

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin (IKET) und Zentrum für Klinische und
Transfusionsmedizin Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

**Einfluss einer vierstündigen Hypoxieexposition (12,5% O₂) auf
die Expression von hypoxie- und stressinduzierbaren Proteinen
in Zusammenhang mit Antioxidantien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Katrin Höchst

aus

Bonn

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nieß

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Oxidativer Stress.....	3
1.2	Erythropoietin.....	4
1.3	HIF- 1 α	5
1.4	Hitzeschockproteine.....	7
1.5	Induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS).....	11
1.6	Phagozytose	11
1.7	Oxidativer Burst.....	12
1.8	Antioxidantien	14
1.9	Ziele des Gesamtprojektes	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Probanden und Studiendesign:.....	16
2.2	Experimentelles Procedere	17
2.3	Analytisches Procedere	19
2.3.1	Erythropoietin im Plasma.....	19
2.3.2	α - Tocopherol- Konzentration im Plasma.....	19
2.3.3	Blutgase und Sauerstoffsättigung	20
2.3.4	Peroxidspiegel	20
2.3.5	Western Blot	20
2.3.6	FACS (Durchflusszytometrie).....	25
2.3.7	Bestimmung des oxidativen Bursts	26
2.3.8	Phagozytose	27

2.3.9	RNA-Isolierung aus PBMC	27
2.3.10	RT- PCR (Reverse Transkriptase- Polymerase Kettenreaktion)	28
2.3.11	Statistik	32
2.3.12	Materialien	33
3	Ergebnisse	38
3.1	Western Blot	39
3.2	Vitamin E- Spiegel.....	39
3.3	Peroxidspiegel	40
3.4	Erythropoietin	41
3.5	Funktionelle Tests der Leukozyten: Phagozytose und Burst.....	43
3.5.1	Phagozytose:	43
3.5.2	Oxidativer Burst:	46
3.6	Intrazelluläre Expression von Hitzeschockproteinen und HIF 1 α (% und Intensität) in mononukleären Zellen.....	48
3.6.1	HIF-1	48
3.6.2	Hitzeschockproteine.....	50
4	Diskussion.....	56
4.1	Erythropoietin.....	57
4.2	Peroxidspiegel	58
4.3	Phagozytose und Burst	59
4.4	HIF-1 α	61
4.5	Hitzeschockproteine.....	62
4.6	Antioxidantien	66
4.7	Hypoxie in Zusammenhang mit Sport und Höhentraining	70
4.8	Schlussfolgerung.....	72

5	Zusammenfassung und Ausblick	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Veröffentlichungen	84
8	Danksagung	85
9	Lebenslauf.....	86

1 Einleitung

Für das menschliche Leben stellt eine adäquate Sauerstoffversorgung eine essentielle Grundvoraussetzung dar. So sind alle menschlichen Organe in ihrer Funktion auf Sauerstoff angewiesen. Dies gilt in besonders hohem Maße für das Gehirn [1]. Schon nach wenigen Minuten treten bei Sauerstoffmangel am Hirnengewebe irreversible Schäden auf. Weiterhin sind auch alle Körpersysteme, beispielsweise das hämatologische System und das Immunsystem in ihrer Funktion auf die adäquate Sauerstoffversorgung angewiesen. Bereits ein relativ leichter Abfall der Sauerstoffkonzentration in der Atemluft kann zu Dysfunktionen in diesen Körpersystemen führen [2].

Besonders den immunsuppressiven Effekten von Sauerstoffmangel ist bei zusätzlicher Belastung, z.B. körperlicher Art, Beachtung zu schenken. In diesem Fall wird das Immunsystem zwei Belastungen ausgesetzt, nämlich der Hypoxie und der körperlichen Belastung. Dies ist beispielsweise beim Höhentraining der Fall, bei dem die Sportler bewusst hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden, um durch eine Erythropoietin (Epo)-Steigerung unter Hypoxie die Sauerstoffbindungskapazität im Blut zu steigern. Erythropoietin wird physiologisch vor allem dann vermehrt synthetisiert, wenn das Sauerstoffangebot sinkt. Dies ist einerseits bei einer Anämie der Fall, d.h., wenn die Sauerstoffträger im Blut fehlen. Andererseits wird dann Erythropoietin vermehrt synthetisiert, wenn der Sauerstoffgehalt der Luft geringer ist, z. B. beim Höhengaufenthalt. Der Zusammenhang einer durch Erythropoietin verursachten Polyzythämie bei Aufenthalt in der Höhe und dem dort herrschenden geringeren O₂-Druck wurde schon vor mehr als 100 Jahren beschrieben [3]. Heutzutage wird der Effekt der Epo-Steigerung beim Höhengaufenthalt im Leistungssport zielgerichtet u.a. in Form des live high-train low-Konzeptes eingesetzt. Dabei wird in der Höhe gelebt und nur leichtes körperliches Training absolviert, im Tal findet das Training auf Wettkampf-Niveau statt. Hier ist der Körper also zwei Belastungen, nämlich der Hypoxie und dem körperlichen Training ausgesetzt.

Starke körperliche Belastung in der Höhe kann verschiedene Probleme wie die Höhenkrankheit, Akklimatisationsprobleme oder Immunsuppression [4-9] zur Folge haben. Es stellt sich weiterhin die Frage, ob auch eine körperliche Belastung geringerer Intensität unter hypoxischen Bedingungen negative Auswirkungen haben kann. In diesem Fall müsste nämlich zusätzliches Training während eines Höhengaufenthaltes mit mehr Vorsicht betrachtet werden. In diesem Punkt wird auch die klinische Relevanz der durchgeführten Studie deutlich: Wird beim Höhenttraining die Belastung zu groß, könnten die negativen Auswirkungen beispielsweise auf das Immunsystem überwiegen. Hier erscheint es sinnvoll, den Effekt des Sauerstoffmangels „allein“ auf das Immunsystem zu erforschen, um dann die Auswirkung einer zusätzlichen körperlichen Belastung besser einschätzen zu können. In der durchgeführten Studie wurden verschiedene „Antworten“ des Körpers auf den Stressfaktor Hypoxie auf molekularer Ebene betrachtet, die sämtliche als Versuch der Erhaltung der Sauerstoffhomöostase zu werten sind. Hierunter fällt als bekanntester Vertreter aus dem hämatologischen System das oben genannte Erythropoietin, welches in der Niere synthetisiert wird und die Hämoglobinsynthese triggert. Als Reaktionen auf immunologischer Ebene sind der oxidative Burst sowie die Phagozytoseaktivität der Monozyten und Granulozyten von großer Bedeutung. Als weitere „Stressantwort“ auf akute Hypoxie sind verschiedene Stressproteine bekannt, unter anderem die leukozytären HSP 72/ 27 (Hitzeschockproteine), HO-1 (Hämoxygenase-1) und iNOS (induzierbare Stickoxidsynthase). Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α (hypoxia-inducible factor) spielt bei Hypoxie eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener Zielgene, u.a. Erythropoietin, HO-1, VEGF (vascular endothelial growth factor) und iNOS. Bei der HIF-1 α -Induktion ist u.a. der zelluläre Redoxstatus von Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit soll die individuelle Regulation der einzelnen „Stressantworten“ des Körpers in Leukozyten untersucht werden, weiterhin soll der Einfluss des zellulären Redoxstatus auf die oben genannten Reaktionen mit Hilfe einer Supplementierung von Antioxidantien erforscht werden.

Im Folgenden wird genauer auf die einzelnen Stressantworten des Immunsystems und auf die eingesetzten Antioxidantien eingegangen.

1.1 Oxidativer Stress

Der Körper ist kontinuierlich Radikalen, d.h. reaktionsfreudigen Molekülen, z.B. Sauerstoffradikalen oder Stickstoffradikalen ausgesetzt, die als natürliche Stoffwechselprodukte entstehen. Verschiedene Faktoren, wie z.B. Umweltfaktoren, unter anderem auch Hypoxie [2], körperlicher oder auch seelischer Stress können zur unkontrollierten Produktion dieser Radikale führen, was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Radikale Im Allgemeinen können Radikale Körperfunktionen, wie z.B. das Immunsystem, bzw. Strukturen, wie z.B. Membranen oder DNA, beschädigen. Besonders bei starker körperlicher Belastung und bei Ischämie-Reperfusionssituationen (d.h. Sauerstoffmangel gefolgt von Wiederdurchblutung) entstehen gehäuft freie Radikale [10,11].

Im Zusammenhang mit sportlicher Belastung kommt es auf verschiedene Faktoren an, die entscheidend für einen eher protektiven oder auch schädlichen Effekt des Sports sind. Wichtige Punkte sind hier die Trainingsintensität, die Regelmäßigkeit des Trainings und die körperliche Fitness des Einzelnen. Für Sport in moderatem, regelmäßigem Maße wurde schon häufig eine gesundheitsförderliche Wirkung beschrieben die mit geringerem Auftreten von beispielsweise kardiovaskulären Erkrankungen und sogar einer geringeren Mortalität in Zusammenhang steht [11,12]. Andererseits kann Sport jedoch auch zu Schädigungen von Biomolekülen, Zellen und Geweben führen, die unter anderem durch die im oxidativen Stress vermehrt gebildeten Radikale, verursacht werden [11].

Als Reaktion auf oxidativen Stress werden verschiedenste „Schutzmechanismen“ des Körpers aktiviert, wie z.B. die vermehrte Synthese von Hitzeschockproteinen. Es werden ebenfalls Immunfunktionen wie die Phagozytose und der oxidative Burst an die bestehende Stresssituation angepasst [13].

1.2 Erythropoietin

Erythropoietin sorgt momentan vor allem im Leistungssport für viel Aufregung, da es in Vergangenheit und auch aktuell häufig zu Doping-Zwecken im Leistungssport missbraucht wird. Hierbei handelt es sich um ein Glykoprotein-Hormon, das physiologisch hauptsächlich in der Niere synthetisiert wird und die Produktion von roten Blutkörperchen im Knochenmark stimuliert. Therapeutisch wird Erythropoietin in der Anämiebehandlung eingesetzt. Eine andere Anwendung findet es im Leistungssport im bereits erwähnten Höhentraining. Ein weiterer, jedoch nicht rechtmäßiger Einsatzbereich dieses Hormons findet sich ebenfalls im Leistungssport zur Steigerung der körperlichen Ausdauerleistungsfähigkeit, allgemein als Doping bekannt. Bis zum Jahr 2000 war der analytische Nachweis eines Epo-Missbrauchs noch mit der Schwierigkeit verbunden, dass gentechnisch hergestelltes nicht von endogenem Erythropoietin zu unterscheiden war [14]. Mit dem Hintergrund dieser vielfältigen Einsatzbereiche des Erythropoietins interessiert die Wirkung dieses Hormons auf molekularer Ebene umso mehr. Epo besteht aus 4 α -Helix-Bündeln und hat eine Molekularmasse von 30,4 kDA. Der Epo-Spiegel unterliegt einer tageszeitlichen Schwankung und ist nachts um 40 % höher als am Morgen. Die Erythropoietin-Produktion in Leber und Niere wird nicht nur bei Sauerstoffmangel, sondern auch bei verminderter O_2 -Kapazität (den Hb-Gehalt des Blutes betreffend) und einer erhöhten O_2 -Affinität stimuliert [15]. Bei schwerem Sauerstoffmangel kann der Epo-Plasmaspiegel sogar bis zu 1000-fach ansteigen [15,16]. Dadurch wird die Produktionsrate der roten Blutkörperchen deutlich gesteigert, was eine verbesserte Sauerstoffkapazität des Blutes und damit eine bessere Sauerstoffversorgung des Organismus bewirkt. Die Tatsache, dass durch eine bessere Sauerstoffversorgung eine gesteigerte Leistungsfähigkeit erreicht werden kann, ist die für Leistungssportler interessante Wirkung des Hormons. Um unter anderem die physiologische Regulation des Erythropoietins im menschlichen Körper zu verdeutlichen, wird im folgenden Abschnitt auf den Transkriptionsfaktor HIF-1 α genauer eingegangen.

1.3 HIF-1 α

HIF-1 war in den letzten Jahren und ist auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung [17-20]. Es ist ein Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie mehrere Zielgene reguliert, u.a. Erythropoietin, HO-1 und iNOS. In der Gruppe der HIF-Proteine werden HIF 1,2, und 3 unterschieden, die sich nochmals in jeweils 2 Untereinheiten α und β differenzieren. Die HIF-1 α -Untereinheit wird kontinuierlich synthetisiert und unter Normoxie sehr schnell wieder abgebaut. Unter normoxischen Bedingungen werden bestimmte Prolin- bzw Asparaginreste des HIF-1 α hydroxyliert. Dadurch wird einerseits die Ubiquitin-Konjugation und proteasomale Degradation getriggert, andererseits wird die transkriptionale Aktivierung der Zielgene gehemmt. Diese Regulation auf molekularer Ebene wird in Abbildung 1 verdeutlicht. Die Halbwertszeit von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen beträgt weniger als 5 min [20]. Unter Hypoxie wird allerdings die Hydroxylierung blockiert. So können die beiden Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β dimerisieren. Dieser Komplex wandert in den Zellkern, bindet dort an spezifische DNA-Stellen mit der Basen-Sequenz 5'-RCGTG-3' und induziert so die Transkription und Translation der verschiedenen Zielgene [20] (Abbildung 1).

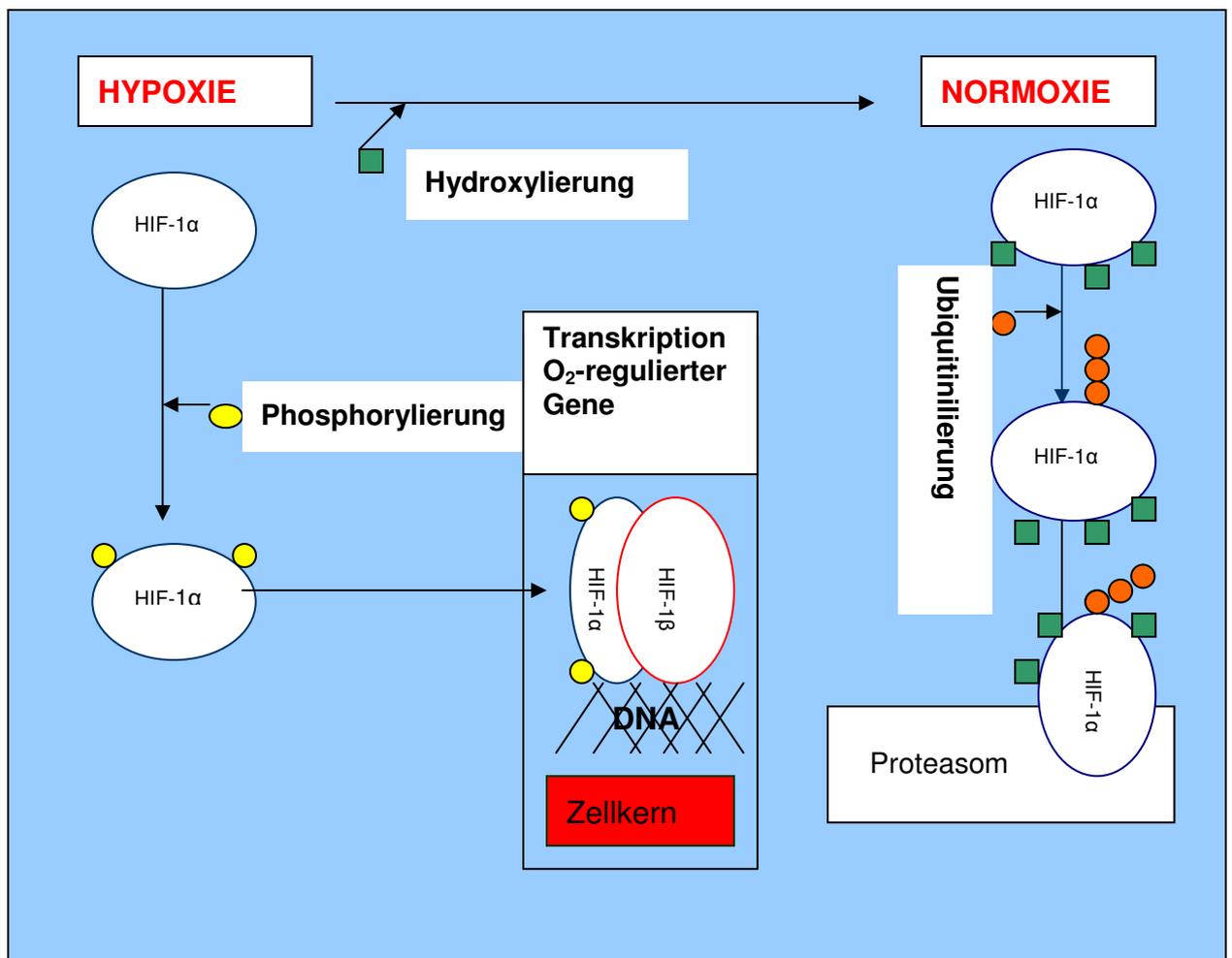


Abbildung 1: Regulation des Transkriptionsfaktors HIF-1α

HIF-1α ist im menschlichen Organismus in verschiedenen Bereichen relevant. Es hat beispielsweise Bedeutung in der Embryonalentwicklung. Fehlendes HIF-1α kann zu Defekten in der Bildung der Neuralleiste oder zu mangelnder Produktion von Blutkörperchen im Gehirn führen. Bei Mäuseembryonen wurden kardiale und vaskuläre Malformationen beobachtet [1]. Eine andere, noch bedenklichere Rolle spielt es in der Tumorphysiologie [19]. In Tumoren wurde eine höhere HIF-1α Expression festgestellt, während Tumorzellen ohne HIF-1α-Expression deutlich in ihrem Wachstum eingeschränkt waren [19,21,22]. Eine für die durchgeführte Studie bedeutsame Rolle spielt HIF-1α beim Sauerstoffmangel in Organen oder Geweben, indem es die Transkription und Translation von Proteinen induziert, die für die Revaskularisierung, d.h. Wiederdurchblutung, von Bedeutung sind [19,23]. Zu den durch HIF-1α

regulierten Proteinen zählen unter anderem auch die Proteine Hämoxxygenase 1 (HO-1) und die induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS). Die Hämoxxygenase 1 gehört wiederum zur Gruppe der Hitzeschockproteine, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine werden von prokaryoten und eukaryoten Zellen in Reaktion auf eine Vielzahl von Stressoren gebildet. Hierunter fallen beispielsweise die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten Proteine HSP 72, HSP 27, HO-1 und iNOS. Der Begriff „Stress“ bedeutet in diesem Zusammenhang unter anderem Hitzestress, aber auch oxidativen Stress durch Radikalbildung, Schwermetalle, Hypoxie [24], Gewebeschaden, Infektionen, Glukosemangel, einen erniedrigten pH-Wert oder einen erhöhten Calciumspiegel [25] (Abbildung 2). Die für diese Proteine kodierenden Gene sind vor der Einwirkung des Stressors inaktiv oder auf niedrigem Niveau transkribiert. Bei Stresseinwirkung gehen die Zellen von der breiten Synthese verschiedener Proteine zur stärkeren Produktion der Stressproteine über. In Zusammenhang mit Hitzestress, aber auch mit oxidativem Stress, konnte nachgewiesen werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Synthese von Hitzeschockproteinen und einer Toleranz gegenüber nachfolgendem thermischen Stress besteht [13,25]. Hieraus kann man folgern, dass offensichtlich gemeinsame induzierende bzw. protektive Mechanismen bei den verschiedenen Stressoren existieren. Die Gruppe der Hitzeschockproteine wird gemäß ihres Molekulargewichtes in verschiedene Subklassen unterteilt: 20-30 kDa, 50-60 kDa, 70 kDa, 90 kDa und 110 kDa. In dieser Arbeit wird lediglich auf die Subtypen HSP 27, HSP 72 und HO-1 genauer eingegangen.

Die 72 kDa-Familie ist eine stark untersuchte Gruppe. Das konstitutiv exprimierte HSP 73 ist im Gegensatz zum HSP 72 nur wenig stressinduziert. Es befindet sich im Zytoplasma. Bei Hitzeschock wandert es in den Nukleolus und bindet dort an denaturierende Ribosomen, wodurch vermutlich deren Renaturierung erleichtert wird [2].

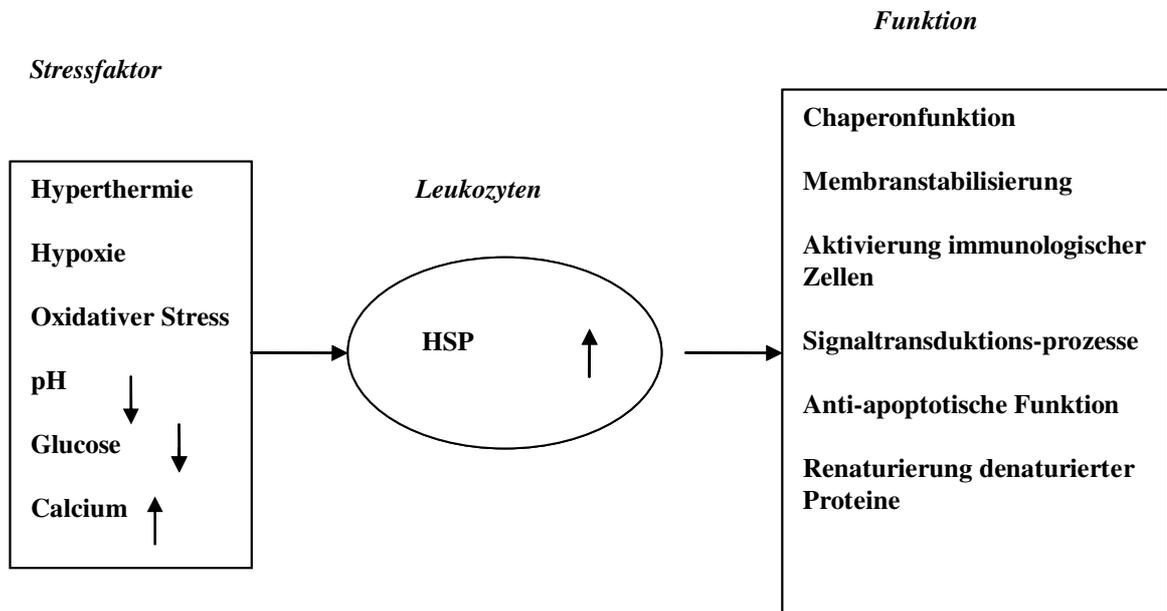


Abbildung 2: Verschiedene Stressfaktoren, die zu einer HSP-Erhöhung in Leukozyten führen können und Funktion dieser HSPs

HSP 72 ist die stark stressinduzierbare Isoform, die schnell im Zytoplasma synthetisiert wird und in den Zellkern wandert [25,26]. Dort besitzt HSP 72 vor allem eine „Chaperonfunktion“, d.h. es schützt neu synthetisierte Polypeptidketten während ihres empfindlichen Prozesses der korrekten Faltung zu einer dreidimensionalen, funktionstüchtigen Struktur vor störenden Einwirkungen von außen und bewirkt zusätzlich den Transport aus dem Zytoplasma zum Bestimmungsort [27,28]. Weiterhin kommt ihm eine wichtige Funktion bei der Reaktivierung bzw. Renaturierung von durch Stresseinwirkung denaturierenden Proteinen, sowie bei der Membranstabilisierung zu. Die Aufgabe der Membranstabilisierung ist vor allem nach Hitzeschock von großer Bedeutung, da besonders unter Hitzeschock die Membranfluidität stark zunimmt und eine Wiederherstellung der Rigidität erfordert. Auch extrazellulär besitzt HSP 72 eine wichtige Funktion, nämlich bei der Aktivierung von immunologischen Zellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen)[5]. HSP 72 kann an die Zelloberfläche von menschlichen Monozyten binden und so die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin 6,

Tumornekrosefaktor- α) aktivieren [29,30]. Ebenfalls wird die HSP-Expression an der Oberfläche von viral oder bakteriell infizierten Zellen, auf Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, sowie auf Tumorzellen beschrieben [31]. Die HSP-Bindung an der Zelloberfläche ermöglicht deren Erkennung und Elimination durch immunologische Zellen [29,31,32]. Im Zusammenhang mit starker sportlicher Belastung ist aufgrund des dadurch verursachten oxidativen Stress die Protein-Homöostase des Körpers bedroht. Die intrazelluläre HSP-Antwort ist hier zum Zellüberleben von enormer Bedeutung [33,34].

HSP 27 ist im Zytoplasma von „ungestressten“ Zellen lokalisiert und befindet sich bei Stressbedingungen im Nukleolus oder in dessen Nähe. HSP 27 akkumuliert langsamer als andere HSPs, wird aber dafür über einen längeren Zeitraum nach der Stresssituation synthetisiert [2]. Konstitutiv wird HSP 27 im Nervensystem in einigen sensorischen und motorischen Neuronen und im Spinalkanal exprimiert [35]. Es ist in Signaltransduktionsprozesse sowie Wachstum und Entwicklung involviert.

Die Hämoxxygenase ist in drei Isoformen bekannt, die HO-1 (32kDa = HSP 32), HO-2 (36 kDa) und HO-3 (33 kDa), unter denen die HO-1 die am stärksten induzierbare Form darstellt [36,37]. Zu den Induktoren gehören u.a. Häm, Schwermetalle, Zytokine, Hypoxie [37], Hormone, bakterielle Toxine und, zumindest in Nagetieren, auch Hitzeschock [38]. Die HO-1 gehört zu den durch HIF-1 α regulierten Proteinen [19]. Eine besonders starke Expression der Hämoxxygenase-1 in Leukozyten wird in Zusammenhang mit sportlicher Ausdauerbelastung beobachtet [39,40]. Weiterhin konnte eine deutliche Hochregulation der HO-1 in Monozyten bei entzündlichen Vorgängen festgestellt werden. Bei Patienten mit chronischen Immundefekten fiel eine hohe HO-1-Aktivität in Monozyten auf [41]. Der HO-1 kommt nicht die Chaperonfunktion wie HSP 27/ 72 zu. Es spielt vielmehr eine bedeutende Rolle im Hämoglobinkatabolismus, in dem es für den initialen Abbauschritt des oxidativ wirkenden Häms zum Biliverdin, Eisen und Kohlendioxid verantwortlich ist [2]. Biliverdin wird in einem nachfolgenden Schritt durch die Biliverdin-Reduktase zum antioxidativen Bilirubin umgewandelt [37].

