

Aus dem Bereich Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Beeinflussung der akuten belastungsinduzierten Immunreaktion durch aktive Erholung

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2008

vorgelegt von Joachim Franzmann,
geboren am 20.07.1974 in Birkenfeld

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abbildungsverzeichnis	III
III Tabellenverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 BELASTUNGSLEUKOZYTOSE	6
2.1.1 Sofortige Leukozytose.....	7
2.1.2 „Open Window“	8
2.1.3 Verzögerte Leukozytose	10
2.2 AKUTE-PHASE-REAKTION (APR)	11
2.3 AKTIVE ERHOLUNG	13
2.4 HYPOTHESEN	16
3 Material und Methoden	17
3.1 PROBANDEN	17
3.2 ALLGEMEINER UNTERSUCHUNGSABLAUF	18
3.2.1 Eingangsuntersuchung	18
3.2.2 Eingangstest	19
3.2.3 Studiendesign	20
3.3 LABOR	23
3.3.1 Blutbild und Klinische Chemie.....	24
3.3.2 Durchflusszytometrie.....	24
3.3.3 Immunphänotypisierung.....	25
3.3.4 Oxidativer Burst	27
3.3.5 Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen	29
3.3.6 ELISA Tests	31
3.3.6.1 IL-4-Bestimmung.....	31

3.3.6.2 IL-6-Bestimmung.....	33
3.3.6.3 IL-10-Bestimmung.....	34
3.3.6.4 TNF- α -Bestimmung	36
3.4 DATENERFASSUNG	37
3.5 DATENANALYSE.....	38
3.6 ZUSAMMENFASSUNG DER UNTERSUCHTEN ZELLSUBPOPULATIONEN	44
3.7 PLASMAVOLUMENKORREKTUR	45
3.8 STATISTIK	46
4 Ergebnisse	47
4.1 HERZFREQUENZEN UND LAKTATWERTE	47
4.2 KREATINKINASE (CK) UND HARNSTOFF.....	48
4.3 LEUKOZYTEN- UND LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN.....	49
4.4 OXIDATIVER BURST DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN.....	53
4.5 NK-ZELL-ZYTOTOXIZITÄT.....	55
4.6 ZYTOKINE UND AKUTE-PHASE-REAKTION.....	57
5 Diskussion.....	59
5.1 LEUKOZYTEN- UND LYMPHOZYTENSUBPOPULATIONEN.....	59
5.2 ZELL-FUNKTIONEN.....	62
5.2.1 Oxidativer Burst	62
5.2.2 NK-Zell-Zytotoxizität.....	64
5.3 ZYTOKINE UND AKUTE-PHASE-REAKTION.....	65
5.4 PROBANDEN.....	68
5.5 BEURTEILUNG DER LEISTUNGSPHYSIOLOGISCHEN PARAMETER	69
5.6 KREATINKINASE UND HARNSTOFF	71
5.7 METHODENKRITIK	73
6 Abkürzungen	74
7 Literaturverzeichnis.....	77

II Abbildungsverzeichnis

2.1	Sofortige Leukozytose.....	08
2.2	Verzögerte Leukozytose.....	11
3.1	Testablauf.....	21
3.2	Intervallbelastungsschema.....	22
3.3	Blutentnahmezeitpunkte.....	22
3.4	Verdünnungsreihe IL-4-Bestimmung.....	32
3.5	Untersuchungsablauf IL-6-Bestimmung.....	34
3.6	Untersuchungsablauf IL-10-Bestimmung.....	35
3.7	Punktvolke Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.....	39
3.8	Punktvolke Prämakrophagen.....	40
3.9	Punktvolke T-Zellen und T-Suppressorzellen.....	40
3.10	Punktvolke T-Helfer-Gedächtnis-Zellen.....	41
3.11	Punktvolke B-Zellen und aktivierte T-Helfer-Zellen.....	41
3.12	Punktvolke MHC-restringierte zytotoxische T-Zellen.....	42
3.13	Punktvolke NK-Zellen.....	43
3.14	Punktvolke oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten.....	43
3.15	Punktvolke NK-Test.....	44
4.1	Verlauf der Kreatinkinase- und Harnstoffkonzentration.....	48
4.2	Verlauf der Leukozytenkonzentration.....	49
4.3	Verlauf der Monozyten, Prämakrophagen, basophilen Granulozyten und B-Zellen.....	50
4.4	Verlauf der Lymphozyten, T-Zellen, T-Helferzellen, aktivierten T-Helferzellen, nicht MHC-restringierte T-Zellen und zytotoxische T-Zellen.....	51
4.5	Verlauf der natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten.....	52
4.6	Verlauf des oxidativen Bursts der neutrophilen Granulozyten.....	54
4.7	Verlauf der NK-Zell-Zytotoxizität.....	55
4.8	Verlauf der TNF- α -, Interleukin-4-, -6- und -10-Konzentration.....	57

III Tabellenverzeichnis

3.1	Anthropometrische Daten.....	18
3.2	Laborparameter.....	23
3.3	Verwendete Fluorochrome.....	25
3.4	Verwendete monoklonale Antikörper.....	26
3.5	Pipettierschema der Immunphäotypisierung.....	27
3.6	Inkubationsschema des oxidativen Bursts.....	28
3.7	Pipettierschema des NK-Tests.....	30
3.8	Detektionswellenlängen.....	37
3.9	Absorptionswellenlängen der Elisa-Tests.....	38
3.10	Untersuchte Zellsubpopulationen.....	44
4.1	Herzfrequenzen.....	47
4.2	Laktatwerte.....	47

1 Zusammenfassung

Bei Leistungssportlern werden gehäuft Infektionen der oberen Atemwege beobachtet, als deren Ursache belastungsbedingte immunsuppressive Effekte in der Nachbelastungsphase („Open Window“) diskutiert werden. Deshalb stellte sich die Frage, ob das „Open Window“ durch spezielle Maßnahmen so beeinflusst werden kann, dass die Immunsuppression geringer ausfällt oder sogar ganz ausbleibt. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass durch eine Kohlenhydratsubstitution während körperlicher Belastung eine Verkleinerung des „Open Window“ erreicht werden kann.

Um die Gestaltung der Nachbelastungsphase für Sportler unter immunologischen Gesichtspunkten zu optimieren, war es Ziel dieser Studie zu überprüfen, ob es durch eine aktive Erholung zu einer günstigen Beeinflussung des „Open Window“ kommt.

17 ausdauertrainierte Radfahrer und Triathleten (Alter 25 ± 5 Jahre; Gewicht 75 ± 7 kg; Größe 181 ± 5 cm; maximale Sauerstoffaufnahme 65 ± 7 ml/min/kg; individuelle anaerobe Schwelle: $3,7 \pm 0,5$ W/kg) absolvierten nach einem fahrradergometrischen Eingangstest an zwei verschiedenen Untersuchungstagen zwei hoch intensive Intervallbelastungen auf dem Fahrradergometer (Dauer: 23 Minuten, bestehend aus acht 2-Minuten Intervallen bei 116% der individuellen anaeroben Schwelle, unterbrochen durch sieben einminütige Entlastungsphasen bei 60% der individuellen anaeroben Schwelle) im Abstand von 2,5 Stunden, an die sich unmittelbar in randomisierter Reihenfolge die Intervention aktive Erholung (AE, 30 Minuten Ausfahren bei 60% der individuellen anaeroben Schwelle) beziehungsweise passive Erholung (PE, 30 Minuten Liegen) anschloss. Durchflusszytometrisch wurden die Konzentrationen der Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen zu zehn Zeitpunkten des Untersuchungstages und der oxidative Burst der neutrophilen Granulozyten zu sieben, sowie die Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen zu fünf Zeitpunkten bestimmt. Außerdem wurde Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-10, der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und C-reaktives

Protein bestimmt, um eine eventuelle Verschiebung im TH1/TH2-Zell-Muster und eine Akute-Phase-Reaktion aufzuzeigen.

Die Intervallbelastungen führten in beiden Untersuchungsregimen (AE, PE) zu einem vergleichbaren Anstieg der Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen. In der Nachbelastungsphase fielen die Leukozyten- und Lymphozytenpopulationen nach aktiver Erholung im Mittel langsamer ab, ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen aktiver und passiver Erholung bestand allerdings nur bei Leukozyten ($p < 0,004$ bzw. $p < 0,001$) und NK-Zellen ($p < 0,03$ bzw. $p < 0,001$) nach beiden Regenerationseinheiten des Tages, sowie nach der zweiten Erholung bei den neutrophilen Granulozyten ($p < 0,003$).

Die belastungsbedingte Abnahme des oxidativen Bursts der neutrophilen Granulozyten war bei aktiver und passiver Erholung gleich. Hingegen war die NK-Zell-Zytotoxizität bei einem Effektor-/Target-Zell-Verhältnis von 25:1 nach passiver Erholung signifikant niedriger als nach aktiver Erholung ($p < 0,015$).

Bis auf IL-6 verhielten sich die Zytokine IL-4, IL-10 und TNF- α sowie das CRP nicht unterschiedlich. Die Ursache der Erhöhung von IL-6 bei Belastung ist nicht als Ausdruck einer inflammatorischen Reaktion zu werten, sondern eher durch den bei Versorgung der Muskelzelle der Arbeitsmuskulatur im Rahmen der belastungsbedingten Glucoseverarmung der Myozyten induzierten IL-6-Anstieg erklärbar.

Schlussfolgernd kann angenommen werden, dass nach intensiver sportlicher Belastung durch eine aktive Erholung hinsichtlich der Zellkonzentrationen eine Verkleinerung des „Open Window“ bei den Leukozyten, hervorgerufen durch die neutrophilen Granulozyten und die NK-Zellen erzielt wird. Im Gegensatz zum durch aktive Erholung unbeeinflussten oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten scheint sich die aktive Erholung positiv auf die NK-Zell-Zytotoxizität auszuwirken. Die Ergebnisse zeigen, dass eine aktive Erholung als sinnvolle Maßnahme zur Infektprophylaxe bei Sportlern nach intensiven Belastungen empfohlen werden kann.

Summary

Infections of the upper respiratory system are often observed in competitive athletes, as origin thereof, stress related immune suppressive effect in the post workout phase ("open window") are discussed. Therefore the question arises, if the "Open window" can be influenced by special measures so that the immune suppression is reduced or even eliminated. For example, it could be shown that a reduction of the "Open window" could be achieved during physical stress through a carbohydrate substitute.

In order to optimize the post workout phase for athletes according to immunological viewpoints, it was the goal of this study to analyze if a positive influence of the "Open window" could be reached through active regeneration.

17 endurance trained cyclists and triathletes (Age 25 ± 5 years; Weight 75 ± 7 kg; Height 181 ± 5 cm; maximal oxygen absorption 65 ± 7 ml/min/kg; individual anaerobe threshold: $3,7 \pm 0,5$ W/kg) completed two highly intensive interval stresses on the bicycle ergometer after a bicycle ergometric initial test on two different test days (duration: 23 minutes, comprising eight 2-minute intervals at 116% of the individual anaerobic threshold, interrupted by seven one minute relaxation phases at 60% of the individual anaerobic threshold) in intervals of 2,5 hours, on which the intervention active regeneration (AR, 30 minutes roll out at 60% of the individual anaerobic threshold) respectively passive regeneration (PR, 30 minutes laying) followed in random order. Volumetric flow rates of the concentration of the leukocytes and lymphocyte population were measured at 10 different points in time during the testing day, the oxidative burst of the neutrophilic granulocytes seven times and the cytotoxicity of the natural killer cells was measured on five different occasions. Furthermore, Interleukin-4, Interleukin-6, Interleukin-10, the Tumor-Necrotic-Factor-alpha und C-reactive protein was determined, in order to show a possible displacement in the TH1/TH2-cell-pattern and an acute-phase-reaction.

The intermittent stress led to a comparable increase of the leukocytes and lymphocyte population in both test groups (AR, PR). In the post work out phase, the leukocytes and the lymphocyte population fell slowly on the average after

active regeneration, a significant concentration difference between active and passive regeneration was however only present in the leukocytes ($p < 0,004$ or $p < 0,001$) and NK-Cells ($p < 0,03$ or $p < 0,001$) after both regeneration phases of the day as well as after the second regeneration of the neutrophilic granulocytes ($p < 0,003$).

The stress related reduction of the oxidative burst of the neutrophilic granulocytes due to the stress related was the same in active and passive regeneration. In comparison, the NK-cell-cytotoxicity in an effector-/target-cell-relation of 25:1 after passive regeneration was significantly lower than after active regeneration ($p < 0,015$).

Apart from IL-6, the cytokines IL-4, IL-10 and TNF- α as well as CRP were not different. The cause of increase of IL-6 upon stress is not to be considered an indication of an inflammatory reaction, but rather explainable by an increase in IL-6 due to the glucose reduction of myocytes in the muscles cells of the working muscles.

Summarized, it can be assumed that after intensive physical strain, the "Open window" can be reduced through active regeneration concerning the cell concentration of the leukocytes, induced by the neutrophilic granulocytes and the NK-cells. In contrast to the oxidative burst of the neutrophilic granulocytes which are not influenced by active regeneration, active regeneration appears to positively influence the NK-cell-cytotoxicity. The results show that an active regeneration can be recommended to athletes as a useful measure of infection prophylaxis after intensive training.

2 Einleitung

Bei Leistungssportlern werden gehäuft Infektionen der oberen Atemwege beobachtet (FITZGERALD 1991, BRENNER et al. 1994, NIEMAN 1994, CALABRESE & NIEMAN 1996, PETERS 1996, DAVIS et al. 1997, SHEPHARD 2000), als deren Ursache belastungsbedingte immunsuppressive Effekte diskutiert werden (NIEMAN et al. 1990, CANNON 1993, BRENNER et al. 1994, HOFFMANN-GOETZ & PEDERSEN 1994, NIEMAN 1994, WEIDNER 1994, SHEPHARD & SHEK 1999, GABRIEL 2000, NIEMAN 2000). In verschiedenen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass die Abwehrleistung von Zellen des unspezifischen Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen) im Anschluss an intensive, repetitive oder lang andauernde Belastungen gemindert sein kann (PEDERSEN et al. 1988, GABRIEL et al. 1994, PYNE et al. 1996, NIEMAN et al. 1998). Diese in der Nachbelastungsphase beobachteten immunsuppressiven Effekte werden als „Open Window“ bezeichnet, wodurch die Entstehung von Infektionen begünstigt erscheint (DAVIS et al. 1997).

Basierend auf diesen Erkenntnissen stellt sich die Frage, ob und inwieweit die nach intensiven Belastungen auftretenden Reaktionen des Immunsystems durch Interventionsmaßnahmen beeinflusst werden können. So konnte gezeigt werden, dass eine Kohlenhydratsubstitution während Belastung durch Modulation des Cortisolspiegels den Anstieg von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie die Abnahme des oxidativen Bursts vermindert und so durch Reduktion der belastungsbedingten Stresssituation das „Open Window“ verkleinert (SCHARHAG et al. 2002, SCHARHAG et al. 2006). Außerdem wurde untersucht, ob eine Zufuhr von Vitaminen, zum Beispiel Vitamin C und E, die Immunantwort positiv beeinflusst. Bei Zufuhr von Antioxidantien konnte kein sicherer gewinnbringender Effekt für das Immunsystem im Anschluss an eine Belastung nachgewiesen werden (NIEMAN 2001, ROBSON et al. 2003). Auch die Optimierung von regenerativen Maßnahmen, wie beispielsweise eine aktive Erholung, die nach Wettkämpfen oder intensiven Belastungen im

Leistungssport in Form des „Auslaufens“ oder „Ausfahrens“ üblich sind, könnten das „Open Window“ positiv beeinflussen. WIGERNAES et al. berichteten, dass in der Nachbelastungsphase durch aktive Erholung eine Beschleunigung von metabolischen Erholungsvorgängen erfolgt und der Abfall von Zellen der unspezifischen Abwehr, hierbei insbesondere der Abfall der Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Monozyten), gemindert wird. Dies ist wahrscheinlich auf die langsamer abfallende AdrenalinKonzentration und länger erhöhte KortisolKonzentration bei aktiver Erholung zurückzuführen. Da der Abfall der Lymphozyten im Blut durch eine aktive Erholung ebenfalls verlangsamt war, vermuteten WIGERNAES et al., dass dadurch das „Open Window“ günstig beeinflusst wird (WIGERNAES et al. 2000, WIGERNAES et al. 2001).

Das Immunsystem reagiert auf Belastungen in spezifischer Weise, auf die in den folgenden Abschnitten gesondert eingegangen wird.

2.1 Belastungsleukozytose

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde bei körperlicher Belastung eine Zunahme der Leukozytenkonzentration im Blut beobachtet und als „Arbeitsleukozytose“ bezeichnet (SCHULZ 1893). Die immunologischen Veränderungen bei körperlicher Belastung von weniger als 1,5 bis 2 Stunden führen zu einem biphasischen Anstieg der Leukozytenkonzentration: eine sofortige Leukozytose während der Belastungsphase und eine verzögerte Leukozytose in der Nachbelastungsphase (GABRIEL & KINDERMANN 1997b). Bei Belastungen von mehr als 2 Stunden verschmelzen sofortige und verzögerte Leukozytose (SCHARHAG 2004).

2.1.1 Sofortige Leukozytose

Im Ruhezustand befinden sich etwa 50% der Immunzellen im Blutstrom, der Rest haftet mittels Adhäsionsmolekülen am Gefäßendothel, dem so genannten marginalen Pool (KLONZ et al. 1996). Sowohl bei aeroben als auch bei anaeroben Belastungen kommt es während Belastung durch das gesteigerte Herzzeitvolumen und die Freisetzung von Katecholaminen zu einem raschen Anstieg der Leukozyten im Blut (GABRIEL 2000). Das Herzzeitvolumen erhöht die Scherkräfte auf die am Endothel befestigten Zellen. Adrenalin führt zur Stimulation der Beta-2-Adenorezeptoren und somit zur Herabsetzung der Leukozytenadhäsionskräfte am Endothel (GADER & CASH 1974, VAN TITS et al. 1990).

Für die akute Lymphozytenmobilisation ist die Belastungsintensität ein wichtiger Parameter, da sie mit dem Ausmaß der Adrenalinausschüttung korreliert (GABRIEL 2000). Dabei ist die Mobilisation der Lymphozyten von der Beta-2-Adenorezeptordichte abhängig. Die natürlichen Killerzellen weisen deshalb den größten relativen Anstieg auf. In absteigender Reihe folgen zytotoxische T-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten und B-Zellen (VAN TITS et al. 1990). Anders verhält es sich mit den Monozyten und den neutrophilen Granulozyten. Für sie ist die Belastungsdauer der entscheidende Stimulus (GABRIEL 2000). Die neutrophilen Granulozyten sind aufgrund ihrer hohen Blutkonzentration etwa zur Hälfte am Leukozytenanstieg beteiligt. Wegen der geringeren Adrenalinsensitivität nimmt ihre Bedeutung an der sofortigen Belastungsleukozytose mit steigender Intensität ab (GABRIEL & KINDERMANN 1997b).

Bei Belastungen oberhalb der individuellen anaeroben Schwelle (IAS; STEGMANN et al. 1981) kommt es zu einer überproportionalen Ausschüttung von Katecholaminen und einem daraufhin übermäßigen Anstieg von adrenalinsensitiven Lymphozyten. Somit hat die IAS auch immunologisch eine besondere Bedeutung (GABRIEL et al. 1992b).

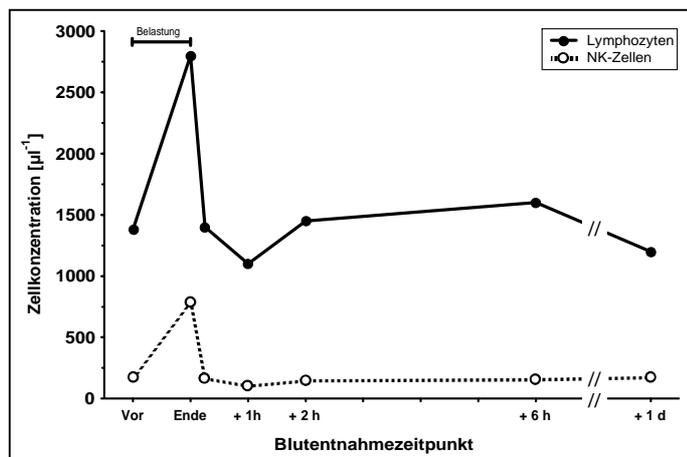


Abbildung 2.1: Lymphozyten- und NK-Zellkonzentrationsveränderung bei 30-minütiger Belastung mit 100% der IAS. Die Blutentnahmen fanden vor und nach der Belastung, 1, 2 und 6 Stunden nach Belastungsende sowie am Folgetag statt (SCHARHAG 2004).

Es kann aber nicht davon ausgegangen werden, dass eine Erhöhung der Zellkonzentration, und damit verbunden eine Erhöhung der gesamten Zellaktivität, auch mit einer Steigerung der Aktivität auf Einzelzellniveau gleichzusetzen ist. Der oxidative Burst von neutrophilen Granulozyten und Monozyten wird sogar durch Adrenalin supprimiert (BERCZI 1997). Vielmehr ist anzunehmen, dass die Zellen mit erhöhter Aktivität im Blut aus dem marginalen Pool rekrutiert und nicht durch die Belastung aktiviert wurden (GABRIEL & KINDERMANN 1998).

2.1.2 „Open Window“

Das Modell des „Open Window“ beschreibt den Nachbelastungszeitraum, in dem die immunologischen Abwehrmechanismen supprimiert sind (PEDERSEN et al. 1988). Dabei setzt durch den verminderten sympathischen Antrieb ein rascher Abfall von Herzfrequenz und Blutdruck ein. Die Adrenalin- und NoradrenalinKonzentrationen im Blut sinken wegen ihrer kurzen Halbwertszeit rasch ab (PORTA et al. 1985). Da beide hauptursächlichen Antriebskräfte der

sofortigen Leukozytose herabreguliert wurden, kommt es in der Nachbelastungsphase zu einem schnellen Leukozytenkonzentrationsabfall im Blut (GABRIEL et al. 1992a). Erstmals wurde 1988 von PEDERSEN et al. eine erniedrigte NK-Zell-Konzentration sowie eine verminderte NK-Zell-Zytotoxizität in den ersten 2 bis 6 Stunden nach Belastungsende beschrieben. Eine halbe Stunde nach Belastungsende können NK-Zellen, Monozyten und T-Lymphozyten das Ausgangsniveau wieder erreichen, meist ist es noch unterschritten. Die B-Zellen weisen eine etwas langsamere Kinetik auf (GABRIEL et al. 1991, GABRIEL et al. 1992b). Einen Konzentrationsabfall unter das Ausgangsniveau hinaus findet man insbesondere bei NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten. Dieses Phänomen zeigt sich vor allem bei intensiven Intervalleinheiten sowie bei intensiven und hoch intensiven Dauerbelastungen. Die immunologische Beeinflussung kann dabei für mehrere Stunden nach Belastung anhalten (PEDERSEN et al. 1988, GABRIEL & KINDERMANN 1997b, GABRIEL 2000). Wegen der beschriebenen immunsuppressiven Effekte im „Open Window“ wird ein erhöhtes Infektionsrisiko, vor allem der oberen Atemwege, vermutet (FITZGERALD 1991, BRENNER et al. 1994, NIEMAN 1994, CALABRESE & NIEMAN 1996, PETERS 1996, DAVIS et al. 1997, SHEPHARD 2000).

Eine positive Beeinflussung des „Open Window“ lässt sich möglicherweise einerseits durch aktive Erholung nach intensiven Belastungen (WIGERNEAS et al. 2000, WIGERNEAS et al. 2001) und zum anderen durch eine Kohlenhydratsubstitution während und nach längeren Belastungen erreichen (SCHARHAG et al. 2002, SCHARHAG et al. 2006).

2.1.3 Verzögerte Leukozytose

Bei körperlichen Belastungen unter 2 Stunden kommt es circa 30 Minuten bis eine Stunde nach Belastungsende zu einem erneuten Anstieg der Leukozyten im Blut. Die Konzentrationserhöhung kann über mehrere Stunden persistieren und erreicht ihr Maximum zwischen 2 bis 4 Stunden nach Belastungsende (GABRIEL et al. 1992b). Die Ausgangskonzentration an Leukozyten ist in der Regel nach 24 Stunden wieder erreicht (GABRIEL 2000).

Für die verzögerte Leukozytose ist fast ausschließlich der Anstieg der neutrophilen Granulozyten und nur im geringen Maß der von Monozyten verantwortlich. Diese verzögerte Wirkung wird durch die bei Belastung freigesetzten Hormone Adrenalin und Kortisol ausgelöst, wobei Kortisol den weitaus größeren Anteil stellt. Dies führt konzentrationsabhängig zum Anstieg der neutrophilen Granulozyten (SCHARHAG et al. 2005 und 2006). Man kann davon ausgehen, dass die in der Nachbelastungsphase im Blut befindlichen neutrophilen Granulozyten durch Kortisol frisch aus dem Knochenmark bei gleichzeitiger Verminderung der Gewebemigration mobilisiert wurden (BISHOP et al. 1968, GABRIEL 2000).

Im Gegensatz zur sofortigen Leukozytose ist für den Kortisolanstieg und die verzögerte Leukozytose die Belastungsdauer entscheidend, weniger die Intensität (GABRIEL 2000). Belastungsintensitäten im Bereich der IAS führen zu den höchsten Neutrophilenanstiegen in der Nachbelastungsphase, aber gleichzeitig wird der oxidative Burst der Zelle negativ beeinträchtigt (GABRIEL 2000). Dagegen führen einstündige Ausdauerbelastungen bei 80% der IAS zu einem geringeren Anstieg der Neutrophilen bei gleichzeitiger Stimulation der Neutrophilenfunktion (GABRIEL & KINDERMANN 1997b). Circa 24 Stunden nach Belastungsbeginn liegt in der Regel wieder die Ausgangskonzentration der neutrophilen Granulozyten im Blut vor (GABRIEL 2000).

