Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
der Deutschen Sporthochschule Köln
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

Akuter und chronischer Einfluss einer Sportintervention auf die Hämorheologie von Kindern und Jugendlichen mit Sichelzellanämie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Max Niklas Jerke
aus Köln

promoviert am 22. Januar 2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2021

Druckerei Digital Express 24 GmbH & Co. KG, Friesenplatz 25, 50672 Köln

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. J. Herter

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 01.08.2020 Unterschrift:

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen sind an der Deutschen Sporthochschule Köln am Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin in der Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin sowie im Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße in Köln durchgeführt worden.

Die Einweisung zur eigenständigen Durchführung der in dieser Arbeit angegebenen Experimente erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Marijke Grau, Herrn M. Sc. Alexander Schenk sowie den technischen Assistenten Herrn Thomas Dietz.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die es mir ermöglicht haben, die vorliegende Arbeit zu verfassen und die mich im Untersuchungs- sowie Schreibprozess motivierend unterstützt haben.

Zuerst danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch für die unkomplizierte Kommunikation, die gelungene Arbeitsgruppenfindung sowie die Möglichkeit der Nutzung von Laboren und Untersuchungsräumen der Sporthochschule in Köln.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Marijke Grau für die Überlassung des Themas und für die tatkräftige Unterstützung in allen Phasen des Projektes. Sie stand mir als zuverlässige und hilfsbereite Betreuerin zur Seite und mit ihr war jederzeit ein konstruktiver Austausch möglich.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Thomas Dietz bedanken, der mich als technischer Assistent bei Fragen zu Arbeiten im Labor unterstützte. Mit ihm gestaltete sich die Betreuung und Untersuchung der Probanden als sehr angenehm.

Mein Dank gebührt ebenfalls den Studienteilnehmern und ihren begleitenden Familienangehörigen, ohne deren Bereitschaft die umfangreichen und zeitintensiven Untersuchungen nicht möglich gewesen wären.

Zuletzt möchte ich meiner Familie einen großen Dank aussprechen. Ihr habt mich insbesondere in nicht-fachlichen Fragen mit Optimismus und Geduld unterstützt und es mir damit ermöglicht, diese Arbeit zu verfassen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 7

1. Einleitung 11

1.1 Die Sichelzellanämie 12
1.2 Hämorheologische Pathophysiologie 15
1.2.1 Erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation 15
1.2.2 Stickstoffmonoxid 19
1.2.3 Oxidativer Stress 23
1.2.4 Hämolyse 26
1.3 Krankheitsbild 29
1.3.1 Klinik 29
1.3.2 Therapie 32
1.3.3 Prognose 36
1.4 Forschungsstand 38
1.4.1 Auswirkung von Sport auf die Hämorheologie bei Gesunden 38
1.4.2 Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten 40
1.5 Zielsetzung 45

2. Material und Methoden 46

2.1 Verwendete Materialien 46
2.1.1 Verbrauchsmaterialien 46
2.1.2 Chemikalien und Lösungen 47
2.1.3 Antikörper und Kits 49
2.1.4 Geräte und Software 50
2.2 Studiendesign 52
2.2.1 Studienprotokoll 52
2.2.2 Probandenkollektiv 54
2.2.3 Blutentnahmen 55
2.3 Parameter 57
2.3.1 Leistungsmessung 57
2.3.2 Laktat 59
2.3.3 Blutbild 60
2.3.4 Freies Hämoglobin 61
2.3.5 L-Arginin im Erythrozyten 63
2.3.6 Erythrozytäre Verformbarkeit 65
2.3.7 Erythrozytäre Aggregation 67
2.3.8 Nitrit im Plasma und Nitrit/RSNO/Fe-NO im Erythrozyten 69
2.3.9 Erythrozytäre NO-Synthase, Akt und Nitrotyrosin 73
2.3.10 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) 76

2.3.11 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies 79
2.3.12 Totale antioxidative Kapazität 82
2.4 Statistische Auswertung 84