Die Regulation der Hitzeschockproteine verläuft in den oben genannten Stresssituationen sehr rasch ab. Eine bestimmte DNA-Sequenz, die in der Nähe der zu kodierenden Proteine liegt, wird HSE (heat-shock-element) genannt. HSE wiederum besitzt eine Bindungsstelle für HSF (Heat-shock-transcription-factor). Die HSF-Aktivierung stellt einen bedeutenden Schritt in der HSP-Synthese dar. In ungestressten Bedingungen liegt HSF im Zytoplasma und Nukleolus als Monomer vor und bindet nicht an HSE. Unter Stressbedingungen bildet HSF ein Trimer, wodurch es DNA-Bindungsaktivität erlangt und an HSE bindet. Auf die anschließende Phosphorylierung des HSF-Trimers folgt die Transkription der Hitzeschockproteine [25], (Abbildung 3).

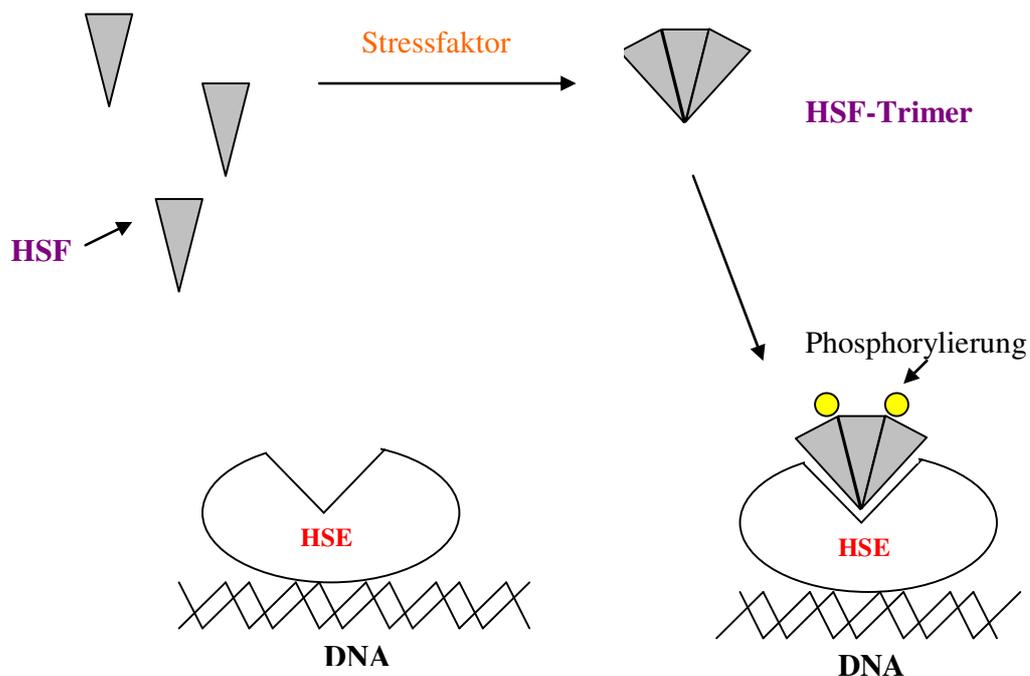


Abbildung 3: Schematische HSP-Regulation unter Stresseinwirkung. Die Dreiecke stellen den Heat-shock-transcription-factor (HSF) dar, der unter Stress ein Trimer bildet und so an das Heat-shock element (HSE) binden kann. Darauf folgt die Transkription des Zielproteins.

1.5 Induzierbare Stickoxidsynthase (iNOS)

Die Stickoxidsynthase liegt in mehreren Isoformen vor. Typ1 (nNOS) kommt in höheren Konzentrationen in neuronalen Zellen vor und übernimmt neurotransmitterähnliche Aufgaben, Typ 3 (ecNOS) spielt als endotheliale Form eine wichtige Rolle bei der Gefäßrelaxation. Der für diese Arbeit interessante Typ 2 (iNOS) wird in Monozyten und Makrophagen als Bestandteil des umfangreichen Abwehrapparates angesehen. Die iNOS gehört zu den u.a. durch HIF-1 α regulierten Proteinen, das heißt, die Regulation findet hauptsächlich auf Transkriptionsebene statt. Weitere Induktoren der iNOS sind verschiedene Zytokine wie TNF α , IFN γ , IL-1, IL-2 und ROS. Hier wird deutlich, dass es sich bei der iNOS um ein vor allem in Stresssituationen gebildetes Protein handelt.

Eigentlicher Funktionsträger dieses Proteins ist das Stickstoffmonoxid (NO) als Produkt einer Reaktion, an deren Ende NO und Citrullin aus Arginin entstehen. In Weiterreaktion mit O₂ entsteht das äußerst toxische Peroxynitrit (ONOO).

NO stellt ein Radikal dar (s. Kapitel Oxidativer Burst), dass mit zunehmender Konzentration gewebeschädigend wirken kann. Im Übermaß gebildetes NO besitzt durch Störung der mitochondrialen Atmungskette und der Proteinsynthese sowie durch Enzymwechselwirkungen und DNA-Schädigungen zytotoxische Eigenschaften und ist an entzündlichen und autoimmunologischen Prozessen beteiligt [42,43]. Als weitere Immunfunktionen, die sich als Reaktion auf Stressbedingungen wie auch Hypoxie verändern können, wurden die Phagozytose und der oxidative Burst bestimmt. Diese werden im Folgenden näher erläutert.

1.6 Phagozytose

Die Phagozytoseaktivität der Leukozyten ist ein wichtiger Parameter der unspezifischen Immunabwehr. Die Phagozytose und der folgende oxidative Burst der Phagozyten sind die natürliche und essentielle Abwehrreaktion der Leukozyten (neutrophile Granulozyten bzw. Makrophagen) auf körperfremde Bakterien [44,45]. Eine reduzierte Phagozytose konnte bei verschiedenen

erworbenen Erkrankungen wie z.B. Trauma, Diabetes mellitus, Nierenversagen, rezidivierenden Infektionen und AIDS festgestellt werden.

Der Phagozytosevorgang kann in drei verschiedene Phasen eingeteilt werden [45]:

1. Chemotaxis: Wanderung der Phagozyten zum Ort des Geschehens
2. Adhäsion von Partikeln an der Zelloberfläche der Phagozyten
3. Ingestion des Fremdkörpers und intrazelluläres Abtöten

Im Falle einer Beeinträchtigung des Immunsystems kann sowohl der prozentuale Anteil der Leukozyten, die in der Lage sind zu phagozytieren, verringert sein, als auch deren Phagozytoseaktivität [11]. Im Zusammenhang mit starker sportlicher Belastung kann als Immundefizienz also auch die Phagozytose beeinträchtigt werden [11]. Dies muss sich nicht primär in der Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut widerspiegeln, denn eine supprimierte Immundefizienz kann auch schon bei normaler Leukozytenzahl vorliegen. Dies kann dann der Fall sein, wenn bei unveränderter Leukozytenanzahl anteilsmäßig weniger Leukozyten Phagozytose betreiben.

1.7 Oxidativer Burst

Unter oxidativem Burst versteht man die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen in neutrophilen Granulozyten. Als freie Radikale werden Atome oder Moleküle bezeichnet, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und eine ausgeprägte chemische Reaktivität besitzen [46]. Zu den wichtigen Vertretern gehören das Superoxid (O_2^-), Hydroxyl (OH) oder Stickstoffradikal (NO). In Abhängigkeit von ihrem zentralen Atom unterscheidet man reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sowie reaktive Stickstoffradikale (RNS), die insgesamt als RONS bezeichnet werden. Typische Generierungsmechanismen der RONS sind u.a. die Bildung von H_2O_2 über die Superoxiddismutase, die Bildung von OH aus H_2O_2 und freiem Eisen via Fentonreaktion sowie die Bildung von Hypochlorsäure (HOCL) aus H_2O_2 und Cl über die Myeloperoxidase. Superoxid wird einerseits in Mitochondrien durch Sauerstoffreduktion über die Cytochromperoxidase, andererseits über die

Xanthinoxidase im Stoffwechselweg von Hypoxanthin zu Xanthin und weiter zu Urat gebildet. Während Entzündungsvorgängen im Körper werden RONS von verschiedenen immunkompetenten Zellen wie Monozyten und Granulozyten als „Waffen“ gegen Mikroorganismen wie Viren oder Bakterien gebildet [47]. Beispielsweise leiden Patienten mit einer gestörten Granulozytenfunktion (chronic granulomatous disease, CGD) und daher gestörtem oxidativem Burst unter rezidivierenden bakteriellen oder durch Pilze hervorgerufenen Infekten, da die neutrophilen Granulozyten nicht in der Lage sind den oxidativen Burst auszuüben [44,45]. RONS können einerseits schädliche Auswirkungen auf Zellstrukturen haben, andererseits aber auch wichtige regulatorische Funktionen ausüben. Zu den schädlichen Auswirkungen gehört die Protein-Strukturveränderung durch Oxidation einzelner Aminosäuren und Spaltung von Polypeptidketten, was zu einer beeinträchtigten Funktion oder zu einer Anhäufung von beschädigten Proteinen führt. Weiterhin können Radikale DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche verursachen.

Andererseits können bestimmte, durch RONS verursachte Schäden wiederum HSPs aktivieren, die bei der Renaturierung der denaturierten Proteine helfen. Zu den positiven Effekten der RONS gehört der oben genannte Angriff auf Mikroorganismen, die Zellproliferation, sowie die Aktivierung von Nukleasen zur DNA-Reparatur. Hieraus wird deutlich, dass im Zusammenhang mit RONS die Ausgewogenheit von positiven und negativen Eigenschaften von großer Bedeutung ist, und somit Eingriffe in den Redoxstatus einer Zelle, beispielsweise durch Antioxidantien, mit sehr viel Vorsicht zu betrachten sind [29]. Schon unter Ruhebedingungen produziert der menschliche Körper RONS, die jedoch durch das antioxidative Enzymsystem, wie z.B. die Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase unschädlich gemacht werden können [47]. Im Zusammenhang mit sportlicher Belastung kann es zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems (geringere Phagozytose, verstärkte Radikalbildung mit eventuell schädigender Wirkung) kommen [47]. Mochida et al. [48] konnten beispielsweise einen Abfall der RONS nach starker sportlicher Belastung nachweisen, was eine herabgesetzte bakterizide Kapazität bedeuten kann. Auch Chinda et al. wiesen nach einer

Marathon-Belastung eine Reduktion von oxidativem Burst bzw. Phagozytose und gleichzeitig einen Anstieg der Leukozyten nach [49].

1.8 Antioxidantien

Um den Einfluss des zellulären Redoxstatus auf die oben beschriebenen Faktoren zu erforschen, wurden in der durchgeführten Studie die Antioxidantien α -Tocopherol sowie α -Liponsäure eingesetzt.

Die für den Menschen bedeutendste in der Natur vorkommende Verbindung mit Vitamin-E-Aktivität ist α -Tocopherol [17]. Eine seiner wichtigsten Funktionen ist die eines lipidlöslichen Antioxidans, das in der Lage ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfett vor einer Zerstörung durch Oxidation (Lipidperoxidation) zu schützen und so zur Membranstabilität beizutragen [4, 47]. Eine weitere Funktion ist die des Radikalfängers. Freie Radikale können die Doppelbindungen der Fettsäuren der Zell- und Organellmembranen angreifen und die Membran somit schädigen. Tocopherol wirkt hier als Radikalfänger, indem es selbst zu einem reaktionsträgen Radikal wird. In erster Linie wirkt es in der Lipidstruktur von Membranen. Die oxidierte Form wird in Wechselwirkung mit Ascorbinsäure und dem Glutathionsystem regeneriert [18].

α -Liponsäure zählt zu den endogenen Thiolen. Nach Aufnahme in den Körper wird es zu Dihydroliponsäure reduziert [50]. Dihydroliponsäure kann „verbrauchtes“ Vitamin E regenerieren. Weiterhin ist α -Liponsäure ein potentes Antioxidans, da es Radikale sowohl in wässriger als auch in Lipidphase abfangen kann.

Mit dem Hintergrund dieser Wirkung der Antioxidantien wurden sie unter der Fragestellung verabreicht, ob sie die durch Hypoxie verursachten Stressreaktionen wie beispielsweise den oxidativen Burst vermindern können. Unter Normalbedingungen verfügt der menschliche Körper über genügend eigene enzymatische Schutzsysteme, um eventuell anfallende Radikale abzufangen und unschädlich zu machen. Unter Stressbedingungen, wie z.B. Hypoxie oder starker körperlicher Belastung kann es jedoch zu einer

vermehrten Produktion potentiell schädlicher Stoffwechselprodukte kommen, so dass diese körpereigenen Systeme überlastet werden. Hier könnten die in unserer Studie verabreichten Antioxidantien zur Wirkung kommen und Stressreaktionen vermindern. Die kombinierte Verwendung von α -Tocopherol und α -Liponsäure erfolgte unter dem Gesichtspunkt der verschiedenen Wirkmechanismen der beiden Antioxidantien und deren Synergismus. Beide Antioxidantien zeigten in Kombination schon bei Ischämie-Reperfusionsschäden, d.h. Sauerstoffmangel mit nachfolgender Wiederdurchblutung, und Neurodegeneration protektive Effekte [50].

1.9 Ziele des Gesamtprojektes

Wie bereits erwähnt, kann Sauerstoffmangel im menschlichen Körper in verschiedenen Köpersystemen, unter anderem im Immunsystem, zu Dysfunktionen führen. In diesem Projekt soll die Auswirkung einer kurzzeitigen, moderaten Hypoxieexposition (4h, 12,5 % O₂) über Maskenatmung auf verschiedene Parameter des menschlichen Immunsystems (Stressproteine, Immunfunktionen) untersucht werden.

Da Antioxidantien bekanntermassen einen protektiven Effekt gegenüber Stressoren wie unter anderem auch gegenüber Hypoxie haben können, wird getestet, ob antioxidativ wirkende Medikamente die Stressantwort des Körpers auf die Hypoxieexposition vermindern können, d.h. ob sie hier einen protektiven Effekt auf das Immunsystem haben.

Aus dieser Studie kann weiterhin ein Zusammenhang zum Höhentraining im Sport hergestellt werden. Auch starke sportliche Belastung kann eine immunsuppressive Wirkung haben. Die hier gewählte Sauerstoffkonzentration von 12,5 % entspricht einer ungefähren Höhe von 4100 m. Bei einer deutlichen Auswirkung dieser Hypoxieexposition auf die hier gemessenen Parameter des Immunsystems sollte also von einer starken körperlichen Belastung durch Training abgesehen werden, um den zusätzlichen immunsuppressiven Effekt zu vermeiden.

2 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt beschreibt zu Beginn das genaue Studiendesign. Weiterhin wird auf die experimentellen Messmethoden sowie die verwendeten Materialien eingegangen.

2.1 Probanden und Studiendesign:

Die Studie wurde mit 12 erwachsenen, männlichen Probanden durchgeführt. 2 Wochen vor dem ersten Versuch wurde die Tauglichkeit für die Studienteilnahme untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass keiner der Probanden unter hämatologischen, respiratorischen oder renalen Krankheiten oder unter Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems litt. Ebenso waren alle Probanden Nichtraucher, sie waren nicht höhenadaptiert und waren in den letzten 8 Wochen nicht geflogen. Das Alter betrug 27,1 - 34,1 Jahre, das Körpergewicht 79,8 - 87,6 kg, die Körpergröße 184 - 189 cm. Die Teilnehmer nahmen keine Medikamente ein, ebenso keine Vitaminpräparate. Die Studie wurde unter dem Einverständnis der Probanden und Genehmigung der Ethikkommission der Universität Tübingen durchgeführt. Über einen Zeitraum von neun Wochen unterzogen sich die Probanden einer doppelblinden, placebokontrollierten, randomisierten Crossover-Studie, d.h. weder den Probanden noch den Versuchsleitern war vor Abschluss der Studie die Aufschlüsselung von Placebo-bzw. Verumgabe bekannt. Während dieses Zeitraums wurden die Probanden zu drei verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Abbildung 4):

Zeitpunkt 1: Woche 0 vor Placebo-bzw. Verum-Einnahme (Normoxie-Kontrollversuch) ,

Zeitpunkt 2: am Ende von Woche 3 (erstes Hypoxie-Experiment H1),

Zeitpunkt 3: am Ende von Woche 9 (zweites Hypoxieexperiment H2)

Im Anschluss an H1 folgte eine 3wöchige Auswaschperiode, bevor die Probanden das jeweils andere Medikament erhielten. Die Verumgabe bestand aus 2 Kapseln zu jeweils 400 mg all-rac- α -tocopherol (α -Toc) und einer Kapsel zu 600 mg α -Liponsäure (α -LA). Die Medikamente wurden von der Klinikapotheke der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Die Entblindung wurde erst nach Abschluss aller Analysen durchgeführt. Die Probanden wurden angewiesen, all-rac- α -tocopherol (bzw. Placebo) über 3 Wochen, α -Liponsäure (α -LA) (bzw. Placebo) über 2 Wochen vor dem Hypoxieversuch täglich oral einzunehmen.

Kontrollversuch (20,9 % O₂)

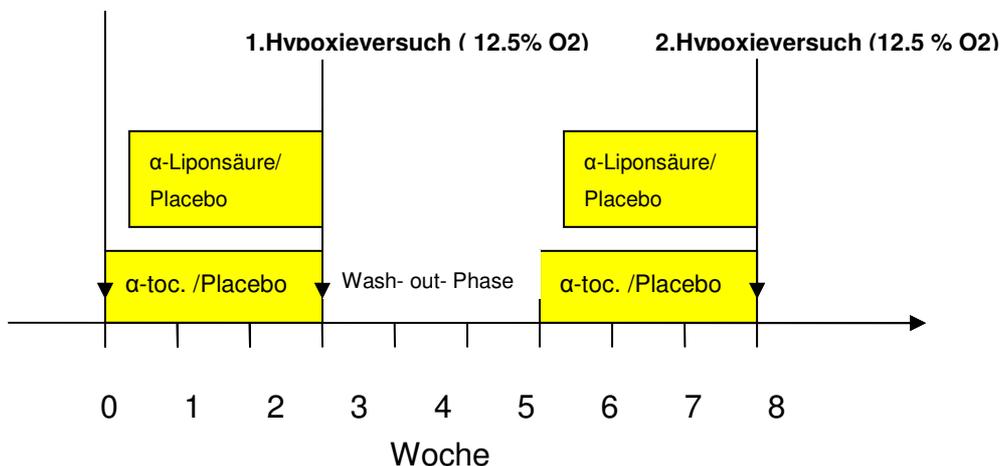


Abbildung 4: Schematische Abbildung zum Versuchsablauf der Studie mit Kontrollversuch bzw. Hypoxieversuch 1 und 2 nach Medikamenten- bzw. Placebosubstitution.

2.2 Experimentelles Procedere

Die Hypoxie- bzw. Normoxieexposition wurde um 8 Uhr morgens begonnen und dauerte 4 h. Die Probanden saßen während dieser Zeit in einer bequemen Position und atmeten über eine eng anliegende Maske entweder normale Raumluft (Kontrollversuch; O₂-Gehalt 20,9%) oder ein hypoxisches Gasgemisch vermischt mit Stickstoff (Hypoxieversuch 1 bzw. 2, O₂-Gehalt 12,5%) (Abbildung 5).



Abbildung 5 : Aufnahme während des Versuches

Venöse Blutproben wurden jeweils 10 Minuten vor dem jeweiligen Versuch (Zeitpunkt 0), während der zweiten bzw. vierten Stunde des Versuchs (Zeitpunkt 2 bzw.4), und 1h, 4h, 8h und 20h nach dem Versuch abgenommen. (Zeitpunkt 5, 8, 12, 24),(Abbildung 6).

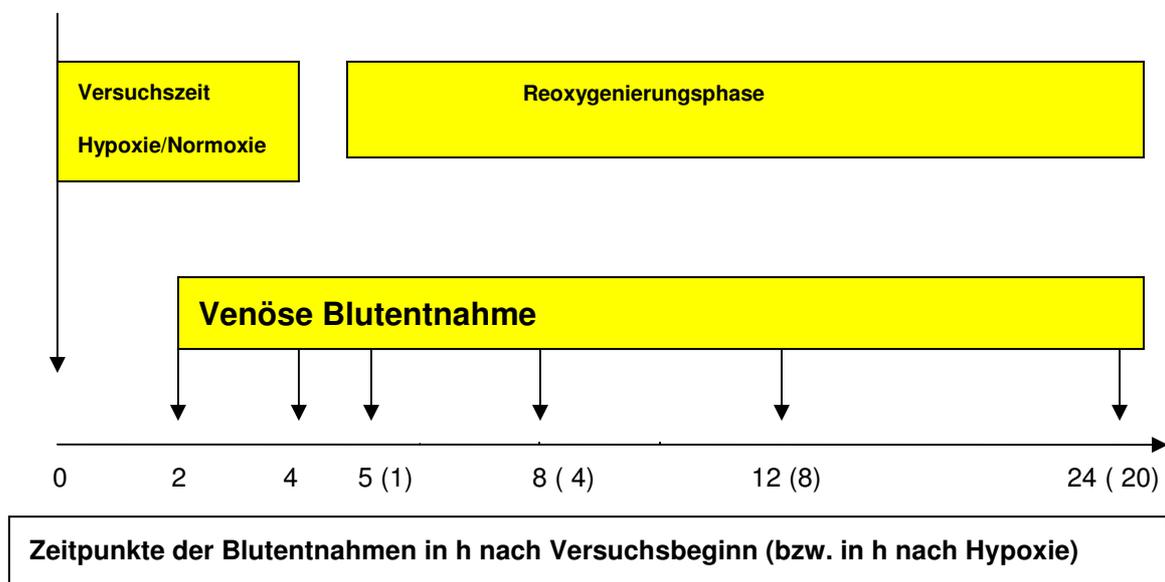


Abbildung 6: Schematische Abbildung zu den Zeitpunkten der venösen Blutentnahmen

Die Blutabnahmen nach dem Versuch wurden mit dem Ziel abgenommen, auch die Reoxygenierungsphase nach der Hypoxie zu berücksichtigen, da sich bestimmte Auswirkungen der Hypoxie auch erst mit Verzögerung einstellen können und ohne die Betrachtung dieser Phase vernachlässigt würden. Vor Beginn, während und in einem Zeitraum von 30 min. nach Ende der Hypoxie- bzw. RaumlufTEXposition wurden Atem- und Herzfrequenz, sowie die pulsoxymetrische Sauerstoffsättigung und die Blutgase gemessen. Die gewonnenen Blutproben wurden in Kühlbehältern zum Analyselabor transportiert und dort zur Plasmagewinnung sofort zentrifugiert (4°C, 1000g, 15 min). Das Blutplasma wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C tiefgefroren. Aus den verbliebenen zellulären Bestandteilen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) für FACS-Analysen (fluorescence activated cell sorting) bzw. PCR (polymerase chain reaction) gewonnen.

2.3 Analytisches Procedere

Dieser Abschnitt beschreibt die angewandten Messmethoden und die hierbei verwendeten Rezepte.

2.3.1 Erythropoietin im Plasma

Die Plasma-Erythropoietin-Konzentration wurde mittels Immunoassay durch das Analysegerät *Immulite (JPC Biermann GmbH, Bad Nauheim)* im Labor von Prof. E.M. Schneider der Anästhesiologie der Universitätsklinik Ulm bestimmt.

2.3.2 α -Tocopherol-Konzentration im Plasma

Zur Bestimmung der α -Tocopherol-Konzentration im Plasma wurde den Probanden in einer Serum-Monovette Blut entnommen.

Die Messung wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC System Merck, Hitachi L6200, Merck, Darmstadt) durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Die α -Tocopherol-Plasmakonzentration wurde mittels UV-Detektion (Chromsysteme, München) bestimmt.

2.3.3 Blutgase und Sauerstoffsättigung

Zur Messung der Blutgase wurde den Probanden aus dem Ohrläppchen in einer Glaskapillare 50µl Kapillarblut entnommen. Die Bestimmung erfolgte mittels eines Blutgasanalyzers (STAT Profile pHox, Nova Biomedical, Waltham Ma, USA). Die Sauerstoffsättigung wurde pulsoxymetrisch bestimmt.

2.3.4 Peroxidspiegel

Zur Bestimmung des Peroxidspiegels wurde den Probanden Blut in einer EDTA-Monovette entnommen und abzentrifugiertes Plasma wurde photometrisch mittels des *PeroxKit, Immunodiagnostik Bensheim* gemessen.

2.3.5 Western Blot

Der Western Blot wurde als in-vitro-Vorversuch der Studie durchgeführt. 4 freiwilligen Probanden wurde Blut in einer EDTA-Monovette abgenommen und in vitro den in der Studie gewählten Bedingungen ausgesetzt (4 stündige Hypoxie, 12,5% O₂). Die Hälfte der Blutröhrchen jeder Person wurde zur Kontrolle unter Normoxie gehalten. Direkt im Anschluss wurden PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Das EDTA-Vollblut wurde 1:2 mit PBS verdünnt und auf das gleiche Volumen Dichtegradient (Lymphoflot) überschichtet. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 2200 rpm, ohne Bremse wurde der Zellring bestehend aus mononukleären Zellen entnommen und durch 2 Waschschrte mit PBS (Zentrifugation bei 1200rpm, 10min) gereinigt. Aus den PBMC-Pellets wurden mit Hilfe der Reagenzien des NE-PER kits (Pierce/Perbio) Kern- bzw. Zelllysate gewonnen und daraus die entsprechenden Proteinfractionen, vor Abbau geschützt durch Proteinaseinhibitoren, im Western Blot eingesetzt. Untersucht wurden die Proteine HSP 27 bzw. HSP 70.

Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren zur Darstellung von Proteinen, dass insbesondere in der Medizin und der Proteinbiochemie Anwendung findet. Im Western Blot werden Proteine über Diffusionsblotting, Kapillarblotting oder Elektroblothing von einem Gel auf eine Trägermembran transferiert und mit Hilfe von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen

visualisiert. Der Name „Western Blot“ geht auf den Erfinder der Blotting-Technik, Erwin Southern, zurück, der 1975 eine Methodik zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und anschließender Hybridisierung, den sogenannten „Southern Blot“, durchführte. In Anlehnung an seinen Namen wurde die Auftrennung von RNA-Fragmenten Northern Blot und schließlich die Auftrennung von Proteinen Western Blot genannt.

Die Methodik des Western Blots wird in 5 Teilschritte unterteilt, nämlich die Proteinisolation, die Messung der Proteinkonzentration, die Auftrennung per SDS-Page (*Sodium-Dodecyl-Sulfate-PolyAcrylamidGelElektrophorese*), Blotting mit anschließendem Blocking und die Immundetektion. Im Rahmen der Proteinisolation wurde aus den Zellen zum einen die nukleäre, zum anderen die zytoplasmatische Proteinfraction, je nach Vorkommen, gewonnen und weiterverwendet. Für Genregulationsstudien wird generell die Verwendung der nukleären Fraction gegenüber des Gesamtzelllysates bevorzugt. Zelluläre Komponenten im Gesamtzelllysate können sich nachteilig auf die nukleären Proteininteraktionen und Stabilität auswirken, ausserdem werden nukleäre Proteine im Gesamtzelllysate stärker verdünnt als im spezifischen Nuklear-Extrakt.

Die Proteinisolierung erfolgte mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extractions kits von PIERCE. Um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern wurde den Reagenzien Cer 1 und Ner der Protein Inhibitor cocktail Halt-Protease Inhibitor Cocktail (100x) (Pierce, ProduktNr. 78410) im Verhältnis 1:100 zugefügt. Zur erfolgreichen Proteinisolierung wurde ein Homogenisator „Ultra turrax“ eingesetzt. Alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der PBMC-Isolierung wurde das trockene Zellpellet (ca. 2×10^6 Zellen) mit 200µl eiskaltem CER 1 versetzt und 40sec. mit dem Ultra turrax bearbeitet. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden zur jeder Probe 11µl eiskaltes CER 2 pipettiert, 1 Minute auf eis inkubiert und 15 sec. mit dem Ultra turrax bearbeitet. Diese beiden Reagenzien bewirken einen Aufschluß der Zellmembranen und eine Freisetzung des zytoplasmatischen Inhalts. Eine 5minütige Zentrifugation bei 14000rpm und 4°C führt dazu, dass sich nun im Überstand die zytoplasmatische Proteinfraction befindet. Zum Pellet werden 100µl NER-

Reagenz gegeben, nach einer Behandlung mittels Ultra turrax und 40 minütiger Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation von 10min bei 4°C und 14000 rpm, werden die Zellkerne lysiert und man erhält die nukleäre Fraktion im Überstand.

Im Anschluss an diesen Vorgang wurde die Proteinkonzentration ermittelt, um eine einheitliche Proteinmenge im Western Blot einsetzen zu können. Mittels Bradford-Methode wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Hierbei werden durch Bindung von Coomassie Brillnat Blue G-250 an Proteine im sauren Milieu Komplexe gebildet. Dadurch kommt es zur Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes, der ohne Protein bei 465 nm, mit Protein bei 595 nm liegt. Eine Zunahme der Absorption bei 595 nm gilt als Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Für die Durchführung des Tests wurde eine Standardreihe mit BSA hergestellt. Als Farbreagenz diente Bio-Rad Protein Assay (katNr. 500-0006, Bio-Rad). Es wurden je 10µl Standard bzw. Probe in ein well einer 96 well Mikrotiterplatte pip. und mit 200µl Farbreagenz, welches 1:5 in aqua dest verdünnt wurde, versetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte mittels eines Plattenreaders der Firma SLT bestimmt und die Protein Konzentration über eine Standardkurve berechnet.

Jede Proteinprobe wurde so eingestellt, dass sie 40µg Protein beinhaltet. Sie wurde mit reduzierendem Ladepuffer (Laemmli-Puffer) versetzt und 2min bei 95°C erhitzt. Das in diesem Puffer enthaltene SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate, Fa. Roth) bindet an die Proteine und verleiht diesen dadurch eine negative Ladung. Die Eigenladung der Proteine wird hierbei überdeckt. Durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle kommt es zu einer Auflösung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Aufgrund von reduzierenden Thiolverbindungen des beta Mercaptoethanols löst sich die Quartärstruktur auf.

Die fertigen Proben wurden nun in die Geltaschen aufgetragen. Das Polyacrylamidgel wurde nach dem in Tabelle 1 genannten Rezept hergestellt. Zur Elektrophorese wurde die *Elektrophoresekammer Mini-Protean 3* der Firma

Biorad eingesetzt, der Elektrophoresepuffer wurde nach dem in der Tabelle 2 genannten Rezept hergestellt. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Protein-SDS-Komplexe während der Elektrophorese zur Anode(Plus-Pol) und werden somit aufgetrennt. Trennkriterium ist hier die Größe der Proteine, kleine wandern leicht durch die Gelmaschen, größere Proteine wandern langsamer. Das Polyacrylamidgel wurde nach dem in der Tabelle beschriebenen Rezept hergestellt. Als Größenmarker wurden der Western Standard (Invitrogen) und der Prestained Standard (Invitrogen) eingesetzt. Bei einer Spannung von 120 V dauerte die Elektrophorese ca. 1,5h. Beim Blotting werden die im Gel aufgetrennten Proteine mittels Elektroblothing auf eine Nitrozellulose Membran transferiert und mittels Antikörpern visualisiert. Der Blottingvorgang wurde mit der Blottingkammer der Firma Biorad durchgeführt, der dazu benötigte Blottingpuffer wurde nach dem in der Tabelle 2 aufgeführten Rezept hergestellt. Nach dem Blotting wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit Magermilch (Biorad) geblockt. Der notwendige Puffer besteht aus 5% Magermilch in TBST-Puffer und 0,1% Tween (Biorad). Die Inkubationszeit der Membran in Magermilch betrug ca. 24 h bei 4 °C. Nach dieser Inkubation wurde die Magermilch von der Membran gewaschen, um im Anschluss daran die Antikörperreaktion zur Detektion des untersuchten Proteins durchgeführt. Die Antikörper binden hierbei an das jeweils passende Epitop der gesuchten Proteinbande. Nach mehreren Waschschrinen zur Entfernung überschüssiger Antikörper folgte die Inkubation des Sekundärantiköper. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen bestimmte Teile des Primärantiköper gerichtet und gleichzeitig mit einem Enzym gekoppelt (z. B. HRP= Horse radish peroxidase) Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung des Farbstoffes Luminol in seine oxidierte Form. Dabei wird eine Lumineszenz detektiert, die der gesuchten Proteinbande entspricht. Im Anschluss daran konnte mittels einer Chemilumineszenzlösung (Super signal West Pico Chemiluminescent Substrate) die gesuchte Proteinbande unter UV-Licht detektiert werden. Die Messung erfolgte im Imaging System der Firma Ray-Test mit dem Messprogramm DIANA und dem Auswertungsprogramm AIDA.

Dieselbe Membran wurde nun 15 min in restore Westernblot stripping buffer (Pierce, ProdNr. 21059) inkubiert, um alle Antikörper von der Membran zu entfernen und anschließend erneut mit dem House-keeping Gene beta-Actin (40kDa)-Antikörper, nach demselben Verfahren wie oben beschrieben, markiert und detektiert. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass in allen Geltaschen dieselbe Proteinmenge aufgetragen wurde, da beta-Actin nicht reguliert wird.

Tabelle 1: Rezept zur Herstellung des Polyacrylamidgels

Trenngel-Lösungen (8%)		Sammelgel-Lösungen (7%)	
Acrylamidlösung (30%)	5,3 ml	Acrylamidlösung (30%)	1,7 ml
1,5 M Tris/HCL (pH 8,8)	5 ml	Tris / HCl (p 6,8)	1,3 ml
10% SDS	0,2 ml	10% SDS	0,1 ml
a.dest	9,3 ml	a.dest	6,8 ml
10% APS	0,2 ml	10% APS	0,1 ml
TEMED	0,016 ml	TEMED	0,010 ml

Tabelle 2: Rezept zur Herstellung von Elektrophorese- bzw. Blotting-Puffer

Elektrophoresepuffer		Blotting-Puffer		TBST	
10x für 1l		10x für 1l		10x für 1l	
Tris (pH=8,3l)	30,3 g	Tris	5,8 g	Tris (pH =8,0)	12,1 g
Glycin	144 g	Glycin	2,9 g	NaCl	87,7 g
SDS	10 g	SDS	37 g	Tween 20	0,5 %
		Methanol 20%	200 ml		

2.3.6 FACS (Durchflusszytometrie)

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur intrazellulären Analyse von Proteinen (HSP, HO, HIF) sowie zur funktionellen Analyse (Phagozytose, oxidativer Burst) eingesetzt. Ein besonderer Vorteil der Durchflusszytometrie in unserer Studie war die Möglichkeit, die Leukozyten in vivo in ihrer „Normalumgebung“ Vollblut sofort nach der Blutentnahme zu untersuchen, was in anderen Techniken nicht der Fall ist.

2.3.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Der Name FACS steht für fluorescence activated cell sorting, im deutschen auch Durchflusszytometrie genannt. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur Zelldifferenzierung (beispielsweise im Blut) und zur differenzierten Betrachtung von Zelloberflächen bzw. intrazellulärem Geschehen und Zellfunktion.

Ein Durchflusszytometer besteht aus den drei Komponenten Flüssigkeitssystem (Zelltransport), Optik und Elektronik (Umwandlung optischer in elektronische Signale). Das Prinzip des Durchflusszytometers ist die hydrodynamische Fokussierung: Die Trägerflüssigkeit erzeugt eine laminare Strömung. Zusätzlich wird durch eine Verringerung des Querschnitts in der Messküvette der Probenstrom verjüngt und beschleunigt. Die Zellen passieren nun perlschnurartig aneinandergereiht den Laserstrahl. Die Messparameter der Durchflusszytometrie sind einerseits das Streulicht, andererseits die Fluoreszenzimpulse. Beim Streulicht werden das Vorwärtsstreulicht (forward scatter) als Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (side scatter) als Maß für die Granularität unterschieden. Zur Fluoreszenzmessung werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper eingesetzt, die sowohl gegen intrazelluläre als auch gegen extrazelluläre Strukturen gerichtet sein können. Messparameter sind hier die Anzahl positiver Ereignisse (%) und die relative Fluoreszenzintensität. Die PBMC Gewinnung erfolgte, wie im Kapitel Western-Blot beschrieben. Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die Zellen intrazellulär, indirekt markiert und mittels FIX&PERM Kit (GAS-002-1, Fa. An der Grub) fixiert und permeabilisiert. Es wurden 5×10^5 Zellen in 50 μ l FACS-Puffer pro Röhrchen eingesetzt und durch Zugabe von 100 μ l Reagenz A fixiert, nach

einem Waschvorgang mit FACS-Puffer folgte die Permeabilisierung der Zellmembran durch 100 µl Reagenz B und die Markierung mit 20µl (1µg/20µl)speziellen Primär-Antikörpern, die gegen die zu messenden Proteine HSP 27, HSP 70, HO-1, iNOS und HIF-1α gerichtet sind. Zur Fluoreszenzmessung wurden nun 20 µl eines mit FITC konjugierten Sekundärantikörpers (s.Liste Materialien) hinzugefügt. Nach 20 minütiger Inkubation und einem weiteren Waschvorgang folgte die Messung der Zellsuspension am Durchflusszytometer FACS-Scan EPICS-XL-MCL der Firma Coulter.

2.3.7 Bestimmung des oxidativen Bursts

Während der Phagozytose oder nach äußerer Stimulation entstehen in Granulozyten oder Monozyten Sauerstoffradikale (Superoxid-Anionen, Hydrogenperoxid, Hypochlorsäure), die das beim Phagozytosevorgang ingestierte Bakterium zerstören sollen. Um nun die Produktion dieser Radikale nachweisen zu können, muss ein Stoff zugefügt werden, der sich unter Radikaleinwirkung verändert und quantitativ gemessen werden kann. Es handelt sich dabei um nicht fluoreszierendes Dihydrorhodamin (DHR 123), dass durch Radikaleinwirkung in fluoreszierendes Rhodamin (R 123) oxidiert wird. R123 kann quantitativ in den Zellen mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Es werden einerseits die Höhe der mittleren Aktivität der Sauerstoffradikalbildung und andererseits der prozentuale Anteil der phagozytierenden, radikalproduzierenden Zellen gemessen. Der oxidative Burst wurde mittels des BURSTTESTS der Firma Orpegen Pharma bestimmt. Als Bakterium wurde hier E.coli als partikulärer Stimulus verwendet, als Stimulantien phorbol-12-myristat 13-acetat (PMA als high stimulus) und N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP als low stimulus), und als Fluoreszenzsubstrat Dihydrorodamin 123 (DHR 123). 100 µl heparinisiertes Vollblut wurden in 4 Tubes a 5 ml gegeben. Nun wurde mit verschiedenen Ansätzen weitergearbeitet. In Ansatz 1 wurden 20 µl fMLP als low stimulus gegeben, in Ansatz 2 20 µl PMA als high stimulus. Zu Ansatz 3 wurden 20 µl Waschlösung als Negativkontrolle zugefügt. In Ansatz 4 wurden 20 µl E.coli als partikulärer

Stimulus zugefügt. Die Proben inkubierten jeweils 10 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschliessend wurden 20 µl Substratlösung (DHR 123 im Kit enthalten) je Tube hinzugefügt und wiederum 10 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um vorhandene Erythrozyten zu lysieren, wurden in jedes Tube 2 ml LyseLösung gegeben (LyseLösung im Kit) und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschvorgängen (Waschlösung im Kit) und Zentrifugation (5 min, 250 x g, 4 °C) wurden 200 µl DNA-Färbelösung hinzugefügt und 10 min bei 0 °C inkubiert. Anschliessend folgte die Messung des oxidativen Bursts im Durchflusszytometer FACScan EPICS-XL-MCL (Firma Coulter) bei 488nm Argonlaser.

2.3.8 Phagozytose

Die Phagozytose wurde mittels des PHAGOTEST der Firma Orpegen Pharma durchgeführt. Als Substrat wurden hier FITC-gekoppelte (fluorescein DTAF-conjugated) E.coli verwendet. 100 µl heparinisieretes Vollblut wurden in 5 ml Probenröhrchen aliquotiert und 10 min auf Eis vorgekühlt. Allen Ansätzen wurden 20 µl E.coli hinzugefügt. Die Probenansätze, in denen die Phagozytoseaktivität gemessen werden sollte, inkubierten für 10 min im Wasserbad bei 37°C, eine Probe blieb als Negativkontrolle auf Eis stehen. Nach „Quenchen“ der Proben und drei Waschvorgängen (Quenching –Solution bzw. Waschpuffer im Kit) wurden vorhandene Erythrozyten lysiert (je 2ml Lysepuffer, im Kit enthalten, Inkubation 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln). Im Anschluss daran wurden die Proben abzentrifugiert (5 min, 250 x g, 4 °C). Die DNA der Zellen wurde nun mit DNA-Färbelösung (Färbelösung im Kit) angefärbt und die Phagozytoserate der Granulozyten im Durchflusszytometer FACScan EPICS-XL-MCL (Firma Coulter) bestimmt.

2.3.9 RNA-Isolierung aus PBMC

Zur Messung der RNA wurde aus PBMC mittels des RNeasy MiniKit (Quiagen (250) die RNA isoliert. Das Prinzip der RNA Isolierung mittels RNeasy Mini Kit basiert auf der selektiven Bindungseigenschaft einer Silicagel-Membran und der Mikrozentrifugationstechnik.

Die isolierten PBMC werden lysiert und homogenisiert in einem stark denaturierendem, Guanidinisothiocyanat haltigem Puffer RLT. Intakte RNA kann dadurch isoliert werden, da RLT-Puffer RNasen sofort inaktiviert.

Die Probe wird mittels Qia-Shredder-Säulen homogenisiert, genomische DNA wird geschert und die Viskosität des Lysates reduziert. Die Zugabe des Ethanol zum Durchfluss dient dazu für die RNA optimale Bindungsbedingungen an die Silicagelmembran des RNeasy-Säulchens zu schaffen. Es kommt zu einer Adsorption der RNA an die Membran. Durch Waschschrte mit RW1 und RPE-Puffer werden kontaminationen (Salze, Proteine usw.) entfernt. Schließlich wird die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert.

2.3.10 RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)

Die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion) ist eine Kombination aus zwei in der Molekularbiologie verwendeten Methoden, um die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder Blutserum nachzuweisen.

2.3.10.1 Reverse Transkription

Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, wird die abgelesene RNA untersucht. Bei der Amplifikation von DNA in der Polymerase-Kettenreaktion werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet. Das heißt, sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Um nun die RNA nachzuweisen, muss diese vorher mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in der Reversen Transkription in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden.

Diese cDNA kann dann verwendet werden, um daraus in der PCR bestimmte Sequenzen zu amplifizieren.

Die Reverse Transkription wurde mittels des GeneAmp-RNA-PCR Core Kits der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Da totale RNA das Ausgangsmaterial darstellte, musste mittels der Reversen Transkription mit Hilfe von Oligo-dT-Primern und einer Reversen Transkriptase aus mRNA eine cDNA erstellt werden.

Zur Erstellung der cDNA wurde mit den in Tabelle 3 und 4 aufgeführten Ansätzen gearbeitet.

Tabelle 3: Ansatz zur Erstellung der cDNA

Komponente	Volumen
DEPC-Wasser	Variabel
RNA	variabel 500 ng
Gesamtvolumen	3 μ l

Tabelle 4: Ansatz des Master Mixes pro Ansatz

Komponente	Volumen	Endkonzentration
25mM MgCl ₂	4 μ l	5 mM
10 \times PCR-Puffer	2 μ l	1x
dGTP	2 μ l	1 mM
dATP	2 μ l	1 mM
dTTP	2 μ l	1 mM
dCTP	2 μ l	1 mM
Rnase-Inhibitor	1 μ l	1 U/ μ l
MuLV Reverse Transkriptase	1 μ l	2,5 U/ μ l
Oligo-dT 16 Primer	1 μ l	2,5 U/ μ l
Gesamtvolumen:	17 μ l	

Bei der Reaktion wurde folgendes Temperaturprofil eingestellt: 10 min Raumtemperatur, danach 15 min bei 42°C, dann 5 min bei 99°C und letztlich 5 min bei 5 °C.

2.3.10.2 PCR

Allgemein alternieren im Verlauf der PCR in mehreren Zyklen 3 Reaktionsschritte:

1. *DNA-Denaturierung*: Die doppelsträngig vorliegende DNA wird in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Dies geschieht durch Erhitzung auf 94-96 °C.

2. *Primer-Annealing*: Die Primer docken an die korrespondierende DNA-Sequenz an. Hiermit werden die Startpunkte der DNA-Synthese festgelegt.

3. *Elongation*: Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase (temperaturstabil, z.B. taq-Polymerase) polymerisiert die vorliegenden Nukleotide entlang der Ziel-DNA.

Das Gesamtvolumen aus dem oben genannten Reaktionsansatz von 50 µl wurde zur PCR in 5 Portionen zu je ca. 9 µl geteilt.

Zu den 9 µl wurden pro Ansatz noch 14 µl a.bidest, je 1 µl der 10pM konzentrierten beiden Primer (sense und antisense) und 25 µl Red Taq Polymerase (Jumpstart Red Taq Ready Mix, Firma Sigma) hinzugefügt. Als Primer wurden Oligonukleotidprimer von Interactiva, Ulm verwendet (Sequenzen s.Tabelle 5). Aktin wurde als Housekeeping-Gene zur Standardisierung verwendet. Zur Vergleichbarkeit der gemessenen Werte für HSP 27, HSP 72, HO-1 und iNOS wurde jeweils der Quotient des gemessenen Proteins mit Aktin gebildet.

Tabelle 5 Stressprotein-Oligonukleotidprimersequenzen

Stressgen	5' SensePrimer 3'	5' AntisensePrimer 3'	Amplifikat bp
HSP 27	CACGAGGAGCGGCAGG ACGAG	CAGTGGCGGCAGCAGG GGTGG	285
HSP 72	CTCCAGCATCCGACAAG AAGC	ACGGTGTTGTGGGGGTT CAGG	234
HO-1	CAGGCAGCGAATGCTGA GTTC	GATGTTGAGCAGGAACG CAGT	555
iNOS	CGGTGCTGTATTTCTTA CGAGGCGAAGAAGG	GGTGCTGCTTGTTAGGA GGTCAAGTAAAGGGC	258
β-Aktin	GGCGGCACCACCATGTA CCCT	AGGGGCCGGACTCGTC ATACT	202

Die PCR erfolgte mit einem GeneAmp PCR system 9700 Thermal Cycler.

Tabelle 6 zeigt die Amplifikationsbedingungen der einzelnen Stressproteine:

Tabelle 6: Amplifikationsbedingungen der Stressproteine HSP 27, HSP 72, iNOS und HO-1

Target-Gen	Melting	Annealing	Extension	Zyklen	Primer-Konz.
HSP 27	95°	69°	72°	28	10 pmol/μl
HSP 72	95°	62°	72°	28°	10 pmol/μl
iNos	94°	77°	72°	33	50 pmol/μl
HO-1	94°	56°	72°	25	10 pmol/μl
Aktin	94°	64°	72°	24	10 pmol/μl

Die Produkte dieser RT-PCR können dann auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt werden. Im Anschluss daran werden sie durch Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und dadurch sein Absorptionsspektrum verändert unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Produkt kann so anhand seiner Grösse (kDa) im Gel als das gesuchte Produkt identifiziert und über die Grösse der Banden quantifiziert werden.

2.3.10.3 DNA –Elektrophorese:

Nach der Amplifikation folgte die DNA –Elektrophorese auf einem Agarosegel. Zur Gelherstellung wurde Agarose 2% in eine Horizontalgelkammer gegossen, wo es ca. 45 min. polymerisierte. Als Referenzbande für den Größenvergleich dienten parallel mitlaufende DNA –Standardfragmente. Direkt nach der Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad 5 min lang gefärbt. Die Abbildung erfolgte unter UV-Licht mittels eines *Imaging systems der Firma Raytest* mit dem Messprogramm DIANA und dem Auswertungsprogramm AIDA.

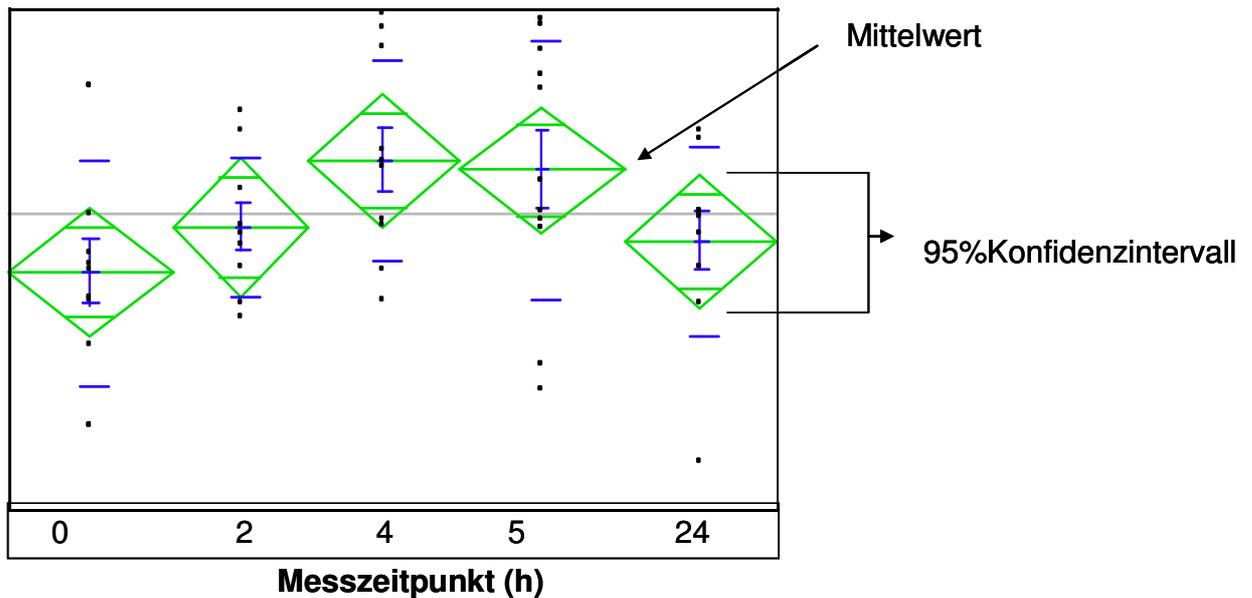


Abbildung 7: Legende der verwandten Plotsymbole „Diamonds“

2.3.11 Statistik

Die statistische Analyse wurde mittels des Statistikprogramms *JMP 5.1* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Die graphischen Darstellungen erfolgten mit *Microsoft office Excel 2003*, *JMP 5.1* und *Kaleida Graph* (Synergy Software, Abelbeck, Reading, PA, USA). Die Darstellung der Mittelwerte und 95%-Konfidenzintervalle erfolgte mittels sogenannter „Diamonds“ (Abbildung 7).