Nach der Freisetzung der Neutrophilen ins Blut kann die Migration nur in das Gewebe und nicht zurück in das Knochenmark erfolgen. Über den genauen Verbleib der Granulozyten herrscht noch Unklarheit. In einer Studie von MALM aus dem Jahre 2001 wurde keine Migration von Leukozyten nach einer

körperlichen Belastung in den Skelettmuskel nachgewiesen. Andere Autoren fanden bei Untersuchungen nach Belastungen eine erhöhte Konzentration von Neutrophilen und Makrophagen in der Muskulatur und diskutierten, ob diese dort Reparaturprozesse am durch die hohe Belastung geschädigten Muskel durchführen (TIDBALL 1995, MACINTYRE et al. 1996).

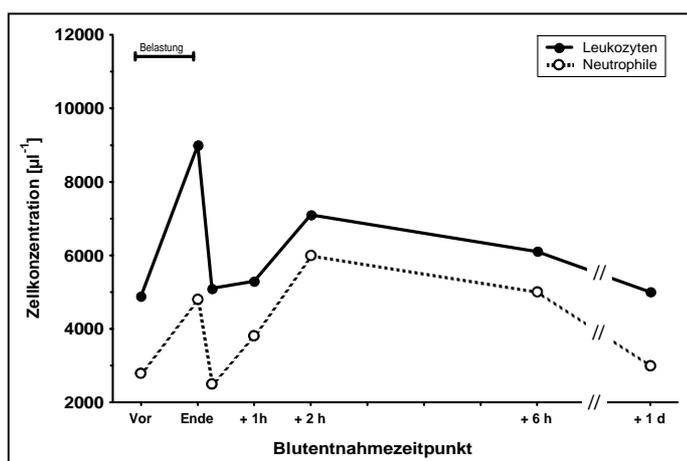


Abbildung 2.2: Leukozyten- und Neutrophilenkonzentrationsveränderung bei 30-minütiger Belastung mit 100% der IAS. Die Blutentnahmen fanden vor und nach der Belastung, 1, 2 und 6 Stunden nach Belastungsende sowie am Folgetag statt (SCHARHAG 2004).

2.2 Akute-Phase-Reaktion (APR)

Die Akute-Phase-Reaktion (APR) dient dem Schutz vor Gewebszerstörung bei Infektionen, Verletzungen und akuter körperlicher Belastung und leitet Abwehr- und Reparaturprozesse ein (GABRIEL et al. 2000). Bei einer lokalen Entzündungsreaktion werden pro- und anti-inflammatorische Zytokine, unter anderem IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α von den phagozytierenden Zellen, z. B. Makrophagen und Blutmonozyten, freigesetzt und führen als Botenstoffe dazu, dass der gesamte Organismus mit in die Entzündungsreaktion einbezogen wird (PEDERSEN 2000, STEENBERG et al. 2000). Beispielsweise wird durch IL-1,

IL-6 und TNF- α im Hypothalamus der Sollwert der Körpertemperatur angehoben, es werden vermehrt Leukozyten aus dem Knochenmark mobilisiert und in der Leber werden durch IL-6 Akute-Phase-Proteine produziert, wie das C-reaktive Protein (CRP). Dieses lässt sich wegen seiner guten diagnostischen Verwertbarkeit ausgezeichnet als Maß und Verlaufsparemeter der APR verwenden (GABRIEL et al. 2000).

Bereits Ende der sechziger Jahre wurde das Auftreten einer APR nach körperlicher Belastung beobachtet (HARALAMBIE 1969). Es gilt mittlerweile als gesichert, dass durch lange Ausdauerbelastungen eine APR angeregt wird, durch kurze konzentrische Ausdauerbelastungen hingegen nicht. Dabei reicht die muskuläre Beanspruchung offenbar nicht zur Aktivierung der APR aus. Anders verhält es sich bei anaeroben Intervallbelastungen. Diese führen zu CRP-Erhöhungen um das drei- bis zehnfache, einer Verdoppelung des Fibrinogens und einem Anstieg des Haptoglobins um zehn bis zwanzig Prozent (GABRIEL 2000). Außerdem kommt es zum Anstieg weiterer Akute-Phase-Proteine, wie α -1-Antitrypsin, α -2-Makroglobulin, α -1- und α -2-Glykoprotein, Coeruloplasmin und der Komplementfaktoren C3a und C4a (LIESEN et al. 1977, BERG et al. 1985, DUFAUX & ORDER 1985, TAYLOR et al. 1987, SMITH et al. 1990, WEIGHT et al. 1991, GABRIEL 2000, MEYER et al. 2001).

Um die APR im betroffenen Gewebe im Gleichgewicht zu halten, schütten Phagozyten, Endothelzellen und Fibroblasten verschiedene Zytokine aus. Entsprechend konnten in vielen Studien erhöhte Konzentrationen von IL-1, IL-6, TNF- α , Neopterin, löslichen IL-2-Rezeptoren sowie lösliches CD8 und lösliches CD23 bei Fahrrad-, Laufbelastungen und Triathlonwettbewerben nachgewiesen werden (CANNON & KLUGER 1983, CANNON et al. 1986, EVANS et al. 1986, DUFAUX & ORDER 1989, ESPERSON et al. 1990, CANNON et al. 1991, NORTHOFF & BERG 1991, SPENGER et al. 1992, NORTHOFF et al. 1994). Es hat sich aber gezeigt, dass die Zytokinerhöhung auch anderen Ursprungs sein kann. So fand PEDERSEN als Ursache einer IL-6-Erhöhung im Serum während körperlicher Belastung dessen Produktion im Muskel. IL-6 hilft, die Versorgung der Muskelzelle zu gewährleisten und die Homöostase im Muskel aufrecht zu halten. Dabei ist der IL-6-Anstieg hauptsächlich auf einen

belastungsbedingten Abfall des Blutzuckerspiegels zurückzuführen (PEDERSEN et al. 2001, FEBBRAIO & PEDERSEN 2002, PEDERSEN et al. 2003, PEDERSEN et al. 2004, SCHARHAG et al. 2005).

Andererseits führen die Zytokine systemisch unter anderem zu einem Kortisolanstieg, der zusammen mit den anti-inflammatorisch wirkenden IL-1ra, IL-4, IL-10 und löslichen TNF- α -Rezeptoren zur Abschwächung der Immunantwort führt (RICHARDS & GAULDIE 1995, OSTROWSKI et al. 1999, PEDERSEN 2000). Diese Eigenschaft ist aber als erwünscht zu betrachten, da sie einer überschießenden Immunreaktion entgegenwirkt.

2.3 Aktive Erholung

Es wird angenommen, dass nach intensiven Belastungen durch eine darauf unmittelbar folgende leichte dynamische Belastung die Regenerationsvorgänge im beanspruchten Muskel beschleunigt werden können. Als Erklärung dient eine vermehrte Durchblutung des Muskels und damit verbunden eine Beschleunigung der restitutiven Prozesse. In verschiedenen Studien konnten durch leichte konzentrische Beanspruchung in zuvor durch erschöpfende Belastung intensiv beanspruchten Muskelgruppen eine schnellere Laktatbeseitigung festgestellt werden (HERMANSEN & STENSVOLD 1972, MCLELLAND & SKINNER 1982, DODD et al. 1984, BANGSBO et al. 1994, FALK et al. 1995, GUPTA et al. 1996).

Im Vergleich zwischen aktiver und passiver Erholung konnte nach aktiver Erholung ein schnellerer Abfall der Kreatinkinase (CK) im Blut gezeigt werden (DONELLY et al. 1992), die nach erschöpfenden Belastungen als Indikator des entstandenen Muskelschadens ansteigt (ARMSTRONG 1984, NOAKES 1987, KUIPERS 1994). Es ist aber noch unklar, ob es durch aktive Erholung auch tatsächlich zu einer schnelleren Regeneration des Muskels, beziehungsweise Reparatur des Muskelschadens, kommt (SAXTON & DONELLY 1995).

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass das Immunsystem bei der Einleitung von Abwehr- und Reparaturprozessen eine Schlüsselrolle einnimmt.

Die Annahme, aktive Erholung könne nicht nur die Kinetik von Kreatinkinase und Laktat, sondern auch die Abwehrleistung des unspezifischen Immunsystems sowie zelluläre Reparaturprozesse der Akute-Phase-Reaktion günstig beeinflussen, liegt nahe. Jedoch sind die Auswirkungen von aktiver Erholung auf das Immunsystem bisher noch unzureichend untersucht.

In zwei norwegischen Studien wurde zum einen der Einfluss von aktiver Erholung auf die Leukozytenkonzentration im peripheren Blut nach hoher und moderater Belastungsintensität untersucht (WIGERNAES et al. 2000), zum anderen hat man den Einfluss von hoch intensiven Belastungen auf die Konzentration von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im peripheren Blut überprüft (WIGERNEAS et al 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass durch aktive Erholung der rasche Abfall und das Ausmaß des Abfalls der Leukozyten, der neutrophilen Granulozyten und der Monozyten in der direkten Nachbelastungsphase vermindert wurde. Die Lymphozyten fielen nur tendenziell in der Nachbelastungsphase geringer ab. Außerdem war der Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung nach intensiveren Belastungen größer als nach weniger intensiven Belastungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch aktive Erholung die Zellkonzentration beeinflusst wird. Jedoch wurde in den Studien die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen nur mittels eines Cell-Counters durchgeführt, sodass weitere Aussagen zum Verhalten von Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen nicht möglich sind. Es wäre eine durchflusszytometrische Bestimmung zur weiteren Analyse der Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen (Prämakrophagen, natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten, T-Helfer-Lymphozyten, T-Supressor-Lymphozyten) sowie der Funktionsfähigkeit einzelner Zellpopulationen (oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten, NK-Zell-Zytotoxizität) wünschenswert, um weitere Aussagen zur Beeinflussung des „Open Window“ durch aktive Erholung treffen zu können.

In beiden Studien wurden fixe Prozentsätze der $VO_2\text{max}$ zur Festlegung der Belastungsintensität gewählt. Diese Vorgehensweise führt zu interindividuellen Unterschieden in der Belastungsintensität. Die Bestimmung der $VO_2\text{max}$ hängt vom gewählten Belastungsprotokoll, der Art der Belastung, dem Ernährungs-

und Trainingszustand sowie vom Grad der Ausbelastung ab (GABRIEL 2000). Mit der IAS (STEGMANN et al. 1981) als Berechnungsbasis der Belastungsintensität sind präzisere Leistungsvorgaben möglich (MEYER et al. 1999), um für jeden Probanden und somit auch dessen Immunsystem, eine gleich intensive Beanspruchung zu erhalten.

Darüber hinaus hat die Betrachtung der Immunreaktion nach Belastungswiederholungen und deren Beeinflussbarkeit durch aktive Erholung praxisrelevante Bedeutung, da zu bestimmten Trainingszeitpunkten intensive Belastungen in kurzen zeitlichen Abständen durchgeführt werden müssen (z. B. Intervalltraining, an einem Tag mehrere Trainingseinheiten, wie z. B. im Trainingslager). Aus zu hohen Belastungsintensitäten bzw. unzureichender Regeneration können Überlastungs- und Übertrainingszustände resultieren (KUIPERS & KEIZER 1988, LEHMANN et al. 1993, URHAUSEN et al. 1995), die mit einer verminderten Abwehrleistung des unspezifischen Immunsystems einhergehen (GABRIEL 2000) und gehäuft Infektionen verursachen können (FITZGERALD 1991).

Wegen der oben aufgezeigten Defizite erscheint es sinnvoll, eine neue Untersuchung der akuten Immunreaktion nach intensiven, trainingsähnlichen Belastungen und deren Beeinflussung durch aktive Erholung, durchzuführen.

Ziel dieser Studie ist es, wissenschaftlich fundierte Hinweise für eine optimale Form der Erholung im Anschluss nach wiederholten Intervallbelastungen zu erhalten und deren Auswirkung auf das Immunsystem zu beschreiben, um konkrete Empfehlungen für Trainer und Athleten ableiten zu können, damit krankheitsbedingte Ausfallzeiten reduziert werden.

2.4 Hypothesen

Nach intensiven Intervallbelastungen führt eine aktive Erholung im Vergleich zu einer passiven Erholung in der Nachbelastungsphase

1. zu einem geringeren Abfall der Leukozyten- und Lymphozyten-subpopulationen
und
2. zu einer geringeren Beeinträchtigung der Zellfunktion (Zielparameter: Oxidativer Burst, NK-Zell-Zytotoxizität).

Dies würde eine günstige Beeinflussung des „Open Window“ durch aktive Erholung belegen.

3. Die APR wird durch aktive Erholung günstig moduliert (Zielparameter: IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und CRP).

3 Material und Methoden

Die experimentelle Untersuchung wurde am Institut für Sport- und Präventivmedizin der Universität des Saarlandes durchgeführt. Der Zeitraum der Datenerfassung erstreckte sich über zwei Jahre.

3.1 Probanden

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie waren ein unauffälliger Gesundheitsstatus bei der Eingangsuntersuchung (siehe Kapitel 3.2.1) und die Vollendung des 18. Lebensjahres. Zusätzlich mussten die Probanden einen Eingangstest (siehe Kapitel 3.2.2) absolvieren und eine Leistungsfähigkeit von mindestens 3 W pro kg an der IAS aufweisen.

Es wurden im Untersuchungszeitraum 22 sehr gut ausdauertrainierte männliche Radfahrer und Triathleten getestet, wovon 19 die Aufnahmekriterien erfüllten. Krankheitsbedingt konnten zwei der Probanden den zweiten Teil des Tests nicht im geforderten Testzeitraum von 14 Tagen absolvieren, sodass 17 Athleten in die Studie aufgenommen wurden. Die anthropometrischen Daten der Teilnehmer sind aus Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die Testpersonen wurden zu Beginn der Studie, die durch das Bundesinstitut für Sportwissenschaften genehmigt wurde (Forschungsnummer: VF 0407/01/10/2002-2003), über Verlauf und Zielsetzung unterrichtet und gaben ihr mündliches Einverständnis zur Studienteilnahme.

Parameter	Mittelwert und Standardabweichung
Alter [Jahre]	25 ± 4,8
Gewicht [kg]	75 ± 7
Größe [cm]	182 ± 5
Körperfett [%]	11,2 ± 2,5
VO ₂ max [ml · min ⁻¹ · kg ⁻¹]	65 ± 7
Herzfrequenz max [Hz]	190 ± 9
Herzfrequenz IAS [Hz]	163 ± 10
Laktat max [mmol · l ⁻¹]	10,7 ± 1,4
Laktat IAS [mmol · l ⁻¹]	2,9 ± 0,6
Leistung max [W]	385 ± 36
Leistung IAS [W]	271 ± 32
Leistung relativ [W · kg ⁻¹]	3,7 ± 0,5
116% IAS [W]	315 ± 37
60% IAS [W]	163 ± 19

Tabelle 3.1: Anthropometrische Daten und Leistungsparameter im fahrradergometrischen Stufentest (n=17).

3.2 Allgemeiner Untersuchungsablauf

3.2.1 Eingangsuntersuchung

Vor Beginn der fahrradergometrischen Belastung erfolgte bei den Sportlern eine umfassende körperliche Untersuchung, um akute und chronische Erkrankungen, eventuelle gesundheitliche Risiken und Kontraindikationen auszuschließen. Das Untersuchungsprotokoll beinhaltete:

1. Anamnese
2. Trainingsanamnese
3. Erfassung anthropometrischer Daten und des Körperfettanteils
4. Körperliche Untersuchung

5. Routinelaboruntersuchung (Blutsenkungsgeschwindigkeit, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten-, Thrombozytenkonzentration, GOT, GPT, γ GT, Kreatinkinase, Harnstoff, Kreatinin, Harnsäure, Cholesterin, HDL-C, Triglyceride, Glucose, CRP)
6. Ruhe-EKG (Ableitungen: V1 bis V6, I, II, III, aVR, aVL, aVF, aV_{R3}, aV_{R4})
7. Blutdruckmessung nach Riva Rocci

3.2.2 Eingangstest

Der Eingangstest wurde sitzend auf einem elektrisch gebremsten Fahrradergometer (Excalibur Supersport, Lode, Groningen, Niederlande) durchgeführt. Die stufenförmig ansteigende Belastung begann bei 100 W und wurde alle 3 Minuten um 50 W gesteigert. Der Eingangstest endete bei Erschöpfung der Probanden. Ein Belastungs-EKG wurde durch das Anlegen eines EKG-Gurtes mit sechs Brustwandelektroden abgeleitet. Von den letzten 15 Sekunden jeder Stufe wurde das EKG mitgeschrieben, aus dem am Ende des Tests die Herzfrequenz ermittelt wurde. Der Blutdruck wurde nach Riva Rocci jeweils in der zweiten Minute einer Stufe bis einschließlich 250 W gemessen. Vor Belastung, 10 Sekunden vor Ende jeder Stufe, bei Belastungsabbruch und nach 1, 3, 5, 7 und 10 Minuten der Nachbelastungsphase wurden mittels Glaskapillaren aus dem hyperämisierten Ohrläppchen des Athleten 20 μ l Kapillarblut zur Laktatbestimmung entnommen. Die Messung der Laktatkonzentration erfolgte enzymatisch (SuperGL, R. Greiner BioChemica). Anhand der Laktatkinetik konnte die individuelle anaerobe Schwelle (IAS) nach STEGMANN et al. bestimmt werden.

Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) wurde nach SWAIN & WRIGHT (1997) mit der Formel $VO_{2max} = 700 + 11 \times \text{Watt}$ der maximalen Leistung berechnet.

3.2.3 Studiendesign

Die geeigneten Probanden wurden innerhalb von drei bis fünf Tagen nach dem Eingangstest zum ersten Testtag einbestellt. Der zweite Testtag, der sich nur durch das Erholungsregime (aktive oder passive Erholung) vom Ersten unterschied, musste anschließend innerhalb von zwei Wochen absolviert werden. Die Festlegung der Erholungsform erfolgte durch Randomisierung stratifiziert nach der Leistung an der IAS in Watt pro Kilogramm Körpergewicht. Die Untersuchungen begannen zwischen 7.45 Uhr und 8.30 Uhr und endeten zwischen 13.45 Uhr und 14.30 Uhr. Einen Tag später mussten die Probanden noch einmal zwischen 7.45 Uhr und 8.30 Uhr zur abschließenden Blutentnahme erscheinen.

Pro Termin wurden zwei identische Intervallbelastungen mit einem Abstand von 3 Stunden durchgeführt (siehe Abbildung 3.1). Während der Intervallbelastung war es den Athleten nicht gestattet zu trinken. Außerdem wurden die Probanden angehalten, an beiden Testtagen dieselben Nahrungsmittel zu sich nehmen. Nach beiden Belastungen durfte kein weiteres Training bis zum Folgetag durchgeführt werden. Die Athleten durften zwei Tage vor den Tests lediglich ein lockeres regeneratives Grundlagenausdauertraining ohne intensive Einheiten absolvieren. Die Dauer des Trainings sollte 2 Stunden nicht überschreiten.

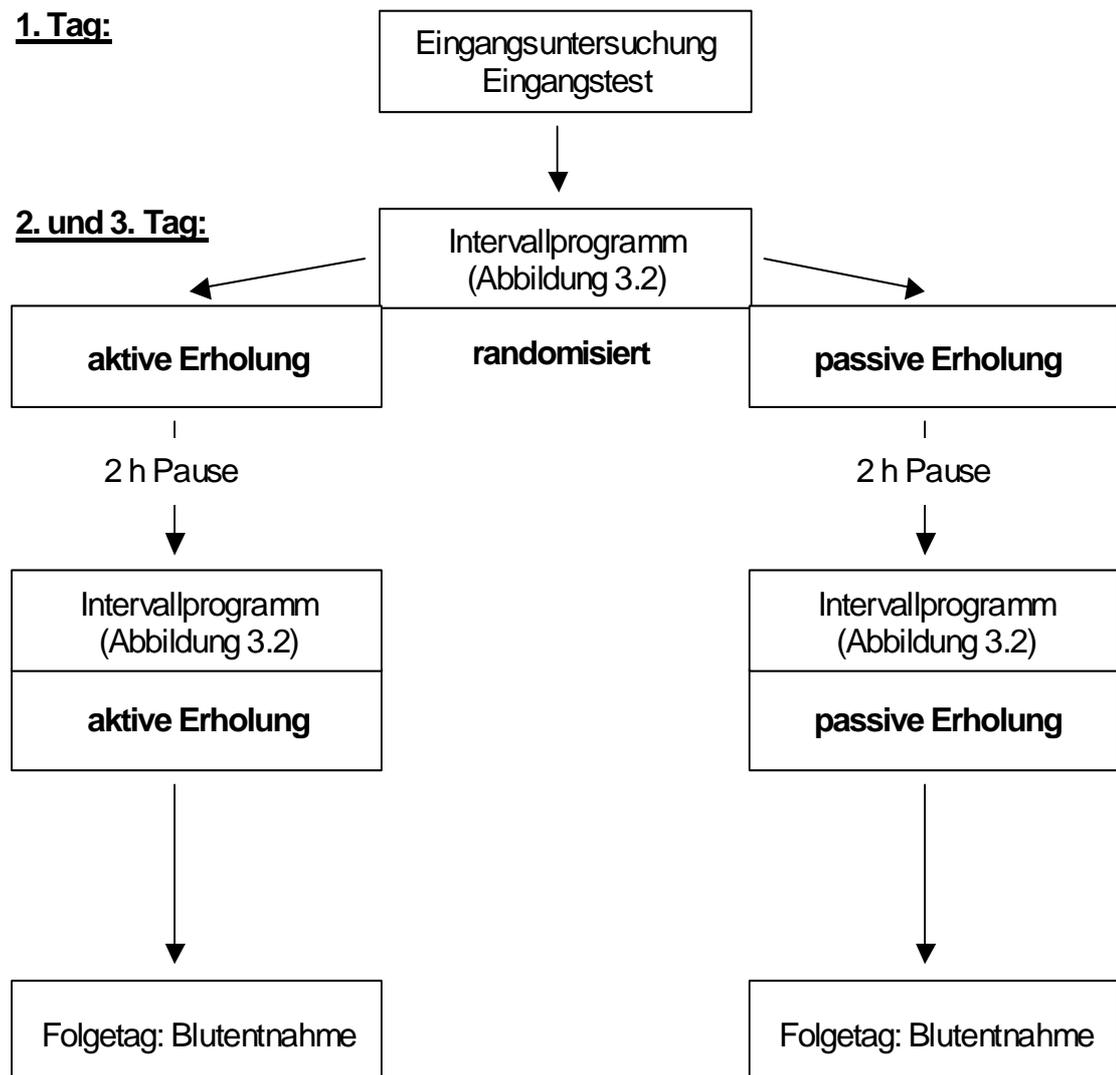


Abbildung 3.1: Testablauf

Der Test begann mit einem fünfminütigen Einfahren mit 60% der IAS. Danach folgte acht mal eine zweiminütige Belastung mit der Intensität von 116% der IAS, die durch einminütige Erholungsphasen bei 60% der IAS unterbrochen wurden. Unmittelbar daran schloss sich in randomisierter Reihenfolge entweder die Intervention passive Erholung, als 30 Minuten Ausruhen auf einer Liege, oder die aktive Erholung, als 30 Minuten Radfahren auf dem Ergometer mit 60% der IAS, an. Die Herzfrequenz wurde mit einem Sporttester der Firma Polar registriert. Zur Kontrolle der Belastungsintensität wurde dem Probanden

zu verschiedenen Zeitpunkten Kapillarblut zur Laktatbestimmung abgenommen (siehe Abbildung 3.2).

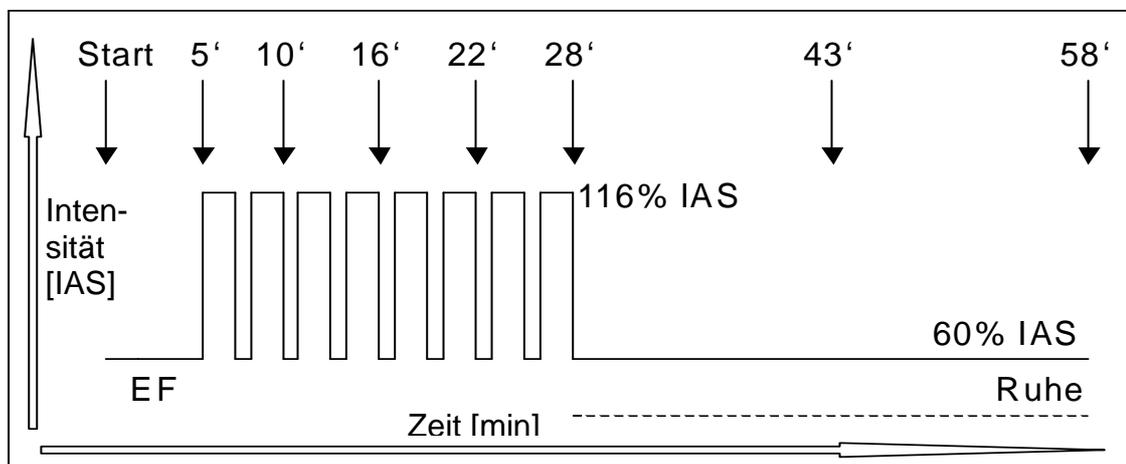


Abbildung 3.2: Schema der Intervall- und Nachbelastung. Zuerst 5 Minuten Einfahren (EF). Anschließend acht mal 2 Minuten Intervallbelastungen bei 116% IAS mit einer Minute Entlastung bei 60% IAS. Es folgt aktive Erholung (durchgezogene Linie) bei 60% IAS oder passive Erholung (gestrichelte Linie) in Ruhe. Die Laktatentnahmezeitpunkte in Minuten sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zur Bestimmung der laborchemischen und immunologischen Parameter wurde jedem Teilnehmer zu zehn verschiedenen Messzeitpunkten Blut mittels einer vorher platzierten Venenverweilkanüle entnommen (siehe Abbildung 3.3).

