mittels elektrochemischer Techniken mit der HPLC bestimmt werden.

Die Bestimmung der Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin wurde mittels des Testkits von Chromsystems HPLC (München) durchgeführt. Dieses Testkit ermöglicht die Extraktion der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus der Plasmamatrix vor der HPLC Analyse mit einer Ionenaustausch-

säule. Die Testdurchführung ist aufgrund des nur einmaligen Waschvorganges mit Wasser und der Verwendung des Plasmas ohne vorherige pH-Wert Anpassung wenig fehleranfällig. Die abschließende HPLC Analyse erlaubt somit die sichere und zuverlässige Quantifizierung der Katecholamine.

Im Einzelnen wurden die folgenden Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Analyse durchgeführt. In die beschrifteten Ionenaustauschpatronen (eine pro Probe) wurden jeweils 0,5 ml Extraktions-Pufferlösung pipettiert und gründlich vermischt (Vortex). Nach der Zugabe von 1 ml der jeweiligen Plasmaprobe und 50 µl der internen Standardlösung wurde die Ionenaustauschpatrone am oberen Ende verschlossen und für 10 min auf einem Schüttler platziert. Nach Öffnung des unteren Verschlusses wurde das Plasma Supernatant durch einminütiges Zentrifugieren bei 3.000 rpm entfernt. Anschließend wurde die Ionenaustauschpatrone wieder mit dem unteren Verschluss geschlossen und am oberen Ende geöffnet. Nach Zugabe von 1 ml Waschlösung wurde die Patrone erneut verschlossen, 30 Sekunden vermischt (Vortex) und unten geöffnet. Das Plasma-Supernatant wurde abermals durch einminütiges Zentrifugieren bei 3.000 rpm und Raumtemperatur entfernt und die Patrone wiederum verschlossen. Dieser Waschvorgang wurde zwei Mal wiederholt und im Anschluss daran die Patrone trocken zentrifugiert.

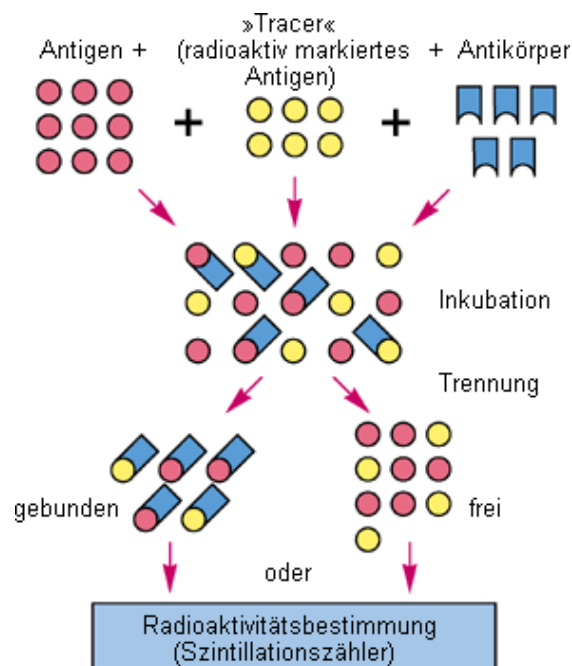
Im folgenden Schritt wurde das im Testkit enthaltene Plastikröhrchen an der Ionenaustauschpatrone befestigt, 120 µl Elution-Pufferlösung hinzugegeben und gründlich gemischt. Nach einer Wartezeit von 5 Minuten zur Ablösung der Katecholamine wurde 30 Sekunden gevortext und die Ionenaustauschpatrone mit dem daran befestigten Plastikröhrchen bei 2.000 rpm und Raumtemperatur eine Minute zentrifugiert. Die gereinigte Probe wurde beim Zentrifugieren im Plastikröhrchen gesammelt und anschließend in den Waters WISP autosampler gestellt.