Durch die Länge der Konfidenzintervalle wird die Variabilität der Daten zu einem bestimmten Messzeitpunkt deutlich. Der Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten erlaubt eine Beurteilung darüber, wie sich die Mittelwerte der Ergebnisse zu den einzelnen Messzeitpunkten unterscheiden. Hierbei bedeuten sich überlappende Konfidenzintervalle keinen signifikanten Unterschied in den Mittelwerten, während bei nicht überlappenden Intervallen von einem signifikanten Unterschied der zugehörigen Mittelwerte ausgegangen werden kann. [51]

2.3.12 Materialien

Chemikalie	Name	Firma / Sitz der Firma
Acrylamidlösung (30%)		Biorad/München
Tris	Trizma Base	Sigma- Aldrich/München
SDS	Sodium-Sodecyl-Sulfate	Roth/ Karlsruhe
APS	Ammonium Persulfate	Sigma- Aldrich/München
TEMED	Tetramethylethlendiamin	Sigma- Aldrich/München
Glycin		Sigma- Aldrich/München
NaCl	Natriumchlorid	Merck /Darmstadt
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonola- urat	Sigma- Aldrich/München
Methanol		Merck /Darmstadt
Magermilch		Biorad/München
Laemmli-Puffer		Biorad/München
PBS	Phosphate buffered saline	Lonza/Wuppertal
TBST		Biorad/München
Lymphoflot		Biotest/Dreieich
MgCl ₂	Magensiumchlorid, Komponente des Gene Amp- RNA/ PCR-Core Kits	Roche

Chemikalie	Name	Firma / Sitz der Firma
PCR-Puffer	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
DEPC-Wasser	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
NE-PER Nuclear and cytoplasmatic extractions reagent Perbio/Pierce Nr.78833	Kit zur Herstellung von Kernlysatz bzw. Zelllysatz.	Pierce/Perbio
HALT Protease Inhibitor Cocktail Kit Perbio/Pierce Nr. 78410		Pierce/Perbio
Agarose		Sigma-Aldrich/München
PHAGOTEST		Orpegen Pharma /Heidelberg
Bursttest		Orpegen Pharma/ Heidelberg
RNeasy Mini Kit		Quiagen (250), Kat.-Nr: 74106
f MLP	N-formyl-Met-Leu-Phe	
PMA	phorbol-12-myristat 13-acetat	
E.coli		
Dihydrorhodamin		
Quenching solution		
FACS-Reagenz A		(Fix&Perm)

Chemikalie	Name	Firma / Sitz der Firma
FACS-Reagenz B		(Fix&Perm)
FACS-Puffer	500 mg Na Acid, 500 mg BSA, 500 ml PBS	
BSA	Bovine serum albumine	Sigma- Aldrich/München
NaAcid		Sigma-Aldrich/ München
PBS	Phosphate buffered saline	Lonza/Wuppertal
Isotyp : Mouse IgG1- UNLB-Standard		Biozol (Kat. Nr. 0102-01
Anti-HSP 27 mouse		Stressgen Biomol, Kat.-Nr.: SPA-800
Anti-HSP 70 mouse monoclonal		Stressgen Biomol, Kat. Nr.: SPA-810
Anti-HO-1 mouse monoclonal		Stressgen Biomol, Kat.-Nr.: OSA-110
Anti-iNOS mouse monoclonal		Santa Cruz, Biotechnology, Kat.- Nr.: SC-7271
-Anti-HIF-1 α , mouse IgG1		BD Biosciences, Kat.- Nr.: H-72320
Fluorescein DTAF- conjugated AffiniPure F, Fragment Goat Anti- mouse IgG		Jackson Immuno Research Lab, Kat.- Nr.: 115-016-068

Chemikalie	Name	Firma / Sitz der Firma
PCR-Puffer	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
DEPC treated water		
dGTP	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
dATP	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits Roche	
dCTP	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
dTTP	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
Rnase-Inhibitor	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
MuLV Reverse Transkriptase	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
Oligo-dT-Primer	Komponente des Gene Amp-RNA/ PCR-Core Kits	Roche
FITC gekoppelte Antikörper		
RNeasy MiniKit.		Quiagen
Oligonukleotidprimer		Interactiva Ulm
Red Taq Polymerase:Jumpstart Red Taq Ready Mix		Sigma-Aldrich/München

Chemikalie	Name	Firma / Sitz der Firma
GeneAmp PCR system 9700 Thermal Cycler		Applied Biosystems
DNA – Standardfragmente.		
Ethidiumbromid	Stammlsg. 10 mg/ml	Sigma- Aldrich/München
Super signal West Pico Chemiluminescent Substrate (34080)		Pierce/Perbio
Geräte:		
Ultra turrax		IKA Werkerstufen
Raytest UV-Kammer mit Digitalkamera		Raytest Isotopenmessgeräte GmbH Straubenhardt
2-D Densiometrie Programm AIDA		Raytest Isotopenmessgeräte GmbH Straubenhardt
Durchflusszytometer FACScan EPICS-XL- MCL		Beckman Coulter/ Krefeld

3 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Auswirkungen der Hypoxieexposition bzw. der Medikamentengabe auf die gemessenen Stressparameter genauer betrachtet. Die Ergebnisse wurden mit den im Kapitel „Material und Methoden“ beschriebenen Experimenten erzielt. Bei den dargestellten Effekten der Hypoxie bzw. der Medikamentengabe handelt es sich in den meisten Fällen nicht um signifikante Effekte, sondern lediglich um Tendenzen. Um methodische Effekte auszuschließen, wurden (außer bei den Ergebnissen des oxidativen Bursts) immer die Werte aus dem Kontrollversuch ohne Hypoxie von den Werten unter Hypoxieexposition subtrahiert. Signifikante Ergebnisse wurden in den Abbildungen mit Sternchen (*) gekennzeichnet. Im Rahmen von Vorversuchen der Studie wurden 4-stündige in vitro-Hypoxieversuche mit einer O₂-Konzentration von 12,5 % durchgeführt, um den Hypoxieeffekt in vitro zu beobachten, bevor die in vivo-Experimente starteten. Als Stressproteine wurden beim Vorversuch HSP 27 bzw. HSP 72 im Western Blot bestimmt. Für die geplante Studie entschieden wir uns jedoch für die Methode der Durchflusszytometrie, da hier im Gegensatz zum Western Blot eine differenzierte Betrachtung der Granulozyten bzw. Monozyten möglich ist. Bei den mittels der Durchflusszytometrie erzielten Ergebnissen wurden jeweils die % positiver Ereignisse, beispielsweise die % phagozytierender Monozyten bzw. Granulozyten, und die relative Fluoreszenzintensität (mfc) bestimmt.

Im folgenden Ergebnisteil werden in den dargestellten Diagrammen die Zeitpunkte der Blutabnahmen jeweils auf der x-Achse dargestellt. Zeitpunkt 0 entspricht der Blutabnahme kurz vor dem Beginn der Hypoxiephase (bzw. Normoxiephase im Kontrollversuch), beim Zeitpunkt 2 um die Abnahme während der Hypoxiephase und Zeitpunkt 4 direkt nach 4 h Hypoxie. Die Zeitpunkte 5, 8, 12, und 24 betreffen die Reoxygenierungsphase (d.h. die Zeit direkt im Anschluss an die Hypoxieexposition) 1h, 4h, 8h und 20h nach Hypoxieende. Zur weiteren Verdeutlichung sei hier auf Abbildung 6 im Teil Material und Methoden verwiesen.

3.1 Western Blot

Wie oben bereits erwähnt, wurde im Rahmen von Vorversuchen ein in vitro-Hypoxieversuch mit einer O₂-Konzentration von 12,5% durchgeführt. Im Western Blot wurden anschließend die Hitzeschockproteine HSP 27 und HSP 72 bestimmt. Sowohl bei HSP 27 als auch bei HSP 72 fielen bei den vier untersuchten Probanden keine großen Veränderungen der Proteinexpression durch die vierstündige Hypoxie auf. Exemplarisch wird hier der Western Blot HSP 72 zweier männlicher Probanden gezeigt (Abbildung 8).

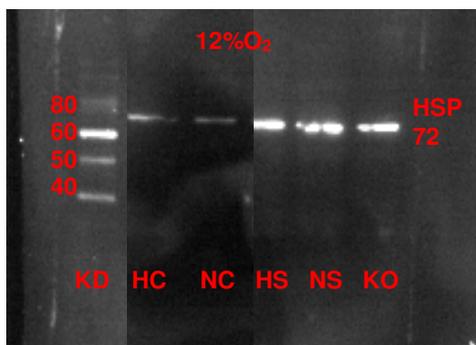


Abbildung 8 : Western Blot HSP 72 zweier männlicher Probanden. Abkürzungen: H= Hypoxie, N=Normoxie , C,S= Namenskürzel, KO =Kontrolle, KD= Kilodalton

3.2 Vitamin E-Spiegel

In der durchgeführten Studie wurden in einer doppelblinden, randomisierten crossover-Studie die Antioxidantien α -Tocopherol und α -Liponsäure substituiert. Hintergrund war die Fragestellung, ob antioxidativ wirkende Mittel die durch Hypoxie verursachten Effekte verändern können. Bei den Probanden wurde jeweils der Vitamin-E-Spiegel bestimmt, um eventuelle Non-responder zu erkennen und so eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern. Die Gabe der verwendeten Antioxidantien α -Tocopherol und α -Liponsäure hatte im Vergleich zum Kontrollversuch in Normoxie und ohne Medikamentengabe einen deutlichen Anstieg des Antioxidantienspiegels im Blut zur Folge, wie in Abbildung 9 deutlich wird. Lediglich bei zwei Probanden (Proband 6 und 9) stieg der Antioxidantienspiegel nicht an. Diese beiden Probanden können als Non-responder gewertet werden. Da sich jedoch die gemessenen Parameter bei

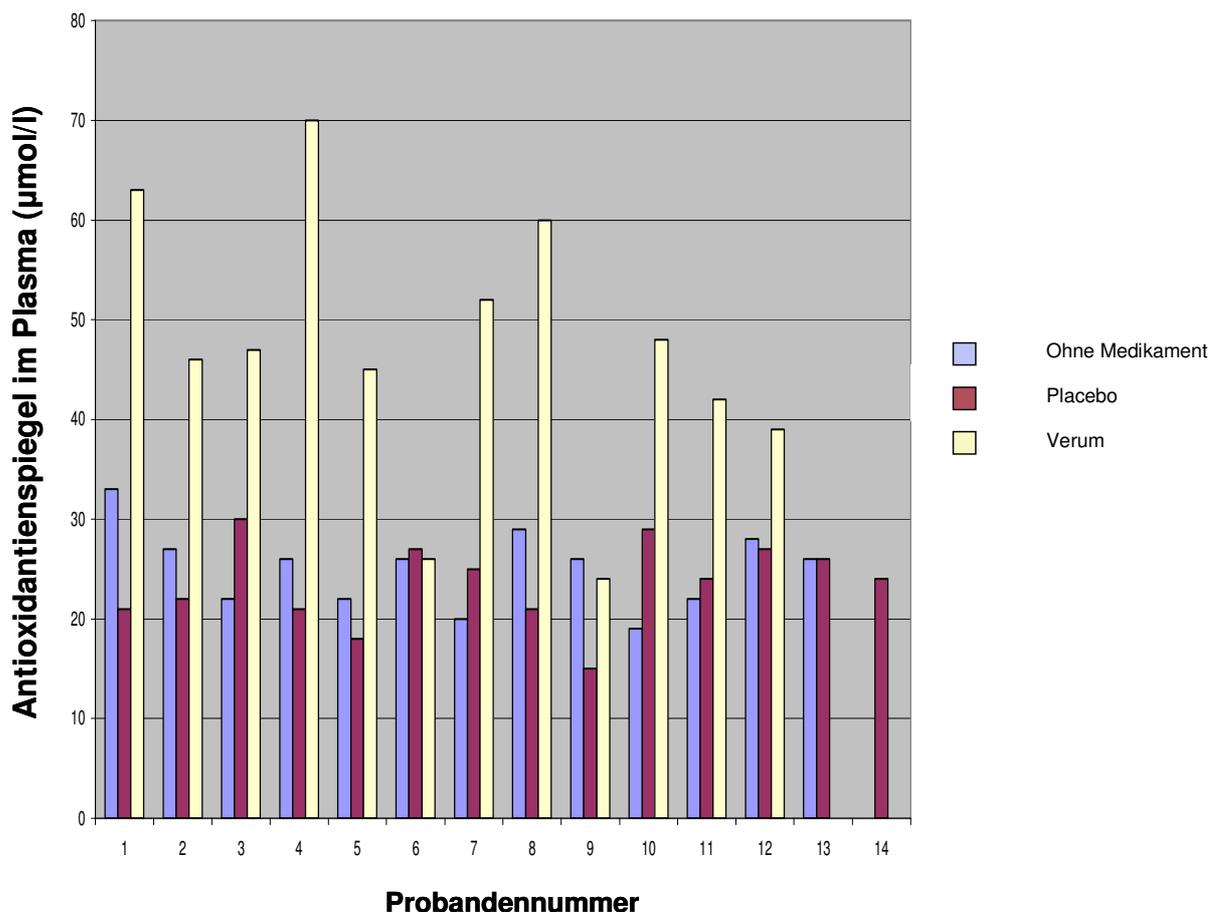


Abbildung 9: Serumspiegel von Antioxidantien ohne Medikamentengabe, unter Placebo und unter Verum.

diesen vergleichbar zu den Werten der anderen Probanden verhalten, muss hier nicht von einer Verfälschung der Ergebnisse ausgegangen werden.

3.3 Peroxidspiegel

Der Plasmaperoxidspiegel der Probanden wurde als Marker für den durch die Hypoxieexposition verursachten oxidativen Stress gemessen. Weiterhin wurde getestet, ob die Antioxidantiengabe einen Einfluss auf die Höhe des Peroxidspiegels hat. Bei starkem oxidativem Stress steigt der Plasmaperoxidspiegel bekanntermassen an [52-54]

In den Messungen zeigte sich während der Hypoxie und Reoxygenierungsphase unter Verum und Placebo keine deutliche Veränderung

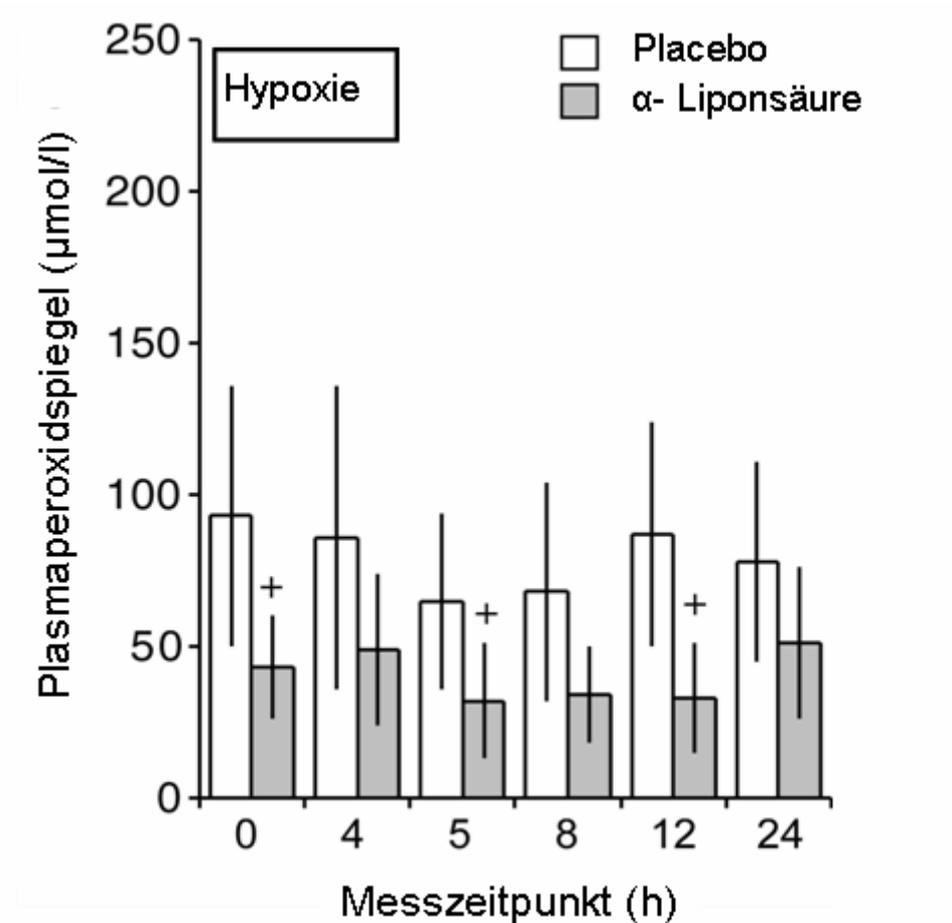


Abbildung 10: Plasmaperoxidspiegel im Blut unter Antioxidantien- bzw. Placebogabe zu verschiedenen Messzeitpunkten, signifikante Effekte mit + markiert. Abbildung aus: [65]

im zeitlichen Verlauf. (Abbildung 10) Es wurde jedoch festgestellt, dass der Plasmaperoxidspiegel unter Verumbedingungen signifikant niedriger als unter Placebo war.

3.4 Erythropoietin

Das Plasma-Erythropoietin zeigte im zeitlichen Verlauf für alle Probanden einen deutlichen Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert. Bis zum Zeitpunkt 2 während der Hypoxiephase fiel bei einzelnen Probanden eine primäre Reduktion des Plasma-Epo-Spiegels auf, auch hier kam es aber nach Zeitpunkt 2 zu einem deutlichen Anstieg. Ferner wurde eine starke probandenabhängige

Variabilität beobachtet. Der maximale individuelle Epo-Anstieg variierte zwischen 35 und 201%. (Abbildung 11)

In Abbildung 12 wird der zeitliche Verlauf des Erythropoietinspiegels in Normoxie und Hypoxie unter Placebogabe bzw. Verumgabe als Mittelwert aller Probanden zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Normoxie zeigte bis zum Zeitpunkt 8 keinen Effekt, bis zum Zeitpunkt 12 erfolgte jedoch ein signifikanter Anstieg der Epo-Konzentration, der bis zum Zeitpunkt 24 bestehen blieb. In Hypoxie stieg die Epo-Konzentration bereits in der Hypoxiephase sowohl unter Placebo- als auch unter Verumbedingungen bis zum Zeitpunkt 4 signifikant an, bis zum Zeitpunkt 12 erfolgte ein weiterer Anstieg, bis zum Zeitpunkt 24 sank er wieder leicht ab, war jedoch auch hier noch signifikant erhöht im Vergleich zum Ausgangswert (Zeitpunkt 0). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Placebobedingungen, unter Verumbedingungen lag der Spiegel jedoch interessanterweise über dem Spiegel unter Placebo (Abbildung 12).

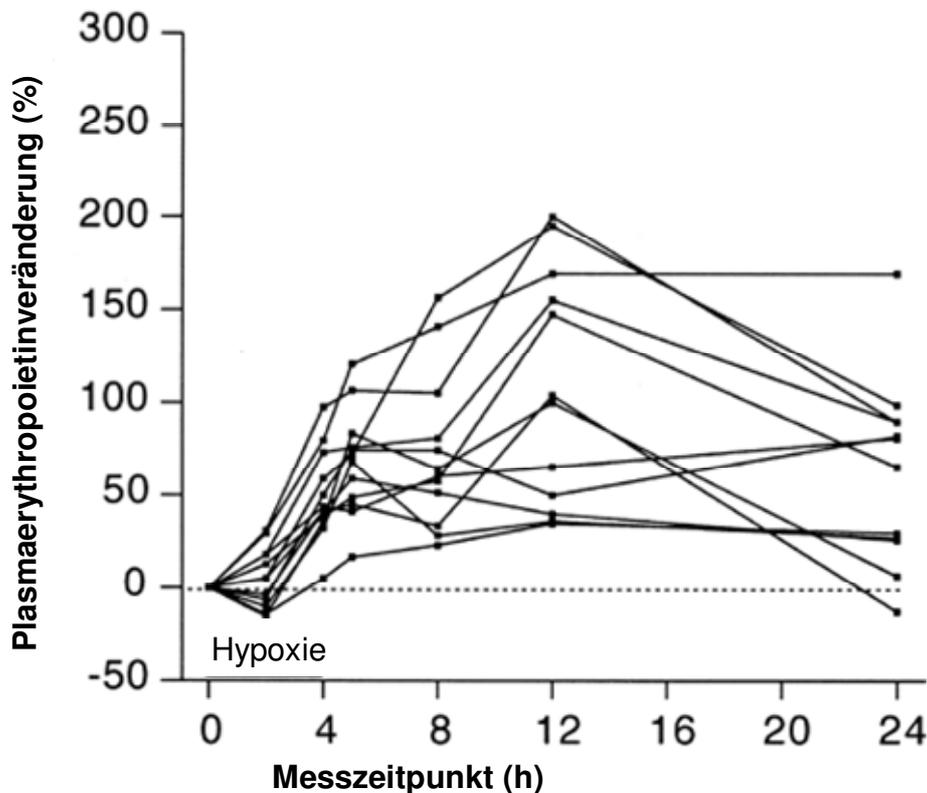


Abbildung 11: Individuelle Plasma-Epo-Veränderung während und nach Hypoxie unter Placebo-Bedingungen. Abbildung aus: [65]

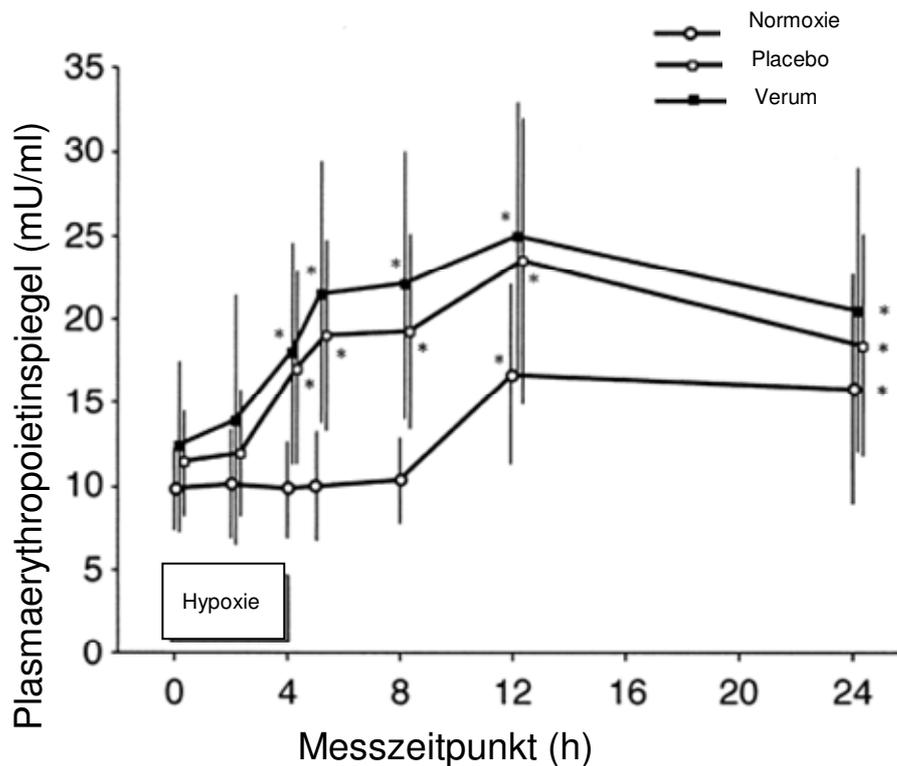


Abbildung 12 : Epo-Veränderungen im Plasma während und nach Hypoxie unter Verum bzw. Placebo und in der Kontrollgruppe unter Normoxie. Darstellung als zeitpunktabhängige Mittelwerte mit zugehörigen 5% bzw 95% Konfidenzintervallen. * signifikante Veränderung im Vergleich zum Zeitpunkt 0. Abbildung aus: [65]

3.5 Funktionelle Tests der Leukozyten: Phagozytose und Burst

3.5.1 Phagozytose:

Die Experimente zur Phagozytose und zum oxidativen Burst wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Generell hatten sowohl die 4stündige Hypoxie von 12,5% Sauerstoffkonzentration als auch die Gabe von Antioxidantien keinen signifikanten Einfluss auf die Phagozytoserate von Mono- und Granulozyten des peripheren Blutes. Alle Werte lagen innerhalb des Normbereichs mit teilweise hohen individuellen Schwankungen (siehe Standardabweichung). Es zeigten sich jedoch erwähnenswerte Tendenzen, auf die hier näher eingegangen werden soll.

Die % phagozytierender Monozyten sowie Granulozyten (hier verkürzend als Phagozytose bezeichnet) nahmen während der Reoxygenierungsphase (d.h. die Zeit nach der Hypoxieexposition, Blutabnahmezeitpunkte 5 bzw. 8) ab. In Abbildung 13 wird dies beispielsweise im Vergleich der Phagozytose der Monozyten unter Verumgabe Zeitpunkt 4 (12,9%) gegenüber Zeitpunkt 5 (0,6%) besonders deutlich. Es handelt sich allerdings hier nicht um signifikante Unterschiede. Unter Antioxidantiengabe fiel generell eine niedrigere Phagozytoserate auf als unter Placebogabe. In Abbildung 13 zeigt sich dies z.B. bei Zeitpunkt 2 im Vergleich von Placebo und Verum der jeweiligen Zellen. (Es stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auf die Antioxidantiengabe zurückzuführen ist. In der Diskussion wird auf diese Frage genauer eingegangen.) Abbildung 13 zeigt ebenfalls, dass die Phagozytose der Granulozyten zu jedem Zeitpunkt höher lag als die Phagozytose der Monozyten.