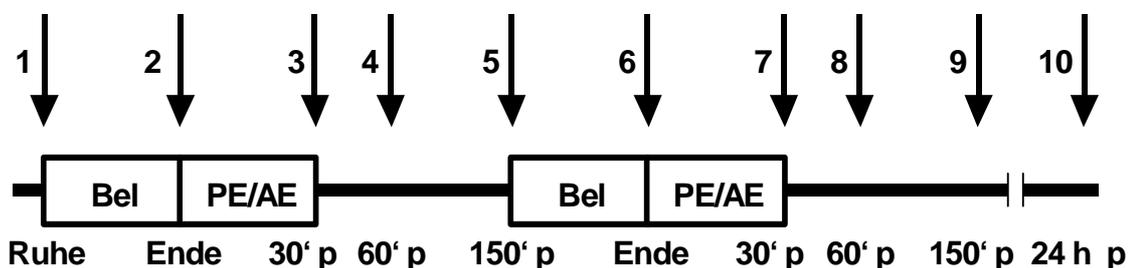


Abbildung 3.3: Blutentnahmezeitpunkte (Bel = Belastung, PE = Passive Erholung, AE = Aktive Erholung, 30' p = 30 Minuten nach Belastungsende).

3.3 Labor

In Tabelle 3.2 werden alle Parameter aufgeführt, die am jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt bestimmt wurden (vergleiche Abbildung 3.3). Auf die Bestimmungsverfahren wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Blutentnahme	EDTA	Li-Heparin	Serum
1	Immunphänotypisierung, Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hk), Leukozyten	Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen (NK-Test), oxidativer Burst neutrophiler Granulozyten (Ox. Burst)	Interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), C-reaktives Protein (CRP), Kreatinkinase (CK), Harnstoff (HS)
2	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst	
3	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst, NK-Test	
4	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten		
5	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst, NK-Test	
6	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst	
7	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst, NK-Test	
8	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten		
9	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst	IL-6, IL-10, TNF- α
10	Immunphänotypisierung, Hb, Hk, Leukozyten	Ox. Burst, NK-Test	IL-4, CRP, CK, HS

Tabelle 3.2: Laborparameter, mit Zuordnung zu den Bestimmungszeitpunkten und die erforderlichen Entnahmetuben (vergleiche Abbildung 3.3). EDTA = Ethylendiamintetraacetat, Li-Heparin = Lithium-Heparin

3.3.1 Blutbild und Klinische Chemie

Die Hämoglobin-, Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration sowie der Hämatokrit wurden innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme mittels Zellzähler (CellCounter, Sysmex Microcell-Counter, K-1000, TOA Medical Electronics Company, Japan) gemessen. Die serologische Konzentrationsbestimmung von GOT, GPT, γ GT, Kreatinkinase, Harnstoff, Harnsäure, Cholesterin, HDL-C, Triglyceride, Glucose und C-reaktivem Protein erfolgte nach Trennung des Serums aus dem Gesamtblut durch Zentrifugation mit dem Beckman Synchron CX 5 delta (Beckman Coulter, Heidelberg).

3.3.2 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflußzytometrie werden die Zellen, während sie hintereinander durch eine dünne Messkammer (Flow Cell) fließen, von einem Laserlicht angestrahlt. Dabei verursachen die Zellen, die den Laserstrahl kreuzen, Streulicht. Je größer die Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren enthalten sind, desto größer ist die Lichtbrechung. An zwei Stellen wird das Streulicht gemessen. Die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) gibt Auskunft über die Größe der Teilchen. Die Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SSC) ermöglicht Aussagen über die Zusammensetzung der Zellen, der Granularität und der Membranfaltung.

Die zweite optische Eigenschaft, die gemessen werden kann, ist das Fluoreszenzlicht. Dafür werden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper (MAK) gegen den zu detektierenden Rezeptor der Zelle markiert. Dieser Antikörper trägt zusätzlich eine fluoreszierende Gruppe, die aufleuchtet, wenn sie von einem Licht- oder Laserstrahl getroffen wird. Zur Unterscheidung mehrerer Zellen bei einer Messung stehen verschiedene Fluorochrome mit einem einheitlichen Absorptionsspektrum, aber unterschiedlichen Emissionsspektren zur Verfügung. Die in dieser Studie verwendeten

Fluorochrome sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Durch die unterschiedliche Fluoreszenz wird die Zelltypisierung vorgenommen.

Fluorochrome	Absorption [nm]	Emission [nm]	Fluoreszenz
FITC	495	525	FL 1: grün
R-PE	488, 565	578	FL 2: orange-rot
R-PE-Cy-5	488, 565,652	674	FL 3: tief-rot
Rhodamin 123	488	540	FL 1: grün
SNARF-1/AM	488	575-595	FL 2: orange

Tabelle 3.3: Verwendete Fluorochrome mit Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie deren jeweilige Fluoreszenz. FL 1-3: Fluoreszenz 1-3; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; R-PE: R-Phycoerythrin; R-PE-Cy-5: R-Phycoerythrin-Cyanin-5; SNARF-1/AM: Carboxy-Semi-Naphto-Rhoda-Fluor-1-Acetoxy-Ester.

3.3.3 Immunphänotypisierung

Um bei der Immunphänotypisierung die verschiedenen Zellpopulationen zu unterscheiden, verwendet man markierte monoklonale Antikörper. Der MAK bindet an ein entsprechendes Antigen der Zelloberfläche und identifiziert auf diese Weise unterschiedliche Oberflächenstrukturen, die für eine Zellpopulation typisch sind. Die entstandenen Gruppen wurden in der CD-Nomenklatur (Cluster of differentiation) zusammengefasst und werden durch die Human-Leukocyte-Differentiation-Antigens-(HLDA)-Konferenz ständig erweitert. Mit Hilfe der CD-Nomenklatur lassen sich durch Verwendung von MAK-Kombinationen Zellpopulationen unterscheiden. Die folgende Tabelle zeigt alle in der Studie angewendeten MAK.

MAK	Fluoro- chrome	Antigenexprimierende Zellen	Funktion
CD3	R-PE-Cy5	T-Zellen, Thymozyten	Assoziiert mit dem T-Zellantigen-Rezeptor, Signaltransduktion
CD4	FITC	T-Helfer-Zellen, Monozyten, Thymozyten, Makrophagen	Co-Rezeptor für MHC-Klasse-II, Signaltransduktion
CD8	R-PE, FITC	T-Suppressor-Zellen	Co-Rezeptor für MHC-Klasse-I, Signaltransduktion
CD14	R-PE	Monozyten	Rezeptor für Lipopolysaccharid-Komplex und Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
CD16	FITC	Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen	Fc γ RIII; vermittelt Phagozytose und antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität;
CD19	R-PE	B-Zellen	Corezeptor für B-Zellen; Aktivierung
CD30	R-PE	Aktivierte B- und T-Zellen	Rezeptor aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren; Apoptose
CD45	FITC	Alle hämatopoetischen Zellen	Tyrosinphosphatase; Regulation der Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen
CD45RO	R-PE	T-Helfer-Gedächtniszellen	Isoform von CD45
CD56	R-PE	NK- Zellen	Adhäsionsmolekül
HLA-DR	R-PE-Cy5	Aktivierte T-Helfer-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen	Präsentation von pathogenen Antigenen dem T-Zell-Rezeptor

Tabelle 3.4: Verwendete MAK in CD-Nomenklatur und die jeweils zugehörigen Fluorochrome, sowie Zellen, die das Antigen exprimieren und ihre Funktion in der Immunologie (JANEWAY & TRAVERS 1997; MUTA et al. 2000). CD: Cluster of differentiation; FITC: Fluoresceinisothiocyanat; Fc γ RIII: niedrigaffiner Fc-Rezeptor; MAK: monoklonale Antikörper; MHC: Major Histocompatibility Complex; R-PE: R-Phycoerythrin; R-PE-Cy5: R-Phycoerythrin-Cyanin-5.

Die Analyse der Blutproben erfolgte innerhalb von 2 Stunden nach der Blutentnahme. Hierzu wurden die MAK nach dem in Tabelle 3.5 abgebildetem Pipettierschema in die Reagenzgläser pipettiert, gefolgt von jeweils 20 μ l EDTA-Vollblut. Nach einer Inkubationszeit von 15 bis 20 Minuten wurden die Erythrozyten mittels 1 ml einer Lysing-Solution (Ammoniumchlorid, <5% Diethylenglycol, <1,5% Formaldehyd, von Becton Dickinson, Heidelberg) 7 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die Proben bei 1200 U/min unter Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Der

Überstand des Zentrifugats wurde dekantiert. Nach Resuspension der verbleibenden Zellen mit 2 ml einer Waschlösung (CellWash, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde nochmals unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Proben wurden bis zur Messung, die innerhalb von 2 Stunden nach Beendigung des Aufbereitungsvorganges durchgeführt wurde, im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

RG	FITC (FL1)	µl	R-PE (FL2)	µl	R-PE-Cy5 (FL3)	µl
1	CD 16	10	CD 14	10	---	
2	CD 4	10	CD 8	10	CD 3	10
3	CD 4	10	CD 30	10	CD 3	10
4	CD 8	10	CD 30	10	CD 3	10
5	CD 4	10	CD 19	10	HLA-DR	10
6	CD 4	10	CD 45RO	10	---	
7	CD 16	10	CD 56	10	CD 3	10
8	CD 45/14	10	---		---	
9	CD 16	10	CD 14	10	CD 3	10

Tabelle 3.5: Pipettierschema der Immunphänotypisierung

3.3.4 Oxidativer Burst

Während des oxidativen Bursts der neutrophilen Granulozyten wird durch membrangebundene NADPH-Oxidase, mit dem Zwischenschritt über Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid gebildet. Dieses inaktiviert in einer myeloperoxidase-katalysierten Reaktion phagozytierte Mikroorganismen (GABRIEL 2000).

Zur Bestimmung des intrazellulären oxidativen Bursts nach Rothe (ROTHER et al. 1994) wird den Zellen (Monozyten und Granulozyten) nicht fluoreszierendes Dihydrorhodamin 123 (DHR) zugegeben. Dieses wird in der Zelle wie pathogene Keime in einer peroxidase-katalysierten Reaktion oxidiert. Dabei entsteht grünfluoreszierendes Rhodamin 123, dessen mittlere Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer gemessen wird. Zeichen einer Voraktivierung der Zellen lassen sich mit Hilfe von schwachen Reizauslösern

wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) und fMLP (formyliertes 1-Methionyl-1-Leucyl-1-Phenylalanin) nachweisen.

Die Untersuchung der Proben erfolgte innerhalb von 60 Minuten nach der Blutentnahme. Zur Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten wurde eine Dichtegradientensedimentation durchgeführt. 3 ml Li-Heparin-Blut ($10 \text{ IU} \times \text{ml}^{-1} \text{ Na}^+$ Heparin) wurden auf 3 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgeschichtet. Die Probe wurde für 50 Minuten ohne Zentrifugation bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Anschließend wurden 800 μl des leukozytenreichen Überstands abpipettiert.

In der Zwischenzeit wurden vier Gefäße mit jeweils 5 μl Glucose und 995 μl Phosphatpuffer (PBS, Gibco, Auckland Neuseeland) gefüllt und im Wasserbad konstant auf 37°C gehalten. In alle Gefäße wurden dann jeweils 10 μl SNARF-1/AM (0,01 mM Carboxy-Semi-Naphto-Rhoda-Fluor-1-Acetoxy-Methyl-Ester), 10 μl DHR (0,02 mM) und 50 μl des hergestellten Leukozytenkonzentrats hinzugegeben. Das nicht fluoreszierende SNARF-1/AM erleichtert die Identifizierung der nicht oxidativ wirkenden, toten Zellen bei der Analyse, da es in den lebenden Leukozyten in orangefluoreszierendes SNARF-1 gespalten wird. 5 Minuten nach Zugabe der Leukozyten wurde in Gefäß 2 und 4 je 10 μl TNF (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurden in Gefäß 3 und 4 je 10 μl fMLP (0,01 mM) hinzupipettiert. Das Gefäß 1 diente als Negativkontrolle und wurde ohne Stimuli inkubiert.

Zeit (min)	Gefäß 1 Negativkontrolle	Gefäß 2 TNF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Gefäß 3 fMLP 0,01 mM	Gefäß 4 TNF + fMLP
-10	+995 μl PBS + 5 μl Glucose			
Wasserbad				
0	+10 μl DHR +10 μl SNARF +50 μl Zellsuspension			
5	---	+10 μl TNF	---	+10 μl TNF
10	---	---	+10 μl fMLP	+10 μl fMLP
25	auf Eis	auf Eis	auf Eis	auf Eis

Tabelle 3.6: Inkubationsschema des oxidativen Bursts

Alle Gefäße wurden nach insgesamt 25 Minuten aus dem Wasserbad entnommen und sofort auf Eis gestellt und in einem abgedunkelten Raum gelagert, um die Reaktion zu beenden. Da die Proben nur für 90 Minuten stabil sind, erfolgte die durchflusszytometrische Messung sofort im Anschluss.

3.3.5 Zytotoxische Aktivität natürlicher Killerzellen

Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität natürlicher Killerzellen wurde der NKTEST® (Orpegen Pharma, Heidelberg) verwendet. Das Testkit enthält kryokonservierte vorgefärbte K562 Target-Zellen, Komplettmedium und DNA-Färbelösung.

Das Vorbereiten und Durchführen der Tests fand in der Sterilbank statt. Die Reagenzgläser wurden stets verschlossen gehalten und Flaconröhrchen mit Schraubverschluss benutzt.

12 Stunden vor Testbeginn wurde das Wasserbad im Inkubator (37°C, 5% CO₂) aufgefüllt und das Komplettmedium aufgewärmt.

Die 4,5 ml Li-Heparin-Blut (10 IU x ml⁻¹ Na⁺ Heparin) wurden spätestens 30 Minuten nach Entnahme beim Probanden im Labor weiterverarbeitet. Zuerst wurde das Li-Heparin-Blut in einem 15-ml-Flaconröhrchen mit 4,5 ml PBS verdünnt. In einem zweiten Flaconröhrchen wurde das verdünnte Blut auf 5 ml Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgeschichtet. Zur Auftrennung der verschiedenen Blutbestandteile wurden die zwei Phasen für 20 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Um Turbulenzen beim Bremsen zu vermeiden, wurde die Bremse ausgeschaltet.

Nach Auftrennung des Blutes wurde die mononukleäre Zellschicht aus der Interphase vorsichtig mit einer Einwegpipette entnommen und in ein 15-ml-Flaconröhrchen gegeben (ca. 2 ml). Zum Waschen der Zellen wurde bis auf 14 ml mit PBS aufgefüllt und vorsichtig durchmischt. Zum Lösen der Zellen aus der Flüssigkeit wurde mit 1200 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die Bremse war eingeschaltet, wurde aber ab 300 Umdrehungen abgeschaltet. Der Überstand wurde dekantiert und 700 µl Komplettmedium zum verbliebenen Zellpellet

resuspendiert. Die Zellzahl wurde im Cell-Counter bestimmt und mit Kompletmedium auf eine Konzentration von circa 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zum Auftauen der Target-Zellen wurde in ein 50-ml-Flaconröhrchen das vorgewärmte Kompletmedium gegeben. Die im Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrten kryokonservierten K562 Target-Zellen und das IL-2 wurden entnommen und für 60 Sekunden im Wasserbad aufgetaut. Die Target-Zellsuspension wurde danach sofort in das Flaconröhrchen mit dem Nährmedium gegeben. Die Zellen und das Medium wurden gut gemischt und dann für 5 Minuten bei 800 U/min mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet 1 ml Kompletmedium hinzugegeben. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellkonzentration mit Kompletmedium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Testansätze wurden nach dem Schema in Tabelle 3.7 in 5-ml-Probenröhrchen pipettiert.

Verhältnis E : T	Kontrolle	Kontrolle	50:1	25:1	IL 50:1	IL 25:1
Kompletmedium	100 μl	100 μl	---	50 μl	---	50 μl
Effektorzellen	---	---	100 μl	50 μl	100 μl	50 μl
Interleukin 2	---	---	---	---	20 μl	20 μl
Target-Zellen	100 μl					

Tabelle 3.7: Pipettierschema des NK-Tests

Alle Röhrchen wurden kurz mittels MS1 Minishaker (IKA, Hamburg) durchmischt und anschließend für 3 Minuten bei 800 U/min zentrifugiert. Danach kamen sie für exakt 3 Stunden ins Wasserbad des Inkubators.

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Reagenzgläser direkt in Eiswasser gestellt und dunkel gelagert. Unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung wurden zur Unterscheidung von toten und lebenden Target-Zellen 50 μl DNA-Färbelösung mit einem lipophilen grünfluoreszenten Membranfarbstoff je Probe zugegeben. Die Proben wurden gemischt und 5 Minuten im lichtgeschützten Eiswasserbad inkubiert. Da die Proben danach nur für 30 Minuten stabil sind, wurden sie innerhalb von 15 Minuten im Durchflusszytometer gemessen. Durch den DNA-Farbstoff, der spezifisch die

Kerne von membrangeschädigten Target-Zellen anfärbt, kann der Anteil an Target-Zellen, die durch NK-Zellen abgetötet wurden, erfasst werden.

3.3.6 ELISA Tests

Das für die ELISA Tests benötigte Serum wurde direkt nach der Blutentnahme abzentrifugiert und im Gefrierschrank bei -80°C bis zur Messung gelagert.

Die Bestimmung von IL-4, IL-6, IL-10 und TNF- α wurde nach Gewinnung aller Proben vor Abschluss der Studie durchgeführt.

3.3.6.1 IL-4-Bestimmung

Zur Bestimmung des IL-4 wurde das Testkit Quantikine® HS, Human IL-4 der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) verwendet. Dieser Test basiert auf der quantitativen Sandwich Enzyme Immunoassay Technik.

Als Erstes wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. Dann wurden die Reagenzien vorbereitet.

1. Waschlösung: 100 ml Waschlösungskonzentrat in 400 ml destilliertes Wasser;
2. Substratlösung: 10 Minuten vor dem Gebrauch Zugabe von 6 ml Substratverdünnungsmittel zum Substrat;
3. Verstärkerlösung: 10 Minuten vor dem Gebrauch Zugabe von 6 ml Verstärkerverdünnungsmittel zum Verstärker;
4. Vorratslösung: Zugabe von 5 ml Kalibraterverdünnung zum IL-4 Standard;

- Standardlösungen: 500 μL Kalibratervedünnung in jedes Reagenzglas; mit der Vorratslösung wird eine Verdünnungsreihe von sechs Schritten, um die verschiedenen Vergleichskonzentrationen herzustellen, angelegt. 500 μL Vorratslösung werden ins Reagenzglas 1 hinzupipettiert, nach dem Durchmischen werden aus dieser Lösung erneut 500 μL entnommen und dem nächsten Reagenzglas hinzugefügt. Dieser Vorgang erfolgt bis zur Fertigstellung der Verdünnungsreihe (siehe Abbildung 3.4).

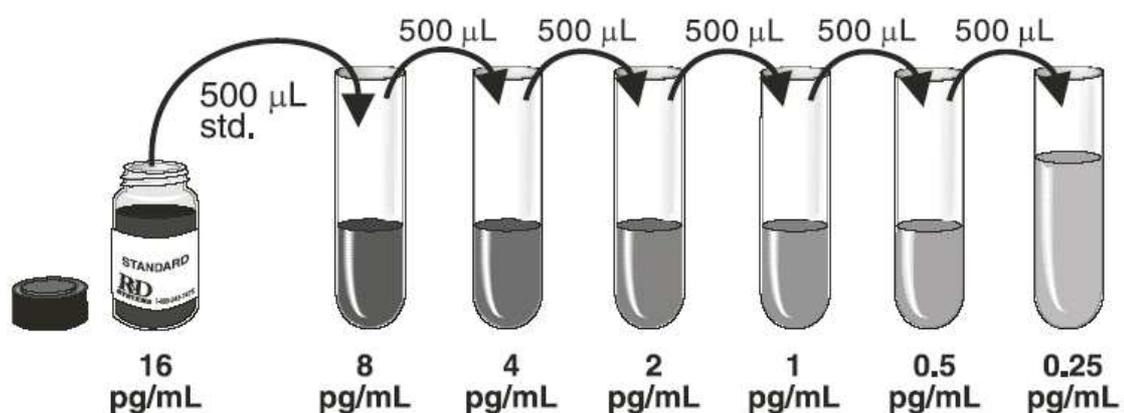


Abbildung 3.4: Verdünnungsreihe der Standardlösungen (R&D Systems)

In der ELISA-Platte sind kleine Vertiefungen (Wells) eingelassen, die am Boden mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-4 beschichtet sind. Zuerst wurden 50 μL Probenverdünnung HD1-6, ein Proteinpuffer, in jedes Well der Platte pipettiert. Anschließend wurden in die Wells der ersten Spalte der Untersuchungsplatte je 200 μL der Standardlösungen in zunehmender Konzentration hineinpipettiert. Vom Probandenserum wurden dann je 200 μL in die weiteren freien Wells gegeben. Nach Aufkleben einer Schutzfolie mussten die Proben für 3 Stunden bei Raumtemperatur und in Dunkelheit auf dem MS1 Minishaker mit 500 U/min inkubiert werden. Nachdem die flüssige Phase von jedem Well durch eine Pipette entfernt wurde, erfolgten vier Waschschriffe. Bei einem Waschschriff wurden 400 μL Waschpuffer je Well zugegeben und anschließend dekantiert. Um jegliche Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Untersuchungsplatte auf

trockenen, sauberen Tüchern fünf mal vorsichtig aufgeschlagen. Nach dem Waschvorgang wurde in jedes Well 200 µl IL-4-Konjugat, ein polyklonaler Antikörper gegen IL-4, pipettiert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit, unter den gleichen Bedingungen wie oben, wurden erneut vier Waschvorgänge durchgeführt. Nachdem 50 µl Substrat-Lösung mit NADPH in jedes Well hinzugegeben wurden, mussten die Reagenzien nochmals für eine Stunde bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubieren. Die jetzt zugefügte Verstärkerlösung, die INT-violet und Verstärkerenzyme enthält, wurde für 30 Minuten unter gleichen Bedingungen wie oben inkubiert. Bei diesem Schritt färbte sich je nach Konzentration der Interleukine das Well an. Hohe Konzentrationen von IL-4 ergeben eine kräftigere Färbung als geringere Interleukinkonzentrationen. Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl einer Stopplösung in jedes Well hinzugegeben, um die Reaktion zu beenden. Innerhalb von 10 Minuten mussten die Konzentrationen von IL-4 bestimmt werden, um keine verfälschten Werte zu erhalten.

3.3.6.2 IL-6-Bestimmung

Die Bestimmung von IL-6 wurde mit dem Testkit Quantikine® HS, Human IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Da das Vorgehen, wie bei der IL-4 Bestimmung, nur mit anderen Reagenzien und veränderten Konzentrationen erfolgt, ist hier lediglich eine schematische Zusammenfassung des Untersuchungsablaufes dargestellt.

1. Pipettieren von 100 µl Probenverdünnung RD1-75 in jedes Well



2. Pipettieren von 100 µl Standardverdünnungsreihe oder Serum in jedes Well. Inkubation für 2 Stunden (bei Raumtemperatur im Dunkeln auf dem MS1 Minishaker bei 500 U/min)



3. Sechs Waschvorgänge

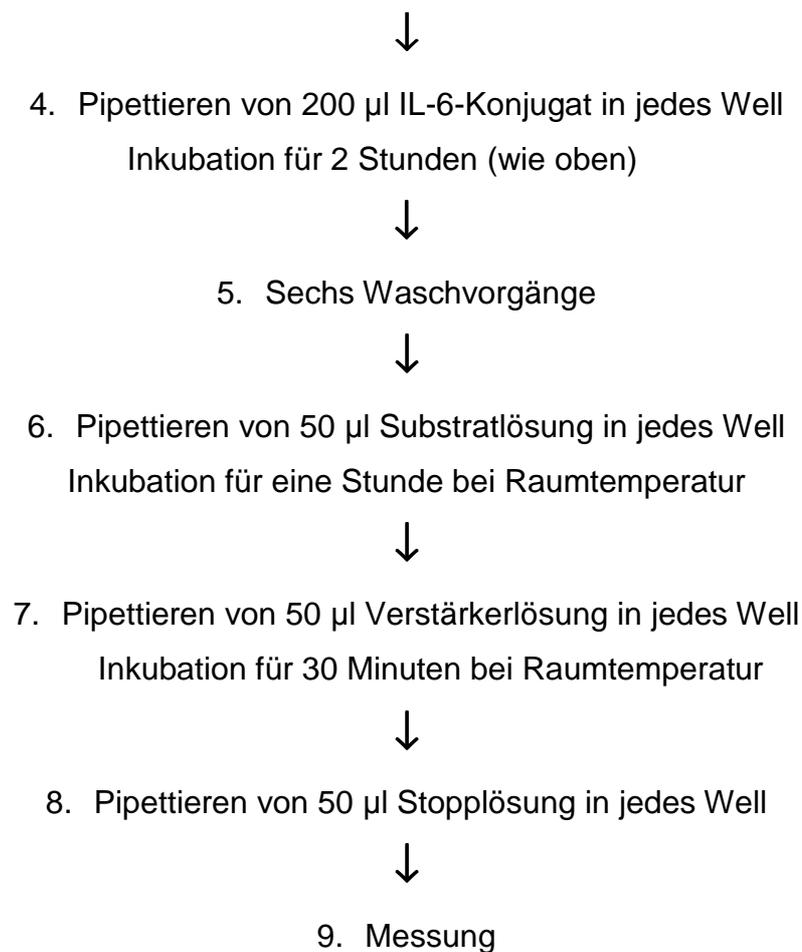


Abbildung 3.5: Untersuchungsablauf IL-6-Bestimmung

3.3.6.3 IL-10-Bestimmung

Die IL-10-Bestimmung wurde mit dem Testkit Quantikine® HS, Human IL-10 (R&D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Dieser Test basiert ebenfalls auf der quantitativen Sandwich Enzyme Immunoassay Technik. Der Testablauf entspricht dem von IL-4 und IL-6, nur mit anderen Reagenzien und veränderten Konzentrationen. Deshalb erfolgt eine schematische Zusammenfassung des Untersuchungsablaufes.