3. Ergebnisse 85

3.1 Akute Effekte 85
3.1.1 Leistungsparameter und Laktat 85
3.1.2 Blutbild 86
3.1.3 Freies Hämoglobin 87
3.1.4 Erythrozytäre Verformbarkeit 88
3.1.5 Erythrozytäres NO 88
3.1.6 Erythrozytäre NO-Synthase 89
3.1.7 Oxidativer Stress 90
3.2 Chronische Effekte 92
3.2.1 Leistungsparameter 92
3.2.2 Ventilatorische Effizienz 93
3.2.3 Blutbild 93
3.2.4 Freies Hämoglobin 94
3.2.5 Erythrozytäre Verformbarkeit 94
3.2.6 Erythrozytäre Aggregation 95
3.2.7 Erythrozytäre NO und NO im Plasma 96
3.2.8 Erythrozytäre NO-Synthase, Akt und L-Arginin 96
3.2.9 Oxidativer Stress 98
3.2.10 Aktivitätsfragebogen 99

4. Diskussion 101

4.1 Akute Effekte 103
4.2 Chronische Effekte 108
4.3 Limitationen und Ausblick 114

5. Zusammenfassung 117

6. Literaturverzeichnis 118

7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen 138

8. Anhang 139

8.1 Abbildungsverzeichnis 139
8.2 Tabellenverzeichnis 141
8.3 Aktivitätsfragebogen 142

Lebenslauf 144

Abkürzungsverzeichnis

Biochemische Termini

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Calcium
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cu^{+}, Cu^{2+}	Kupfer
DAB	Diaminobenzidin
DCF(H)	Dichloro(dihydro)fluorescin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Fe, Fe^{2+}, Fe^{3+}	Eisen
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HbA	Adultes Hämoglobin
HbAS	Hybrides Hämoglobin
HbF	Fetales Hämoglobin
$HbFe^{2+}O_2$	Oxygeniertes Hämoglobin
$HbFe^{3+}$	Methämoglobin
HbS	Sichelzell-Hämoglobin
$HO^{\bullet}$	Hydroxyl-Radikal
HRP	Meerrettichperoxidase
HU	Hydroxyurea
I_2	Iod
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KI	Kaliumiodid
LDH	Laktatdehydrogenase
LOD	Laktatoxidase
MDA	Malondialdehyd
Na+	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	N-Ethylmaleinimid
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
$NO(^{\bullet})$	Stickstoffmonoxid(radikal)
NO^{+}	Nitrosoniumionen
NO_2	Stickstoffdioxid
NO_2^{-}	Nitrit
NO_3^{-}	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase

NP-40	Nonidet P-40
NSL	Nitritstammlösung
O_2	Molekularer Sauerstoff
$O_2^{-\bullet}$	Superoxid-Anion
O_3	Ozon
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RBC	Erythrozyten
RBC-NOS	Erythrozytäre Stickstoffmonoxid-Synthase
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
$ROO^\bullet$	Peroxylradikal
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSNO	S-Nitrosothiole
SDS	Natriumlaurylsulfat
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBS	Dreifach gepufferte Salzlösung
TMB	Tetramethylbenzidin
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
WBC	Leukozyten
XO	Xanthin-Oxidase

Einheiten

$\dot{\gamma}$	Scherrate (s^{-1})
°C	Grad Celsius
au	Arbitrary Units
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m, m^2, m^3	Meter, Quadratmeter, Kubikmeter
min	Minute
mol	Stoffmenge
Pa	Pascal
RFU	Relative Fluorescence Units
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
V	Volt
W	Watt

Vorsätze

c	Zenti, 10^{-2}
d	Dezi, 10^{-1}
f	Femto, 10^{-15}
k	Kilo, 10^{3}
m	Milli, 10^{-3}
n	Nano, 10^{-9}
p	Piko, 10^{-12}
µ	Mikro, 10^{-6}

Sonstige Abkürzungen

$\gamma_{dlsc\ min}$	Aggregations-Disaggegrationsscherrate
AA	Gesunde Kontrollprobanden
Abb.	Abbildung
AI	Augmentationsindex
ANOVA	Varianzanalyse
AUC	Fläche unter der Kurve
BE	Blutentnahme
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CLD	Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion
EI	Elongationsindex
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
et al.	und andere
GVHD	Graft-versus-Host Disease
HbSβ	Heterozygote Mischform der Sichelzellanämie und β-Thalassämie
HbSS	Homozygote Form der Sichelzellanämie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigensystem
LORCA	Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer
lsc	Intensität des rückgestreuten Lichtes
MCHC	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten
MRT	Magnetresonanztomographie
p	p-Wert
RER	Respiratory Exchange Ratio
SAD	S-Antilles-D Punjab Transgen
SCA	Sichelzellanämie
TAK	Totale antioxidative Kapazität
V‘E	Atemminutenvolumen
V‘E/V‘O_2	Atemäquivalent für Sauerstoff
V’CO_2	Kohlendioxidabgabe
V’E/V’CO_2	Atemäquivalent für Kohlendioxid
V’O_2	Sauerstoffaufnahme
VT1	Erste ventilatorische Schwelle