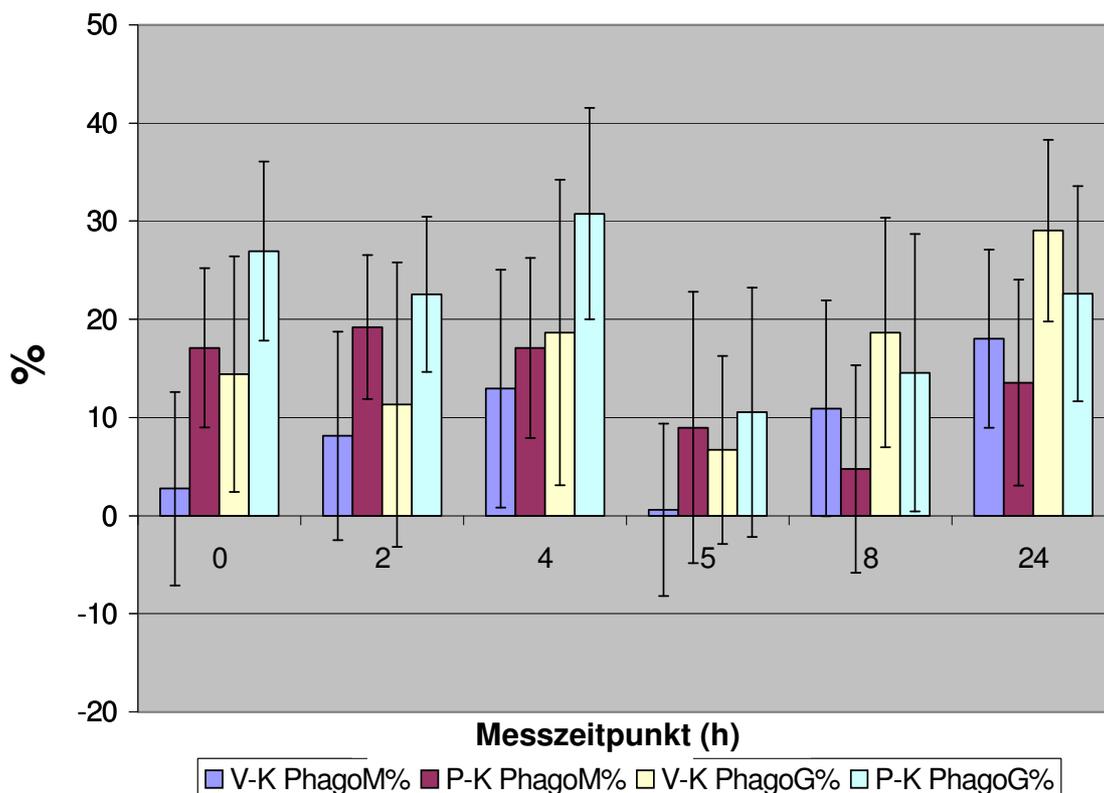


Abbildung 13 : % (delta Hypoxie unter Verum (V)- bzw. Placebogabe (P) – Normoxie (K)) phagozytierender Monozyten (M) bzw. Granulozyten (G) mit eingezeichneter Standardabweichung.

Bei den beschriebenen Ergebnissen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass allein die Atmung durch eine Maske für die Probanden einen Stressfaktor bedeuten kann. Um diesen potentiell verfälschenden Faktor ausschließen zu können, wurde der Kontrollversuch in Normoxie durchgeführt. Interessanterweise empfanden die Probanden die Maskenatmung subjektiv durchaus als Stress, während objektiv kein Effekt bei den gemessenen Parametern zu beobachten war. Trotzdem wurden die unter Normoxie gemessenen Werte in den Darstellungen von den Werten unter Hypoxie Verum (V) – Kontrolle (K) bzw. Placebo (P)- Kontrolle (K) subtrahiert, um einen potentiellen Effekt sicher auszuschließen. Im zeitlichen Verlauf wird in Abbildung 14 deutlich, dass die Maskenatmung allein keinen Effekt auf die Phagozytose der Monozyten bzw. Granulozyten hatte. Abbildung 14 zur Phagozytose kann hier exemplarisch für alle gemessenen Parameter gewertet werden.

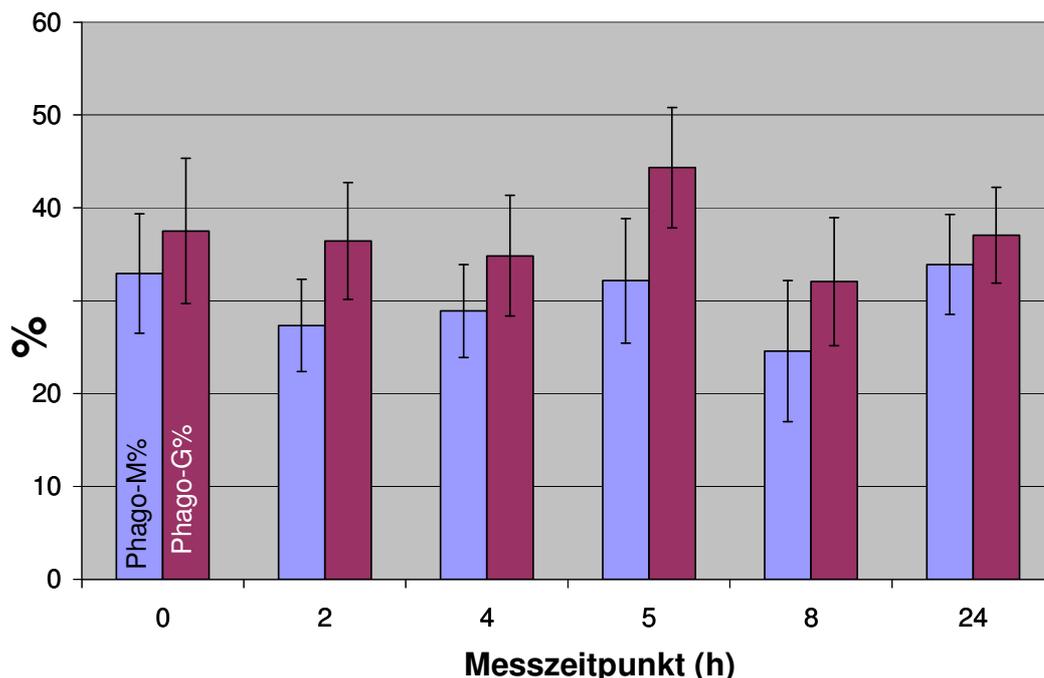


Abbildung 14: % phagozytierende Monozyten (M) bzw. Granulozyten (G) bei Maskenatmung unter Normoxie

3.5.2 Oxidativer Burst:

Bei der Bestimmung des oxidativen Bursts wurden 3 verschiedene Messungen durchgeführt.

Der ersten Probe wurden lediglich E.coli-Bakterien als Substrat zugefügt, der zweiten Probe als „Low control“ das Stimulans fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) und E. Coli, der dritten Probe als „High-control“ das Stimulans PMA (phorbol-12-myristat 13-acetat) und E. coli. Die beiden Stimulationen dienten als low- bzw. high-control dazu, Grenzwerte des oxidativen Bursts festzulegen, um die gemessenen Werte ohne Stimulation in diesem Bereich einordnen zu können. In unseren Messungen zeigte sich die Burstrate bei der Stimulation mit fMLP wie erwartet niedrig, die Burstrate bei der Stimulation mit PMA hoch. Exemplarisch werden hier die Abbildungen der % positiven Granulozyten bzw. die Fluoreszenzintensität der Granulozyten unter Placebo eines Probanden gezeigt (Abbildung 15,16). Bei den gemessenen Proben lagen sowohl die % positiven Granulozyten als auch die Fluoreszenzintensität des Bursts in Granulozyten im Referenzbereich auf relativ hohem Niveau. Im zeitlichen Verlauf zeigten sich bei der low-control sowohl bei der Anzahl positiver Zellen (%) als auch bei der Fluoreszenzintensität kaum Veränderungen. Bei den Werten der high-control bzw. der unstimulierten Proben fiel bei den % positiven Zellen ein interessanter zeitlicher Verlauf auf. Zu Beginn der Hypoxie bis Zeitpunkt 2 bzw. 4 gab es eine Reduktion der % positiven Zellen, in der Reoxygenierungsphase wieder einen Anstieg bis zum Ausgangsniveau. Zwischen den Werten unter Placebo bzw. Verumgabe zeigten sich keine auffälligen Unterschiede des oxidativen Bursts.

Zusammenfassend ist hier zu bemerken, dass die Werte des oxidativen Bursts jeweils zwischen low- und high-control, das heißt trotz Hypoxieexposition im Referenzbereich lagen.

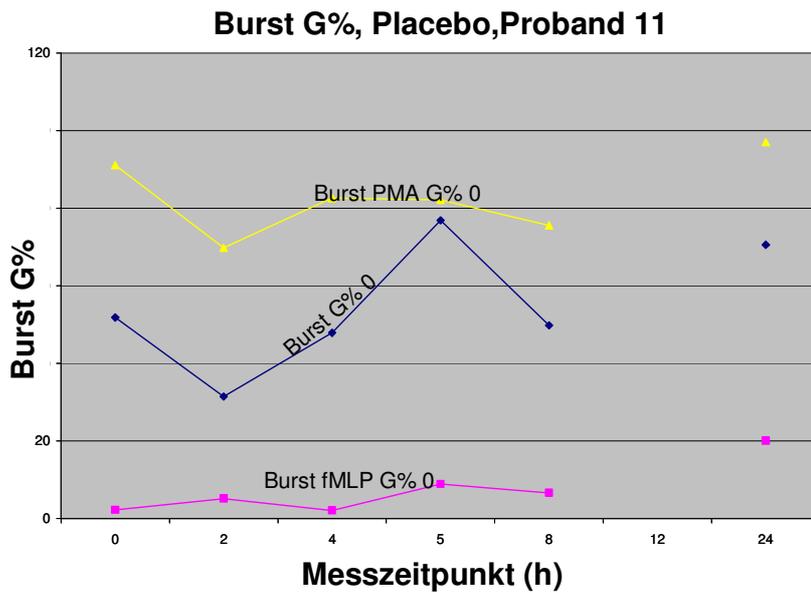


Abbildung 15 : % Burst positiver Granulozyten (G) unter Placebo (0) ,Prob.11(fMLP= low control, PMA= high control), keine Subtraktion der Werte aus dem Kontrollversuch

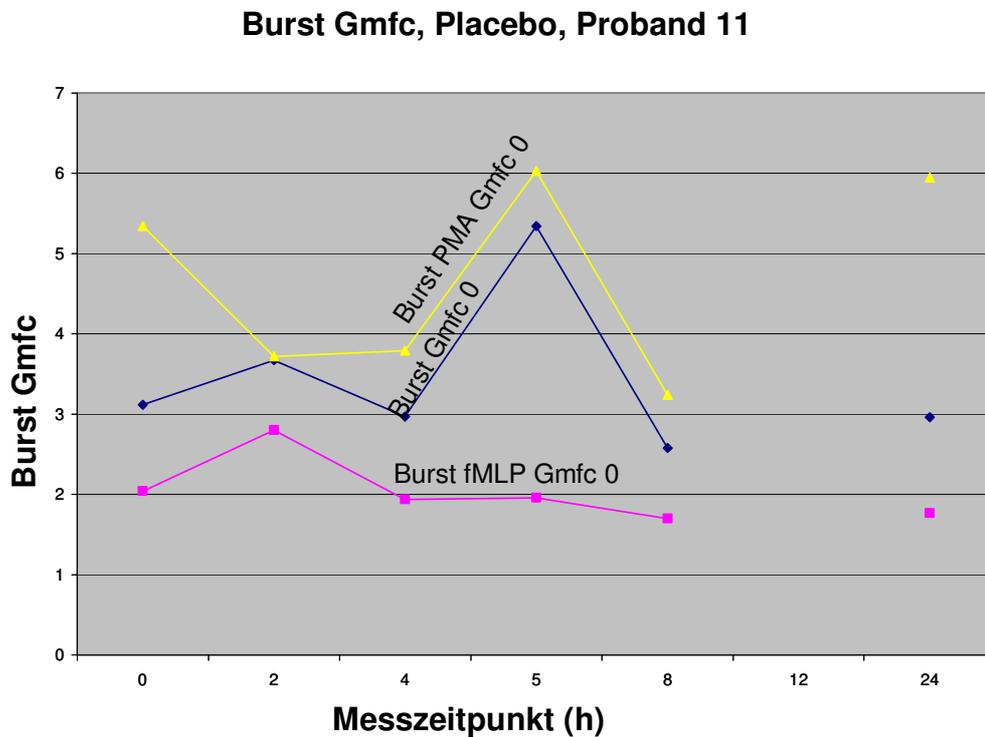


Abbildung 16: Fluoreszenzintensität Burst in Granulozyten (G) unter Placebo, Prob.11 (fMLP= low control, PMA= high control), keine Subtraktion der Werte aus dem Kontrollversuch

3.6 Intrazelluläre Expression von Hitzeschockproteinen und HIF 1 α (% und Intensität) in mononukleären Zellen

Als weitere typische „Stressantworten“ des Körpers auf die vierstündige Hypoxie wurde die intrazelluläre Expression von HIF-1 α und den Hitzeschockproteinen HSP 72, HSP 27, HO-1 und iNOS in Lymphozyten und Monozyten untersucht. Der prozentuale Anteil der exprimierenden Zellen bzw. die Expressionsrate zeigten unterschiedliche Effekte in der Hypoxie- und Reoxygenierungsphase.

3.6.1 HIF-1

HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie verschiedene Zielgene reguliert, die bei Sauerstoffmangel von Bedeutung sind. Hierzu gehören unter anderem Erythropoietin, HO-1 und iNOS. Unter Sauerstoffmangel wird ein Anstieg von HIF-1 erwartet [1,18], da die unter Normoxie sehr instabile HIF-1 α -Untereinheit unter hypoxischen Bedingungen nicht abgebaut wird und mit HIF-1 β dimerisiert (Abbildung 1). Die Veränderungen im zeitlichen Verlauf beziehen sich einerseits auf den prozentualen Anteil der HIF-1 α positiven Lymphozyten und Monozyten und andererseits auf die Expressionsrate von HIF-1 α in den genannten Zellen. Eine fehlende Änderung im prozentualen Anteil kann sich also kompensatorisch in der Expressionsrate des Proteins in den betreffenden Zellen ausdrücken. Der Anteil (in %) HIF 1 α positiver Lymphozyten bzw. Monozyten veränderte sich in der Hypoxie- und Reoxygenierungsphase minimal. Die Expressionsrate von HIF 1 α nahm sowohl in Lymphozyten als auch in Monozyten während der Hypoxie zu und in der Reoxygenierungsphase wieder ab. (Abbildung 17, 18). Bei den Zeitpunkten 4 und 5 handelte es sich hier um signifikante Veränderungen im Vergleich zu Zeitpunkt 0. Die Medikamentengabe hatte keinen Einfluss auf den Anteil der exprimierenden Zellen und die Expressionsrate.

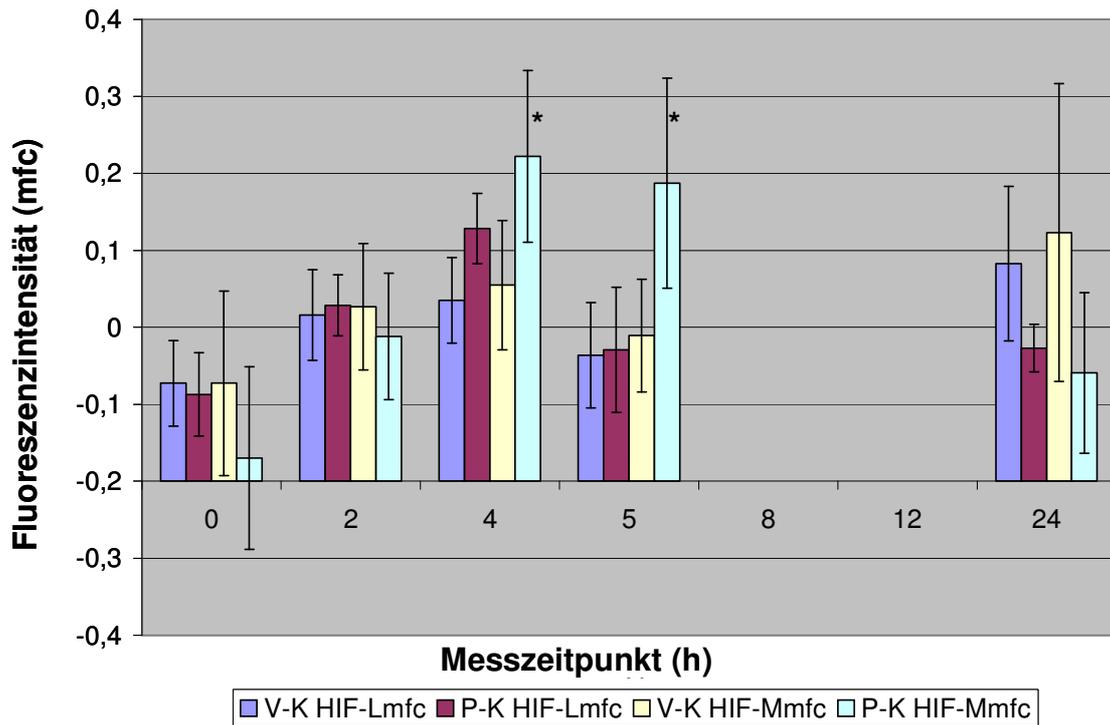


Abbildung 17: Expressionsrate (mfc) HIF-1 α in Lymphozyten (L) und Monozyten (M) unter Placebo bzw. Verum, signifikante Veränderungen mit Sternchen (*) gekennzeichnet.

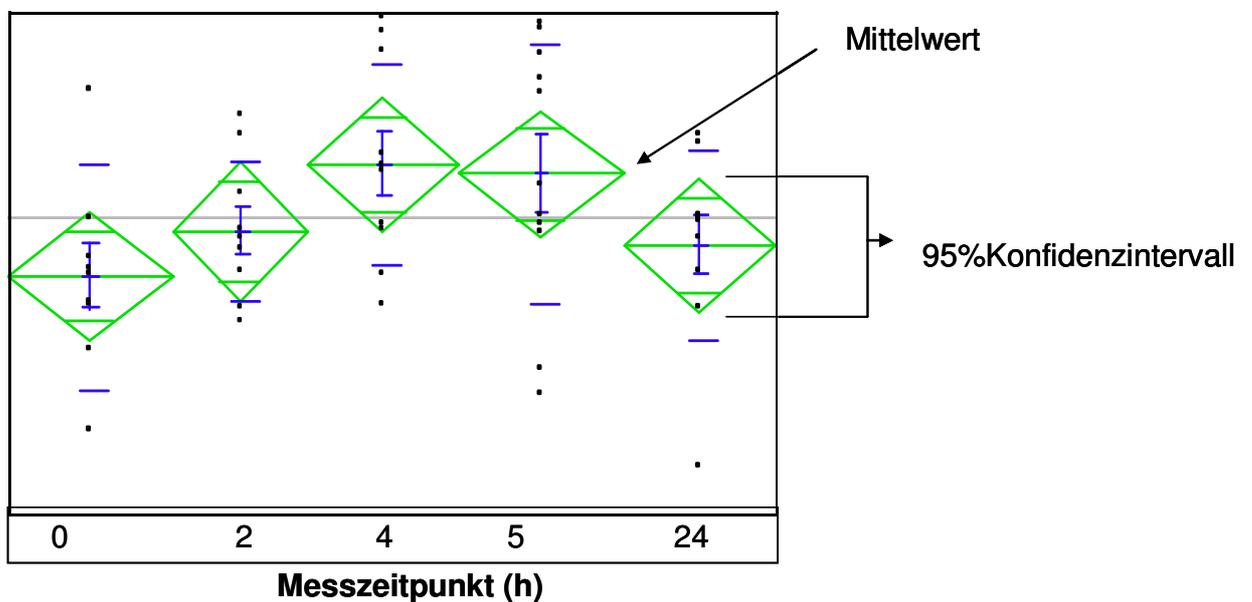


Abbildung 18: Expressionsrate des HIF-1 α in Monozyten unter Placebo zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Zu den Zeitpunkten 4 und 5 wird von einer signifikanten Veränderung ausgegangen, da sich die Konfidenzintervalle im Vergleich zum Zeitpunkt 0 nicht überschneiden.

3.6.2 Hitzeschockproteine

Bei HSP 72 war in Lymphozyten sowie Monozyten ein leichter Hypoxieeffekt erkennbar, der in einer Tendenz zur Down-Regulation der HSP 72-Expression durch Hypoxie bestand. Beim Anteil der Lymphozyten fielen Unterschiede unter Placebo- bzw. Verumgabe auf. Unter Verumgabe zeigte sich eine Abnahme der Anzahl der HSP 72 exprimierenden Lymphozyten (%) bei Zeitpunkt 4, daraufhin erfolgte ein Anstieg, bei Zeitpunkt 24 war der Ausgangswert ungefähr wieder erreicht. Unter Placebogabe verhielt sich die Anzahl der HSP 72 exprimierenden Lymphozyten ähnlich zur Verumgabe, hier war der Effekt jedoch ausgeprägter als unter Verumgabe. Bis Zeitpunkt 4 erfolgte eine deutliche Abnahme und daraufhin wieder eine Zunahme bis zum Zeitpunkt 24. Die Reaktion der Monozyten unter Verumgabe glich dem Verlauf der Lymphozyten, letztere allerdings auf einem niedrigeren Niveau. Unter Placebogabe trat die Hypoxiewirkung eher zögernd ein und hielt noch bis in die Reoxygenierungsphase (Zeitpunkt 5) an, es handelte sich jedoch nicht um eine signifikante Veränderung, sondern lediglich um eine Tendenz. (Abbildung 19).

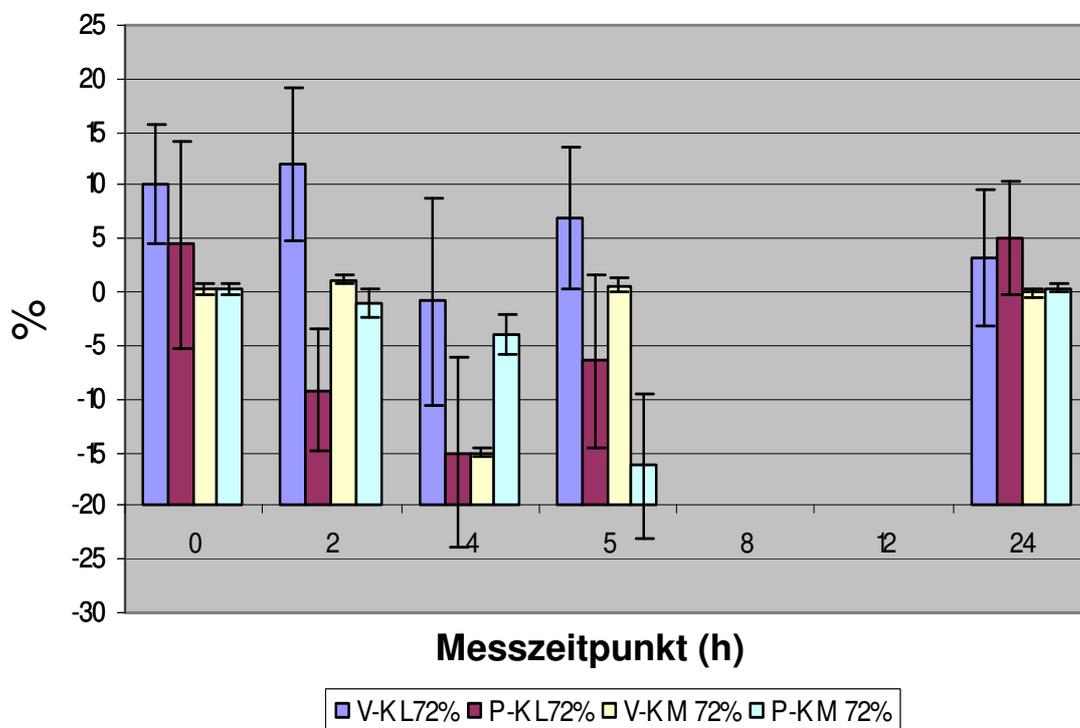


Abbildung 19: % HSP 72 exprimierender Lymphozyten bzw. Monozyten bei Placebo- bzw. Verumgabe

Diese interessante Beobachtung zum HSP 72 wird in der Expressionsrate des HSP 72 in Lymphozyten und Monozyten näher beleuchtet. Da der prozentuale Anteil der Lymphozyten und Monozyten interessanterweise abnahm, stellte sich die Frage, wie sich dieser Effekt auf die Expressionsrate des HSP 72 in den betreffenden Zellen auswirkt. Anteilsmäßig weniger exprimierende Zellen können zu einer geringeren Expressionsrate führen, sich in der Expressionsrate kaum widerspiegeln oder eventuell kompensatorisch zu einer erhöhten Expressionsrate führen. Mit dieser Fragestellung fällt in Abbildung 20 auf, dass sich bei den Lymphozyten der prozentual geringere Anteil HSP 72 exprimierender Zellen in der Expressionsrate nicht widerspiegelte. In den Monozyten nahm die Expressionsrate des HSP 72 sowohl unter Placebo als auch unter Verum bis zum Zeitpunkt 5 ab, nach 24 h war der Ausgangswert wieder erreicht. Der Verlauf unter Placebo lag auf einem deutlich niedrigeren Niveau als unter Verum.