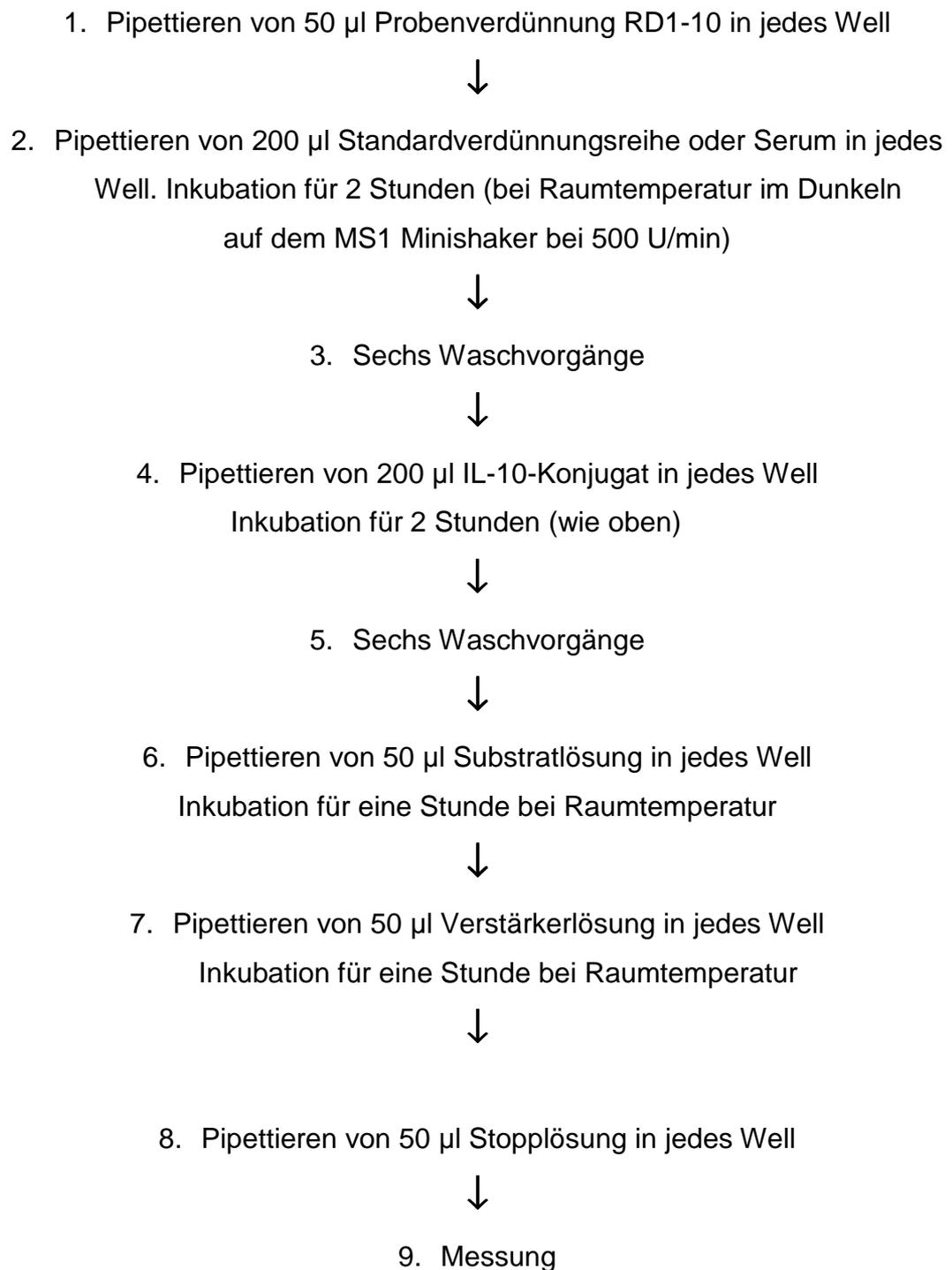


Abbildung 3.6: Untersuchungsablauf IL-10-Bestimmung

3.3.6.4 TNF- α -Bestimmung

Die Bestimmung von TNF- α wurde mit dem Testkit Biosource TNF- α EASIA, der Firma BioSource Europe S.A. (Nivelles, Belgien) durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Solid Phase Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay (EASIA) Technik.

Als Erstes wurden die Reagenzien vorbereitet, dazu mussten sie auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Die Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

1. Standard-0-Lösung: Die Menge des destillierten Wassers, das hinzugegeben werden muss, geht aus dem Etikett des Fläschchens hervor.
2. Standardlösungen 1-5: je 2 ml destilliertes Wasser in jedes Fläschchen;
3. Kontrolllösung: je 2 ml destilliertes Wasser in jedes Fläschchen;
4. Konjugatlösung: 1/11 Anti-TNF- α -HRP-Lösung in 10/11 Konjugatpuffer;
5. Waschlösung: 2 ml Waschlösungskonzentrat auf je 400 ml destilliertes Wasser;
6. Chromogenlösung: 0,2 ml Chromogenkonzentrat in ein Fläschchen Substrat Puffer (21ml); erst kurz vor dem Gebrauch vorbereiten.

Auf der verwendeten Untersuchungsplatte waren in den vorhandenen Vertiefungen (Wells) monoklonale Antikörper gegen TNF- α am Boden aufgebracht. Zuerst wurden 50 μ l Inkubationspuffer in jedes Well pipettiert. Anschließend wurden in die Wells der ersten Spalte je 200 μ l der Standardlösungen in aufsteigender Konzentration und Kontrolllösung hineingegeben. In die restlichen Wells wurden je 200 μ l Serum der Probanden hineinpipettiert. Nach dem Abkleben mit Folie wurde die Platte für 2 Stunden auf dem MS1 Minishaker bei 700 U/min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die flüssige Phase von jedem Well abpipettiert und drei Waschvorgänge durchgeführt. Jeder Vorgang bestand aus Zugabe von 0,4 ml Waschlösung pro Well und anschließender Aspiration. Danach wurden 100 μ l Standard-0-Lösung und 50 μ l TNF- α -Konjugatlösung je Well zugegeben. Nach erneutem Abkleben

wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei den vorherigen Proben für 2 Stunden inkubiert. Nach Aspiration der überstehenden Flüssigkeit wurden wieder drei Waschvorgänge durchgeführt. Nun wurden 200 µl der unmittelbar vorher angefertigten Chromogenlösung innerhalb von 15 Minuten in jedes Well pipettiert. Die Untersuchungsplatte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln auf einem Horizontalshaker bei 700 U/min inkubiert. Nach einer halben Stunde wurden 50 µl Stopplösung in jedes Well hineingegeben. Anschließend wurden die Proben innerhalb von 3 Stunden gemessen.

3.4 Datenerfassung

Die Erfassung der Gesamtleukozytenzahl, der Hämoglobinkonzentration und des Hämatokrits erfolgte mittels eines automatischen Zellzählgerätes (Sysmex Microcell-Counter, K-1000, TOA Medical Electronics Company, Japan).

Die Konzentrationsbestimmung von Kreatinkinase, Harnstoff, GOT, GPT, γGT, Kreatinin, Harnsäure, Cholesterin, HDL-C, Triglyceride, Glucose und dem C-reaktiven Protein wurde mit dem Beckman Synchron CX 5 delta (Beckman Coulter, Heidelberg) durchgeführt.

Zur Laktatbestimmung stand der Super GL der Firma Rolf Kreiner zur Verfügung.

Alle durchflusszytometrischen Daten wurden mit dem Coulter Epics XL (Beckman Coulter, Heidelberg) erfasst. Die verwendeten Detektionswellenlängen sind der Tabelle 3.8 zu entnehmen.

Test	FL-1 [nm]	FL-2 [nm]	FL-3 [nm]
Immunphänotypisierung	591	521	689
Oxidativer Burst	450	450	400
NK-Test	350	285	380

Tabelle 3.8: Detektionswellenlängen der drei Photomultiplier Tubes (PMT). FL-1-3: Fluoreszenz 1-3; FL-1: FITC (Fluoresceinisothiocyanat); FL-2: (R-Phycoerythrin); FL-3: PE-Cy5 (R-Phycoerythrin-Cyanin-5)

Mit Hilfe der Expo32 MultiComp Software (Beckman Coulter, Heidelberg) war es möglich, die Messungen in Echtzeit zu verfolgen. Die Daten wurden in Dotplots dargestellt. So hätten Fehler in Messungen frühzeitig festgestellt und bei Bedarf der immunologische Test wiederholt werden können. Dies war zweimal bei der Immunphänotypisierung erforderlich, da vergessen wurde, ein MAK ins Untersuchungsröhrchen zu pipettieren.

Beim NK-Test wurden 5000 Zellen, beim Oxidativen Burst 10000 Zellen und bei der Immunphänotypisierung 15000 Zellen gezählt.

Die Erfassung der durch ELISA-Tests ermittelten Konzentrationen wurden mit dem Spectra Mini (Tecan, Crailsheim) durchgeführt.

Test	Absorptionsspektrum [nm]
IL-4, IL-6, IL-10	490
TNF- α	450 und 490

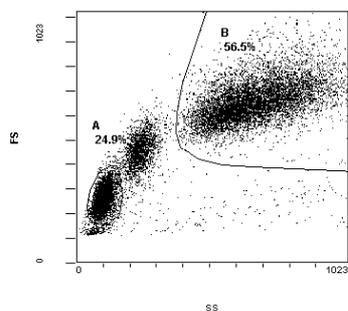
Tabelle 3.9: Absorptionswellenlängen der ELISA-Tests

3.5 Datenanalyse

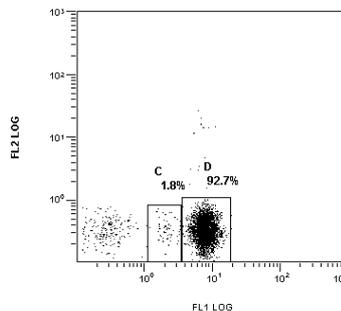
Die Analyse der durchflusszytometrisch erfassten Listendaten wurde mit der Expo32 Analysis Software (Version 1.2, Beckman Coulter, Heidelberg) durchgeführt.

In den folgenden Abbildungen werden die verwendeten Gates zur Bestimmung der unterschiedlichen Zellpopulationen aufgezeigt.

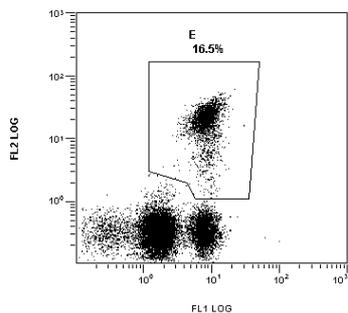
CD 45/14: Hauptsubpopulationen



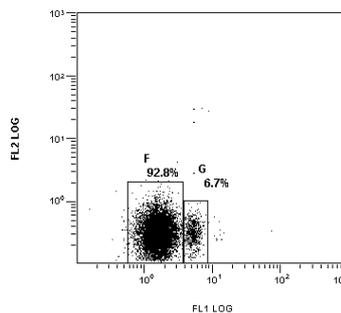
a) Lymphozyten-Gate (A)
Granulozyten-Gate (B)



b) Gate: A; Basophile (C)
und Lymphozyten (D)



c) Gate: keines; Monozyten
(E)



d) Gate: B; Neutrophile (F)
und Eosinophile (G)

Abbildung 3.7: Punktwolken zur Ermittlung der prozentualen Anteile von Basophilen (C), Lymphozyten (D), Monozyten (E), Neutrophilen (F) und Eosinophilen (G).

CD 16/14: Monozyten und Prämakrophagen

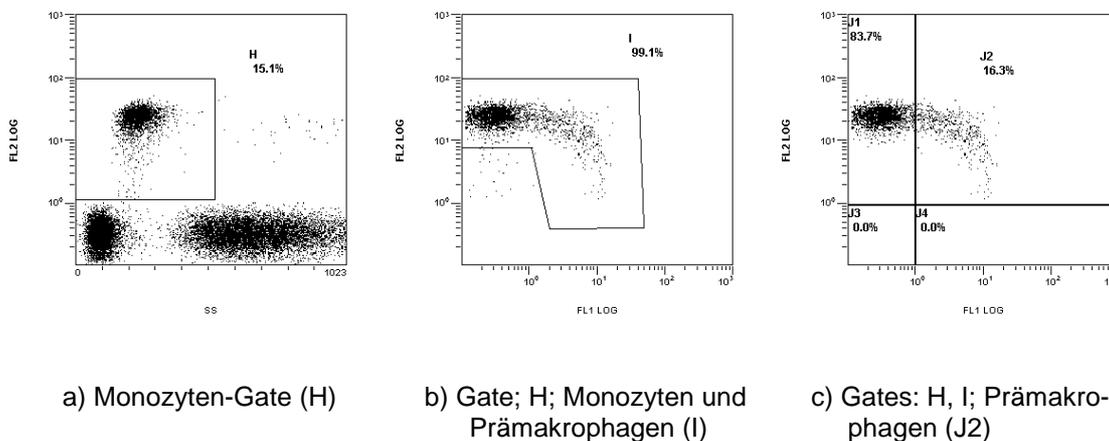


Abbildung 3.8: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von Prämakrophagen (J2).

CD 4/8/3: T-Zellen

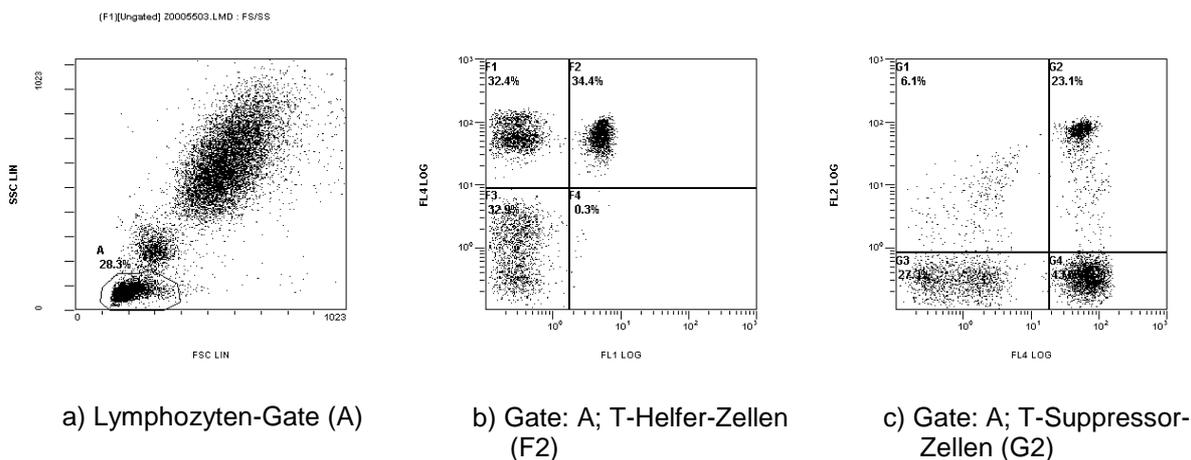
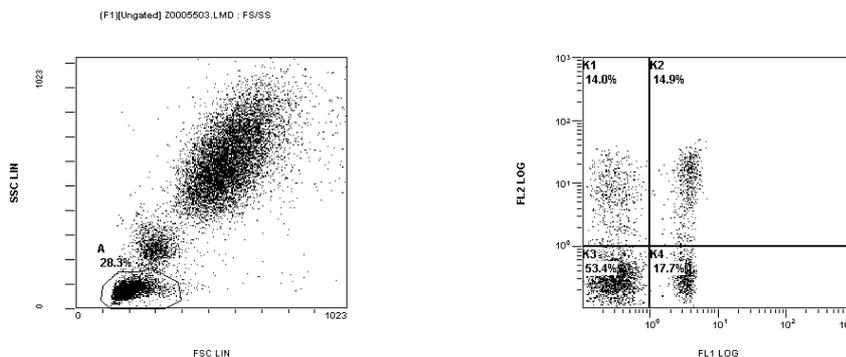


Abbildung 3.9: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von T-Helferzellen (F2) und T-Suppressorzellen (G2).

CD 4/45RO: T-Helfer-Gedächtnis-Zellen

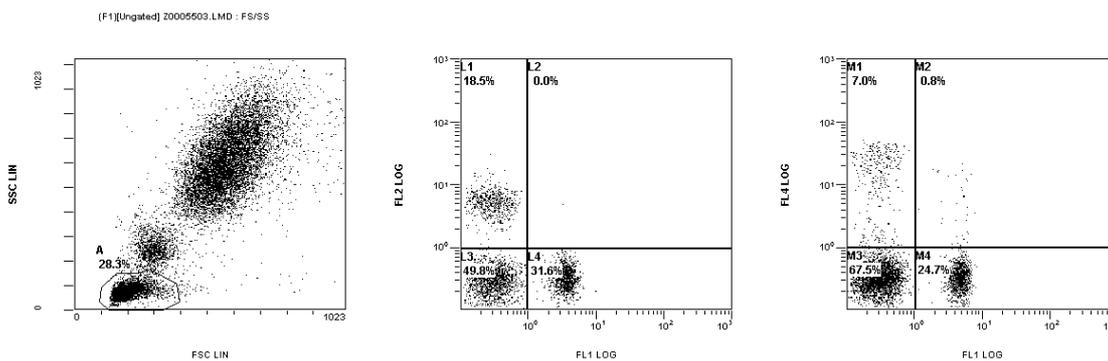


a) Lymphozyten-Gate (A)

b) Gate: A; aktive T-Helfer-Gedächtnis-Zellen (K2)

Abbildung 3.10 Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von T-Helfer-Gedächtnis-Zellen ((K2/K2+K4)/100).

CD 4/19/HLA-DR: B-Zellen und aktivierte T-Helferzellen



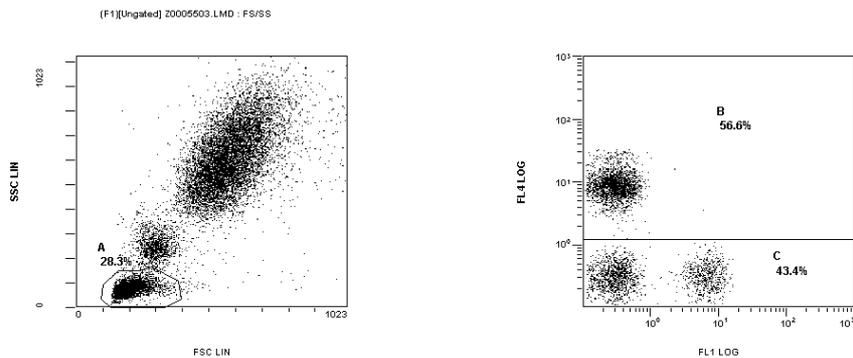
a) Lymphozyten-Gate (A)

b) Gate: A; B-Zellen (L1)

b) Gate: A; aktivierte T-Helferzellen (M2)

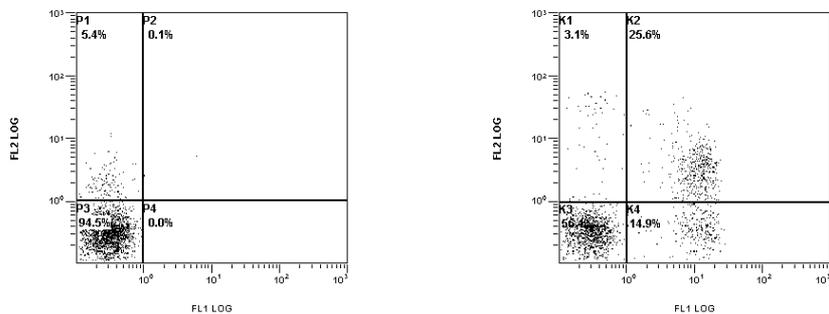
Abbildung 3.11: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von aktivierten T-Helferzellen ((M2/M2+M4)/100) und B-Zellen (L1).

CD 3/16/56: nicht MHC-restringierte T-Suppressorzellen und NK-Zellen



a) Lymphozyten-Gate (A)

b) Gate: A; CD3⁺- (B) und CD3⁻Zellen ©



c) Gates: A und B; nicht MHC-restringierte zytotoxische-T-Zellen (P3)

d) Gates: A und C; NK-Zellen (K3)

Abbildung 3.12: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von MHC-restringierten zytotoxischen-T-Zellen (P3 * B) und NK-Zellen (K3 * C).

CD 16/14/3: NK-Zellen für NK-Test

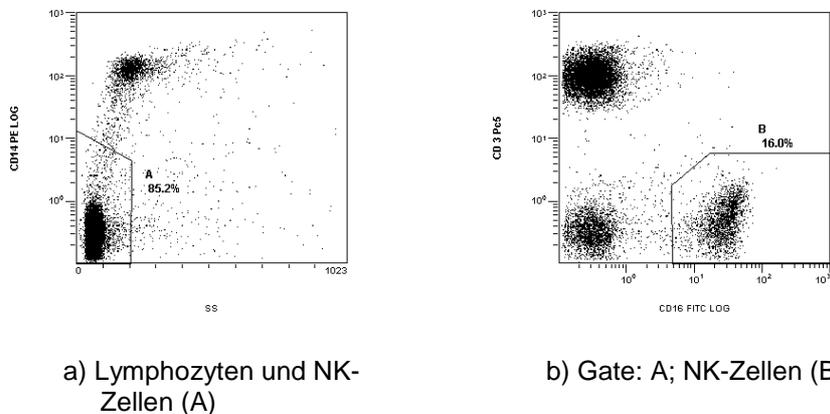


Abbildung 3.13: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteils von NK-Zellen (B).

Oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten

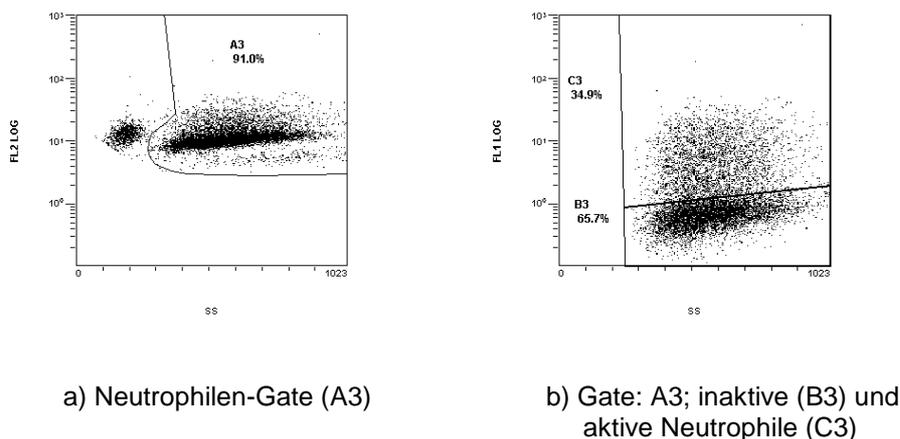
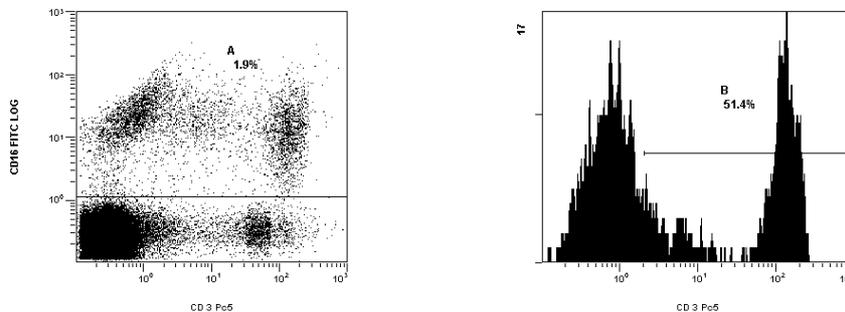


Abbildung 3.14: Punktwolken zur Ermittlung des oxidativen Bursts der neutrophilen Granulozyten. Gate A3: Neutrophile Granulozyten. B3 zeigt die inaktiven und C3 die aktiven neutrophilen Granulozyten.

NK-Test



a) Target-Zellen-Gate (A)

b) Gate: A; getötete Target-Zellen (B)

Abbildung 3.15: Punktwolken zur Ermittlung des prozentualen Anteiles von abgetöteten Target-Zellen (B) im NK-Test.