1. Einleitung

Die Sichelzellkrankheiten, eine Gruppe genetischer Erkrankungen der roten Blutkörperchen, zählen zu den häufigsten Erbkrankheiten der Welt [235]. Sie werden von der Weltgesundheitsorganisation als hämolytische Anämien klassifiziert, bei denen es in Folge eines Gendefekts zur Bildung von abnormem Hämoglobin kommt [299]. Hämoglobin ist das tetramere Sauerstofftransportprotein der Erythrozyten, welches bei gesunden Menschen zu über 90% als Hämoglobin A (HbA) vorliegt und aus jeweils zwei Untereinheiten vom α- und β-Typ besteht [140].

Bei den Sichelzellkrankheiten entsteht durch eine Punktmutation im Gen für die β-Untereinheit das sogenannte Hämoglobin S (HbS). Die defekten β-Untereinheiten im HbS haben zur Folge, dass bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, zum Beispiel im Rahmen körperlicher Anstrengung, die HbS-Moleküle in den Erythrozyten aggregieren und der Sauerstofftransport gestört ist. Dieses Phänomen wird HbS-Polymerisation genannt und führt zur namensgebenden sichelartigen Versteifung der Erythrozyten [62; 235]. In der Folge kommt es bei betroffenen Patienten durch die rigiden Zellen zu multiplen Gefäßverschlüssen und charakteristischen ischämischen Schmerzkrisen [67; 290].

Trotz der weltweit hohen Prävalenz der Sichelzellkrankheiten sind die therapeutischen Strategien zur Bewältigung dieser schweren Krankheit limitiert [140; 235]. In den letzten Jahren konnten jedoch einige Fortschritte im Bereich der supportiven Therapien erzielt werden und insbesondere sportliche Betätigung scheint die Blutfließeigenschaften und damit das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung verbessern zu können [137; 175].

Die vorliegende Arbeit möchte daher die akuten und chronischen Auswirkungen von Sport auf die Hämorheologie von SCA-Patienten untersuchen. Dafür wird im Einleitungsteil nach einem kurzen Überblick zunächst die komplexe Pathophysiologie beschrieben, das Krankheitsbild der Sichelzellanämie erläutert sowie der aktuelle Forschungsstand dargestellt. Im Methodenteil findet sich eine genaue Erklärung des Studienaufbaus mit Darstellung aller erhobenen Parameter. Anschließend werden die statistisch ausgewerteten Daten im Ergebnisteil präsentiert und zum Schluss die neuen Erkenntnisse vor dem Hintergrund bereits bekannter Forschung diskutiert.

1.1 Die Sichelzellanämie

Die größte Untergruppe der Sichelzellkrankheiten stellt die Sichelzellanämie (SCA, *engl. sickle cell anemia*) dar [235; 290]. Je nachdem, ob nur eines oder beide Allele von der Sichelzellmutation betroffen sind, spricht man entweder von homozygoter Sichelzellanämie (HbSS), bei der die Lebenserwartung deutlich reduziert ist und sich das volle klinische Krankheitsbild entfaltet oder von heterozygoter Sichelzellanämie (HbAS), bei der die Betroffenen eine normale Lebenserwartung haben und nur unter extremer Hypoxie Symptome entwickeln (siehe Abb. 1) [103; 272]. Da HbAS-Träger kaum klinische Komplikationen zeigen, jedoch einen HbS-Anteil von bis zu 40% am gesamten Hämoglobin besitzen, wird in der Literatur sowohl von autosomal-rezessiver [167], als auch von autosomal-kodominanter Vererbung gesprochen [140]. Weitere Untergruppen der Sichelzellkrankheiten sind heterozygote Mischformen mit anderen Hämoglobinopathien wie zum Beispiel HbSC oder HbSβ-Thalassämie, die jedoch weitaus seltener vorkommen [290]. Wenn im Folgenden in dieser Arbeit von Sichelzellanämie gesprochen wird, ist damit die klinisch auffällige homozygote Form gemeint.