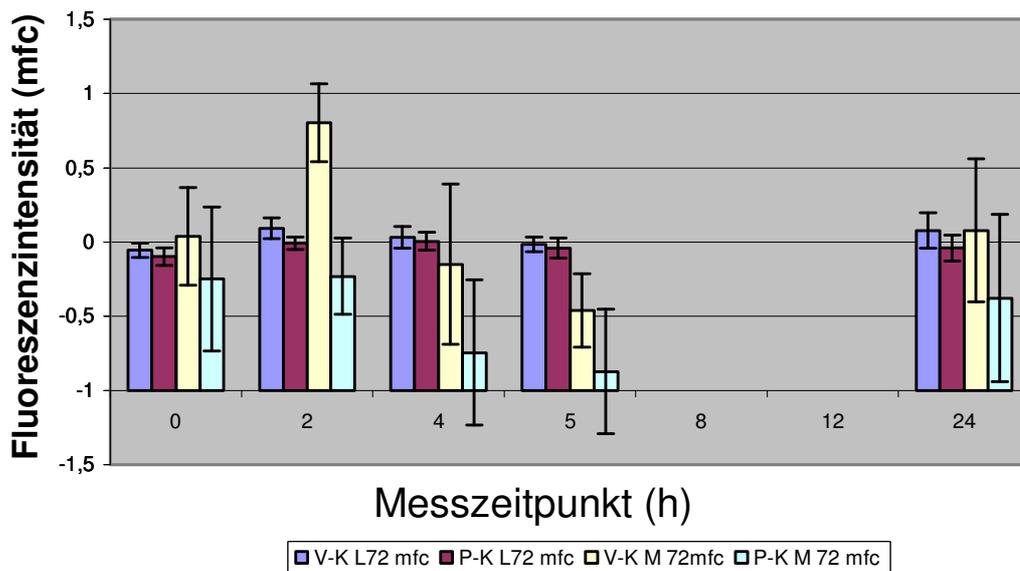


Abbildung 20: HSP 72-Expressionsrate in Lymphozyten bzw. Monozyten unter Verum (V)- und Placebogabe (P) (mfc = mittlere Fluoreszenzintensität)

Auf mRNA Ebene zeigte sich bei HSP 72 kaum eine Veränderung. Während der Hypoxiephase blieb die mRNA-Konzentration ungefähr auf gleichem Niveau, in der Reoxygenierungsphase fiel eine leichte Reduktion (Zeitpunkt 5) auf. Beispielfhaft sei hier auf Abbildung 24 verwiesen. In Versuchsteil A in

Normoxie zeigte sich wiederum keine Veränderung der mRNA-Konzentration im zeitlichen Verlauf. Beispielhaft ist dies in Abbildung 25 für HSP 27-mRNA dargestellt.

Abbildung 21 zeigt den prozentualen Anteil der HSP 27 exprimierenden Lymphozyten und Monozyten im Verlauf während und nach der Hypoxieexposition in den Placebo- bzw. Verumgruppen. Bei HSP 27 war eine Hypoxiereaktion (wiederum nicht signifikant) im Anteil positiver Lymphozyten zu erkennen, die Monozyten zeigten kaum Veränderung. Der Anteil HSP 27 positiver Lymphozyten fiel unter Verum- und Placebogabe bis Zeitpunkt 2 ab, danach erfolgte wieder ein Anstieg bis zum Zeitpunkt 24. Unter Verumgabe lag der Anteil auf einem höheren Niveau als unter Placebogabe.

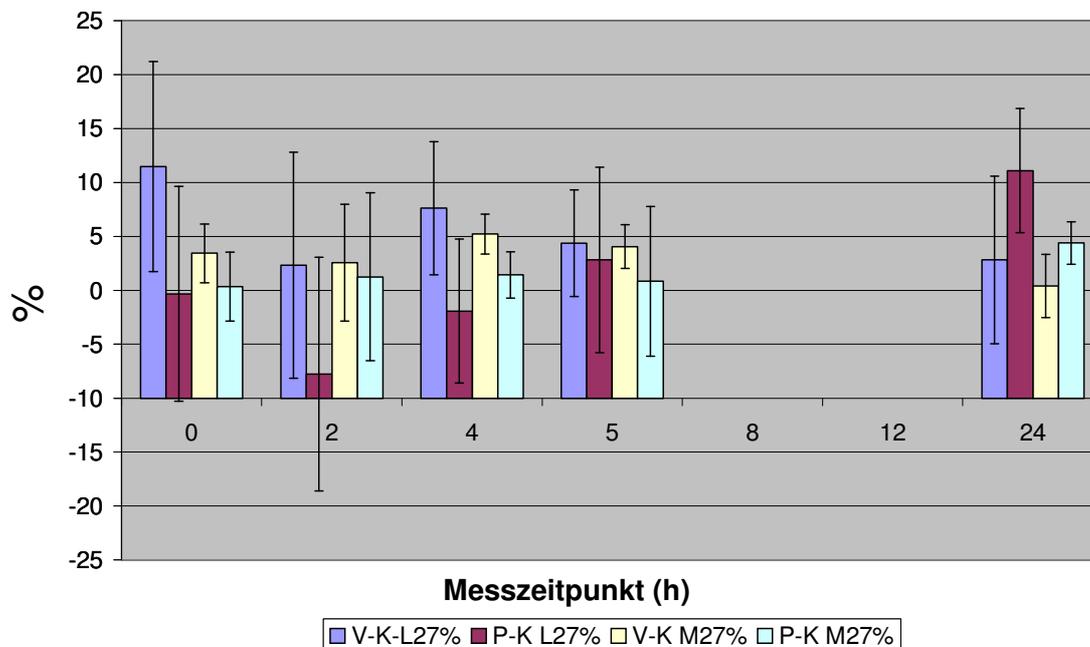


Abbildung 21: Anteil HSP 27-positiver Lymphozyten bzw. Monozyten unter Verum- und Placebogabe

Bei der Expressionsrate von HSP 27 in Lymphozyten bzw. Monozyten war wenig Veränderung unter Hypoxie sowie in der Reoxygenierungsphase zu erkennen.

Auf mRNA-Ebene in Normoxie fiel ebenfalls keine deutliche Veränderung in der Hypoxiephase und Reoxygenierungsphase auf. (Beispielhaft Abbildung 25)

Auch die Experimente zu HO-1 und iNOS zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei HSP 72 und 27. Bei HO-1 war eine Reduktion des exprimierenden Anteils von Lymphozyten und Monozyten bis zum Zeitpunkt 4 zu erkennen, zum Zeitpunkt 5 in der Reoxygenierungsphase erfolgte ein starker Anstieg. In Monozyten wurde der beschriebene Effekt nur unter Placebogabe beobachtet, unter Verum blieb der Anteil konstant. (Abbildung 22)

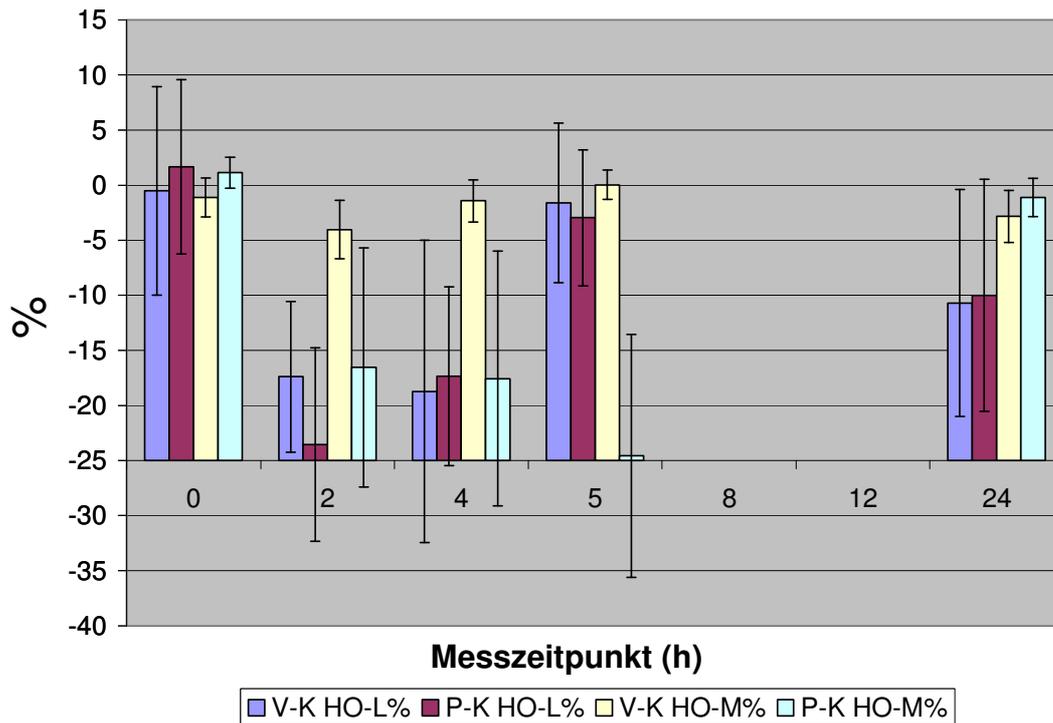


Abbildung 22: Anteil HO-positiver Lymphozyten bzw. Monozyten unter Verum- und Placebogabe

Der Anteil iNOS positiver Lymphozyten bzw. Monozyten nahm vergleichbar zum zeitlichen Verlauf bei HO-1 unter Hypoxie bis zum Zeitpunkt 4 stark ab und stieg in der Reoxygenierungsphase zum Zeitpunkt 5 wieder stark an (Abbildung 23). Hier wurde ebenfalls die Expressionsrate von HO-1 bzw. iNOS betrachtet:

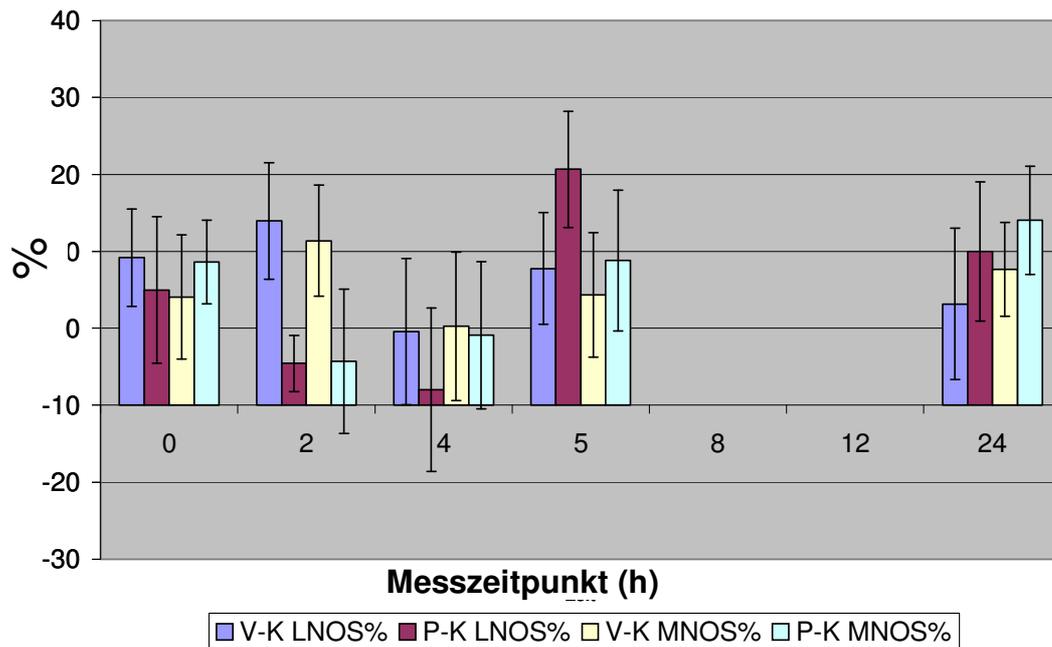


Abbildung 23: Anteil iNOS positiver Lymphozyten bzw. Monozyten unter Verum- und Placebogabe

Die Expressionsrate von HO-1 in Lymphozyten und Monozyten zeigte weder unter Hypoxie noch in der Reoxygenierungsphase eine Veränderung. Die Medikamentengabe hatte bei HO-1 keinen Effekt. Bei iNOS fiel in Lymphozyten weder unter Verum noch unter Placebo eine wesentliche Veränderung der Expressionsrate auf, in Monozyten zeigte sich unter Placebo ein leichter Anstieg der Expressionsrate. Auf mRNA-Ebene gab es wie bei HSP 72 und HSP 27 keine deutliche Veränderung während der Hypoxiephase und Reoxygenierungsphase. (Abbildung 24)

Versuchsteil A (Maskenatmung in Normoxie) hatte weder bei den Funktionen Phagozytose und Burst, noch bei den untersuchten Proteinen einen Effekt, es zeigte sich keine Veränderung des exprimierenden Anteils der Lymphozyten und Monozyten oder der Expressionsrate der untersuchten Proteine. Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich kein Effekt, beispielhaft sei hier auf Abbildung 25 verwiesen.

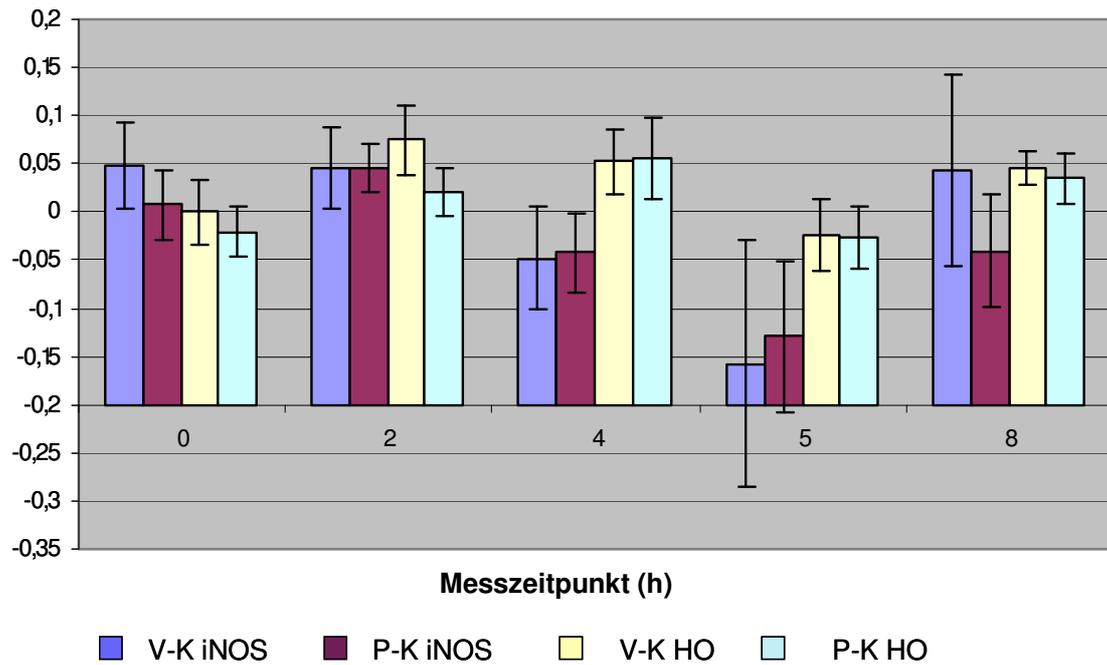


Abbildung 24: mRNA-Expression HO bzw. iNOS unter Verum und Placebogabe

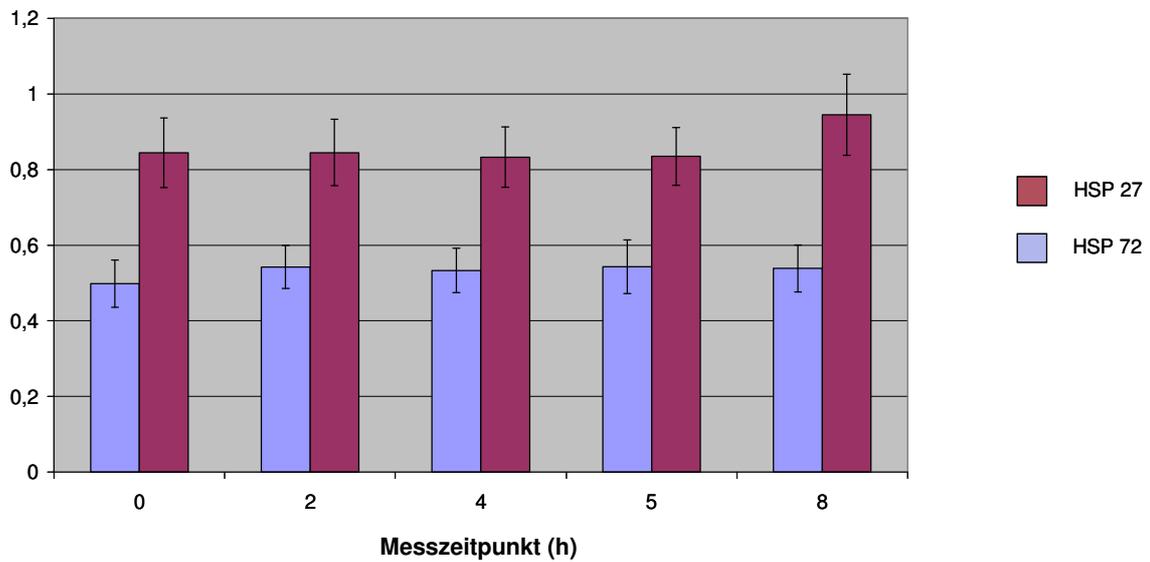


Abbildung 25: mRNA-Expression HSP 27 und HSP 72 unter Maskenatmung in Normoxie

4 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, die individuelle Regulation der einzelnen „Stressantworten“ des Körpers in Leukozyten unter Hypoxie zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluss des zellulären Redoxstatus der Zellen durch Supplementierung mit Antioxidantien erforscht werden. Der Versuch wurde so geplant, dass durch eine festgelegte Probandenauswahl möglichst viele potentiell die Ergebnisse verfälschende Eigenschaften ausgeschlossen wurden: Das Experiment war auf männliche Probanden beschränkt, da bei weiblichen Versuchsteilnehmerinnen zyklusabhängige Schwankungen der bei uns untersuchten Parameter nicht auszuschließen sind [54-57]. Weiterhin wurden Alter (27,1 - 34,1 Jahre), Größe (184 - 189 cm) und Gewicht (79,8 - 87,6 kg) der Probanden festgelegt, um eine Vergleichbarkeit der Effekte unter den Probanden zu gewährleisten. Eine körperliche Untersuchung der Probanden wurde zum einen zur Sicherheit der Probanden durchgeführt, andererseits war dadurch auch eine individuelle Reaktion der Teilnehmer aufgrund einer körperlichen Ursache in einem gewissen Rahmen auszuschließen. Die Einnahme von Medikamenten oder Vitaminpräparaten wurden als Ausschlusskriterium für die Teilnahme am Versuch gewertet, da durch mögliche Wechselwirkungen die von uns durchgeführte Medikamentensupplementierung verfälscht werden könnte. Die Probanden waren alle Nichtraucher, da Rauchen bekannterweise als oxidativer Stress für den Körper gewertet werden kann und daher die Hypoxie nicht allein Auslöser der beobachteten Effekte wäre [58]. Weiterhin waren die teilnehmenden Probanden nicht höhenadaptiert bzw. waren in den letzten 8 Wochen nicht geflogen. Höhenaufenthalt oder Flugreisen können durch die dort herrschende Hypoxie bereits eine Veränderung der bei uns untersuchten Parameter bewirken [59]. Insbesondere ein Höhenaufenthalt hätte eventuell schon die Erythropoietinexpression gesteigert, sodass entweder keine weitere Änderung aufgrund einer Adaptation an den geringeren O₂-Partialdruck mehr stattgefunden hätte, oder aber eine Steigerung nicht eindeutig der Hypoxieexposition hätte zugeordnet werden können. Um den

„Stressfaktor Maskenatmung“ und die allgemeinen Versuchbedingungen als Auslöser einer Veränderung der verschiedenen Stressantworten auszuschließen, führten wir einen Kontrollversuch in Normoxie ohne Medikamentengabe durch. Subjektiv berichteten die Probanden, dass allein die Maske und die Blutentnahme für sie Stressfaktoren darstellten. Bei den untersuchten Parametern wurden daher jeweils der Wert des Kontrollversuchs in Normoxie subtrahiert, um die alleinige Auswirkung der Hypoxie auf die untersuchten Stressantworten betrachten zu können. Hier ergaben sich, wie in den Abbildungen 14 bzw. 25 an den Beispielen der Phagozytose in Granulozyten und Monozyten unter Maskenatmung in Normoxie bzw. mRNA-Expression von HSP 27 und HSP 72 unter Maskenatmung in Normoxie verdeutlicht wird, keine Veränderungen der untersuchten Parameter, der subjektiv empfundene Stress hatte somit bei diesen Beispielen keine objektiv zu messenden Auswirkungen. Bei den anderen gemessenen Parametern zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen.

Die Medikamentenwirkung wurde durch die Messung des Vitamin E-Spiegels im Blut vor bzw. nach Einnahme überprüft. Unter den Probanden gab es einen Non-Responder, wie in Abbildung 9 deutlich wird, dieser zeigte jedoch bei den anderen gemessenen Parametern vergleichbare Effekte wie die anderen Probanden.

Durch diese genaue Probandenauswahl bzw. den durchgeführten Kontrollversuch konnten wir wesentliche Einflussfaktoren auf die gemessenen Parameter ausschließen. Da es sich aber um einen Versuch an Menschen handelt, gibt es weitere individuelle Eigenschaften, wie z.B. die individuell unterschiedliche Reaktion auf die Versuchsbedingungen, die im Voraus nicht vorhergesehen oder gar ausgeschlossen werden können.

4.1 Erythropoietin

Erythropoietin wurde in der vorliegenden Studie als Indikator für den Einfluss der in dieser Studie gewählten hypoxischen Bedingungen gemessen. Es wird unter anderem bei Sauerstoffmangel oder verminderter Sauerstoff-

Bindungskapazität vermehrt gebildet [60] und bewirkt eine vermehrte Bildung roter Blutkörperchen, um eine bestmögliche Ausschöpfung des vorhandenen Sauerstoffs zu gewährleisten. Der signifikante Anstieg des Plasma-Epöspiegels weist einen offenkundigen Einfluss der in dieser Studie durchgeführten Hypoxie nach, wie er auch in anderen Studien beobachtet wurde. [61-63]. Im Gegensatz hierzu konnten Julian et al. in ihrer Studie keinen Einfluss der Hypoxie auf den Erythropoietinspiegel feststellen. In dieser Studie wurden hoch trainierte Langstreckenläufer einer intermittierenden Hypoxie ausgesetzt, d.h. sie atmeten 5 mal wöchentlich über Maskenatmung Luft mit einem Sauerstoffgehalt von 12% in Woche 1, 11% in Woche 2 und 10 % in Woche 3 und 4. Die Expositionszeit betrug jeweils 70 min, von denen intermittierend 5 min hypoxische Luft und 5 min normoxische Luft eingeatmet wurde. Eine Kontrollgruppe atmete in gleichen äußeren Bedingungen normoxische Luft. Gemessen wurde unter anderem der Serum-Erythropoietin-Spiegel der Probanden. Hier konnte kein Anstieg, sondern ein Abfall der Erythropoietin-Konzentration sowohl in der Hypoxie-als auch in der Normoxie-Gruppe gemessen werden. Erklärung hierfür ist eine zu kurze Hypoxieexposition, um einen Anstieg im Erythropoietin-Spiegel hervorzurufen. Im Vergleich zu dieser Studie betrug in unserer Studie die Hypoxiezeit 240 min am Stück, auch in anderen Studien, die einen Anstieg des Erythropoietinspiegels messen konnten, betrug die Hypoxiezeit am Stück mindestens 120 min, oder intermittierend 240 min [64]. In unserer Studie wurde zusätzlich der Einfluss der supplementierten Antioxidantien gemessen. Die supplementierten Medikamente hatten jedoch keinen Einfluss [65]. Hierauf wird im Zusammenhang mit den Antioxidantien noch genauer eingegangen. (s. Abschnitt 4.6 der Diskussion)

4.2 Peroxidspiegel

Der Plasmaperoxidspiegel wurde als Marker für das Ausmaß des durch die Hypoxie verursachten oxidativen Stresses gemessen. Aus den gemessenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Hypoxie unter den hier gewählten Bedingungen offensichtlich keinen messbaren oxidativen Stress bedeutet. Die Gabe von Antioxidantien hat jedoch durchaus einen Einfluss auf den

Plasmaperoxidspiegel, dieser ist unter Verumgabe deutlich (teilweise signifikant) niedriger als unter Placebo. Diese interessante Beobachtung kann eventuell bei oxidativem Stress im Rahmen von Erkrankungen von Relevanz sein. Castilla et al. testeten beispielsweise die Wirkung antioxidativ wirkender Medikamente bzw. im Vergleich dazu roten Traubensaft an Hämodialysepatienten, beides wirkte reduzierend auf die Plasma-Konzentration oxidierten LDLs [66].

4.3 Phagozytose und Burst

Die Phagozytose wurde in dieser Studie als wichtiger Parameter der unspezifischen Immunabwehr der Leukozyten bestimmt. Bei einer Beeinträchtigung des Immunsystems durch die Hypoxieexposition bzw. durch sportliche Belastung ist eventuell eine Veränderung der Phagozytoseaktivität der Leukozyten zu erwarten [49]. Als oxidativer Burst wird die Bildung von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikalen (RONS) bezeichnet. Während Stressreaktionen, beispielsweise bei Entzündungsvorgängen werden im Körper RONS durch immunkompetente Zellen wie Monozyten und Granulozyten als „Waffen“ gebildet. Bei einer Veränderung der Immunlage durch die in dieser Studie angewandte Hypoxie könnte sich also auch eine Veränderung des oxidativen Bursts zeigen. Phagozytose bzw. Burst wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

Bei Phagozytose und Burst fielen zwar leichte Veränderungen durch den Hypoxieeinfluss auf, es handelte sich jedoch nicht um signifikante Effekte.

Die % phagozytierenden Granulozyten bzw. Monozyten zeigten während der Hypoxiephase nur wenig Veränderung, erst in der Reoxygenierungsphase erfolgte ein deutlicher Abfall. Hieraus kann geschlossen werden, dass die vierstündige Hypoxie unter unseren Bedingungen für das Immunsystem offensichtlich keinen so starken Stress bedeutet, dass eine gesteigerte Phagozytose notwendig wird.