3.6 Zusammenfassung der untersuchten Zellsubpopulationen

Zellen	Monoklonale Antikörper
CD45/14	Leukozytensubpopulationen: Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten
CD14 ⁺	Gesamte Monozyten
CD14 ⁺ /16 ⁻	Reguläre Monozyten
CD14 ⁺ /16 ⁺	Prämakrophagen
CD3 ⁺ /4 ⁺	T-Helferzellen
CD3 ⁺ /8 ⁺	T-Suppressorzellen
CD4 ⁺ /45RO ⁺	T-Helfer-Gedächtnis-Zellen
CD3 ⁺ /4 ⁺ /HLA-DR ⁺	Aktivierte T-Helferzellen
CD4 ⁻ /19 ⁺	B-Zellen
CD3 ⁺ /16 ⁺ /56 ⁺	Nicht MHC-restringierte T-Zellen
CD3 ⁻ /16 ⁺ /56 ⁺	NK-Zellen
CD16 ⁺ /14 ⁻ /3 ⁻	NK-Zellen für NK-Test

Tabelle 3.10: Untersuchte Zellsubpopulationen

3.7 Plasmavolumenkorrektur

Um die absolute Zellzahl der einzelnen Subpopulationen feststellen zu können, muss aufgrund des Plasmavolumenverlustes und der Plasmavolumenverschiebung der Probanden während und nach der Belastung eine Plasmavolumenkorrektur durchgeführt werden (DILL & COSTILL 1974). Diese wird wie folgt berechnet:

$$PVK = Hb1/Hb2 \times (100 - Hk2) / (100 - Hk1)$$

Hb1 = Hämoglobin vor Belastung [mmol/l]

Hb2 = Hämoglobin nach Belastung [mmol/l]

Hk1 = Hämatokrit vor Belastung [Fraktion]

Hk2 = Hämatokrit nach Belastung [Fraktion]

PVK = Faktor der Plasmavolumenkorrektur [-]

Nach der Plasmavolumenkorrektur konnte mit folgender Formel die Absolutzahl der einzelnen Zellpopulationen bestimmt werden:

$$Sub_{abs} = (Ges_{abs} \times Ges_{proz}) / 100$$

Sub_{abs} = absolute Zellzahl der Subpopulation [μl^{-1}]

Ges_{abs} = absolute Zellzahl der Gesamtpopulation [μl^{-1}]

Ges_{proz} = prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation [%]

3.8 Statistik

Alle immunologischen Daten, außer denen des NK-Tests, sowie die Verläufe von Harnstoff, Kreatinkinase und des C-reaktiven Protein wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Bei signifikanter Interaktion wurde der post hoc Test nach Scheffé durchgeführt. Beim NK-Test waren die Daten nicht normal verteilt, weshalb in Zusammenarbeit mit Dr. Georg (Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universität des Saarlandes) eine zweifache Logarithmierung erfolgte. Bei den anschließend normal verteilten Daten wurde eine dreifaktorielle univariate Varianzanalyse durchgeführt. Auf signifikante Unterschiede bei der Herzfrequenz und den Laktatwerten wurde mittels t-Test für gepaarte Stichproben geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Für die Auswertung der Tests wurde die Software STATISTICA 6.1 der Firma StatSoft (Tulsa, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Herzfrequenzen und Laktatwerte

In den Tabellen 4.1 und 4.2 sind die Herzfrequenzen und Laktatwerte vor und nach der ersten und zweiten Intervallbelastung sowie nach der Erholungsphase 1 und 2 aufgeführt und für die jeweilige Intervention (aktive Erholung, passive Erholung) dargestellt.

	HF vor Belastung 1 [min ⁻¹]	HF nach Belastung 1 [min ⁻¹]	HF nach Erholung 1 [min ⁻¹]	HF vor Belastung 2 [min ⁻¹]	HF nach Belastung 2 [min ⁻¹]	HF nach Erholung 2 [min ⁻¹]
Passive Erholung	71 ± 10	181 ± 11	76 ± 12	72 ± 11	183 ± 9	76 ± 12
Aktive Erholung	71 ± 13	181 ± 10	142 ± 13 *	74 ± 10	183 ± 10	148 ± 12 *

Tabelle 4.1: Herzfrequenzen vor und nach Belastung sowie nach Erholung (*: p<0,001).

Zwischen aktiver und passiver Erholung besteht vor und direkt nach den Belastungen 1 und 2 kein signifikanter Unterschied. Im Anschluss von Erholung 1 und 2 besteht ein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung (p<0,001).

	Laktat vor Belastung 1 [mmol/l]	Laktat nach Belastung 1 [mmol/l]	Laktat nach Erholung 1 [mmol/l]	Laktat vor Belastung 2 [mmol/l]	Laktat nach Belastung 2 [mmol/l]	Laktat nach Erholung 2 [mmol/l]
Passive Erholung	1,2 ± 0,4	5,7 ± 1,5	2,5 ± 1,2	1,3 ± 0,5	5,2 ± 2,3	2,1 ± 0,9
Aktive Erholung	1,3 ± 0,3	5,7 ± 1,7	1,6 ± 0,4 *	1,5 ± 0,4	5,0 ± 1,3	1,4 ± 0,4 *

Tabelle 4.2: Laktatwerte vor und nach Belastung sowie nach Erholung (*: p<0,05).

Die Laktatkonzentrationen vor und nach Belastung 1 bzw. 2 sind ohne signifikanten Unterschied. Nach Erholung 1 (p = 0,005) bzw. nach Erholung 2 (p = 0,006) sind die Laktatkonzentrationen nach aktiver Erholung signifikant niedriger als nach passiver Erholung.

4.2 Kreatinkinase (CK) und Harnstoff

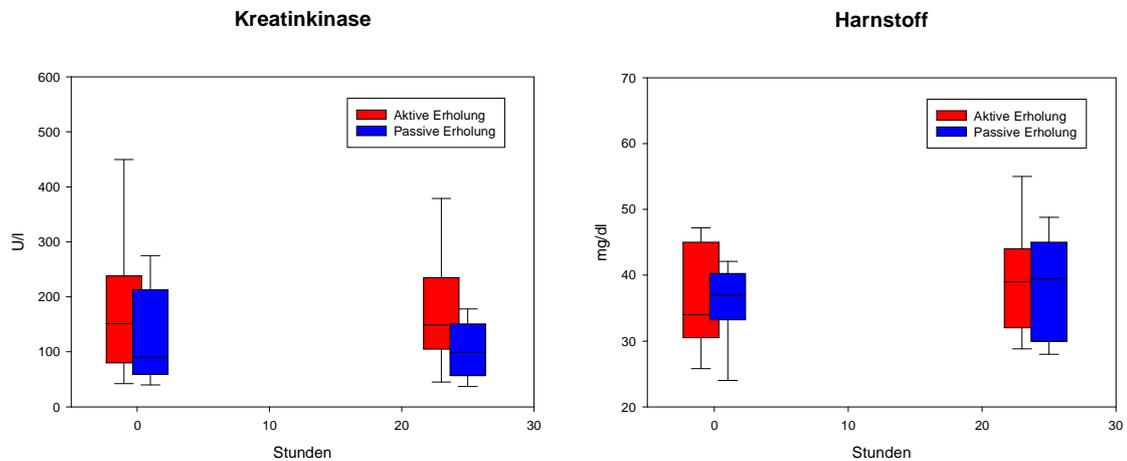
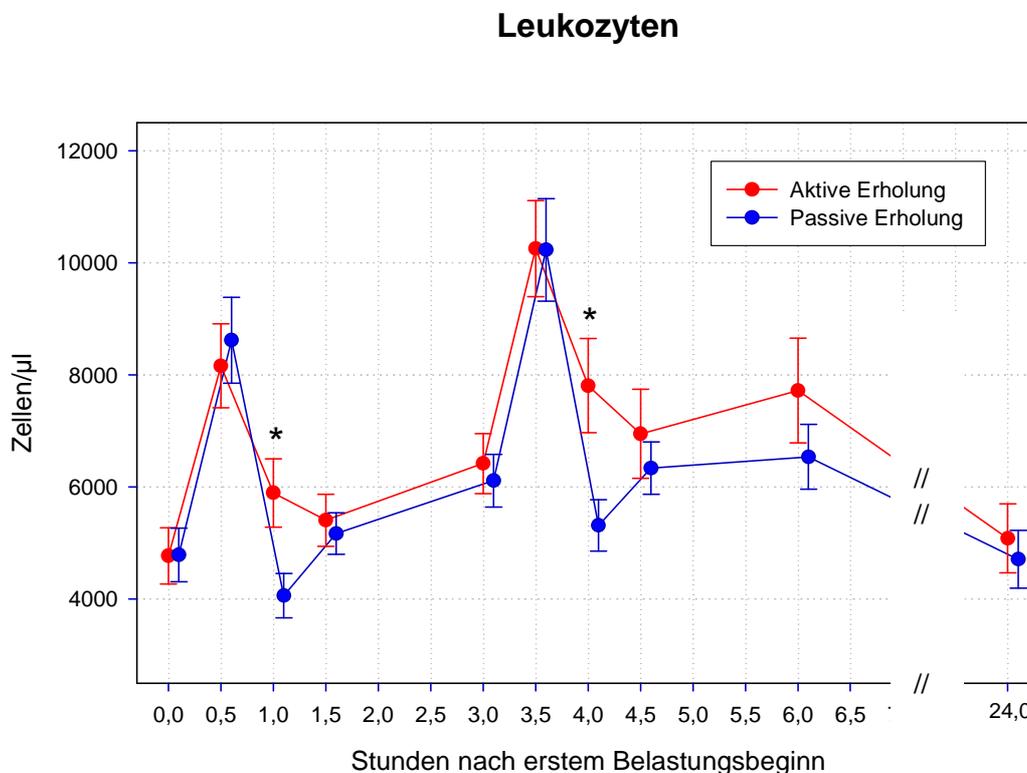


Abbildung 4.1: Verlauf der Kreatinkinase- (U/l) und Harnstoffkonzentration (mg/dl).

Die Kreatinkinasekonzentration ($p = 0,22$) und Harnstoffkonzentration ($p = 0,66$) vor Testbeginn im Vergleich mit der am Folgetag des Tests ist ohne signifikanten Unterschied.

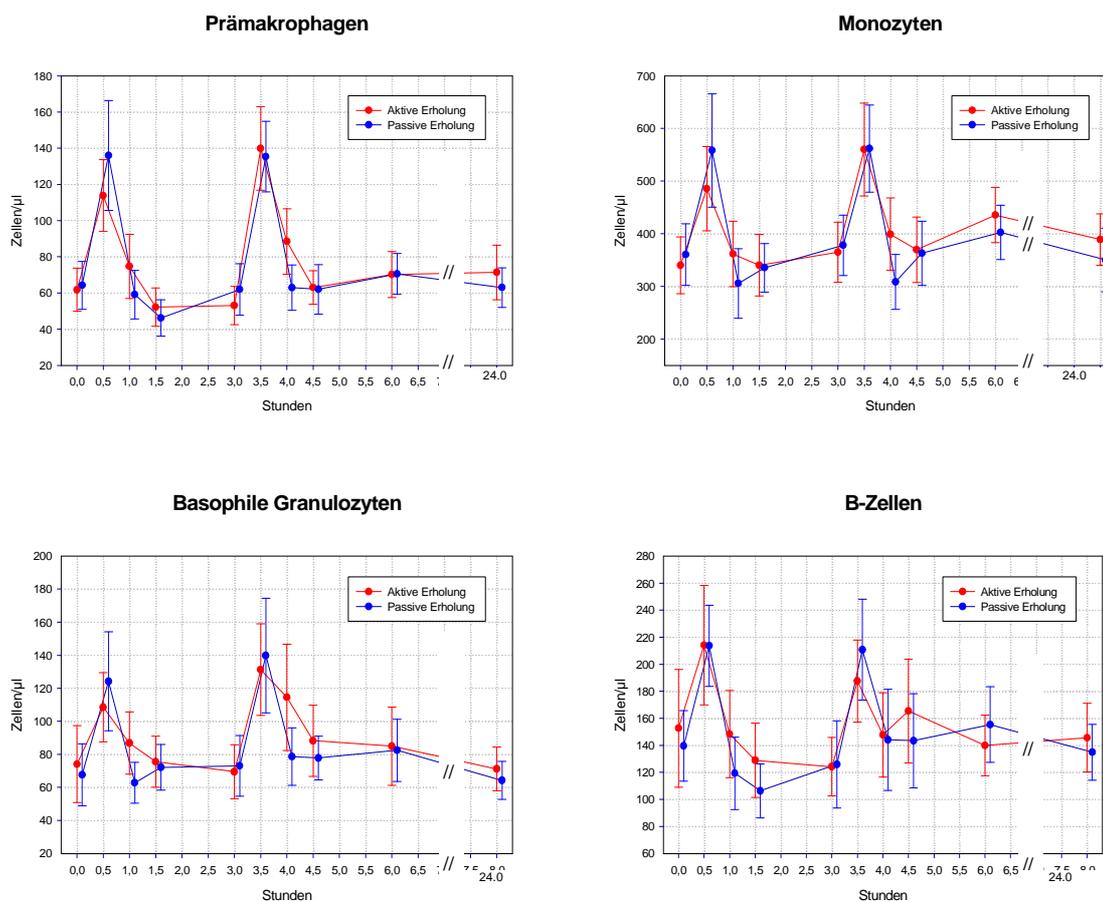
4.3 Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen



Abbildungen 4.2: Verlauf der Leukozyten (Zellen pro µl). Es besteht eine signifikant höhere Zellkonzentration nach aktiver Erholung im Vergleich zur passiven Erholung an den Messzeitpunkten 30 Minuten nach Belastung 1 bzw. 2 ($p < 0,001$).

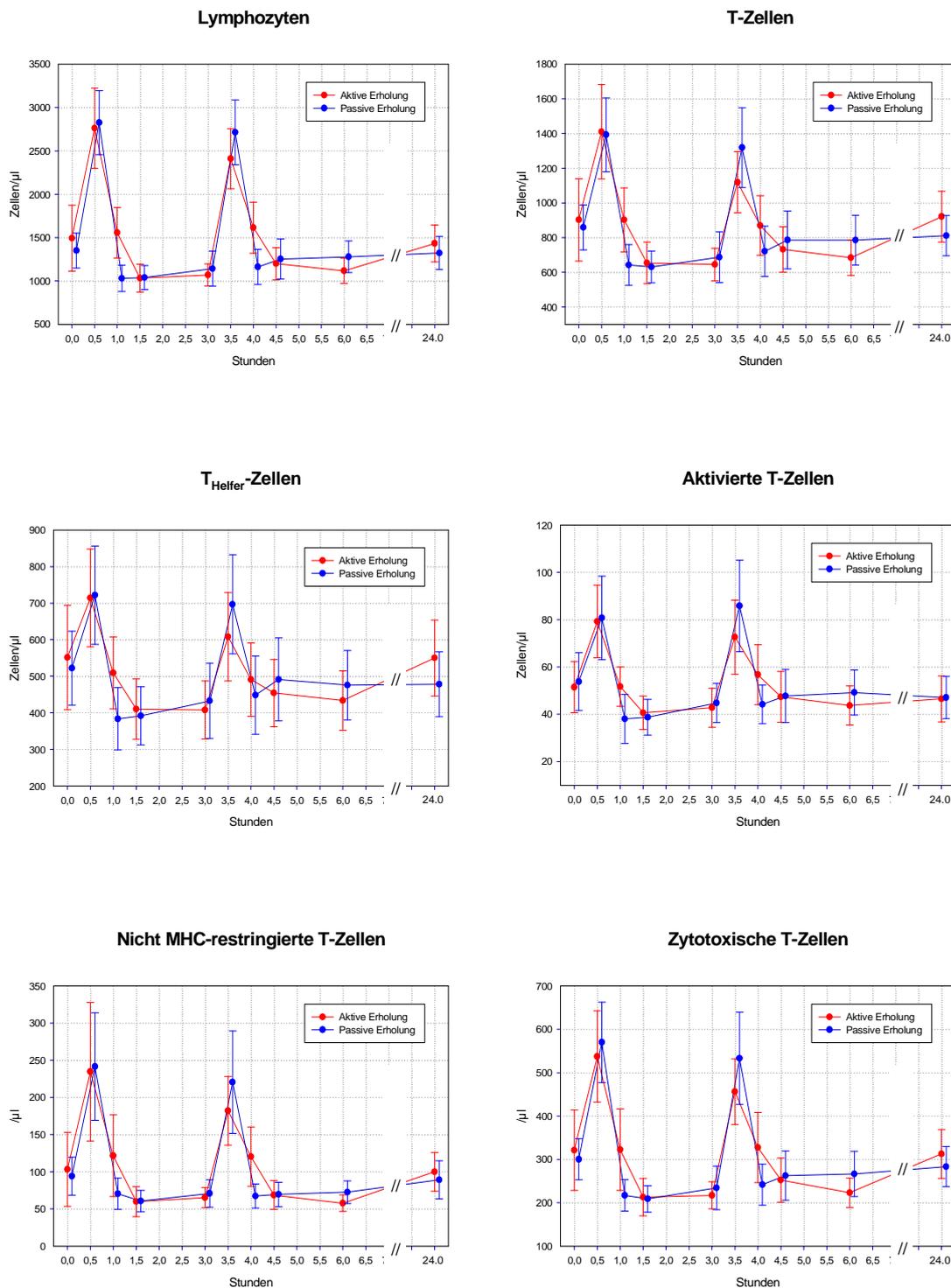
Bezüglich des Verhaltens der Leukozyten sind bei beiden Interventionen zwei Gipfel nach den Belastungen (0,5 und 3,5 Stunden) zu erkennen, wobei der Maximalwert nach der zweiten Belastung vorzufinden ist. Jeweils nach den passiven Erholungen 1 und 2 lagen die Leukozytenkonzentrationen unter denen vor Belastungsbeginn. Im Hinblick auf die unterschiedlichen Interventionen besteht im Anschluss an eine aktive Erholung sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Intervallbelastung (1 und 4 Stunden) ein signifikanter, geringerer Konzentrationsabfall der Leukozyten als nach passiver Erholung ($p < 0,001$). Am Folgetag (24 Stunden) liegen für beide Interventionsformen wieder die Ausgangswerte vor.

Ein ähnliches Verhalten, wie das der Gesamtleukozyten, zeigen die Zellpopulationen von Monozyten, Prämakrophagen, basophilen Granulozyten und B-Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung besteht hier aber zu keinem Zeitpunkt.



Abbildungen 4.3: Verlauf der Monozyten, Prämakrophagen, basophilen Granulozyten und B-Zellen (Zellen pro µl).

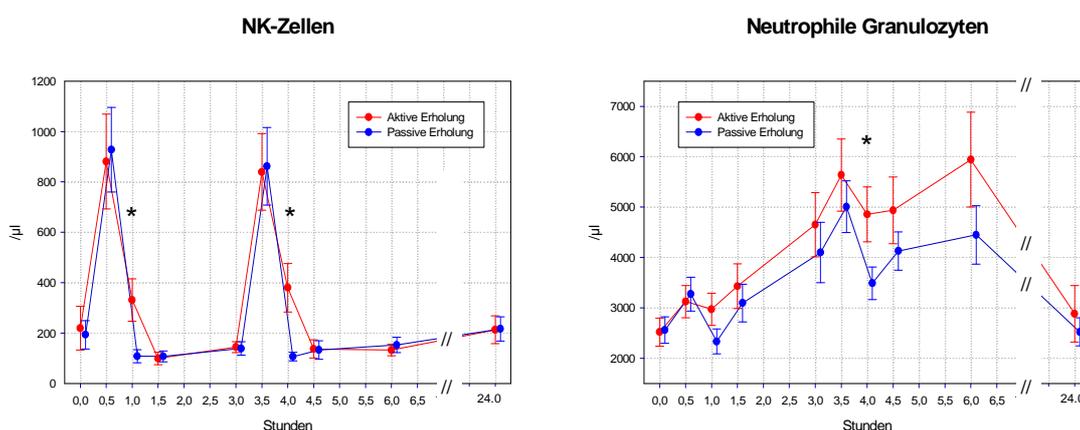
Bei den Lymphozyten, T-Zellen, T-Helferzellen, aktivierten T-Helferzellen, nicht MHC-restringierten T-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen liegen alle Konzentrationen am Testtag bis auf die Zeitpunkte 0,5 und 3,5 Stunden unter der Ausgangskonzentration. Signifikant ist der Zellabfall aber zu keinem Zeitpunkt.



Abbildungen 4.4: Verlauf der Lymphozyten, T-Zellen, T-Helferzellen, aktivierten T-Helferzellen, nicht MHC-restringierten T-Zellen und zytotoxischen T-Zellen (Zellen pro μ l).

Bei den natürlichen Killerzellen nach beiden Interventionen (1 und 4 Stunden, $p < 0,003$ und $p < 0,001$) besteht ein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung. Dabei liegt jeweils die Zellkonzentration nach aktiver Erholung über der nach passiver Erholung.

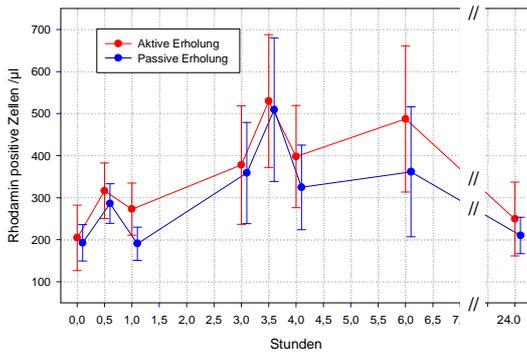
Bei den neutrophilen Granulozyten zeigt sich bei der ersten Belastung ein geringerer Konzentrationsanstieg als bei der zweiten Belastung. Der anschließende Abfall der neutrophilen Granulozytenkonzentration unterscheidet sich bei der aktiven und passiven Erholung in soweit, dass nach aktiver Erholung die Zellkonzentration geringer abfällt als nach passiver Erholung. Ein signifikanter Unterschied liegt jedoch nur nach der zweiten Erholung (4 Stunden) vor ($p < 0,03$). Durch die verzögerte Leukozytose kommt es im Laufe des Testtages zu einem Anstieg der Granulozytenzahl. Bei Beginn der zweiten Belastung waren ca. doppelt so viele neutrophile Granulozyten im Blut wie zu Beginn des Tests. Durch das Intervallprogramm kam es erneut zu einem Anstieg der Zellzahl mit anschließendem Abfall. Wegen der verzögerten Leukozytose stieg die Granulozytenzahl bis zum Messzeitpunkt 6 Stunden wieder an. Am Folgetag lagen erneut die Ausgangswerte vor.



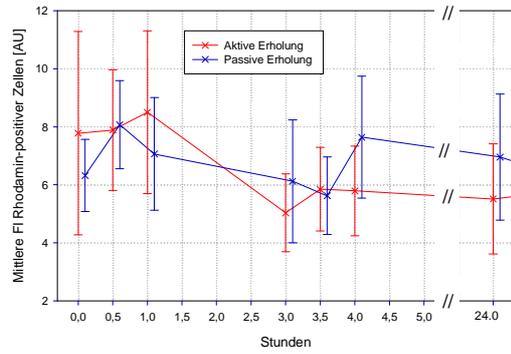
Abbildungen 4.5: Verlauf der natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten (Zellen pro μl). Es besteht ein signifikanter Unterschied im Abfall der Zellkonzentration zwischen aktiver und passiver Erholung bei den NK-Zellen zu den Messzeitpunkten 30 Minuten nach Belastung 1 bzw. 2 ($p < 0,003$, $p < 0,001$), sowie bei den neutrophilen Granulozyten 30 Minuten nach Belastung 2 ($p < 0,03$). Der Zellkonzentrationsabfall ist nach aktiver Erholung geringer.