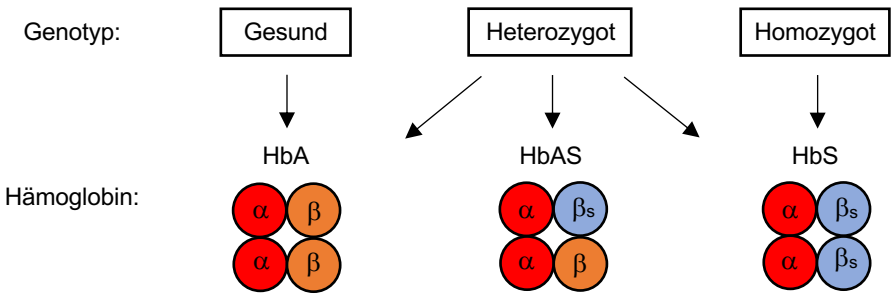


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Hb-Moleküle

Im Gegensatz zu Gesunden (HbA) kommt es bei homozygoter Sichelzellanämie zur Exprimierung von HbS. Heterozygote können sowohl HbA, HbS als auch hybrides HbAS exprimieren.

Historischer Überblick:

Auch wenn die Existenz einer angeborenen Krankheit mit Schmerzkrisen, Milzatrophie und frühzeitigem Tod bereits seit Jahrhunderten in Westafrika bekannt war [207], wurde die Sichelzellanämie erst 1910 an einem aus Grenada stammenden Zahnmedizinstudenten in den USA beschrieben [127]. In den folgenden Jahrzehnten konnten nach und nach mehr pathophysiologische Mechanismen verstanden und 1949 schließlich das abnorme Hämoglobin S identifiziert werden [213]. 1957 wurde dann erkannt, dass der grundlegende Gendefekt durch eine Punktmutation auf Chromosom 11 entsteht, was zu einem Nukleotidaustausch von Adenin zu Thymin führt [134]. Diese Veränderung bewirkt, dass an der sechsten Position der β-Globinkette die hydrophile Aminosäure Glutaminsäure durch hydrophobes Valin ersetzt wird, was die Löslichkeit des Hb-Moleküls erheblich reduziert. Da Hb in den Erythrozyten hoch konzentriert vorliegt, entstehen durch die geringe Löslichkeit unter desoxygenierten Bedingungen die HbS-Polymere, was in den 50er und 60er Jahren mit Hilfe des Elektronenmikroskops und der Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden konnte [193; 216].

Neuere Meilensteine in der Forschung zur Sichelzellanämie umfassen vor allen Dingen therapeutische Fortschritte, wie den Einsatz von Hydroxyurea in der medikamentösen Therapie [50], die Bluttransfusion [2] sowie die Stammzelltransplantation [135]. Letztere stellt für die Patienten bis heute die einzige Möglichkeit der Heilung dar, ist aber für den Großteil der Betroffenen auf Grund von Spendermangel und hohen Kosten keine realisierbare Therapieoption (siehe 1.3.2).

Epidemiologie:

Da sich die geografische Verteilung der Sichelzellanämie weltweit erstaunlich gut mit Endemiegebieten der Malaria durch *Plasmodium falciparum* deckt, wurde bereits seit den 1950er Jahren ein Zusammenhang zwischen heterozygotem Genotyp (HbSA) und einer erhöhten Malariaresistenz vermutet [11]. Tatsächlich konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass Personen mit HbSA ein um 90% reduziertes Risiko haben, an einer schweren Malariainfektion zu erkranken [263]. Dieser evolutionäre Vorteil ist der Grund, weshalb die Sichelzellanämie eine eindeutige Konzentration in Afrika, besonders südlich der Sahara aufweist, wo schätzungsweise dreiviertel der jährlich 300.000 Kinder mit Sichelzellanämie geboren werden [187; 219].

Außerhalb Afrikas finden sich erhöhte SCA-Prävalenzen ebenfalls in Ländern, in denen Malaria endemisch ist, wie in Indien, Brasilien oder dem mittleren Osten sowie auch in Ländern, die historisch bedingt einen größeren Anteil von afrikanischen Migranten an der Gesamtbevölkerung besitzen wie die USA oder Frankreich (siehe Abb. 2) [218]. Nichtsdestotrotz ist die Sichelzellanämie insgesamt eine Erkrankung der weniger entwickelten Welt, in der Patienten nur erschwert Zugang zu Medikamenten und Behandlung finden.