Beim oxidativen Burst zeigte sich ein leichter Anstieg in der Reoxygenierungsphase.

Aus den von uns beobachteten Tendenzen der Reaktion kann man vermuten, dass die Reaktion der Granulozyten bzw. Monozyten auf die Hypoxie erst verzögert (in der Reoxygenierungsphase) eintritt und bei stärkerer oder längerer Hypoxie Phagozytose und Burst eventuell deutlichere Reaktionen zeigen würden. In Bezug auf sportliche Belastung kann dies bedeuten, dass erst bei hoher Intensität eine Veränderung der Immunfunktion auftritt. Briviba et al. konnten in ihrer Studie an Absolventen eines Halbmarathons bzw. Marathons einen Anstieg der Anzahl und der Burst –positiven Granulozyten bzw. Monozyten nachweisen, jedoch keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Phagozytose in Monozyten und Granulozyten veränderte sich nicht. Die Teilnehmer der Studie wurden jeweils 10 Tage vor und sofort nach der Belastung unter anderem auf die Parameter des oxidativen Bursts und der Phagozytose untersucht [11]. In dieser Studie handelt es sich um starke körperliche Belastungen, die mit einer 4stündigen Hypoxieexposition nicht direkt vergleichbar sind, hierin wird jedoch deutlich, dass Sport in Zusammenhang mit Hypoxie, wie es beim Höhentraining eingesetzt wird, sicherlich eine Belastung des Immunsystems bedeuten würde. In einer Studie von Chinda et al. konnte nach einer Marathon-Belastung ein Anstieg der Leukozytenzahl, jedoch eine Reduktion von Phagozytose und Burst nachgewiesen werden. Funktion der Phagozytose und des oxidativen Bursts gewertet werden [67].

In einer Studie von Mochida et al. wurden 13 weibliche Sportlerinnen einer definierten Trainingsbelastung über 2 h ausgesetzt. Diese Trainingsbelastung wurde vor und nach einer Phase von 64 Tagen Training durchgeführt. Direkt danach nahmen die Sportlerinnen an einem intensiven Trainingscamp von 6 Tagen teil, darauf folgend absolvierten sie wiederum die definierte Trainingsbelastung von 2h. Es wurde die Neutrophilenfunktion in Form von Phagozytoseaktivität und RONS vor und nach der 64tägigen Trainingsphase bzw. nach dem 6tägigen intensiven Trainingscamp bestimmt. Die Produktion von RONS stieg vor und nach der 64 tägigen Trainingsphase an, nach dem Trainingscamp fiel sie jedoch ab. Die Phagozytose fiel zu den ersten beiden Messzeitpunkten ab, nach dem Camp zeigte sich keine Veränderung. Der Abfall der RONS-Produktion wird hier mit einer herabgesetzten bakteriziden

Kapazität der Neutrophilen erklärt. In dieser Studie zeigte sich also durchaus eine Veränderung der Immunfunktion nach sportlicher Belastung, es wird jedoch eine gegenseitige Kompensation vermutet, um die Integrität der Neutrophilenfunktion zu gewährleisten [48].

Passend zu den Ergebnissen des oxidativen Bursts sind die beschriebenen Effekte auf den Plasmaperoxidspiegel, der sich im Verlauf der Hypoxie und Reoxygenierungsphase nicht änderte.

Man kann vermuten, dass Ausmaß und Dauer der Hypoxiebelastung, so wie sie in unserer Studie durchgeführt wurde, keine wesentlichen Effekte auf den Redox-Status der Zelle und die Immunfunktion hatten.

4.4 HIF-1 α

HIF 1 α ist ein Transkriptionsfaktor der unter Hypoxie die Transkription bzw. Translation verschiedener Zielgene wie Erythropoietin und HO-1 reguliert [20].

In der durchgeführten Studie wurden neben HIF-1 α unter anderem auch die durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Zielproteine Erythropoietin und HO-1 analysiert. Die Bestimmung dieser beiden „Ebenen“ der Stressantwort ist für die Bewertung der in dieser Studie angewandten Hypoxie ein interessanter Aspekt. Bei einer Veränderung von HIF-1 α ist nach zeitlicher Verzögerung eventuell auch eine Veränderung der Zielgene zu erwarten. Bei einer fehlenden Veränderung von HIF-1 α könnten Veränderungen der Zielgene auch durch andere Mechanismen verursacht worden sein. HIF-1 α wurde in dieser Studie durchflusszytometrisch bestimmt.

Der Anteil HIF 1 α positiver Lymphozyten bzw. Monozyten zeigte unter Hypoxie und Reoxygenierungsphase kaum Veränderung.

Die Expressionsrate von HIF 1 α nahm sowohl in Lymphozyten als auch in Monozyten während der Hypoxie zu und in der Reoxygenierungsphase wieder ab. (Abbildung 14,15). Bei den Zeitpunkten 4 und 5 handelte es sich hier um signifikante Veränderungen im Vergleich zu Zeitpunkt 0. In einer Studie von Patel et al. [67] konnte ebenfalls ein Anstieg des HIF-1 α nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde bei Leberoperationen die Portalvene zweimal

für jeweils 15 min. abgeklemmt, die Reoxygenierungsphase betrug jeweils 5 min. Vor und nach jeder Ischämie- bzw. Reoxygenierungsphase wurde Lebergewebe entnommen und zur HO-1, HSP 70, HIF-1 und HSF-1 (Heat shock factor) –Bestimmung weiterverarbeitet.

In dieser Studie handelte es sich im Gegensatz zu unserer Studie um Leberzellen und um eine vollkommene Ischämie im Vergleich zur Hypoxie, die in unserer Studie gewählt wurde. In beiden Studien konnte jedoch, wie erwartet, ein Anstieg des HIF-1 α nachgewiesen werden. Auffällig ist jedoch, dass in unserer Studie zwar keine Veränderung des Anteils HIF-1 α positiver Lymphozyten bzw. Monozyten, jedoch ein deutlicher Anstieg der Expressionsrate gezeigt werden konnte. Wir vermuten, dass die Lymphozyten bzw. Monozyten zuerst die Expressionsrate bis zu einem Maximalwert steigern und danach erst eine Steigerung des Anteils HIF-1 α exprimierender Zellen auffallen würde.

4.5 Hitzeschockproteine

Die Hitzeschockproteine HSP 72, HSP 27 bzw. HO-1 und iNOS werden als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren wie Hitzeschock, Hypoxie und oxidativen Stress vermehrt synthetisiert [24]. In der vorliegenden Studie soll deren individuelle Regulation als Antwort auf die vierstündige Hypoxie in vivo bestimmt werden. Die Hitzeschockproteine wurden durchflusszytometrisch, HSP 27 und 72 auch im in vitro-Vorversuch im Western Blot bestimmt.

Beim HSP 72 zeigt sich interessanterweise entgegen unseren primären Vermutungen kein Anstieg der Expression. In der Literatur wurden vergleichbare Studien häufig in vitro an anderen Zellen wie z.B. Leberzellen, durchgeführt. Außerdem war in diesen Studien die Hypoxie deutlich stärker. In einer anderen Studie wurde ein HSP 72 Anstieg in Leberzellen gemessen [24]. Chiral et al. konnten keine Veränderung des HSP 72 in Cerebellum, Cortex und Hippocampus von Schweinen nach einer 4stündigen Hypoxie und einem pO_2 von 5% feststellen [68]. Diese Beobachtungen führten uns zu der Vermutung,

dass sich keine bzw. ein Anstieg der HSP 72-Expression unter 4stündiger Hypoxieexposition einstellen würde.

In den durchgeführten Messungen zeigte sich im Mittel bei den getesteten Probanden kein Anstieg, sondern tendenziell ein Abfall der HSP 72-Expression.

Dieser Abfall zeigt sich deutlicher in der Anzahl (%) HSP exprimierender Lymphozyten bzw. Monozyten als in der Expressionsrate (mfc). Wir vermuten, dass die Eigenschaften des HSP 72 wie Membranstabilisierung, Chaperonfunktion und Renaturierung von denaturierten Proteinen unter unseren Bedingungen nicht notwendig zu sein scheinen, da die 4stündige Hypoxie bei einem pO₂ von 12,5% für das Immunsystem anscheinend noch keinen sehr starken Stress darstellt, was wir auch bei Phagozytose und Burst vermuteten. Die HSP 72-Expressionsrate veränderte sich unter unseren Bedingungen kaum.

Wir vermuten, dass als Hypoxieantwort primär der Anteil HSP 72-exprimierender Lymphozyten bzw. Monozyten abfällt und erst bei anhaltender Hypoxie auch eine Verminderung der Expressionsrate auffallen würde.

In anderen Studien wurde als Kurzzeithypoxie eine Hypoxiedauer von mindestens 8 h bzw. ein geringerer Sauerstoffgehalt als in unserer Studie gewählt [67,68].

Ein HSP 72-Abfall wurde bisher sehr selten beobachtet, insbesondere die Untersuchung im menschlichen Blut in unserer Studie ist neuartig.

Ramaglia und Buck konnten in ihren Versuchen an Schildkröten einen Abfall des HSP 72 auf Proteinebene im Western Blot beobachten [68,69], hier ist dieses Phänomen jedoch unter anoxischen Bedingungen und lediglich in Leberzellen festgestellt worden. Der Erklärungsansatz dieser interessanten Beobachtung ist hier eine verminderte Proteinsynthese in der Leber.

Wie Maheswaran et al. beobachteten [70], kann erhöhtes HSP 72 unter anderem die Zellproliferation hemmen.

Diese Eigenschaft würde in unseren Versuchen eine Hemmung der Granulozyten-Proliferation bedeuten, was unter Stressbedingungen für den menschlichen Körper von Nachteil wäre.

Wir gehen daher davon aus, dass in unserer Studie die Leukozytenproliferation von Bedeutung ist und eine HSP 72-Vermehrung durch eine Hemmung dieser Proliferation eher schädlich als von Nutzen wäre.

Möglicherweise entspricht unsere Beobachtung dem normalen Verlauf der HSP-Antwort bei Hypoxie, nämlich einer primären Reduktion bei 4 h, einem folgenden Anstieg bei 8 h und wiederum einer Reduktion bei 24h, der von Ning et al. bei einem O₂-Gehalt von 1% beschrieben wurde [71].

Ein ähnlicher Effekt fällt auch bei HSP 27 auf, hier ist ein ähnliche Ursache wie bei HSP 72 wahrscheinlich. Auf mRNA-Ebene hatte die Hypoxieexposition keinen deutlichen Einfluss auf die Expression von HSP 72 und HSP 27.

Hier gehen wir davon aus, dass bei einer stärkeren bzw. längeren Hypoxieexposition die Expression steigen würde. In einer Studie von Patel et al. [67] konnte in Lebergewebe nach zweimaliger 15 min. Ischämiezeit, (d.h. keine Durchblutung und folglich keine Sauerstoffversorgung) und jeweils folgender 5 minütiger Reperfusion (Wiederdurchblutung, d.h. Wiederversorgung mit Sauerstoff) eine erhöhte HO-1-mRNA-Expression nachgewiesen werden, jedoch kein Anstieg der HSP 72-mRNA-Expression. Da es sich in diesem Versuch um eine völlige Ischämie handelt, ist die O₂-Konzentration im Lebergewebe wesentlich niedriger als in unserem Versuch.

Erklärungsansatz dieser Beobachtung in der erwähnten Studie ist ebenfalls eine zu kurze Hypoxiedauer, um einen HSP 72-Anstieg nachweisen zu können. Eine mögliche Erklärung für den HO-1-Anstieg, der in dieser Studie nachweisbar war, könnte an den unterschiedlichen Regulationsmechanismen der Proteine HO-1 und HSP 72 liegen. Die HO-1-Regulation erfolgt über HIF-1 α , die HSP-Regulation über den HSF. Eventuell verläuft die Regulation über HIF-1 α früher und schneller als die über den HSF.

Auch bei HO-1 und iNOS fällt ein, teilweise signifikanter, Abfall der exprimierenden Lymphozyten bzw. Monozyten auf. Dies könnte ebenfalls dem

normalen zeitlichen Verlauf der Hypoxieantwort entsprechen. Beide Proteine werden durch HIF-1 α reguliert. Die HIF-1 α -Expressionsrate steigt, wie oben diskutiert, während der Hypoxiephase signifikant an. Bei diesem Anstieg von HIF-1 α ist mit etwas Zeitverzögerung auch ein Anstieg der durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Proteine, beispielsweise HO-1, zu rechnen.

Auf mRNA-Ebene zeigt sich bei HO-1 und iNOS wiederum kein deutlicher Effekt der Hypoxieexposition und Reoxygenierung. In einer Studie von Patel et al. wurde ein HO-1-mRNA Anstieg während der Hypoxiephase und vor allem in der Reoxygenierungsphase nachgewiesen [67]. Es konnte ein HO-1-Anstieg in der ersten Ischämiezeit und nach Reperfusion, ein leichter Abfall in der zweiten Ischämiezeit und wiederum ein Anstieg in der zweiten Reperusionszeit festgestellt werden. In der beschriebenen Studie handelt es sich im Gegensatz zu unserer Studie um Leberzellen und eine vollkommene Ischämie (d.h. keine Sauerstoffversorgung) Eine Erklärung für den deutlichen HO-1-Anstieg in der Studie von Patel et al. ist die Tatsache, dass die mRNA-Synthese vom Energiehaushalt der Zelle begrenzt wird. Während einer Ischämie ist der Energiehaushalt der Zelle begrenzt und wird in der Reperfusion rasch wieder erhöht, sodass während der Reperfusion wieder eine verstärkte mRNA-Synthese stattfinden kann. Dieser Erklärungsansatz könnte auch in unserer Studie von Bedeutung sein. Während der Hypoxiephase ist weniger ATP zur mRNA-Synthese vorhanden. Eventuell könnte zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls ein Anstieg gemessen werden.

Tomomi et al. [38] konnten in ihrer Studie einen Abfall der HO-1 mRNA Expression in menschlichen Glioblastomzellen bei einem Sauerstoffgehalt von 1% in einer Hypoxiekammer und einer Expositionszeit von 6-48 h nachweisen. Weiterhin konnten sie eine Reduktion der HO-1-Halbwertszeit unter Hypoxie von 3h auf 1,5 h zeigen. Hier gibt es verschiedene Erklärungsansätze, unter anderem ein Schutz der Zelle vor den potentiell toxischen Abbauprodukten des Häm-Katabolismus, der durch HO-1 getriggert wird, eine Einsparung der Energie, die im Häm-Stoffwechsel benötigt wird, und eine reduzierte Eisenakkumulation. Eisen häuft sich beim Katabolismus von Häm ebenfalls an und ist im Tumorwachstum von Bedeutung. Die untersuchten Glioblastomzellen

benötigen Eisen zur Zellproliferation, daher wäre eine Eisenakkumulation von Nachteil. In dieser Studie handelt es sich einerseits um eine längere und stärkere Hypoxieexposition als in unserer Studie, andererseits um Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Blutzellen in unserer Studie. Ein direkter Vergleich ist aus diesen Gründen nicht möglich. Eine interessante Beobachtung ist die verkürzte HO-1-mRNA-Halbwertszeit unter Hypoxie. Mit einem schnelleren Abbau der HO-1 unter Hypoxie ist erklärbar, dass sich im zeitlichen Verlauf kein deutlicher Effekt in der mRNA-Expression durch die Hypoxieexposition zeigt.

Auch Nakyama et al. [37] konnten einen HO-1-mRNA-Abfall unter Hypoxie (1% Sauerstoff, 6-48 h) in menschlichen Nabelschnurendothelzellen feststellen. Auch hier ist der Erklärungsansatz einerseits eine Einsparung der für den Häm-Stoffwechsel benötigten Energie, andererseits eine Art Verteidigungsmechanismus der Zelle unter Hypoxie. In dieser Studie handelt es sich ebenfalls um eine wesentlich längere und stärkere Hypoxieexposition und um Endothelzellen. Bei in vitro-Versuchen, die in den beiden zuletzt beschriebenen Studien durchgeführt wurden, kann eine beliebige Hypoxiezeit- bzw. intensität gewählt werden, was bei unserer Studie in vivo nicht der Fall ist. Eventuell wäre bei einer längeren und stärkeren Hypoxieexposition ein ähnlicher Effekt zu beobachten.

4.6 Antioxidantien

In der durchgeführten Studie wurden als Medikamente die Antioxidantien α -Tocopherol sowie α -Liponsäure verwendet. Applikation bzw. Einnahme der Antioxidantien wurde anhand der Vitamin E-Konzentration im Serum überprüft. Bis auf einen Probanden konnten alle Werte eindeutig den entsprechenden Placebo- oder Verumphasen zugeordnet werden.

Durch ihre Wirkung als Radikalfänger bzw. als Regenerator von verbrauchtem Vitamin E wurden diese beiden Antioxidantien mit der Fragestellung substituiert, ob sie in der Lage sind, die durch Hypoxie verursachten Stressreaktionen, wie z.B. den oxidativen Burst und die HSP Synthese zu vermindern.

Beim oxidativen Burst werden reaktive Sauerstoffradikale bzw. Stickstoffradikale (RONS) in neutrophilen Granulozyten gebildet. Diese RONS können einerseits schädliche Auswirkungen auf Zellstrukturen haben, andererseits aber auch wichtige regulatorische Funktionen ausüben.

Zu den schädlichen Auswirkungen gehört die Protein-Strukturveränderung durch Oxidation einzelner Aminosäuren und Spaltung von Polypeptidketten, was zu einer beeinträchtigten Funktion oder zu einer Anhäufung von beschädigten Proteinen führt.

Weiterhin können Radikale DNA-Schäden wie Einzel- oder Doppelstrangbrüche verursachen.

Andererseits können bestimmte, durch RONS verursachte Schäden wiederum HSPs aktivieren, die bei der Renaturierung der denaturierten Proteine unterstützen.

Zu den positiven Effekten der RONS gehört der oben genannte Angriff auf Mikroorganismen, die Zellproliferation, sowie die Aktivierung von Nukleasen zur DNA-Reparatur. Durch die oben beschriebene Antioxidantiengabe könnte der durch Stresseinwirkung eventuell erhöhte oxidative Burst vermindert werden. In ihrer Wirkung als Radikalfänger können Antioxidantien den durch die Hypoxie bedingten oxidativen Stress vermindern und somit auch die Synthese von Stressproteinen wie HSP 70 und HSP 27 verringern.

Unter Antioxidantiengabe fielen bei den gemessenen Parametern interessante Effekte auf.

Primär ist zu sagen, dass es unter den Probanden zwar einen Non-responder gab, bei ihm jedoch im Vergleich zu den übrigen Probanden vergleichbare Effekte zu beobachten sind.

Bei der Phagozytose beobachteten wir niedrigere Werte unter Verum-als unter Placebo (s. Abb. 7 Ergebnisteil). Dies entspricht unserer Erwartung an die Gabe von Antioxidantien, die die durch den oxidativen Stress verursachten Effekte vermindern sollen (s. o.). Die Hypoxieexposition hatte, wie oben beschrieben, keinen Anstieg der Phagozytoseaktivität zur Folge. Die Phagozytose ist jedoch

ein Prozess, der auch ohne Stresseinwirkung stattfindet und offensichtlich durch die Gabe von Antioxidantien verringert werden kann.

Beim oxidativen Burst fiel kein Unterschied zwischen Placebo- und Verumgabe auf. In einer zu unserer Studie in vielen Punkten vergleichbaren skandinavischen Studie von Nielsen et al. wurden 18 Sportlern über einen Zeitraum von 4 Wochen Antioxidantien substituiert, um die Wirkung von Antioxidantien auf den RONS-Spiegel nach körperlicher Belastung zu erforschen. Primär ist zu sagen, dass die körperliche Belastung der Probanden keine signifikante Auswirkung auf den RONS-Spiegel hatte. Vergleichbar zu unseren Ergebnissen konnte auch in dieser Studie kein Effekt der Antioxidantiengabe auf den Status des oxidativen Stresses beobachtet werden.

Bei Erythropoietin, HSP 70, HSP 27 und HO-1 in Monozyten lagen die beobachteten Effekte bei Verumgabe tendentiell höher als bei Placebogabe.

Wie oben bereits beschrieben, verursachte die in dieser Studie gewählte kurze und milde Hypoxieform keinen so großen Stress, sodass eine vermehrte Expression von Stressproteinen oder eine Verstärkung der Immunfunktionen wie Phagozytose und Burst nicht nötig wurde. Möglicherweise war die Hypoxieintensität zu schwach oder die Hypoxiedauer zu kurz, Es könnte einerseits eine Umverteilung der in der Stressreaktion „aktiven“ Leukozyten im peripheren Blut stattfinden, sodass diese der Messung entgehen, andererseits war jedoch eventuell die Hypoxiedauer bzw -intensität zu gering, um eine Stressantwort der Leukozyten zu verursachen [47].

Die Antioxidantien wurden mit der Fragestellung substituiert, ob sie in der Lage sind, den durch die Hypoxie verursachten Stress zu vermindern, und somit auch die Stressantworten zu verringern. Da insgesamt keine deutlichen Stressantworten zu messen waren, wurden hier auch die Antioxidantien mit ihrer vermuteten Wirkung nicht benötigt. Im Fall der Phagozytose bzw. dem Peroxidspiegel zeigt sich jedoch, dass die verwendeten Antioxidantien unabhängig von der Hypoxieexposition durchaus einen vermindernenden Effekt auf die gemessenen Parameter haben.

Die beschriebenen Effekte der Antioxidantien bei HSP, Phagozytose und Burst sind daher nicht im Zusammenhang mit der Hypoxieexposition zu werten.

Auffällig ist allerdings, dass der Erythropoietinspiegel während der Hypoxie signifikant ansteigt, hier also die Hypoxie einen deutlichen Effekt hatte, die Antioxidantiengabe hier jedoch keinen Effekt zeigte. Es stellt sich die Frage, ob Antioxidantien in den Erythropoietin- Stoffwechsel eingreifen können. Bekannt ist, dass die Erythropoietin-Regulation vor allem in Zusammenhang mit Veränderungen des O₂-Gehaltes der Atemluft steht und nicht mit dem zellulären Redoxstatus, bei dem die Antioxidantien u.a. als Radikalfänger wirken können [60]. Somit ist auf dieser Ebene nicht mit einer Veränderung des Erythropoietinspiegels zu rechnen. Eine andere Möglichkeit der Beeinflussung des Erythropoietinspiegels ist über die HIF 1- α Regulation möglich, da die Erythropoietinsynthese von diesem Transkriptionsfaktor abhängig ist. Die Regulation dieses Transkriptionsfaktors ist jedoch ebenfalls, wie in Abbildung 1 deutlich wird, vom Sauerstoffgehalt, genauer von einer sauerstoffabhängigen Hydroxylierung des HIF 1- α abhängig [20]. Auch an dieser Stelle haben Antioxidantien keinen Einfluss.

Entgegen unseren Ergebnissen beobachteten Hildebrandt et al. einen steigernden Effekt einer Antioxidantiengabe auf die Plasma-Epo-Konzentration in Normoxie und sechstündiger Hypoxie bei einem pO₂ von 12,0% [63]. Erklärungsansatz für diese Beobachtung lautet hier folgendermassen: Reaktive Sauerstoffradikale, die bei Sauerstoffmangel gebildet werden, führen normalerweise zu einer Verminderung des HIF 1- α , der wiederum Transkriptionsfaktor einiger Proteine, wie z.B. EPO und VEGF ist. Das in der Studie von Hildebrandt et al. eingesetzte Antioxidans N-acetyl-cystein soll reaktive Sauerstoffradikale vermindern. Dies hätte eine Steigerung des HIF 1- α zur Folge, durch den u.a ein EPO-Anstieg reguliert werden kann.

In einer zu unserer vergleichbaren Studie von Freudenthaler et.al (O₂-Gehalt 13%, 6h) konnte dahingegen kein Effekt einer Antioxidantiengabe auf das Plasma-Erythropoietin festgestellt werden [62]. Im Gegensatz zu unserer Studie wurden die Antioxidantien jedoch nur im Zeitraum bzw. eine halbe Stunde vor,

während und eine halbe Stunde nach Hypoxie substituiert. Freudenthaler et al. erklären diese gegensätzliche Beobachtung im Vergleich zu einer in vitro-Studie an Leberzellen damit, dass es sich hier um eine in vivo-Studie an menschlichen Zellen und um eine kurzzeitige Medikamentensubstitution handelt. Um diese widersprüchlichen Angaben weiter zu erforschen, müsste ein Folgeversuch mit längerer bzw. stärkerer Hypoxie bzw. mit unterschiedlichen Zeiträumen der Antioxidantien substitution durchgeführt werden.

4.7 Hypoxie in Zusammenhang mit Sport und Höhentraining

Ein weiterer interessanter Gesichtspunkt der durchgeführten Studie ist der Zusammenhang der Hypoxie mit Sport und Höhentraining. Körperliches Training kann bekanntermassen einerseits protektive Effekte auf das Immunsystem haben [9], es kann jedoch bei stärkerer Intensität auch immunsuppressiv wirken. In der oben bereits erwähnten Studie von Chinda et al.[49] wurde bei 36 Marathonläufer nach einem absolvierten Marathon die Neutrophilenfunktion sowie die Neutrophilenanzahl getestet. Hier fiel ein Anstieg der Neutrophilenanzahl, jedoch eine Reduktion der Neutrophilenfunktion wie der oxidative Burst oder die Phagozytoseaktivität auf. Der Neutrophilenanstieg wird hier als kompensatorische Reaktion auf die geringere Aktivität gewertet. In dieser Studie wird deutlich, dass eine starke körperliche Belastung allein (d.h. ohne zusätzliche Hypoxie) schon immunsuppressiv wirken kann.