4.4 Oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten

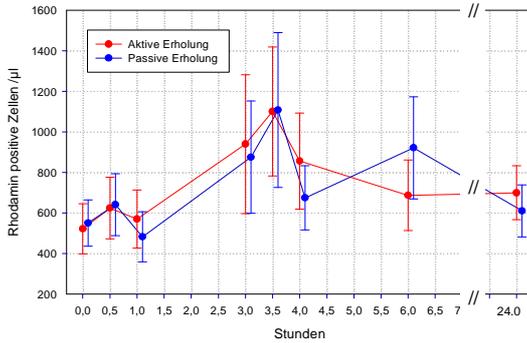
Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
ohne Stimulation



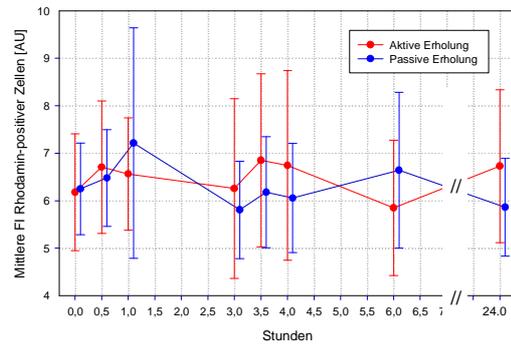
Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
ohne Stimulation



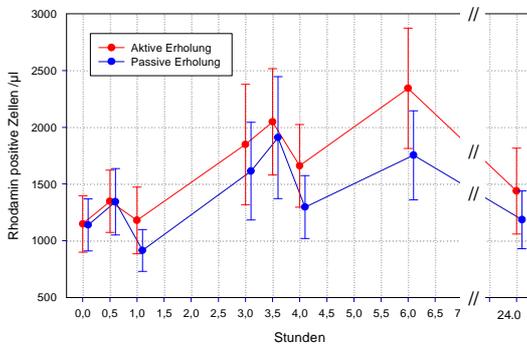
Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
Stimulation mit FMLP



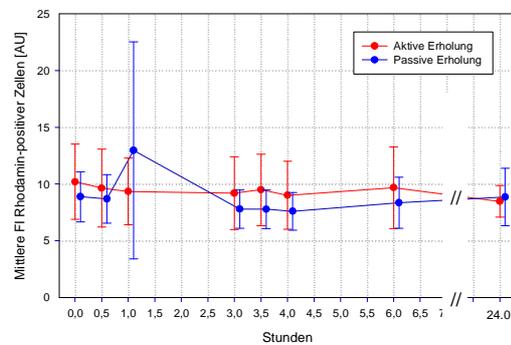
Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
Stimulation mit FMLP

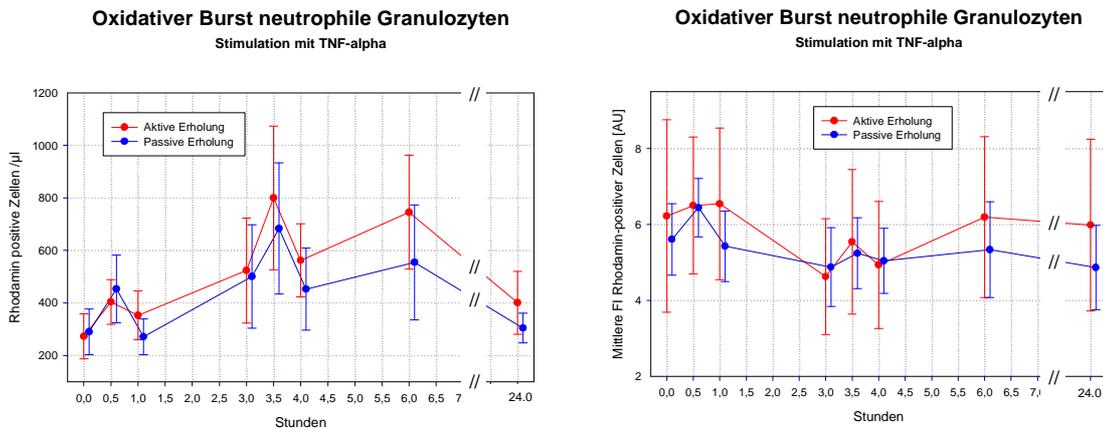


Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
Stimulation mit TNF-alpha und FMLP



Oxidativer Burst neutrophile Granulozyten
Stimulation mit TNF-alpha und FMLP





Abbildungen 4.6: Verlauf des oxidativen Bursts der neutrophilen Granulozyten ohne Stimulation, mit Stimulation durch FMLP, TNF- α + FMLP und TNF- α ; links die Anzahl der stimulierbaren neutrophilen Granulozyten pro μl und rechts die mittlere Fluoreszenzintensität (mittlere FI) rhodamin-positiver Zellen als Maß der Aktivierbarkeit auf Einzelzellniveau.

Ein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung fand sich im oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten ohne Stimulation nicht (Zellen: $p = 0,61$; FI: $p = 0,26$). Gleiches gilt auch für die Stimulation mit TNF- α (Zellen: $p = 0,06$; FI: $p = 0,76$), FMLP (Zellen: $p = 0,28$; FI: $p = 0,27$) und TNF- α + FMLP (Zellen: $p = 0,11$; FI: $p = 0,45$).

4.5 NK-Zell-Zytotoxizität

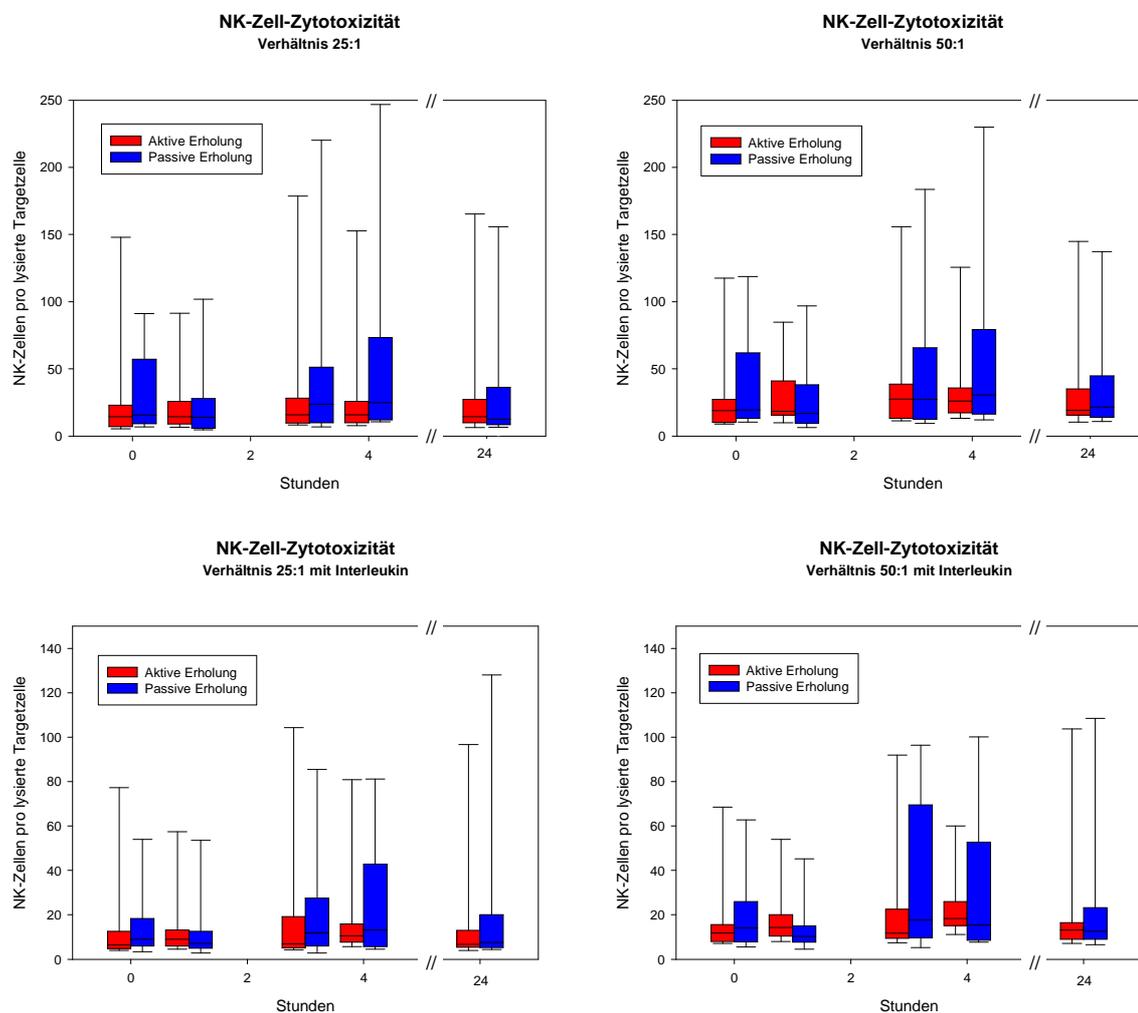
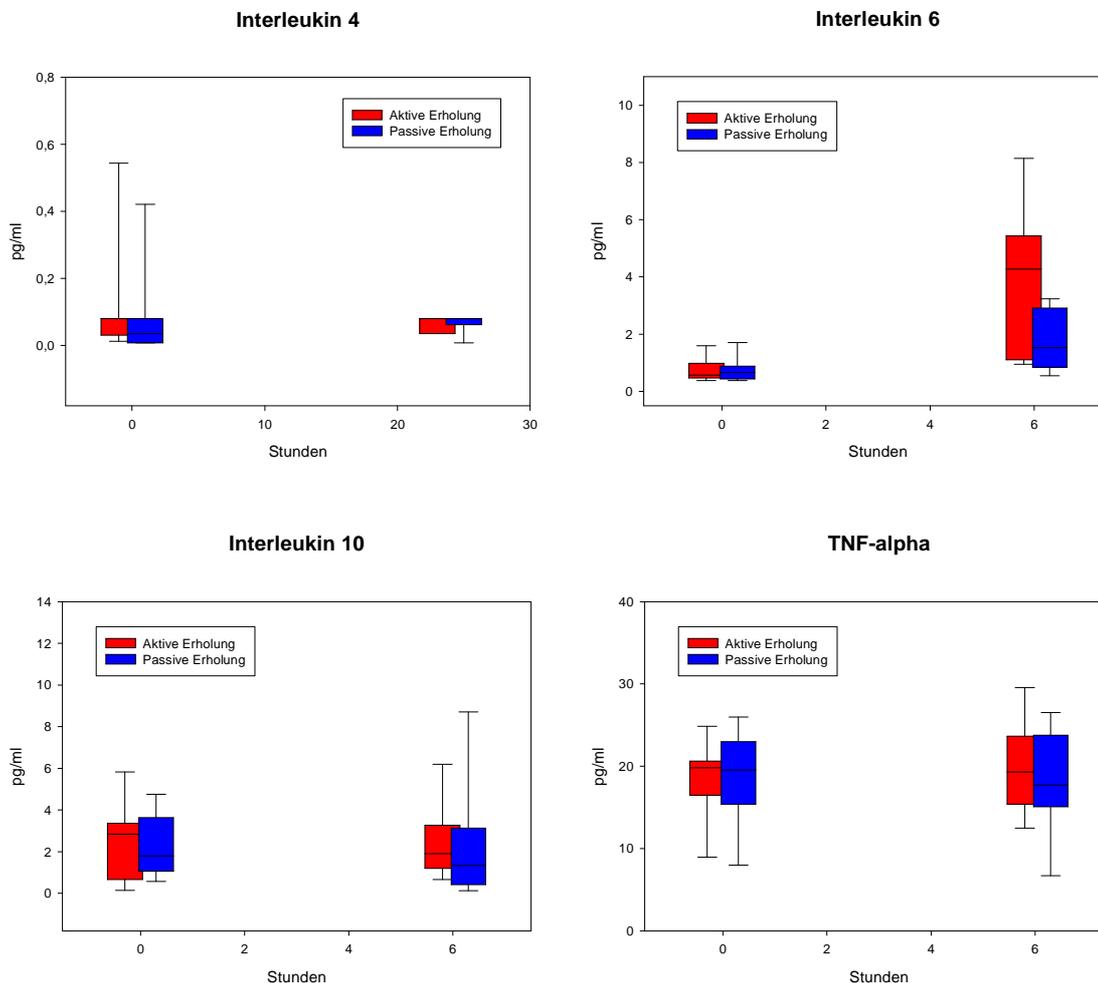


Abbildung 4.7: Verlauf der NK-Zell-Zytotoxizität (NK-Zellen pro lysierte Targetzelle). Es besteht ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen aktiver und passiver Erholung ($p = 0,015$) beim Verhältnis 25 Effektorzellen auf eine Target-Zelle. Dargestellt in den Graphiken sind die Mediane der Konzentrationen mit der Quartile 25 und 75 sowie der Perzentile 5 und 95.

Hinsichtlich der NK-Zell-Zytotoxizität fand sich nach zweifacher Logarithmierung und anschließender dreifaktorieller univariater Varianzanalyse ein signifikanter Gruppenunterschied zwischen aktiver und passiver Erholung ($p = 0,015$) beim Verhältnis 25 Effektorzellen zu einer Target-Zelle. Hier fällt auf, dass vor der zweiten Belastung (3 Stunden) und 30 Minuten nach der zweiten Belastung (4 Stunden) mehr NK-Zellen nach passiver Erholung als nach aktiver Erholung

zum Abtöten einer Target-Zelle notwendig sind, d.h. die NK-Zellaktivität ist zu diesen Zeitpunkten nach passiver Erholung niedriger als nach aktiver Erholung. Am Folgetag war die NK-Zell-Zytotoxizität bei beiden Interventionen wieder gleich. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur Ausgangsaktivität. Beim Verhältnis 50:1 ($p = 0,14$), 25:1 mit Stimulation durch Interleukin 2 ($p = 0,33$) und 50:1 mit Stimulation durch Interleukin 2 ($p = 0,26$) bestand kein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung.

4.6 Zytokine und Akute-Phase-Reaktion



Abbildungen 4.8: Verlauf der TNF- α -, Interleukin-4-, -6- und -10-Konzentration (pg/ml). Signifikanter Anstieg der Interleukin-6-Konzentration bei beiden Erholungsformen ($p < 0,001$). Dieser fiel bei aktiver Erholung signifikant höher aus als bei passiver Erholung ($p = 0,02$). Dargestellt in den Graphiken sind die Mediane der Konzentrationen mit der Quartile 25 und 75 sowie der Perzentile 5 und 95.

Es fand ein signifikanter Anstieg der Interleukin-6-Konzentration bei beiden Erholungsformen ($p < 0,001$) statt. Dieser fiel bei aktiver Erholung signifikant höher aus als bei passiver Erholung ($p = 0,02$). Weder bei TNF- α ($p = 0,44$) noch bei IL-4 ($p = 0,66$) und IL-10 ($p = 0,78$) kam es zu signifikanten belastungsinduzierten Konzentrationsänderungen.

Eine Erhöhung des CRP-Werts lag sowohl vor Belastung als auch einen Tag danach nicht vor und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung ($p = 0,86$).

5 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob durch eine aktive Erholung als Regenerationsmaßnahme im Anschluss an intensive Belastungen eine positive Beeinflussung des „Open Window“ zu erreichen ist.

5.1 Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen

Hormone spielen bei der Regulierung des Immunsystems eine wichtige Rolle (HOFFMAN-GOETZ & PEDERSEN 1994). Die Katecholamine werden vermehrt bei anaeroben Belastungen ausgeschüttet (KINDERMANN et al. 1982), die Blutkonzentration wird hauptsächlich von der Belastungsintensität beeinflusst (PEDERSEN & ULLUM 1994, GABRIEL & KINDERMANN 1997b, GABRIEL 2000). Die Kortisolausschüttung ist vorwiegend von der Belastungsdauer, weniger von der Belastungsintensität abhängig (GABRIEL und KINDERMANN 1997b).

Die intensive Intervallbelastung der durchgeführten Studie führte zu einem 63-prozentigen Anstieg der Leukozyten, der differenziert betrachtet vor allem durch natürliche Killerzellen und Lymphozyten bedingt ist. Die natürlichen Killerzellen stiegen um das Viereinhalbfache und die zytotoxischen T-Zellen um 81 Prozent an. Dies ist insbesondere durch die Änderung des Adhäsionsverhaltens der Lymphozyten durch adrenerge β_2 -Stimulation bedingt (VAN TITS et al. 1990, KLONS et al. 1996, GABRIEL & KINDERMANN 1997b, GABRIEL 2000). Da die NK-Zellen die größte β_2 -Rezeptordichte aufweisen, gefolgt von den zytotoxischen T-Zellen, ist deren Anstieg am stärksten (VAN TITS et al. 1990). Vorangegangene Studien haben ebenfalls beschrieben, dass bei hoch intensiven Belastungen die NK-Zellen den größten Anstieg aufweisen (FERRY et al. 1990, GABRIEL et al. 1992b, NIEMANN et al. 1992, NIELSEN et al. 1996, GABRIEL et al. 2003).

Auffällig ist, dass sich die Prämakrophagen während der Belastung verdoppeln. Gabriel et al.(2003) beschreibt sogar eine Vervielfachung der Prämakrophagen nach einer maximalen 60 Sekunden Belastung. Der relativ starke Anstieg ließe sich dadurch erklären, dass der Großteil der Prämakrophagen dem marginalen Pool angehört und dessen Funktion als ein Pool aktivierter Immunzellen angesehen werden kann, der zur Migration ins Gewebe bereitsteht (GABRIEL et al. 2003). Die T-Helferzellen, B-Zellen und Monozyten stiegen zwischen 30 und 40 Prozent an.

Den geringsten prozentualen Anstieg während der Belastung verzeichneten die neutrophilen Granulozyten mit 26 Prozent. Deren Mobilisation erfolgt hauptsächlich durch Kortisol und tritt erst 60 bis 90 Minuten nach dem Belastungsreiz auf (GABRIEL et al. 1992b). Dabei ändert sich die Gesamtzahl der Granulozyten im Organismus nicht, es findet vielmehr eine rasche Umverteilung vom marginalen Granulozytenpool zugunsten der zirkulierenden Granulozyten statt (ATHENS et al. 1961). Wenn man den geringen Anstieg der neutrophilen Granulozyten dem Adrenalin zuschreibt (GABRIEL 2000, SCHULZ 2002), erfolgt die erste kortisolbedingte Erhöhung 90 Minuten nach Belastungsbeginn. Deshalb waren zu Beginn der zweiten Belastung 76 Prozent mehr neutrophile Granulozyten im Blut als zu Belastungsbeginn. Da die neutrophilen Granulozyten mit 59 Prozent an den Gesamtleukozyten (SCHMIDT & THEWS 1997) den Großteil ausmachen, ist die Gesamtleukozytenzahl ebenfalls vor der zweiten Belastung erhöht (um 22 Prozent).

Nach Belastungsende fällt die Konzentration von Adrenalin im Blut wegen dessen kurzer Halbwertszeit schnell ab. Mit der verminderten Katecholaminkonzentration geht auch die Zahl der zirkulierenden Lymphozyten im Blut zurück (SCHEDLOWSKI 1993). Die Hauptursache des Lymphozytenabfalls ist aber nicht die verminderte AdrenalinKonzentration, sondern die gestiegene Kortisolkonzentration im Blut. Die Kortisolkonzentration führt zum vermehrten „Homing“ der Immunzellen, worunter man das Verbleiben der Zellen in den Lymphknoten und Organen versteht (YEDNOCK & ROSEN 1990).

WIGERNAES et al. (2001) untersuchte das Verhalten von Adrenalin und Kortisol bei passiver und aktiver Erholung (15 Minuten bei 50% der VO_{2max}) nach einstündiger Belastung. Dabei blieb die AdrenalinKonzentration bei aktiver Erholung signifikant höher. Die KortisolKonzentration unterschied sich zu keinem Zeitpunkt der beiden Erholungsregime signifikant. Bei der gleichen Studie gab es einen signifikanten Unterschied bei den Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten. Dieses Ergebnis war in der vorliegenden Studie nur bei den Leukozyten sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten Belastung nachzuvollziehen. Dabei fiel die Zellzahl nach der ersten Belastung bei aktiver Erholung um 25 Prozent, bei passiver Erholung um 50 Prozent und damit sogar unter den Ausgangswert des Tages.

Die in dieser Studie zusätzlich untersuchten NK-Zellen fielen durch aktive Erholung signifikant langsamer ab als nach passiver Erholung. Sie waren nach passiver Erholung sogar 51 Prozent niedriger als der Ausgangswert (GABRIEL 2000). Die Lymphozyten, T-Zellen, T-Helferzellen, aktivierte T-Helferzellen, nicht MHC-restringierte T-Zellen, zytotoxische T-Zellen und B-Zellen zeigen einen ähnlichen aber nicht signifikanten Verlauf.

Wegen der hohen Adrenalinsensitivität der NK-Zellen und Lymphozyten (VAN TITS et al. 1990) und des geringeren Adrenalinabfalls bei aktiver Erholung (WIGERNEAS et al. 2001) ist der positive Effekt der aktiven Erholung auf diese Zellen sehr wahrscheinlich auf den belastungsbedingt höheren Adrenalin Spiegel zurückzuführen (SCHEDLOWSKI et al. 1993, BENSCHOP et al. 1996). Dass diese längere Belastung und der darauf folgende länger erhöhte Adrenalin Spiegel keine negativen Auswirkungen auf die NK-Zell-, Leukozyten- und Lymphozytenzahl hat, lässt sich durch die gleichen Zellkonzentrationen 30 und 240 Minuten nach Regenerationsende zwischen aktiver und passiver Erholung vermuten.

Bei den neutrophilen Granulozyten gab es einen signifikanten Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung nach dem zweiten Intervalltraining. Wegen der längeren Belastung durch die erste aktive Erholung kommt es eventuell zu einer höheren Kortisolausschüttung (GABRIEL & KINDERMANN 1997b) und einer ausgeprägteren verzögerten Leukozytose. Dabei werden

kortisolbedingt vermehrt neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark freigesetzt (BISHOP et al. 1968). Indem die zweite Belastung mit folgender aktiver Erholung auf einem bereits angedeutet höheren Ausgangswert der neutrophilen Granulozyten stattfindet, ist anschließend ein signifikanter Unterschied zwischen aktiver und passiver Erholung zu beobachten. Was auf einen adrenalinbedingten geringeren Abfall der neutrophilen Granulozyten, wie er bei aktiver Erholung auftritt, zurückzuführen zu sein scheint.

Alle Leukozyten- und Lymphozytensubpopulationen hatten am Folgetag wieder Ausgangswerte erreicht, was auch laut Literatur in der Regel innerhalb von circa 24 Stunden nach Belastungsende der Fall ist (GABRIEL 2000, SCHARHAG et al. 2002).

Da die NK-Zellen ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr sind und in der „first line of defense“ des Körpers für die Elimination virusbefallener Zellen eine wichtige Rolle spielen (VAN KAER & JOYCE 2005), kommt deren geringerem Abfall durch aktive Erholung eine besondere immunologische Bedeutung zu.

Die Leukozyten, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten fallen durch eine aktive Erholung nach einer intensiven Intervallbelastung geringer ab. Dies kann das „Open Window“ positiv beeinflussen und das Auftreten von Infektionen nach intensiven oder hoch intensiven Belastungen reduzieren, wobei der Effekt der neutrophilen Granulozyten bei mehreren Belastungen am Tag größer zu sein scheint.

5.2 Zell-Funktionen

5.2.1 Oxidativer Burst

Die Gesamtaktivität der neutrophilen Granulozyten nimmt im Laufe des Testtages, parallel zur Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Blut, zu. Der prozentuale Anteil der aktivierten Zellen an der Gesamtpopulation zeigt also

keinen unterschiedlichen Verlauf, sodass sich die Funktion auf Einzelzellniveau nicht zu verändern scheint.

Es wurde festgestellt, dass extensive Belastungen von bis zu einer Stunde Länge zu einer Stimulation des oxidativen Bursts führen (GABRIEL & KINDERMANN 1997c). Dabei wird diskutiert, dass die neu in die Blutbahn eintretenden Abwehrzellen eine höhere Aktivität als die bereits zirkulierenden Abwehrzellen haben (GABRIEL & KINDERMANN 1997b). Außerdem wurde eine belastungsbedingte Abnahme der Zellaktivität auf Einzelzellniveau in der Nachbelastungsphase von intensiven und hoch intensiven Belastungen beschrieben (HACK et al. 1992, GABRIEL & KINDERMANN 1997a). Die verminderte Bildung von Superoxid-Anionen in einzelnen Granulozyten durch intensive oder hoch intensive Ausdauerbelastungen ist auf eine erhöhte Laktatkonzentration auf 4-8 mmol/l, mit gleichzeitig erniedrigtem extrazellulärem pH, zurückzuführen (BURGARD et al. 1997). Durch die extrazelluläre Laktaterhöhung werden die Ionenkanäle, der Na^+/H^+ -Antiport und ein transmembranöser Laktatcarrier in seiner Funktion eingeschränkt. Die physiologisch eintretende Alkalisierung nach initialer geringer Säurebildung im Zytoplasma bei Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bleibt aus und vermindert die Bildung von Superoxid-Anionen durch die NADPH-Oxidase (GABRIEL 2000). Da es sich bei unserer Studie um eine hoch intensive Intervallbelastung mit Laktatwerten um 5,5 mmol/l nach Belastung handelt, ist eine Einschränkung der Zellaktivität zu erwarten. Dies konnte aber nicht bestätigt werden. Die Aktivität der neutrophilen Granulozyten auf Einzelzellniveau veränderte sich weder durch die intensive Belastung noch durch die unterschiedlichen Regenerationsmaßnahmen. Die unveränderte Aktivität auf Einzelzellniveau könnte sich durch eine Mobilisation aktiverer neutrophiler Granulozyten bei Belastungsbeginn in die Blutbahn mit anschließender Reduktion des oxidativen Bursts durch die hoch intensive Belastung erklären lassen.

5.2.2 NK-Zell-Zytotoxizität

Die NK-Zell-Zytotoxizität wird in einigen Studien als Gesamtaktivität aller NK-Zellen angesehen, in anderen Studien als Aktivität der einzelnen NK-Zelle (SHEPARD 1997). Durch den starken Anstieg der NK-Zellen bei hoch intensiven Belastungen kommt es absolut zu einem Anstieg der NK-Zell-Zytotoxizität. Auf Einzelzellniveau gibt es unterschiedliche Aussagen zur Entwicklung der NK-Zell-Zytotoxizität im Zusammenhang mit Belastungen. So wurde eine unveränderte Aktivität der NK-Zellen nach extensiven und intensiven Belastungen (SHINKAI et al. 1992, NIEMAN et al. 1995, FURUSAWA et al. 2003) oder eine belastungsbedingte Abnahme der NK-Zell-Zytotoxizität (BERK et al. 1990, SUZUI et al. 2004) beschrieben.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass es zum Abfall der NK-Zell-Zytotoxizität, im Verhältnis 25 NK-Zellen auf eine Target-Zelle, vor und 30 Minuten nach der zweiten hoch intensiven Intervallbelastungseinheit kommt. Vor und nach der ersten Belastung fanden sich keine Unterschiede. Bei Versuchen mit Indomethacin wurde gezeigt, dass die NK-Zell-Zytotoxizität durch Prostaglandine (PG), insbesondere PGE₂, die von stimulierten Monozyten und neutrophilen Granulozyten produziert werden, vermindert wird (PEDERSEN et al. 1988, PEDERSEN & ULLUM 1994). Beim zweiten Belastungsblock zirkulierten vermehrt neutrophile Granulozyten im Blut und die Gesamtaktivität der neutrophilen Granulozyten nahm zu. Es ist möglich, dass dadurch vermehrt Prostaglandine freigesetzt wurden, welche die NK-Zell-Zytotoxizität supprimierten. Dieser Abfall konnte durch die aktive Erholung verhindert werden. Dies kann durch die belastungsbedingte Ausschüttung von Endorphinen bedingt sein. Denn in einigen Studien zeigte sich, dass durch Opioidantagonisten ein Anstieg der NK-Zell-Zytotoxizität unmittelbar nach Belastungen verringert werden konnte (MACKINNON 1999). Das Zytokin TNF- α stellt einen potenten Stimulator der NK-Zell-Zytotoxizität dar (MACKINNON 1999). In unserer Studie kam es zu keiner signifikanten TNF- α -Konzentrationsänderung, was den Einfluss von TNF- α auf den geringeren Abfall der NK-Zell-Zytotoxizität eher ausschließt. PEDERSEN und ULLUM

(1994) fanden einen Zusammenhang zwischen der Körperkerntemperatur und der NK-Zell-Zytotoxizität. Sie postulierten, dass eine erhöhte Körperkerntemperatur einer der Mechanismen des belastungsbedingten Anstiegs der NK-Zell-Zytotoxizität sei. Es kann vermutet werden, dass durch die aktive Erholung die Körperkerntemperatur höher ist als bei einer passiven Erholung und sich dadurch eventuell ein Teil des durch aktive Erholung bedingten geringeren Abfalls der NK-Zell-Zytotoxizität erklären ließe. Die genaue Ursache des verminderten Abfalls der NK-Zell-Zytotoxizität ist in folgenden Studien noch genauer zu untersuchen.