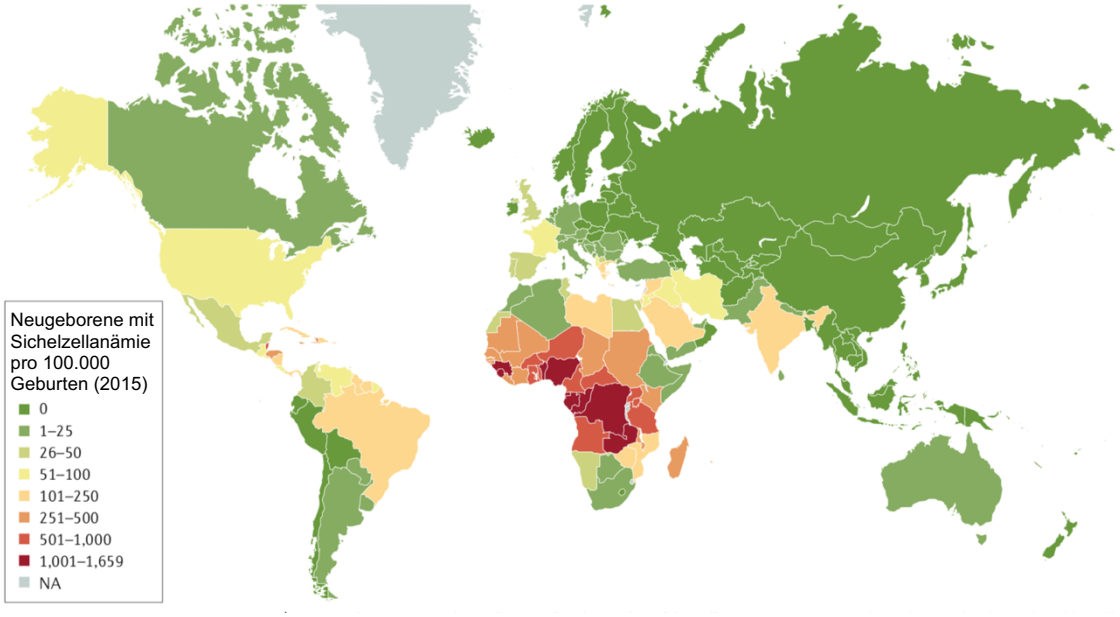


Abbildung 2: Jährliche Inzidenz der Sichelzellanämie weltweit

Modifiziert nach Referenz [140].

Es gibt keine verlässlichen Zahlen, wie viele Millionen Menschen weltweit an Sichelzellanämie erkrankt sind, da besonders in den Ländern mit hohen Prävalenzen kaum Screening-Programme

existieren [115; 173]. In den USA sind schätzungsweise 100.000 Patienten betroffen [123], in Deutschland hat die Zahl auf Grund von Flüchtlingsbewegungen in den letzten Jahren um 60% zugenommen und lag 2015 bei ca. 4000. Davon waren ca. 1000 Deutsche mit türkischer oder afrikanischer Abstammung und 3000 Immigranten [153]. Durch die anhaltenden Migrationsbewegungen aus Afrika südlich der Sahara nach Europa werden auch in Zukunft immer höhere Patientenzahlen erwartet.

Laut epidemiologischen Prognosen wird die globale Inzidenz der Sichelzellanämie bis 2050 auf 400.000 Geburten/Jahr zunehmen [217]. Auf Grund dessen sowie der steigenden Lebenserwartung dank verbesserter Diagnostik und Therapie werden sich auch die Behandlungskosten der Sichelzellanämie vervielfachen [217]. Dies stellt insbesondere die afrikanischen Länder südlich der Sahara, in denen heute noch bis zu 90% der Kinder mit SCA vor dem fünften Lebensjahr versterben (siehe 1.3.3), vor große versorgungstechnische Herausforderungen [115]. Eine US-amerikanische Studie konnte zeigen, dass die Behandlungskosten der Sichelzellanämie im Laufe des Lebens zunehmen und für einen Patienten insgesamt bei knapp einer halben Millionen US$ liegen [142]. Sowohl die Weltgesundheitsorganisation als auch die Vereinten Nationen haben die SCA daher als *global health burden*, also als Belastung der weltweiten Gesundheitsversorgung charakterisiert und die Forderung nach umfassenden Screening-Programmen sowie systematischen Versorgungsstrategien in Europa werden lauter [167; 251; 294].