Katecholamin	Normwert (ng/ml)
Adrenalin	0,05
Noradrenalin	0,2

**Abb. 3.10:** Normwerte der Katecholaminkonzentrationen (PALM et al.1987)

### 3.4.2 Radioimmunassay

Der Radioimmunassay ist eine radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen (ng-Bereich). Ein in seiner Konzentration zu bestimmendes nicht markiertes Antigen (hier ein Hormon) und eine definierte Menge eines radioaktiv markierten Antigens (Tracer, ebenfalls ein Hormon) werden mit ihrem spezifischen Antikörper zur Reaktion gebracht. Die Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt in hoher Verdünnung kompetitiv nach dem Massenwirkungsgesetz, das bedeutet, dass beide Antigene um den zugesetzten Antikörper konkurrieren. Nach einer festgelegten Inkubationszeit werden die freien Tracerantikörper von den gebundenen Tracerantikörper-Antigenkomplexen getrennt (s. Abb. 3.11). Dies geschieht über die Zugabe von chemischen Substanzen wie zum Beispiel Polyethylen, Glykol oder über die Zugabe eines die freien Tracer bindenden Antikörpers. Die Strahlungsaktivität (cpm = Impulse/min) der aufgetrennten Probe ist das Maß für die Konzentration des zu bestimmenden Stoffes und erlaubt indirekt über den Vergleich mit bekannten Standardkonzentrationen die Errechnung der Konzentration des zu bestimmenden Stoffes.



**Abb. 3.11:** RIA, Antigen-Antikörper-Komplexe mit radioaktiv markierten Antigenen ermöglichen über die Messung in einem Szintillationszähler die indirekte Bestimmung der Konzentration von z.B. Hormonen (modifiziert aus ROCHE LEXIKON MEDIZIN 1999)

### Kortisol

Zur Bestimmung der Kortisolkonzentration im Serum wurde ein Radioimmunoassay durchgeführt. Im Gegensatz zu einem Radioimmunassay zum Beispiel für Melatonin wurden hier die freien und gebundenen Antigene durch einen speziellen Antikörper voneinander getrennt. Die Untersuchung wurde mit dem Testkit DRG RIA1635 Kortisol (DRG Instruments GmbH, Marburg) durchgeführt. Vor dem Testansatz müssen sich alle Testreagenzien auf Raumtemperatur erwärmen können. Zur Erhöhung der Genauigkeit des Tests werden die Kontroll-, Standard- und unbekanntes Ansätze in doppelter Ausführung angesetzt. Jeweils 25 ml der Kontroll-, Standard- und unbekanntes Ansätze wurden auf die Böden der zuvor beschrifteten Teströhrchen pipettiert. Danach wurden sofort 500 µl der Kortisol Antiserum-Komplex Lösung zugegeben und die Röhrchen gevortext. Im Wasserbad inkubierten alle Proben anschließend bei 37°C +/- 2°C für 45 Minuten. Bis auf die Kontroll-Röhrchen wurden danach alle Röhrchen für 15-20 Minuten bei 3.000 rpm und 5°C zentrifugiert. Die flüssigen Überstände in den Röhrchen wurden vollständig dekantiert (bis auf TC). Der jeweils verbleibende Flüssigkeitsrest kann die Messqualität negativ beeinflussen. Eventuell an der Innenseite anhaftende Flüssigkeitsreste müssen deshalb mit Wattestäbchen entfernt werden. Die Proben wurden für eine Minute im Gammazähler (Minigamma, Modell 1275, Fa. Pharmacia LKB, Upsala, Schweden) gemessen. Die Hormonkonzentration wurde automatisch errechnet. Das nachfolgende Prinzip liegt der automatischen Berechnung zu Grunde.

Zur Ermittlung der Kortisolkonzentration wurde zunächst der Mittelwert (cpm) der aus den jeweils doppelt vorliegenden Ergebnissen der Teströhrchen berechnet. Anschließend wurde der mittlere cpm der Standard-Probe von allen Kontrollproben (A-G) und von allen Probandenproben subtrahiert, um den mittleren Netto-cpm für jede Probe zu bestimmen. Zur Berechnung des Verhältnisses „Probe zu Kontrollprobe A“ ( $K_A$ ) wurden jeweils die mittleren Netto-cpm der Kontrollproben und Probandenproben ( $P_x$ ) durch die mittlere Kontroll A-cpm ( $K_A$ ) geteilt und das Ergebnis mit 100 multipliziert.



Anschließend wurde der Wert von % P/K<sub>A</sub> für jede Standardkonzentration in ein Koordinatensystem auf logarithmisches Papier (pg/ml) eingetragen. Die Kortisolkonzentrationen der Probanden konnten dann direkt anhand der Standarddeichkurve abgelesen werden. Normwerte finden sich in Abbildung 3.12.