Somit könnte eine passive Erholung eine höhere Infektanfälligkeit des Athleten nach intensiven Belastungen bedingen, die aktive Erholung hingegen vor Infekten schützen. Warum eine aktive Erholung den Abfall der NK-Zell-Zytotoxizität nach intensiven Belastungen verhindert, müsste in Folge noch weiter abgeklärt werden.

Dieser Effekt sollte jedoch nicht überbewertet werden, da die NK-Zell-Zytotoxizität im Verhältnis 50:1 (NK-Zellen : Target-Zellen) und unter Stimulation mit Interleukin-2 bei den Mischungsverhältnissen 50:1 und 25:1 keine signifikanten Unterschiede aufwies. Als Ursache ist denkbar, dass beim Verhältnis von 50:1 und unter Stimulation mit Interleukin-2 der Anteil der lysierten K562-Zellen meist über 80 Prozent lag und deshalb ein geringeres Angebot an Zielzellen am Ende der Inkubationszeit vorlag, und dabei behinderten sich die NK-Zellen im Sinne einer kompetitiven Hemmung.

Da nur die sensitivste Konzentration von 25:1 zu einem verwertbaren Ergebnis führte, wäre eine weitere Messung mit der Verdünnung 12,5:1 als Ergänzung sinnvoll gewesen.

5.3 Zytokine und Akute-Phase-Reaktion

Der signifikante IL-6 Anstieg im Plasma war bei unserer Studie zu erwarten. Es wurde schon früher eine starke Erhöhung von IL-6 unter Belastung bis zum hundertfachen des Ausgangswertes festgestellt (PEDERSEN & HOFFMANN-

GOETZ 2000, PEDERSEN et al. 2001, FEBBRAIO & PEDERSEN 2002, SCHARHAG et al. 2006). Es wurde diskutiert, dass der belastungsbedingte IL-6-Anstieg durch Immunzellen, als Reaktion auf eine Infektion, bedingt sein kann (NEHLSSEN-CANNARELLA et al. 1997). Aber bei Untersuchungen von Monozyten während einer intensiven und moderaten Belastung kam es zu keinem intrazellulären Anstieg von IL-6 mRNA (ULLUM et al. 1994, MOLDOVEANU et al. 2000). Auch die Hypothese, dass IL-6 unter Belastung von der Leber freigesetzt wird, konnte widerlegt werden. Vielmehr eliminiert die Leber IL-6 aus dem Kreislauf (FEBBRAIO et al. 2003) und induziert eine CRP-Produktion (SCHMIDT & THEWS 1997). Es zeigte sich, dass Muskelkontraktionen ohne Schädigung der Fasern zu einer Erhöhung der IL-6-Konzentration im Plasma führen (PEDERSEN et al. 2001, FEBBRAIO & PEDERSEN 2002, PEDERSEN et al. 2003). Bei Probanden wurden Muskelbiopsien vor und nach Belastung entnommen. Diese enthielten im ausgeruhten Muskel geringe Mengen IL-6 mRNA. Im trainierten Muskel kam es zu einer Erhöhung von IL-6 mRNA bis um das hundertfache des Ausgangswertes (PEDERSEN et al. 2004). Die Erhöhung von IL-6 bei Belastung dient der Versorgung der Muskelzelle bei belastungsbedingter verminderter Glucoseverfügbarkeit (PEDERSEN et al. 2004). Deshalb lässt sich durch eine orale Substitution von Kohlenhydraten der IL-6-Anstieg im Blut reduzieren (SCHARHAG et al. 2006). Die nach Belastung erhöhten IL-6 Konzentrationen im Serum können 24 Stunden später, verglichen mit dem Ausgangswert, immer noch erhöht sein (PENKOWA et al. 2003). IL-6 induziert in der Leber und in anderen Zellen die Produktion von Akute-Phase-Proteinen (GANTER et al. 1989). Da in unserer Studie IL-6 unter körperlicher Belastung signifikant angestiegen ist, aber das C-reaktive-Protein (CRP), als Akute-Phase-Protein, sich im Serum des Folgetages nicht verändert hat, muss man davon ausgehen, dass es sich hier um eine belastungsbedingte, muskulär induzierte IL-6 Erhöhung handelt und nicht um eine klinisch relevante Akute-Phase-Reaktion. Der stärkere Anstieg nach der aktiven Erholung lässt sich mit der längeren Muskelarbeitszeit und der kürzeren Regenerationszeit bis zur Blutentnahme erklären. Mehrstündige extensive Belastungen, besonders

Laufbelastungen, führen zu einer Akute-Phase-Reaktion, was bei kurzen fahrradergometrischen Aktivitäten mit bis zu einer Stunde Dauer nicht auftrat (GABRIEL et al. 2000). Die 23-minütige Belastung ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um eine Akute-Phase-Reaktion zu induzieren.

Die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α wird durch unter Belastung freigegebenes IL-6 und durch rhIL-6-Infusionen herabgesetzt (PEDERSEN et al. 2001, FEBBRAIO & PEDERSEN 2002, PEDERSEN et al. 2003, STARKIE et al. 2003). Die Anzahl der TNF- α produzierenden Zellen im Blut änderte sich unter Belastung nicht (STARKIE et al. 2001), wobei Ostrowski einen TNF- α -Anstieg nach einem Marathonlauf beschreibt, der 2 Stunden nach Belastungsende den Ausgangswert erneut erreicht hatte (OSTROWSKI et al. 1998, OSTROWSKI et al. 1999). In unserer Studie konnte kein Unterschied zwischen der TNF- α -Konzentration vor Belastung und am Ende des ersten Testtages festgestellt werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die hohe IL-6-Konzentration keinen Anstieg von TNF- α im Plasma zuließ oder der Blutentnahmezeitpunkt, der 150 Minuten nach Belastungsende lag, zu spät gewählt war und deswegen schon wieder die Ausgangswerte vorlagen.

Die Untersuchung von IL-4 und IL-10 sollte eine Verschiebung im TH1/TH2-Zell-Muster aufzeigen. Beide Zytokine werden von stimulierten TH2-Zellen produziert, während die TH1-Zellen unter Stimulation von IL-12 und IL-2 Interferon- γ (IFN- γ) produzieren (MOREL & ORISS 1998). Die Zytokine der TH1-Zellen induzieren eher eine zelluläre Immunantwort, die der TH2-Zellen eine humorale Immunantwort (ROMAGNANI 1999). Steensberg et al. beschreiben 2001, dass nach intensiven Belastungen der prozentuale Anteil von zirkulierenden TH1-Zellen abnimmt, die TH2-Zellen aber unverändert bleiben (STEENBERG et al. 2001). Dies sei auf den supprimierenden Effekt von Adrenalin und Kortisol auf die TH1-Zellen zurückzuführen (ELENKOV & CHROUSOS 1999, FRANCHIMONT et al. 2000). Außerdem würde der hohe IL-6-Plasmaspiegel helfen, die TH2-Zellen in der Blutzirkulation zu halten (STEENBERG et al. 2001). Direkt nach intensiver Belastung bleibt die IL-4-Konzentration im Plasma unverändert (IBFELT et al. 2002, LANCASTER et al. 2004, PEAKE et al. 2005). Es kommt 2 Stunden nach Belastungsende zu

einem Anstieg von IL-4 (SUZUKI et al. 2002). Auf diese Studie gestützt, ist der Messzeitpunkt mit 2,5 Stunden nach der Belastung gut gewählt, aber es kam in unserer Untersuchung zu keinem Anstieg von IL-4 im Plasma. Den beschriebenen IL-10 Anstieg nach hoch intensiven Belastungen (PEAKE et al. 2005), nach Marathonläufen (OSTROWSKI et al. 1999) oder nach IL-6 Infusionen (STEENBERG et al. 2003) konnten wir nicht nachvollziehen, das IL-10 blieb ebenfalls unverändert. Damit bestätigt sich die Annahme, dass es nach hoch intensiven Belastungen zu keiner Veränderung der TH2-Zellkonzentration im Plasma kommt. Da IFN- γ , TNF- β und IL-2 nicht bestimmt wurden, können wir keine Aussagen über das Verhalten der TH1-Zellen machen. Dies wäre interessant, da die TH1-Zellen intrazelluläre Pathogene angreifen (ROMAGNANI 1999), wie z. B. Viren, die für belastungsabhängige Infektionen der oberen Atemwege ursächlich sind.

Zur Klärung des Verhaltens von TH1- und TH2-Zellen bei hoch intensiven Belastungen und des Einflusses von aktiver oder passiver Erholung auf das Verhalten in der Nachbelastungsphase hätte die Serumkonzentration der Zytokine an allen Blutentnahmezeitpunkten bestimmt werden müssen. Die dabei gewonnenen Daten hätten eventuell eine genauere Interpretation ermöglicht.

5.4 Probanden

Wie den anthropometrischen Daten zu entnehmen ist (siehe Tabelle 3.1), handelt es sich bei den Probanden dieser Studie um gut bis sehr gut ausdauertrainierte Sportler. Dies wird durch das hohe VO_2 max von 65 ml/min/kg und die überdurchschnittlich hohe relative Leistung von 3,7 W/kg an der IAS untermauert (KINDERMANN 1987, NOWACKI 1987). Somit ist eine Übertragung der Untersuchungsergebnisse auf den Leistungs- und Hochleistungssport gerechtfertigt.

5.5 Beurteilung der leistungsphysiologischen Parameter

Die Herzfrequenz und Laktatkonzentration im Blut bei Belastung stellen ein Kriterium zur Beurteilung der Ausbelastung des Probanden dar. Wegen der einfachen Bestimmungsmöglichkeit wird zur Berechnung der Belastungsintensität häufig die maximale Herzfrequenz herangezogen.

Eine einfache Faustformel für die Berechnung der Herzfrequenz bei Ausbelastung auf dem Fahrradergometer im Sitzen ist „200 minus Lebensalter“ (KINDERMANN 1987). Wegen einer beträchtlichen Streuung der maximalen Herzfrequenz können die berechneten Frequenzen auch deutlich höher sein (KINDERMANN 1987).

Beim Eingangstest der Studie waren die maximalen Herzfrequenzen der Probanden mit 190 ± 9 Schlägen/min über der errechneten Herzfrequenz, sodass von einer Ausbelastung der Probanden ausgegangen werden kann.

Eine andere Möglichkeit, den Ausbelastungsgrad zu überprüfen, ist mit der maximalen Laktatkonzentration im Blut möglich. Nach KINDERMANN (1987) und HECK (1990) sollte für eine Ausbelastung bei stufenförmigen Belastungsschemata wenigstens eine Laktatkonzentration von 8 mmol/l erreicht werden. Die Athleten in unserer Studie erreichten im Durchschnitt Laktatwerte von $10,7 \pm 1,4$ mmol/l beim Eingangstest, was über den angegebenen Mindestanforderungen lag.

Aus den vorliegenden Herzfrequenzen und Laktatwerten beim Eingangstest kann auf eine hohe Ausbelastung geschlossen werden, und die dadurch gewonnenen Daten sind für die Berechnung der individuellen anaeroben Schwelle (IAS) verwendbar.

Eine genaue Bestimmung der IAS ist für diese immunologische Studie wichtig, weil es über der IAS zu einer überproportionalen Ausschüttung von Katecholaminen kommt und daraufhin ein übermäßiger Anstieg von adrenalin sensitiven Lymphozyten stattfindet (GABRIEL et al. 1992b).

Zur Überprüfung der geforderten Belastungsintensität durch das Intervallprogramm wurden zu festgelegten Zeitpunkten (siehe Abbildung 3.2) die Laktatkonzentrationen im Blut gemessen. Intensive Intervallprogramme

finden oberhalb der anaeroben Schwelle statt. Die Höhe der erzielten Laktatkonzentration ist von der Belastungsintensität und der Pausendauer abhängig (KINDERMANN 2004). Die erzielte Laktatkonzentration von $5,7 \pm 1,6$ bzw. $5,1 \pm 1,8$ mmol/l nach der Belastung 1 und 2 zeigen, verglichen mit der Laktatkonzentration von $2,9 \pm 0,6$ mmol/l an der IAS, dass bei der von uns gewählten Belastungsform eine anaerobe Energiegewinnung stattfindet und die Voraussetzungen für ein intensives Training erfüllt werden.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede der Herzfrequenzen und der Laktatkonzentrationen nach den Intervallprogrammen, ganz gleich, ob eine aktive oder passive Erholung folgte. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Probanden einen vergleichbaren Erschöpfungszustand, unabhängig von den bevorstehenden Interventionen, hatten.

Die signifikanten Unterschiede der Herzfrequenzen zwischen aktiver und passiver Erholung nach beiden Erholungsregimen, waren zu erwarten. Allerdings lässt die Herzfrequenz von 142 bzw. 148 Schlägen pro Minute im Anschluss an die aktive Erholung die Frage aufkommen, ob die Belastungsintensität der aktiven Erholung mit 60% der Leistung an der IAS eventuell zu hoch gewählt wurde. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass ein Großteil der Athleten bestätigte, dass sie ihre sonstigen Ausfahrprogramme mit einer geringeren Intensität durchführen und die von uns gewählte Intensität sie weiter ermüdete. Dies wurde jedoch nicht systematisch in einer Befragung festgehalten. Die empfohlene Herzfrequenz bei regenerativen Belastungen liegt um 72% der maximalen Herzfrequenz und bei einer Leistung von 70% der IAS (KINDERMANN & COEN 1998). Die aktive Erholung der Studie erfolgte mit 75% bzw. 78% der max. Herzfrequenz, was leicht über der empfohlenen Höchstfrequenz liegt. Am Ende der aktiven Regeneration bestand eine Laktatkonzentration von $1,5 \pm 0,4$ mmol/l, die damit deutlich unter der empfohlenen Laktathöchstgrenze von 2 mmol/l liegt. Die stark abgefallenen Laktatkonzentrationen im Blut der Athleten bis in den Bereich der Ruhelaktatwerte lassen jedoch die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der aktiven Erholung um eine regenerative Maßnahme handelte.

Die Laktatkonzentrationen unterschieden sich zu den Zeitpunkten nach Regeneration 1 bzw. 2 zwischen passiver und aktiver Erholung signifikant. Die Konzentration nach aktiver Erholung ist niedriger, da durch den angeregten aeroben Muskelstoffwechsel vermehrt Laktat in Brenztraubensäure überführt und als direktes energielieferndes Substrat mittels aerober Oxidation in den roten Muskelfasern und dem Herzmuskel verstoffwechselt wird (WACKERHAGE & LEYK 2000, MADER 2003).

5.6 Kreatinkinase und Harnstoff

Die große Muskelspezifität der Kreatinkinase macht sie zum meist verwendeten Serumindikator für muskuläre Schädigungen (CLARKSON & TREMBLAY 1988). BERG und KEUL (1982) begründen die erhöhten Ruhe-Kreatinkinasewerte bei Sportlern mit der langen Abbauhalbwertszeit des Enzyms. SCHARHAG und URHAUSEN (2007) beschreiben eine regelhafte CK-Konzentration im Blut von Leistungssportlern von 200 bis 500 U/l. Eher selten findet man Konzentrationen unter 200 U/l. Die Athleten unserer Studie hatten vor Testbeginn durchschnittliche Werte von 155 U/l, was auf eine geringe muskuläre Vorschädigung hinweist. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die geforderte Entlastung vor den Testreihen eingehalten wurde.

TIIDUS und IANUZZO (1983) entwarfen ein Testprotokoll für "intensive Belastung", "dauernde Belastung" und "konstante Belastung" und bestimmten die CK-Veränderungen im Blut. Es zeigten sich höhere CK-Anstiege 24 Stunden nach intensiver Belastung als bei den anderen Belastungsformen. SCHUSTER (1981) beobachtete nach dynamisch zyklischen Belastungen (z.B. Radfahren) geringere CK-Anstiege als nach azyklischen Belastungen (z.B. Turnen). Der ausbleibende Anstieg der CK-Konzentrationen im Blut 24 Stunden nach Belastung lässt vermuten, dass bei intensivem Radtraining trotz einer intensiven Belastung geringere Mengen Kreatinkinase anfallen. Des Weiteren erfolgt eine Anpassung des Körpers auf vergleichbare körperliche Belastungen und daraus resultierende geringe Schädigungen des Muskels mit folgenden

niedrigeren CK-Konzentrationen im Blut (ARMSTRONG et al. 1983, CLARKSON & TREMBLAY 1988, KUIPERS 1994, URHAUSEN & KINDERMANN 2000). Es ist davon auszugehen, dass die Muskulatur der sehr gut trainierten Athleten unserer Studie an intensive Belastungen gewöhnt ist und es dadurch ebenfalls zu keinem signifikanten Anstieg 24 Stunden nach Belastung kommt.

Die Harnstoffkonzentration im Blut ist ein Parameter zur Beurteilung der metabolischen Belastung (HARALAMBIE & BERG 1976, KINDERMANN & URHAUSEN 1988). Die Harnstoffkonzentrationen der Sportler in unserer Studie liegen mit 24 bis 59 mg/dl sogar im Normbereich von Nichtsportlern, der 17 bis 56 mg/dl beträgt (SCHMIDT und THEWS 1997). Um Veränderungen der Harnstoffkonzentration nach dem Training feststellen zu können, sollte bei intensiven Belastungen die Mindestdauer 30 Minuten betragen (LORENZ & GERBER 1979). Die Interventionsdauer in unserer Studie ist mit 23 Minuten sehr wahrscheinlich zu kurz, um einen Anstieg des Harnstoffs zu induzieren. HARALAMBIE und BERG (1976) sowie SCHMITT et al. (1981) setzten als Mindestbelastungsdauer sogar eine Stunde an. Nach COEN et al. 2001 ist Harnstoff für einmalige, kurze Belastungen als Parameter nicht sensitiv genug. Ebenfalls trat kein Unterschied in der Harnstoffkonzentration zwischen aktiver und passiver Erholung auf.

Es lässt sich daraus schließen, dass keiner der Probanden mit einer katabolen Stoffwechsellage die Studie in Angriff nahm und die Intervallbelastung mit anschließender aktiver oder passiver Intervention scheinbar zu keiner übermäßigen metabolischen Belastung für den Körper führte.

5.7 Methodenkritik

Es erfolgte keine Bestimmung von Kortisol und Katecholaminen. Diese Hormone haben einen großen Einfluss auf das Immunsystem und wären zur Interpretation der Veränderung durch die beiden Erholungsregime hilfreich. Die einzigen Daten über das Verhalten von Kortisol und Katecholaminen bei aktiver und passiver Erholung stammen aus der Studie von WIGERNAES et al. (2001). Im oxidativen Burst zeigten sich große Standardabweichungen auf Einzelzellniveau (Fluoreszenzintensität). Obwohl dies schon im Verlauf der Studie auffiel und eine Fehlersuche und noch sorgfältigere Bearbeitung der Proben erfolgte, konnte keine Besserung der Streuung erreicht werden.

Die Messung der NK-Zell-Zytotoxizität war eventuell mit dem Verhältnis 50:1, sowie 25:1 und 50:1 stimuliert mit Interleukin-2 nicht sensitiv genug. Bei diesen Konzentrationen wurden meist über 80% der Target-Zellen abgetötet und eventuell in Sinne einer kompetitiven Hemmung das Ergebnis beeinflusst. Eine zusätzliche Bestimmung der Konzentration 12,5:1 könnte eine präzisere Aussage ermöglichen.

Ebenfalls könnte der Entnahmezeitpunkt von TNF- α zu spät gewählt worden sein. Die Entnahme wäre besser zum Entnahmezeitpunkt 8, also 60 Minuten nach Belastung zwei durchgeführt worden als zweieinhalb Stunden nach Belastungsende, da zu einem früheren Zeitpunkt eher mit einem Effekt zu rechnen gewesen wäre.

Zur Interpretation des Einflusses von intensiven Belastungen auf das TH1/Th2-Zell-Muster wäre die Bestimmung mindestens eines Zytokins, das von TH1-Zellen produziert wird (Interleukin-12 oder Interleukin-2), erforderlich gewesen.

6 Abkürzungen

AE	Aktive Erholung
Ag	Antigen
APR	Akute Phase Reaktion
Bel	Belastung
C	Celsius
CD	Cluster of differentiation
CK	Kreatinkinase
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CRP	C-reakives Protein
DHR	Dihydrorhodamin 123
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EASIA	Enzyme Amplified Sensitivity Immunassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Einfahren
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FcγRIII	niedrigaffiner Fc-Rezeptor
FFA	Free fatty acids
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
fMLP	Formyliertes 1-Methionyl-1-Leucyl-1-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter
γ-GT	Gammaglutamyltransferase
Ges _{abs}	Absolute Zellzahl der Gesamtpopulation
Ges _{proz}	Prozentualer Anteil an der Gesamtpopulation

Gly	Glycerin
GOT	Glutamat-Oxalatat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HDL-C	High-density-lipoproteins-Cholesterol
HF	Herzfrequenz
HGH	Human growth hormone
Hk	Hämatokrit
HLDA	Human Leukocyte Differentiation Antigens
HS	Harnstoff
Hz	Herz
IAS	Individuelle Anaerobe Schwelle
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IU	International Units
kg	Kilogramm, 10^3 Gramm
Kort	Kortison
l	Liter
LBP	lipopolysaccharidbindendes Protein
Li-Heparin	Lithium-Heparin
LPS	Lipopolysaccharid
MAK	Monoklonale Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter, 10^{-3} Liter
μ l	Mikroliter, 10^{-6} Liter
mM	Millimolar, 10^{-3} Molar
mmol	Millimol, 10^{-3} Mol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NA ⁺	Natrium
NADPA	Nicotinsäureamind-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat

nm	Nanometer, 10^{-9} Meter
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Ox.Burst	Oxidativer Burst
p	Post
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Passive Erholung
pg	Pikogramm, 10^{-12} Gramm
PVK	Plasmavolumenkorrektur
Ra	Rezeptorantagonist
RG	Reagenzglas
R-PE	R-Phycoerythrin
R-PE-Cy5	R-Phycoerythrin-Cyanin-5
SNARF-1/AM	Carboxy-Semi-Naphto-Rhoda-Fluor-1-Acetoxy-Methyl-Ester
SSC	Side Scatter
Sub _{abs}	Absolute Zellzahl der Subpopulation
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
Tri	Tirglyceride
U	Umdrehungen
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VO _{2max}	Maximale Sauerstoffaufnahme
W	Watt

7 Literaturverzeichnis

- [01] Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA (1983) Eccentric exercise induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 54: 80-93
- [02] Armstrong RB (1984) Mechanisms of exercise-induced delayed onset muscular soreness: a brief review. *Med Sci Sports Exerc.* 16: 529-538
- [03] Athens JW, Hab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, Wintrobe MM (1961) Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest.* 40: 989-995
- [04] Bangsbo J, Graham T, Johansen L, Saltin B (1994) Muscle lactate metabolism in recovery from exhaustive exercise: impact of light exercise. *J Appl Physiol.* 77: 1890-1895
- [05] Benschop R, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M (1996) Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun.* 10: 77-91
- [06] Berczi I (1997) Pituitary function and immunity. In: Hofman-Goetz L (Hrsg.): *Exercise and immune function.* CRC Press. Boca Raton, New York, London, Tokio: 232-244
- [07] Berg A, Keul J (1982) Serumenzymkinetik während und nach intensiver Langzeitbelastung. *Dtsch Z Sportmed.* 8: 12-17
- [08] Berg A, Lais M, Huber G, Keul J (1985) Effekt einer biologischen Wirkstoffkombination auf die belastungsinduzierte Immunreaktion bei Ausdauersportlern. *Medizinische Klinik* 80: 319-322
- [09] Berk LS, Nieman DC, Youngberg WS, Arabatzis K, Simpson-Westerberg M, Lee JW, Tan SA, Eby WC (1990) The effect of long endurance running on natural killer cells in marathoners. *Med Sic Sports Exerc.* 22: 207-212
- [10] Bishop CR, Athens JW, Boggs DR, Warner HR, Cartwright GE, Wintrobe MM (1968) Leukokinetic studies. 13. A non-steady-state kinetic evaluation of mechanism of cortisone-induced granulocytosis. *J Clin Invest.* 47: 249-260
- [11] Brenner IK, Shek PN, Shephard RJ (1994) Infection in athletes. *Sports Med.* 17: 86-107