Sport in Zusammenhang mit Hypoxie wird im Höhentraining in der Form von Live high - train low - Konzepten oder in Live low - train high - Konzepten gerne zu Trainingszwecken eingesetzt. Es stellt sich die Frage, ob unter hypoxischen Bedingungen ein zusätzliches körperliches Training sinnvoll und effektiv sein kann oder eher schädliche Auswirkungen hat. Levine [72] konnte nachweisen, dass das live high - train low - Prinzip die Leistungsfähigkeit des Sportlers deutlich verbessert, der Mechanismus dieser Verbesserung ist vor allem über die Erythropoietin-Steigerung und den damit verbundenen Anstieg der roten Blutkörperchen zu erklären. Andererseits hat laut Levine das Konzept des live low – train high gegenteilige Auswirkungen, nämlich eher verringerte

Geschwindigkeit, geringeren Sauerstofftransport und reduzierte Leistung. Die Schwierigkeit des Höhentrainings allgemein liegt vor allem darin, die richtige „Dosis“ der Hypoxie zu finden, d.h. welche Höhe, wie viele Stunden täglich und über welchen Zeitraum die Hypoxieexposition stattfinden muss, um das gewünschte Ziel der Leistungsverbesserung zu erreichen [73,74]. Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Faktor ist natürlich auch die Individualität der Sportler, da nicht jeder auf die gewählte Höhe beim Höhengaufenthalt oder auf die gewählte Trainingsintensität gleich reagiert [73]. Rusko et al. [75] gehen noch auf ein drittes Konzept des Höhentrainings, nämlich das Live high - train high - Konzept ein. Im Vergleich zum Live high - train low können beide Konzepte des Trainings in der Höhe einen positiven Effekt auf die Leistungsfähigkeit von Sportlern haben. Wie auch schon beim live low- train high angesprochen, können beim Live high - train high jedoch auch negative Effekte überwiegen. Hier kann eine unzureichende Höhe oder eine zu kurze Dauer des Höhengaufenthalts und aufgrund dessen eine fehlende Stimulation der Erythropoietin-Produktion negativ wirken, es kann jedoch auch erhöhter Stress durch den Höhengaufenthalt mit erhöhter Infektanfälligkeit ein Problem darstellen. In unserer Studie wird deutlich, dass zumindest ein vierstündiger Aufenthalt in einer Höhe von 4100 m keinen besonderen Stressfaktor für das Immunsystem bedeutet. Ein zusätzliches Training unter hypoxischen Bedingungen müsste so geringer Intensität sein, dass es unter Normalbedingungen sicherlich keinen suppressiven Effekt auf das Immunsystem hat. Die Reaktion des Immunsystems auf eine körperliche Belastung ist jedoch wie oben beschrieben individuell unterschiedlich, daher kann keine Trainingsintensität in einer Studie für jeden Probanden gleich als „nicht-immunsuppressiv“ oder gar „protektiv“ gewertet werden. Eine weitere Studie zur genaueren Erforschung wäre schon allein aufgrund individueller Unterschiede nur sehr schwer planbar und zusätzlich aus ethischen Gesichtspunkten häufig nicht vertretbar.

4.8 Schlussfolgerung

Eine vierstündige Hypoxieexposition bei einem O₂ Gehalt von 12,5% stellte für den menschlichen Körper keinen so großen Stress dar, dass Schutzmechanismen wie die Expression von Stressproteinen in den Leukozyten des peripheren Blutes unter diesen Bedingungen nicht notwendig sind. Immunfunktionen wie Phagozytose oder oxidativer Burst wurden nicht beeinflusst. Eine unveränderte Peroxidkinetik sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe deutet darauf hin, dass die hier gewählte kurzfristige, milde Hypoxie keinen Radikalstress in Plasma produziert hat.

Antioxidantien werden folglich bei dieser milden Form der Hypoxie nicht benötigt, was durch die Ergebnisse im Vergleich von Placebo und Verum bestätigt wird.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Eine adäquate Sauerstoffversorgung des menschlichen Organismus ist eine essentielle Grundvoraussetzung für die Funktion aller Organe, beispielsweise für Herz und Gehirn, sowie für Körpersysteme wie das hämatologische System und insbesondere das Immunsystem. Das Immunsystem kann durch vielfältige Stressfaktoren in seiner Funktionalität gestört werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns insbesondere mit den Auswirkungen einer Hypoxieexposition, die einer Höhe von 4100m über dem Meeresspiegel entspricht, beschäftigt. Ziel der Studie war es, die Regulation der verschiedenen Stressantworten (Expression der Hitzeschockproteine HSP 27/ 72, HO-1 und iNOS, Erythropoietin, HIF-1 α , Phagozytose und Burst) in Leukozyten auf diese Hypoxie zu erforschen, sowie weiterhin den Einfluss des Redox-Status der Zelle auf diese Stressreaktionen zu untersuchen.

Klinische Relevanz hat dieses Thema beispielsweise beim Höhentraining, da Sport für das Immunsystem einen zusätzlichen Stressfaktor darstellen kann. Bekannterweise steigt nach starker sportlicher Belastung die Infektanfälligkeit des Körpers, der in Zusammenhang mit Hypoxie eine doppelte Belastung für das Immunsystem darstellen könnte.

In unserer Studie wurden 12 männliche Probanden einer vierstündigen Hypoxie (O₂-Gehalt: 12,5%) über Maskenatmung ausgesetzt. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch vorher in Normoxie durchgeführt.

In einer doppelblinden, placebokontrollierten crossover-Studie wurden Antioxidantien (2 Kapseln jeweils 400 mg all-rac- α -tocopherol (α -Toc) und eine Kapsel zu 600 mg α -lipoic acid (α -LA)) verabreicht, um den Einfluss des Redoxstatus der Zelle auf die Stressantworten der Leukozyten zu erforschen.

Die Hitzeschockproteine HSP 27, HSP 72 und HO-1, iNOS, HIF-1 α , Phagozytose und Burst wurden durchflusszytometrisch bestimmt, die mRNA-Expression der genannten Proteine mittels RT-PCR.

Es zeigte sich, dass die vierstündige Hypoxie zu den in dieser Studie gewählten Bedingungen einen signifikanten Anstieg des Plasma-Erythropoietinspiegels zur Folge hatte.

Auf die gemessenen Stressfaktoren bzw. die Immunfunktionen Phagozytose und Burst hatte die Hypoxieexposition jedoch keinen großen Effekt. Die hier gewählte eher milde Hypoxieform scheint folglich für den Körper keinen so großen Stress zu bedeuten, als dass eine gesteigerte Synthese von Stressproteinen oder Immunfunktionen notwendig wäre.

Die unveränderte Peroxidkinetik sowohl unter Placebo- als auch unter Verumbedingungen deutet darauf hin, dass die vierstündige milde Hypoxieform keinen Radikalstress verursacht hat und somit auch die Antioxidantien mit ihrem Wirkmechanismus nicht benötigt werden.

In Hinblick auf ein Höhentraining können die beschriebenen Ergebnisse so gewertet werden, dass zumindest ein vierstündiger Aufenthalt in 4100 m Höhe keinen besonderen Stressfaktor für das Immunsystem bedeutet. Eine zusätzliche körperliche Belastung könnte jedoch durchaus immunsuppressiv wirken. Diese Vermutung könnte in einer weiteren Studie mit ähnlichen hypoxischen Bedingungen und zusätzlichem leichtem Training weiter erforscht werden.

Um die teilweise neuartigen Ergebnisse unserer Studie, wie z.B. die Reduktion des HSP 72, und unsere Hypothesen zu bestätigen, sollte ein Folgeversuch mit längerer und stärkerer Hypoxieexposition angeschlossen werden. Hier stellt sich allerdings das Problem, dass unter ethischen Gesichtspunkten am Menschen keine beliebigen Versuchsbedingungen zu vertreten sind.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Semenza, Gregg L.: Hypoxia-inducible factor 1: Control of oxygen homeostasis in health and disease, *Pediatric Research*, 2001, Vol. 49, No.5,p. 614-617
- [2] Fehrenbach,E.: Molecular and cellular exercise physiology, Chapter 10: *Cellular response to enviromental stress*,
- [3] Stockmann,C.,Fandrey J.: Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(10),968-79,2006
- [4] Fehrenbach, E., Buergler J., Nieß, A.: HSP reaction to exercise in peripheral blood under normal and hypoxic environmental conditions
- [5] Fehrenbach, E.: Heat shock proteins in biology and medicine Chapter V, 15.1:*The exercise associated role of HSP in peripheral blood*, Editors:Radons, J.,Multhoff,G.,2006
- [6] Brines, Robert, Hoffman-Goetz, Laurie and Klarlund Petersen, Bente: Can you exercise to make your immune system fitter?: *Immunology today*, Vol.17, 1996
- [7] Nieß, A.M., Fehrenbach, E., Strobel, G., Roecker, K., Schneider, E.M., Buergler, J., Fuss, S., Lehmann, R., Northoff, H., Dickhuth, H.-H.: Evaluation of stress responses to interval training at low and moderate altitudes, *Medicine& Science in Sports& Exercise*,2003
- [8] Buergler, J.: Immunologische Stressreaktion auf extensives Intervalltraining unter Normal- und moderaten Höhenbedingungen, *Doktorarbeit*, 2004
- [9] Gleeson, M.:Immune function in sport and exercise, *Journal of applied physiology* 103: 693-699,2007

- [10] Sureda,A., Batle, JM, Tauler, P., Cases, N., Aguiló, A., Tur, JA., Pons,A.: Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation, *Free radic res.*, 2004 Sep; 38(9):1003-9
- [11] Briviba,K., Watzl, B., Nickel, K.,Kulling,S., Bös, K., Haertel, S., Rechkemmer,G., Bub,A.: A half marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners, *Redox Rep.*, 2005; 10(6): 325-31
- [12] Helmrich,SP, Ragland,DR, Leung RW, Paffenberger JrRS,:Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 1991;352: 147-152
- [13] Döcke,W.-D-, Volk,H.-D., von Baehr R.: Beziehungen zwischen Immunsystem und Hitzeschockproteinen, *Allerg. Immunol.* 36, S. 209-223, 1990
- [14] Machnik,M., Bialas,B., Schänzer,W.: Der direkte Nachweis von rekombinantem Erythropoietin (rEPO) in Urin, DSHS Köln, Institut für Biochemie
- [15] Jelkmann, W.: Erythropoietin: Structure, control of Production, and function, *Physiological reviews*, Vol.73, No.3, 1992
- [16] Jelkmann,W.: Erythropoietin after a century of research: younger than ever, *European Journal of Haematology* 78 (3): 183–205,2007
- [17] Guang,L.W., Gregg,L., Semenza: Purification and characterization of Hypoxia-inducible factor 1, *American society for Biochemistry and molecular biology*, Vol.270,pp, 1230-1237,1995

- [18] Salceda,S., Caro, J.: Hypoxia-inducible factor 1 α Protein is rapidly degraded by the ubiquitin – proteasome system under normoxic conditions, *American society for Biochemistry and molecular biology*,Vol. 272, pp. 22642-22647, 1997
- [19] Semenza, G.: HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia, *J Appl Physiol*, 88,1474-1480, 2000
- [20] Huang,L.E., Bunn,H.F.: Hypoxia-inducible factor and its Biomedical relevance,*J.Biol.Chem.*, Vol.278, 2003
- [21] Kallio,PJ, Okamoto,K., O'Brien, S., Carrereo, P.,Makino, Y., Tanaka, Hand Poellinger,L., Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear localization and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia –inducible factor-1 α , *EMBO J*17:6573-6586,1998
- [22] Maxwell PH. Dachs, GU., Gleadle JM, Nicolls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O,Pugh CW, and Ratcliffe PJ: Hypoxia-inducible-factor 1 modulates gene expression I solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth.*Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8104-8109,1997
- [23] Ferrara, N. and Davis-Smyth,T. : The biology of vascular endothelial growth factor.*Endocr Rev* 18:4-25, 1997
- [24] Terui, K., Sanae, H. u.a.: Hypoxia/ re-oxygenation- induced, redox-dependent activation of STAT 1(signal transducer and activator of transcription 1) confers resistance to apoptotic cell death via HSP 70 induction, *Biochem. J.*,380, 203-209, 2004
- [25] Locke, M., Noble E.G.: Stress proteins: The Exercise response,*J. Appl. Physiol.*, 20(2),155-167,1995
- [26] Locke, M., The cellular Stress response to exercise: Role of stress proteins

- [27] Nieß, A.M., Fehrenbach, E., Northoff, H., Dickhuth, H.H.: Freie Radikale und oxidativer Stress bei körperlicher Belastung und Trainingsanpassung – Eine aktuelle Übersicht, *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 53, Nr.12,2002*
- [28] Fracella, Rensing: Stressproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin, *Naturwissenschaften Aufsätze 82, S.303-309, 1995*
- [29] Fehrenbach, E., Northoff, H.: Free radicals, exercise, apoptosis and heat shock proteins, *Exercise Immunology Review, Vol. 7: 66-89, 2001*
- [30] Hall, TJ: Role of HSP 70 in cytokine production, *Experientia, 50:1048-1053,1994*
- [31] Blancher, C., Moore, John W., Talks, Kate L., Houlbrooke, S., Harris, Adrian L.: Relationship of Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α Expression to Vascular Endothelial Growth factor induction and Hypoxia Survival in Human Breast cancer cell lines. *Cancer Research 60,7106-7113, December 2000*
- [32] Multhoff, G. and L.E. Hightower: Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response . *Cell-Stress-Chaperones, 1:167-176,1996*
- [33] Whitham, M., Fortes, MB: Heat shock protein 72: release and biological significance during exercise, *Front Biosci 2008, Jan 1,13:1328-39*
- [34] Fehrenbach, E., Nieß, AM.: Role of heat shock proteins in the exercise response, *Exerc Immunol Rev, 1999; 5:57-77*
- [35] Franklin, TB, Krueger- Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW: The role of heat shock proteins HSP 70 and HSP 27 in cellular protection of the central nervous system, *Int.J. Hyperthermia, 2005, Aug;21(5):379-92*
- [36] Elbirt, K.K., Bonkovsky, H.L.: Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role, *Proc Assoc Am Physicians 1999 Sep-Oct;111(5):438-4.*

- [37] Masaharu, Nakayama, Kazuhiro, Takahashi, Tomomi Kitamuro, Ken-ichi, Yasumoto, Dai Katayose, Kunio Shirato, Yoshiaki Fujii-Kuriyama and Shigeki Shibahara: Repression of Heme Oxygenase-1 by Hypoxia in Vascular endothelial cells, *Biochemical and Biophysical research communications* 271, 665-671, 2000
- [38] Tomomi, K., Kazuhiro, T., Kazuhiro, O., Reiko, U-F., Kazuhisa, T., Kazumichi, F. et al.: Bach 1 functions as a Hypoxia-inducible repressor for the Heme-oxygenase-1 Gene in Human Cells: *Journal of biological chemistry*, Vol. 278, No. 11, Issue of march 14, pp. 9125-9133, 2003
- [39] Nieß, A.M., F. Passek, I. Lorenz, E.M. Schneider, H.-H. Dickhuth, H. Northoff and E. Fehrenbach: Expression of the antioxidant stress protein Heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes- Acute and adaptional responses to endurance exercise. *Free Radic. Biol Med.* 26: 184-192. 1999
- [40] F. Passek, A.M. Nieß, S. Veihelmann, H.-H. Dickhuth, H. Northoff, E. Fehrenbach: Einfluss von Ausdauersport auf die Hämooxygenase-Expression peripherer Leukozyten. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 49, Sonderheft 1, 107-110, 1998*
- [41] Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., Willoughby, D.A.: Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response, *Nature Medicine, Vol 2, Number 1, 1996*
- [42] Veith, R. Semiquantitative Expressionsanalyse leukozytärer Stressproteine nach Ausdauerbelastung unter Hitzebedingungen mit Reverse Transkription/ Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)
- [43] Jüttler, T.: Die Bedeutung der endogenen Zytokinexpression für die Regulation der iNOS in Zellen der Blut-Hirn Schranke, *Doktorarbeit, 2003*

- [44] Kasahara,Y., Iwai, K., Yachi, A., Ohta,K., Konno,A., Seki, H., Miyawaki, T., Taniguchi, N.: Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD 95 (FAS/ APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils, *Blood, Vol. 89, No.5 (March 1),1997,1748-1753*
- [45] Orpegen Pharma, Phagotest, Operators Manual , Version 7/96
- [46] Ethordevic NZ, Babic GM, Markovic SD, Oqnjanovic BI, Stajn, AS, Zikic, RV, Saicic ZS: Oxidative stress and changes in antioxidative defense system in erythrocytes of preeclampsia in women, *Reprod. Toxicol., 2007 Nov. 17*
- [47] Nielsen,H.G., Skjonsberg, O.H., Lyberg,T.: The effect of antioxidant supplementation on leukocyte expression of ROS in athletes: the Scandinavian Journal of clinical& laboratory investigation
- [48] Mochida, N., Umeda, T., Yamamoto, Y., Tanabe, M., Kojima, A., Sugawara, K., Nakaji, S.: The main neutrophil and neutrophil –related functions may compensate for each other following exercise- a finding from training in university judoists, *Luminescence, 2007, 22(1):20-8*
- [49] Chinda ,D., Nakaji, S., Umeda,T., Shimoyama, T., Kurakake, S., Okamura, N., Kumae, T., Sugawara, K.: A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes, *Luminescence, 2003,324-9*
- [50] Coombes,J.S. u.a.: Effects of vitamin E and α -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties
- [51] Fehrenbach,E.: Regulation und Bedeutung von Hitzeschockproteinen in Zellen und Plasma des peripheren Blutes nach belastungsassoziertem Stress, *kumulative Habilitationsschrift für des Fach Molekulare Medizin, 2/2006*

- [52] Llurba,E., Gratacos,E., Martin- Gallan,P., Cabero,L., Dominquez, C.: A comprehensive study of oxidative stress and antioxidative status in preeclampsia and normal pregnancy, *Free radic. Biol. Med.*, 2004, August 15, 37(4): 557-70
- [53] Bayhan, G., Atamer,Y., Atamer, A., Yokus,B., Baylan,Y.: Significance of changes in lipid peroxides and antioxidative enzyme activities in pregnant women with preeclampsia and eclampsia, *Clin. Exp. Obstet. Gynecol*, 2000,27(2): 142-6
- [54] Fehrenbach E, Steiner K, Schaible E, Hauth M, Lehmann R, Simon P, et al. Gender dimorphism of the HSP72 response to exercise in human blood. *Med.Sci.Sports Exerc.* 39[5], S60. 2007. Ref Type: Abstract
- [55] Paroo Z, Noble EG. Gender-specific regulation of HSP70: mechanisms and consequences. *Locke M, Noble EG, editors. Exercise and Stress Response. 1 ed. Boca Raton: CRC Press LLC; 2002. p. 163-78.*
- [56] Paroo Z, Haist JV, Karmazyn M, Noble EG. Exercise improves postischemic cardiac function in males but not females: consequences of a novel sex-specific heat shock protein 70 response. *Circ Res* 2002 May 3;90(8):911-7.
- [57] Paroo Z, Dipchand ES, Noble EG. Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 Feb;282(2):C245-C251.
- [58] Catanzaro, DF., Zhou,Y., Chen, R., Yu,F., Catanzaro SE., De Lorenzo MS., Subbaramaiah, K., Zhou, XK., Pratico, D., Dannenberg, AJ., Weksler, BB.: Potentially reduced exposure cigarettes accelerate atherosclerosis: evidence for the role of nicotine, *Cardiovasc. Toxicol.*, 2007,7(3): 192-201
- [59] Wilber RL, Stray-Gundersen J, Levine BD. Effect of hypoxic "dose" on physiological responses and sea-level performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Sep;39(9):1590-9
- [60] Jelkmann,W.: Molecular Biology of Erythropoietin, *Internal Medicine*, Vol.43, No.8,2004

- [61] Knaupp,W.,Khilnani,S.,Sherwood,J.,Scharf,S.,Steinberg,H.:Erythropoietin response to acute normobaric hypoxia in humans, *J Appl Physiol* 73: 837-840,1992
- [62] Freudenthaler,S.M.,Schreeb,K.H. et al.: Influence of controlled hypoxia and radical scavenging agents on erythropoietin and malondialdehyde concentrations in humans, *Acta Physiol Scand* 174: 231-235,2002
- [63] Hildebrandt, W., Alexander S., Bärtsch P., Dröge,W.: Effect of N-acetylcysteine on the hypoxic ventilatory response and erythropoietin production: linkage between plasma thiol redox state and O₂ chemosensitivity, *Blood* 99: 1552-1555,2002
- [64] Julian,C.G., Gore, C.J., Wilber, R.L., Daniels, J.T., Fredericson, M., Stray-Gunderson, J., Hahn, A.G., Parisotto, R., Levine B.D.: Intermittent normobaric hypoxia does not alter performance or erythropoietic markers in highly trained distance runners, *J.Appl Physiol* 96: 1800-1807,2004
- [65] A. M. Nieß, E. Fehrenbach, I. Lorenz, A. Müller, H. Northoff, H.-H. Dickhuth, and E. M. Schneider. Antioxidant intervention does not affect the response of plasma erythropoietin to short-term normobaric hypoxia in humans. *J Appl Physiol* 96:1231-1235,2004.
- [66] Castilla,P., Davalos,A., Teruel, JL., Cerrato, F., Fernandez-Lucas,M., Merino,JL., Sanchez-Martin,CC., Ortuno,J., Lasuncion,MA.: Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxides by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients; *Am J Clin Nutr.* 2008, Apr; 87(4):1053-61
- [67] Patel, A., van de Poll, M.C.G., Greve, J.W.M., et al. : Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning, *Transplantation*,78: 1479-1487, 2004
- [68] Chiral, M., Grongnet, J.-F.: Effects of Hypoxia on Stress Proteins in the Piglet Brain at Birth, *Pediatric Research*, Vol. 56, No.5, 2004 , p. 775-782

- [69] Ramaglia, V.; Buck, L.T.: Time-dependent expression of heat shock proteins 70 and 90 in tissues of the anoxic western painted turtle, *Journal of Experimental Biology* 207, 3775-3784 (2004)
- [70] Maheswaran,S.,Englert, C. et al. Inhibition of cellular proliferation by the Wilms tumor suppressor WT1 requires association with the inducible chaperone Hsp70,*Genes and Development, Vol. 12, No. 8, pp. 1108-1120, April 15, 1998*
- [71] Ning,W. et al.: Genome-wide analysis of the endothelial transcriptome under short-term chronic hypoxia, *Physiol. Genomics* 18: 70-78, 2004.
- [72] Levine, BD: Intermittent hypoxic training: fact and fancy: *High altitude Med Biol, 2002;3(2): 177-93*
- [73] Levine, BD; Stray-Gunderson,J.: Dose response of altitude training: how much altitude is enough?, *Adv Exp Med Biol,2006; 588:233-47*
- [74] Wilber, RL; Stray-Gunderson,J., Levine, BD: Effect of hypoxic “dose” on physiological response and sea-level performance, *Med. Sci. Sports Exerc., 2007Sep.; 39(9):1590-9*
- [75] Rusko,HK; Tikkanen, HO; Peltonen, JE: Altitude and endurance training,*J Sports Sci, 2004,Oct; 22(10) : 928-44; discussion 945*

7 Veröffentlichungen

Fehrenbach, E., Hartmann/ Höchst, K., Mueller, A., Northoff, H., Nieß, A.M.,
Leukocyte Responses to Short-term Normobaric Hypoxia. Med Sci Sports
Exerc, 2005. **37**(5): p. 297.

Fehrenbach, E., Höchst, K., Buergler, J., Fuss, S., Hauth, M., Nieß, A.M.,
*Sportvermittelte HSP72-Reaktion im peripheren Blut in hypoxischer und
normoxischer Umgebung* (Deutscher Sportmedizin Kongress 2007 in Köln)

8 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Für diese Möglichkeit sowie für die Übernahme der ersten Berichterstattung danke ich Herrn Prof. Dr. H. Northoff sehr.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. E. Fehrenbach für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Versuche und bei der Strukturierung der Arbeit.

Für die Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. A. Nieß.

Herzlich danke ich Frau Melanie Hauth für die tatkräftige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung. Ohne sie hätte alles viel länger gedauert.

Weiterhin gilt mein Dank Arnim Höchst für sein Interesse, sein unermüdliches Korrekturlesen und die große Hilfe bei der teilweise verwirrenden Welt des Computers.

Meinen Eltern danke ich ebenfalls für ihr großes Interesse und für die Unterstützung während meines gesamten Studiums, ohne die ich sicherlich nicht an diesem Punkt angekommen wäre.

Meinem Bruder danke ich für seine konstruktiven Vorschläge und die guten Ideen, die mich an mancher Stelle sehr motiviert haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Probanden bedanken, die die Durchführung der Studie ermöglicht haben.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

Staatsangehörigkeit : deutsch
 Geburtstag : 27.12.1976
 Geburtsort : Bonn

SCHULAUSSBILDUNG

1996 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

WS 1996/1997 **Studium der Humanmedizin**
 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

SS 1997 - SS 1998 **Studium von Biologie und Sport**
 Universität zu Köln

seit SS 1999 **Studium der Humanmedizin**
 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

03/2001 Ärztliche Vorprüfung
 04/2002 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung

seit SS 2004 **Studium der Humanmedizin**
 Eberhard-Karls-Universität Tübingen

09/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

seit 10/2004 **Praktisches Jahr**
 im Klinikum am Steinenberg Reutlingen

1. Tertial: Innere Medizin
 2. Tertial: Chirurgie
 3. Tertial: Pädiatrie

11.11.2005 **Drittes Staatsexamen**

FAMULATUREN

08 - 09/2001 Anästhesie, Kreiskrankenhaus Husum

07 - 08/2002 Chirurgie, Klinikum Konstanz

02/2003 Kinderchirurgische Ambulanz, Universitätsklinikum Tübingen

06/2003 Allgemeine Pädiatrie, Universitäts-Kinderklinik Bonn

BERUFSERFAHRUNG

01 - 06/2006,
 seit 09/2007 Chirurgie, Klinikum am Steinenberg, Reutlingen