Tageszeit	Normwert (µg/dl)
vor Mittag	5 – 25
nach Mittag	2 – 12

**Abb.3.12:** Normwerte für die Kortisolkonzentration zu verschiedenen Tageszeitpunkten (DRG Instruments 1999)

### 3.5 Leistungsdiagnostik

Die leistungsdiagnostische Untersuchung der Probanden fand grundsätzlich am gleichen Tag der Blutuntersuchung statt. In fester Reihenfolge absolvierten die Probanden ab 9.00 Uhr den Ergometertest. Durch Einhaltung einer festen Testreihenfolge konnten die Probanden am jeweiligen Untersuchungstag zur gleichen Uhrzeit ( $\pm 60$  min) getestet werden, was zirkadiane Schwankungen des Biorhythmus minimieren sollte. Zur Minimierung von Störfaktoren durch hohe Trainingsumfänge am Untersuchungsvortag wurden die Probanden angehalten, am Tag vor dem Untersuchungstermin eine regenerative Trainingsfahrt (Intensität KB, LINDNER 1993) mit einer maximalen Dauer von zwei Stunden durchzuführen.

#### 3.5.1 Ergometer

Die leistungsdiagnostische Untersuchung der Probanden bestand aus einem Stufentest auf einem Ergometer der Firma Lode (Lode B.V., Groningen, Niederlande, Modell: Excalibur). Der Stufentest wurde jeweils am Vormittag der Blutabnahme durchgeführt.

Das Modell *Excalibur* der Firma Lode ist ein spezielles Hochleistungsergometer mit einer maximalen Bremsleistung von 1.000 Watt zur Testung von Leistungssportlern. Eine elektronisch angesteuerte Wirbelstrombremse erzeugt die drehzahlunabhängigen Bremsleistungen. Testverfahren lassen sich mit Hilfe des Eingabedisplay oder über einen angeschlossenen Personalcomputer belie-

big programmieren und abspeichern. Die Sitzposition (SCHMIDT 2001) kann über eine Verstellung des Sattels und Lenkers sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung verändert werden. Die Übertragung der Sitzposition von der Rennmaschine auf das Ergometer konnte somit durchgeführt werden.



**Abb. 3.13:** Sitzpositionsrelevante Größen am Rennrad; 1: Sitzhöhe, 2: Sitzlänge, 3: Sattelüberhöhung, 4: Nachsitz, 5: Kurbellänge (modifiziert nach SCHMIDT 2000)

Vor der ersten leistungsdiagnostischen Untersuchung wurde die Sitzposition der Probanden auf ihrem Rennrad genau vermessen (Sitzhöhe, Sitzlänge, Nachsitz und Sattelüberhöhung) und auf das Ergometer übertragen (s. Abb. 3.13). Die Werte auf den Skalen des Ergometers wurden protokolliert und zur wiederholten Einstellung des Ergometers bei späteren Testterminen herangezogen. Die Tretkurbellänge des Ergometers betrug 170 mm und konnte nicht verändert werden. Die Probanden montierten jeweils vor der Untersuchung ihr eigenes Rennpedalsystem an die Tretkurbeln, um möglichst geringe Unterschiede gegenüber ihrem Rennrad vorzufinden.

### 3.5.2 Testprotokoll

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit der Probanden wurde das Testprotokoll 100/20/3 gewählt. Dieses Protokoll verwendet der Bund Deutscher Radfahrer zur leistungsdiagnostischen Untersuchung seiner Kadersportler. Bei ei-

ner Eingangsbelastung von 100 Watt, wurde die Leistung alle drei Minuten um 20 Watt bis zum individuellen Belastungsabbruch erhöht. Das Testprotokoll 100/20/3 wird vom Bund Deutscher Radfahrer zur Untersuchung seiner Kamermitglieder angewendet (STOCKHAUSEN 1996) und war den meisten Probanden aus früheren leistungsdiagnostischen Untersuchungen bekannt.

### **3.5.3 Bestimmung der Herzfrequenz**

Die Belastungsherzfrequenz wurde mittels der Herzfrequenzmessgeräte Vantage NV von Polar (Finland) kontinuierlich telemetrisch registriert und aufgezeichnet. Das Speicherintervall der Meßwerte betrug fünf Sekunden. Eine Markierung der Stufenenden erfolgte durch die Betätigung der Intervalltaste. Die Herzfrequenzmessgeräte wurden im Anschluß an den Stufentest mit dem Interface Vantage der Firma Polar (Finland) auf einen Personalcomputer übertragen. Die Software Precision Performance SW 2.1 diente zur Auswertung der Herzfrequenzkurven. Weitere statistische Analysen wurden in Excel 2000 vorgenommen.