- [12] Burgard U, Gabriel H, Gisch K, Kettler K, Müller HJ, Kindermann W (1997) Extracellular pH and L(+)-lactate concentrations alter the function of neutrophils: Effects on intracellular pH and oxidative burst. *Int J Sports Med.* 18: 106
- [13] Calabrese LH, Nieman DC (1996) Exercise, immunity and infection. *J Am Osteopath Assoc.* 96: 166-176
- [14] Cannon JG, Kluger MJ (1983) Endogenous pyrogen activity in human plasma after exercise. *Science* 220: 617-619
- [15] Cannon JG, Evans WJ, Hughes VA, Meredith CN, Dinarello CA (1986) Physiological mechanisms contributing to increased interleukin-1 secretion. *J Appl Physiol.* 61: 1869-1874
- [16] Cannon JG, Meydani SN, Fielding RA, Fiatorone MA, Meyadani M, Farhangmehr M, Orencole SF, Blumberg JB, Evans WJ (1991) Acute phase response in exercise. II. Associations between vitamin E, cytokines and muscle proteolysis. *AM J Physiol.* 260: 1235-1240
- [17] Cannon JG (1993) Exercise and resists to infection. *J Appl Physiol.* 74: 973-981
- [18] Clarkson PM, Tremblay I (1988) Exercise-induced muscle damage, repair, and adaptation in humans. *J Appl Physiol* 65: 1-6.
- [19] Coen B, Urhausen A, Blasko K, Bott W, Kindermann W (2001) Beeinflussung des Erholungsverhaltens im Mikrozyklus durch unterschiedliche Trainingsformen bei ausdauertrainierten Sportlern. *Dtsch Ztg Sportmed.* 52: 42
- [20] Davis JM, Kohut ML, Colbert LH, Jackson DA, Ghaffar A, Mayer EP (1997) Exercise, alveolar macrophage function, and susceptibility to respiratory infection. *J Appl Physiol.* 83: 1461-1466.
- [21] Dill DB, Costill DL (1974) Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol.* 37: 247-248
- [22] Dodd S, Power SK, Callender T, Brooks E (1984) Blood lactate disappearance at various intensities of recovery exercise. *J Appl Physiol.* 57: 1462-1465
- [23] Donnelly AE, Clarkson PM, Maughan RJ (1992) Exercise-induced muscle damage: effects of light exercise on damaged muscle. *Eur Appl Physiol.* 64: 350-353

- [24] Dufaux B, Order U (1985) Complement activation after prolonged exercise. *Clin Chim Acta.* 179 : 45-49
- [25] Dufaux B, Order U (1989) Plasma elastase-alpha-1-antitrypsin, neopterin, tumor necrosis factor and soluble interleukin-2 receptor after prolonged exercise. *Int J Sports Med.* 10: 434-438
- [26] Elenkov IJ, Chrousos GP(1999) Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trends Endocrinol Metab* 10: 359–368
- [27] Espersen GT, Elbaek A, Ernst E, Toft E, Kaalund S, Jersild C, Grunnet N (1990) Effect of physical exercise on cytokines and lymphocyte subpopulations in human peripheral blood. *APMIS* 98: 395-400
- [28] Evans WJ, Meredith CN, Cannon JG, Dinarello CA, Frontera WR, Hughes VA, Jones BH, Knuttgen HG (1986) Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. *J Appl Physiol.* 61: 1864-1868
- [29] Falk B, Einbinder M, Weinstein Y, Epstein S, Karni Y, Yarom Y, Rotstein A (1995) Blood lactate concentration following exercise: effects of heat exposure and of active recovery in heat-acclimatized subjects. *Int J Sports Med.* 16: 7-12
- [30] Febbraio MA, Pedersen BK (2002) Musckle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 16: 1335-1347
- [31] Febbraio MA, Ott P, Nielsen HB, Steensberg A, Keller C, Krstrup P, Secher NH, Pedersen BK (2003) Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Amer J Physiol.* 285: 397-402
- [32] Ferry A, Picard F, Duvallet A, Weill B, Rieu M (1990) Changes in blood leukocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol.* 59 : 435-42
- [33] Fitzgerald L (1991) Overtraining increases the susceptibility to infection. *Int. J Sports Med.:* 5-8
- [34] Franchimont D, Galon J, Gadina M, Visconti R, Zhou Y, Aringer M, Frucht DM, Chrousos GP, and O'Shea JJ (2000) Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. *J Immunol* 164: 1768–1774

- [35] Furusawa K, Tajima F, Umezu Y, Ueta M, Ide M, Mizushima T, Ogata H (2003) Activation of natural killer cell function in recreational athletes with paraplegia during a wheelchair half-marathon race. *Arch Phys Med Rehabil.* 84: 706-711
- [36] Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W (1991) Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. *Eur J Appl Physiol.* 63: 449-457
- [37] Gabriel H, Schwarz L, Steffens G, Kindermann W (1992a) Immunregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sport Med.* 13: 359-366
- [38] Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W (1992b) Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 65: 164-170
- [39] Gabriel H, Müller HJ, Urhausen A, Kindermann W (1994) Suppressed PMA-induced oxidative burst and unimpaired phagocytosis of circulating granulocytes one week after a long endurance exercise. *Int J Sports Med.* 15: 441-445
- [40] Gabriel H, Kindermann W (1997a) Beanspruchung des Organismus durch körperliche Aktivität – Akute und chronische Veränderungen zellulärer und löslicher Faktoren unter besonderer Berücksichtigung von Regulations- und Repairmechanismen. Habilitationsschrift, Universität des Saarlandes
- [41] Gabriel H, Kindermann W (1997b) The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Med.* 18: 28-45
- [42] Gabriel H, Kindermann W (1997c) Impact of different modes of exercise on neutrophil oxidative burst and intracellular pH. *Med Sci Sports Exerc.* 29: 158
- [43] Gabriel H, Kindermann W (1998) Leistungssport und Immunsystem. *Leistungssport Nr. 5:* 4-13
- [44] Gabriel H (2000) Sport und Immunsystem. Modulation und Adaptation der Immunität durch Belastung und Training. Karl Hofmann, Schorndorf
- [45] Gabriel H, Müller HJ, Kindermann W (2000) Die Akute-Phase-Reaktion. *Dtsch Z Sportmed.* 51: 31-32
- [46] Gabriel H, Scharhag J, Rätz M, Kindermann W (2003) Charakterisierung der sofortigen Leukozytose nach anaerober Belastung. *Dtsch Z Sportmed;* 54: 274-280

- [47] Gader AM, Cash JD (1974) The effect of adrenaline, noradrenaline, isoprenaline and salbutamol on the resting levels of white blood cells in man. *Scand J Haemat.* 14: 5-10
- [48] Ganter U, Arcone R, Toniatto C, Morrone G, Ciliberto G (1989) Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukine-1 and interleukin-6. *EMBO J.* 8: 3773-3779
- [49] Gupta S, Goswami A, Sadhukhan AK, MarthuvDN (1996) Comparative study of lactate removal in short term massage of extremities, active recovery and a passive recovery period after supramaximal exercise sessions. *Int J Sports Med.* 17: 106-110
- [50] Hack V, Strobel G, Rau JP, Weicker H (1992) The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 65: 520-524
- [51] Haralambie G (1969) Serum glycoproteins and physical exercise. *Clin Chim Acta.* 26: 287-291
- [52] Haralambie G, Berg A (1976) Serum urea and amino nitrogen changes with exercise duration. *Eur J Appl Physiol.* 35: 39-48
- [53] Heck H (1990) *Energiestoffwechsel und Medizinische Leistungsdiagnostik.* Trainerakademie Köln (Hrsg.). Hofmann, Schorndorf 2. Auflage
- [54] Hermansen L, Stensvold I (1972) Production and removal of lactate during exercise in man. *Acta Physiol Scand.* 86: 191-201
- [55] Hoffmann-Goetz L, Pedersen BK (1994) Exercise and the immune system: a model of the stress response. *Immunology today* 15: 382-387.
- [56] Ibfelt T, Petersen EW, Bruunsgaard H, Sandmand M, Pedersen BK (2002) Exercise-induced change in type 1 cytokine-producing CD8+ T cells is related to a decrease in memory cells. *J Appl Physiol.* 93(2): 645-648
- [57] Janeway CA, Travers P (1997) *Immunologie.* 2. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg
- [58] Kindermann W, Schnabel A, Schmitt WM, Biro G, Cassens J, Weber F (1982) Catecholamines, growth hormone, cortisol, insulin and sex hormones in anaerobic and aerobic exercise. *Eur J Appl Physiol.* 42: 25-34
- [59] Kindermann W (1987) Ergometrie-Empfehlung für die ärztliche Praxis. *Dtsch Z Sportmed.* 38: 244-268

- [60] Kindermann W, Urhausen A (1988) Möglichkeiten der Trainingsüberwachung im Rudersport. In: Steinacker JM (Hrg.): Rudern – Sportmedizinische und Sportwissenschaftliche Aspekte. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag: 55-61
- [61] Kindermann W, Coen B (1998) Aerob-anaerobe Schwellenkonzentration zur Trainingssteuerung. In: Jeschke D, Lorenz R, (Hrg.): Sportspezifische Leistungsdignostik: Energetische Aspekte. Köln: Sport und Buch Strauß: 37-47
- [62] Kindermann W (2004) Anaerobe Schwelle. Dtsch Z Sportmed 55: 161-162
- [63] Klonz A, Wonigeit K, Pabst R, Westermann J (1996) The marginal pool of the rat contains not only granulocytes, but also lymphocytes, NK-cells and monocytes: a second intravascular compartment, its cellular composition, adhesion molecule expression and interaction with the peripheral blood pool. Scand j Immunol. 44: 461-469
- [64] Kuipers H, Keizer HA (1988) Overtraining in elite athletes. Review and directions for the future. Sports Med. 6: 79-92
- [65] Kuipers H (1994) Exercise-induced muscle damage. Int J Sports Med. 15: 132 –135
- [66] Lancaster GI, Halson SL, Khan Q, Drysdale P, Wallace P, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M (2004) Effect of acute exhaustive and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. Exerc Immunol Rev. 10: 91-106
- [67] Lehmann M, Foster C, Keul J (1993) Overtraining in endurance athletes: a brief review. Medicine and Science in Sports and Exercise 25: 854-862
- [68] Liesen H, Dufaux B, Hollmann W, (1977) Modifications of serum glycoproteins the days following a prolonged physical exercise and the influence of physical training. Eur J Appl Physiol. 37: 243-254
- [69] Lorenz R, Gerber G (1979) Harnstoff bei körperlicher Belastung: Veränderung der Synthese, der Blutkonzentration und der Ausscheidung. Medizin und Sport 19: 240-48
- [70] MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, Szasz IJ, McKenzie DC (1996) Presence of WBC decreased strength and delayed soreness in muscle after eccentric exercise. J Appl Physiol. 80: 1006-1013
- [71] Mackinnon LT (1999) Advances in Exercise Immunology. Human Kinetics Publishers

- [72] Mader A (2003) Glycolysis and oxidative phosphorylation as function of cytosolic phosphorylation state and power output of muscle cell. *Eur J Appl Physiol.* 88 : 317-38
- [73] Malm C (2001) Immunological changes in human blood and skeletal muscle in response to physical exercise. Karolinska University Press
- [74] McLelland TM, Skinner JS (1982) Blood lactate removal during active recovery related to the aerobic threshold. *Int J Sports Med.* 3: 224-229
- [75] Meyer T, Gabriel H, Kindermann W (1999) Is determination of exercise intensities as percentages of VO_2 max or Hr_{max} adequate? *Med Sci Sports Exerc* 31: 1342-1345
- [76] Meyer T, Gabriel H, Rätz M, Müller HJ, Kindermann W (2001) Anaerobic exercise induces moderate acute phase response. *Med Sci Sports Exerc.* 33: 549-555
- [77] Moldoveanu AI, Shephard RJ and Shek PN (2000) Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta , IL-6 and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol.* 89: 1499-1504
- [78] Morel PA, Oriss TB (1998) Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 18: 275–303
- [79] Muta H, Boise LH, Fang L, Podack ER (2000) CD30 signals integrate expression of cytotoxic effector molecules, lymphocyte trafficking signals, and signals for proliferation and apoptosis. *J Immunol.* Nov.: 105-111
- [80] Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Schmitt RL, Bailey EM, Warren BJ, Utter A, Davis JM (1997) Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol.* 82: 1662-1667
- [81] Nielsen HB, Secher NH, Kappel B, Hanel B, Pedersen BK (1996) Lymphocyte, NK and LAK responses to maximal exercise. *Int J Sports Med.* 17: 60-5
- [82] Nieman DC, Johannsen LM, Lee JW, Cermak J, Arabatzis K (1990) Infectious episodes in runners before and after the Los Angeles Marathon. *J Sports Med Phys Fitness* 30: 316-328
- [83] Nieman DC, Henson DA, Johnson R, Lebeck L, Davis JM, Nehlsen-Cannarella SL (1992) Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Med Sci Sports Exerc.* 24: 1339-1345

- [84] Nieman DC (1994) Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med sci Sports Exerc.* 26: 128-139
- [85] Nieman DC, Ahle JC, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Davis JM, Buckley KS, Simandle S, Butterworth DE, Fagoaga OR, Nehlson-Canarella SL, (1995) Indomethacin does not alter natural killer cell response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol.* 79: 748-755
- [86] Nieman DC, Nehlson-Canarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, Butterworth DE (1998) Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *J Appl Physiol.* 84: 1252-1259
- [87] Nieman DC (2000) Exercise effects on systemic immunity. *Immunology and Cell Biology.* 78: 496-501
- [88] Nieman DC (2001) Exercise immunology: nutritional countermeasures. *Can J Appl Physiol.* 26 Suppl: 45-55
- [89] Noakes TD (1987) Effects of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Med.* 4: 245-267
- [90] Norhoff H, Berg A (1991) Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 12: 9-15
- [91] Norhoff H, Weinstock C, Berg A (1994) The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med.* 15: 167-171
- [92] Nowacki PE (1987) Trainingssteuerung. In: Eberspächer, H (Hrsg.): *Handlexikon Sportwissenschaft.* Rowohlt, Reinbek (1. Auflage): 504-507
- [93] Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S and Pedersen BK (1998) Evidence that IL-6 is produced in skeletal muscle during intense long-term muscle activity. *J Physiol.* 508: 949-953
- [94] Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK (1999) Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 515: 287-291
- [95] Peake JM, Suzuki K, Hordern M, Wilson G, Nosaka K, Coombes JS (2005) Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol.* 6: 1-8
- [96] Pedersen BK, Tvede N, Hansen FR, Andersen V, Bendix T, Bendixen G, Galbo H, Haahr PM, Klarlund K, Sylvest J, Thomsen BS, Halkjaer-Kristensen J (1988) Modulation of natural killer cell activity in peripheral blood by physical exercise. *Scand J Immunol.* 27: 673-678

- [97] Pedersen BK, Ullum H (1994) NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc.* 26: 140–146
- [98] Pedersen BK (2000) Exercise and cytokines. *Immunol Cell Biol.* 78: 532-535
- [99] Pedersen BK, Hoffman-Goetz L (2000) Exercise and the immune system: Regulation integration and adaptation. *Physiological Reviews* 80: 1055-1081
- [100] Pedersen BK, Steensberg A and Schjerling P (2001) Muscle-derived interleukin-6: possible biological effect. *J Physiol.* 536: 329–337
- [101] Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Febbraio M and Saltin B (2003) Searching for the exercise factor - is IL-6 a candidate? *J Muscle Research and Cell Motility* 24: 113–119
- [102] Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E and Febbraio M (2004) The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 263–267
- [103] Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S and Pedersen BK (2003) Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB J* 17: 2166–2168
- [104] Peters EC (1996) Exercise and upper respiratory tract infections: a review. *SAfr J Sports Med.:* 9-14
- [105] Porta S, Rinner G, Rangetiner B, Sadjak (1985) Enhancement of adrenaline plasma-levels shortens adrenaline half-time. *Horm Metab Res.* 17: 264-265
- [106] Pyne DB, Baker MS, Smith JA, Telford RD, Weidemann MJ (1996) Exercise and the neutrophil oxidative burst: biological and experimental variability. *Eur J Appl Physiol.* 74: 564-571
- [107] Richards C, Gauldie J (1995) Role of cytokines in acute-phase-response. In: Aggarwal BB, Puri RK (Hrsg.): *Human cytokines: Their roles in disease and therapy.* Cambridge (MA): Blackwell Sciencs Inc.: 253-269
- [108] Robson PJ, Bouic PJ, Myburgh KH (2003) Antioxidant supplementation enhances neutrophil oxidative burst in trained runners following prolonged exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab. Sep;* 13: 369-81
- [109] Romagnanis S (1999) Th1/Th2 cells. *Inflamm. Bowel Dis* Nov; 5: 285-294

- [110] Rothe G, Kellermann W, Schaerer B, Valet G, (1994) Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Kap. Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxidproduktion von Granulozyten und Monozyten mit Dihydro-rhodamin 123. Stuttgart, New York: Schattauer
- [111] Saxton JM, Donnelly AE (1995) Light concentric exercise during recovery from exercise-induced muscle damage. *Int J Sports Med.* 16: 347-351
- [112] Scharhag J, Meyer T, Gabriel HH, Auracher M, Kindermann W (2002) Mobilization and oxidative burst of neutrophils are influenced by carbohydrate supplementation during prolonged cycling in humans. *Eur J Appl Physiol.* Oct; 87 (6): 584-587. Epub 2002 Jul 24.
- [113] Scharhag J (2004) Die Belastungsleukozytose. *Dtsch Z Sportmed.* 55: 57-58
- [114] Scharhag J, Meyer T, Gabriel HH, Schlick B, Faude O, Kindermann W (2005) Does prolonged cycling of moderate intensity immune cell function?. *Br J Sports Med.* 39: 171-177
- [115] Scharhag J, Meyer T, Auracher M, Gabriel HH, Kindermann W (2006) Effects of graded carbohydrate supplementation on the immune response in cycling. *Med Sci Sports Exerc.* Feb; 38: 286-292
- [116] Scharhag J, Urhausen A (2007) Kardiale Marker und körperliche Belastung. In: Kindermann W (Hrsg.): *Sportkardiologie – Körperliche Aktivität bei Herzerkrankungen.* Steinkopff, Darmstadt (2. Auflage): S. 119-135.
- [117] Schedlowski M, Falk A, Rohne A, Wagner TO, Jacobs R, Tewes U, Schmidt RE (1993) Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J Clin Immunol.* 13: 344-351
- [118] Schmidt RF, Thews G (1997) *Physiologie des Menschen.* 27. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 411-447 und 672-696
- [119] Schmitt WM, Kindermann W, Schnabel A, Biro G (1981) Metabolismus und hormonelle Regulation bei Marathonläufern unter besonderer Berücksichtigung von Lebensalter, Trainingszustand und Geschlecht. *Dtsch Z Sportmed.* 1: 1-7
- [120] Schulz G (1893) Experimentelle Untersuchung über das Vorkommen und die diagnostische Bedeutung der Leukocytose. *Dtsch Archiv Klin Med.* 51: 584-587
- [121] Schulz T (2002) *Ausdauersport und Immunsystem.* Sport und Buch Strauß, Köln

- [122] Schuster HG (1981) Zur leistungsdiagnostischen Relevanz der Serumkreatinkinase (CK) und des Isoenzym Kreatinkinase (CK-MB). Leipzig, FKS, Forschungsergebnis
- [123] Shephard RJ (1997) Physical activity, training and the immune response. Cooper Publishing Group, Carmel
- [124] Shephard RJ, Shek PN (1999) Exercise, immunity and susceptibility to infection. *Phys Sports Med.* 27: 47-71
- [125] Shephard RJ (2000) Overview of the epidemiology of exercise immunology. *Immun cell Biol.* 78: 485-495
- [126] Shinkai S, Shore S, Shek P, Shephard RJ (1992) Acute exercise and immune function: Relationship between lymphocyte subset counts. *Int J SportsMed* 17: 597-603
- [127] Smith JK, Chi DS, Krish G, Reynolds S, Cambron G (1990) Effect of exercise on complement activity. *Ann Allergy.* 65: 304-310
- [128] Sprenger H, Jacobs C, Nain M, Gressner AM, Prinz H, Wesemann W, Gemsa D (1992) Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors and neopterin after long distance running. *Clin Immunology and Immunopathology* 63: 188-195
- [129] Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ and Febbraio MA (2001) Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running.. *Am J Physiol. Cell Physiol* 280: 769-774
- [130] Starkie RL, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK (2003) Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB J* 17: 884-886
- [131] Steensberg A, Van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen BK (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 529(1): 237-242
- [132] Steensberg A, Toft AD, Bruunsgaard H, Sandmand M, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen BK (2001) Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *J Appl Physiol.* 91: 1708-1712
- [133] Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Moller K, Pedersen BK (2003) IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285: 433-437

- [134] Stegmann H, Kindermann W, Schnabel A (1981) Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med.* 2: 160-165
- [135] Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K (2002) Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol. Rev* 8: 6-48
- [136] Suzui M, Kawai T, Kimura H, Takeda K, Yagita H, Okumura K, Shek PN, Shephard RJ (2004) Natural killer cell lytic activity and CD56 (dim) and CD56 (bright) cell distributions during and after intensive training. *J Appl Physiol* 96: 2167-2173
- [137] Swain D, Wright R (1997) Prediction of VO_2 peak from submaximal cycle ergometry using 50 versus 80 rpm. *Med Sci Sports Exerc.* 29: 268-272
- [138] Taylor C, Rogers G, Goodman C, Baynes RD, Bothwell TH, Bezwoda WR, Kramer F, Hattingh J (1987) Hematologic, iron related, and acute-phase protein responses to sustained strenuous exercise. *J Appl Physiol.* 62: 464-469
- [139] Tidball JG (1995) Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med Sci Sports Exercise* 27: 464-469
- [140] Tiidus PM, Ianuzzo CD (1983) Effects of intensity and duration on delayed soreness and serum enzyme activities. *Med Sci Sports Exerc.* 6: 461-65
- [141] Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer Kristensen J and Pedersen BK (1994) Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1alpha, IL-1beta, IL-6 or TNF-alpha pre.mRNA in BMNC. *J Appl Physiol.* 77: 93-97.
- [142] Urhausen A, Gabriel H, Kindermann W (1995) Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Medicine* 20: 251-276
- [143] Urhausen A, Kindermann W (2000) Aktuelle Marker für die Diagnostik von Überlastungszuständen in der Trainingspraxis. *Dtsch. Sportmed.* 7+8: 226-233
- [144] Van Kaer L, Joyce S (2005) Innate immunity: NKT cells in the spotlight. *Curr Biol.* 7;15: 429-31
- [145] Van Tits LJ, Michel MC, Grosse-Wilde H, Happel M, Eigler FW, Soliman A, Brodde OE (1990) Catecholamines increase lymphocyte beta 2-adrenergic receptors via the beta 2-adrenergic, spleen-dependent process. *J Appl Physiol.* 258: 191-202
- [146] Wackerhage H, Leyk D (2000) Muskulärer Energiestoffwechsel. *Sport & Buch Strauß, Köln*

- [147] Weidner TG (1994) Literature review: upper respiratory illness and sport and exercise. *Int J Sports Med.* 15: 1-9
- [148] Weight LM, Alexander D, Jacobs P (1991) Strenuous exercise: analogous to the acute phase response? *Clin Sci* 81: 677-683
- [149] Wigernaes I, Hostmark AT, Kierulf P, Stromme SB (2000) Active recovery reduces the decrease in circulating white blood cells after exercise. *Int J Sports Med.* 21: 608-612
- [150] Wigernaes I, Hostmark AT, Stromme SB, Kierulf P, Birkeland K (2001) Active recovery and post-exercise white blood cell count, free fatty acids, and hormones in endurance athletes. *Eur J Appl Physiol.* 84: 358-366.
- [151] Yednock TA, Rosen SD (1990) Lymphocyte homing. *Advances in Immunology* 44: 313-378

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. W. Kindermann für die Möglichkeit, diese Studie am Institut für Sport- und Präventivmedizin durchführen zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Jürgen Scharhag für die gute Betreuung und Beratung während der letzten Jahre.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Sport- und Präventivmedizin, die mich während der praktischen Durchführung der Studie unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang den medizinisch-technischen Assistenten Frank Keim für die besonders gute Zusammenarbeit im Immunologielabor.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, deren geduldige und liebevolle Unterstützung diese Arbeit erst möglich gemacht hat. Besonders bedanken möchte ich bei meiner Frau Alena und deren Mutter, Heide Pönnighaus, für die gründliche, mehrmalige Korrekturarbeit.

Dem Bundesinstitut für Sportwissenschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei den 23 Probanden bedanken, die mit ihrem Einsatz die Studie erst möglich machten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franzmann
Vorname: Joachim
Geburtsdatum/-ort: 20.07.1974, Birkenfeld
Anschrift: Koblenzer Str. 64
50968 Köln

Familienstand: seit 2001 mit Dipl. Psych. Alena Franzmann
geb. Pönnighaus verheiratet

Kinder: Maja Franzmann, *06.12.2004 in Saarbrücken
Jonathan Franzmann, *09.10.2006 in Köln

Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch

Schulbildung

1981 – 1985 Grundschole Algenrodt
1985 – 1991 Hauptschole Algenrodt / Birkenfeld
1991 – 1994 Heinrich-Heine-Gymnasium Kaiserslautern
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr

1994 – 1996 Sportförderkompanie Warendorf und Mainz

Hochschulstudium

1996 – 2004 Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
04.05.2004 Ärztliche Prüfung
01.10.2004 Approbation als Arzt

Berufspraxis

2004 – 2006 Allgemein-, Gefäß- und Unfallchirurgie im Knappschaftskrankenhaus Sulzbach
seit 2006 Orthopädie im Krankenhaus der Augustinerinnen Köln

Sonstiges

1993 – 2000 Triathlon Nationalmannschaft
seit 2006 Zusatzbezeichnung Sportmedizin