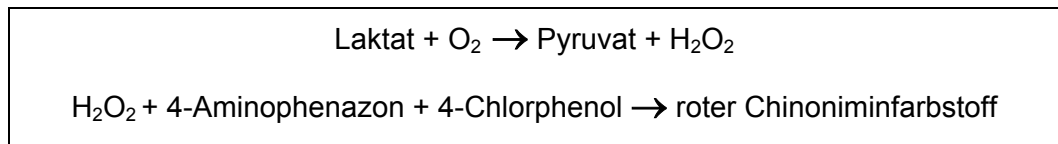
### **3.5.4 Laktatwertbestimmung**

Zum jeweiligen Stufenende wurde den Probanden arterialisiertes Blut aus dem Ohrläppchen mit Hilfe einer 10 µl Mikropipette (Dr. Lange, Berlin) entnommen. Das Ohrläppchen wurde vor Testbeginn für ca. 10 min mit der Salbe Finalgon® (Boehringer, Ingelheim) hyperämisiert und mit einer Einmallanzette im unteren Drittel distal angestochen. Durch leichten Druck mit drei Fingern auf das Ohrläppchen von oben nach unten konnte während der gesamten Stufentestdauer ein ausreichend großer Blutropfen zur Aufnahme in die Mikropipette erzeugt werden.

Durch Ausblasen der Mikropipette wurde das Probandenblut in eine LKM 140 Küvette (Dr. Lange, Berlin) befördert und dort durch anschließendes Schütteln gleichmäßig mit der darin befindlichen Flüssigkeit vermischt. Die primär als Pufferlösung dienende Küvettenflüssigkeit enthält Pipes-Puffer (pH 7,0, 20 mmol/l), 4-Chlorphenol (1,8 mmol/l), Peroxidase > 100 U/l, Natriumazid < 0,1% sowie ein Detergenz (0,2%). Das Blut wird in der Pufferlösung sofort und vollständig hämolysiert.

Nach Testende und Abnahme aller Proben wurde mit dem Miniphotometer LP 20 (Dr. Lange, Berlin) die Nullwertbestimmung der Proben bei einer Wellenlänge von 720 nm durchgeführt. Dazu mussten alle Proben nacheinander in den Messschacht eingeführt werden. Das LP 20 maß und speicherte dann die Leerwerte der einzelnen Proben. Nach anschließendem Austausch des Deckels der ersten Probe und dreimaligem Mischen der Küvette wurde diese abermals in den Messschacht des Photometers platziert und die Messung durch Drücken der Messtaste begonnen. Ohne Verzögerung mussten danach alle Proben der Reihe nach mit einem neuen Deckel versehen und auf die beschriebene Weise vermischt werden. In den Deckeln befand sich ein Startreagenz mit den Substanzen 4-Aminophenazon (0,23 mmol/l), Laktatoxidase (> 450 U/l) und Peroxidase (> 750 U/l), die durch das Mischen sofort aus dem Deckel herausgelöst wurde. Dabei entsteht der später photometrisch messbare Chinoniminfarbstoff (BÖNING et al. 1994). Der genaue Reaktionsablauf findet sich in Abbildung 3.14.

Nach der Anzeige des ersten Laktatwertes wurden die Küvetten nacheinander im Miniphotometer durchgemessen und die Werte notiert.



**Abb. 3.14:** LOX-PAP Methode zur Bestimmung der Laktatkonzentration (DR.LANGE 1998)

### 3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde an einem Personalcomputer mit Hilfe der Programme Microsoft Excel 2000 und STATISTICA® for Windows (Release 4.5, 1993, StatSoft, USA) durchgeführt. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Excel 2000 für Windows von Microsoft. Die Überprüfung der Homogenität der Varianzen erfolgte durch den „Barlett-Box-Test“. Bei inhomogenen Varianzen wurden alternative Tests mit Korrektur der Freiheitsgrade der betroffenen F-Tests (Box) bzw. nichtparametrische Analysen herangezogen. Die Signifikanzen wurden bei Haupteffekten in Form multipler Mittelwertsvergleiche nach Newman-Keuls (post hoc Test) weiter aufgeschlüsselt. Bei der Ergebnisdarstellung wurden die Mittelwerte (M) mit den Standardabweichungen ( $\pm S$ ) aufgetragen. Die Signifikanzen erscheinen, soweit vorliegend, tabellarisch. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.  $p < 0,05$  ist somit „signifikant“,  $p < 0,01$  „hoch signifikant“ und  $p < 0,001$  „sehr hoch signifikant“.