1.2 Hämorheologische Pathophysiologie

Unter Hämorheologie versteht man die Lehre der Fließeigenschaften des Blutes, welche von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen Charakteristika des Blutes selber, wie der Hämatokrit und die Viskosität, aber auch der Gefäße, wie deren Durchmesser und Interaktion mit den Blutzellen [27; 62].

Das klinische Erscheinungsbild der Sichelzellanämie ist das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels verschiedener pathophysiologischer Mechanismen, die diese zellulären und endothelialen Charakteristika negativ beeinflussen. Daher wird die Sichelzellanämie heutzutage als hämorheologische Erkrankung klassifiziert, bei der die veränderten mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten sowie die gestörte Kommunikation der Blutzellen mit dem Endothel entscheidende Faktoren in der Pathogenese von Vasookklusionen und chronischen Organschäden darstellen [62; 67; 140; 195; 235; 259].

In diesem Kapitel wird zunächst auf das veränderte Fließverhalten der Erythrozyten eingegangen, welches Ausdruck einer reduzierten Verformbarkeit sowie eines gestörten Aggregationsverhaltens der roten Blutkörperchen ist. Anschließend wird der Signalstoff Stickstoffmonoxid besprochen, der in der Interaktion von Erythrozyten mit dem Gefäßendothel eine wichtige Rolle einnimmt. Zum Schluss werden oxidativer Stress und Hämolyse dargestellt, die sich in einem Wechselspiel gegenseitig beeinflussen und die Hämorheologie der Sichelzellanämie weiter verschlechtern.

1.2.1 Erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation

Menschliches Blut setzt sich aus fluidem Plasma und verschiedenen Zellen wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten zusammen. Da die Erythrozyten über 99% des zellulären Blutvolumens ausmachen, sind deren biomechanische Eigenschaften entscheidend für das Fließverhalten der gesamten Blutsuspension [27].

Im Gegensatz zu gesunden Erythrozyten weisen Sichelzellen ein gestörtes Fließverhalten auf, da sie deutlich weniger verformbar und elastisch sind [62]. Sie erfüllen damit nicht mehr die Anforderungen, um in der Mikrozirkulation durch feinste Kapillaren fließen zu können und die Sauerstoffversorgung von Gewebe und Organen sicherzustellen [54]. Der pathologischen Morphologie zu Grunde liegt die Polymerisation der HbS-Moleküle, die zu einer Dehydrierung der Erythrozyten führt und die erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation negativ beeinflusst.

<u>HbS-Polymerisation:</u>

Das Phänomen der Sichelung basiert auf der Polymerisation des Hämoglobin S, welches in den Erythrozyten sehr hoch konzentriert vorliegt. Durch die reduzierte Löslichkeit von HbS im Vergleich zu normalem Hämoglobin aggregieren die Hb-Moleküle und bilden längliche Polymere, was eine Elongation der eigentlich bikonkaven runden Form der Zellen bewirkt und sie versteifen lässt [46]. Bei der Bildung der Polymere spielen eine Reihe von Faktoren eine Rolle. Dazu

gehören die intrazelluläre Hb-Konzentration, die relative Menge von HbS am gesamten Hämoglobin, die Temperatur, der pH-Wert und die Konzentration von 2,3-Diphosphoglycerat [25].

Solange die HbS-Moleküle Sauerstoff gebunden haben, behalten sie ihre ursprüngliche funktionale Form, im desoxygenierten Zustand jedoch kommt es zur Polymerisation mit konsekutiver Sichelung. Dieser Vorgang ist per se reversibel, allerdings verändert sich nach jeder Reoxygenierung die Beschaffenheit der Zellmembran, so dass ihre Elastizität stetig abnimmt [155; 196]. Die HbS-Polymerisation beeinflusst somit sowohl die Form als auch die physiologischen Eigenschaften der Erythrozyten und bestimmt maßgeblich die Prognose der Erkrankung, da ihr Ausmaß direkt mit dem Auftreten von Vasookklusionen sowie Schmerzkrisen assoziiert ist [41].

Zusätzlich kommt es im Rahmen der HbS-Polymerisation zu einem ausgeprägten Flüssigkeitsverlust der Erythrozyten, wofür vor allem Mechanismen der zellulären Kationen-Homöostase verantwortlich sind [25; 124]. Zum einen wird durch die Polymerisation in Vesikeln gespeichertes Calcium in der Zelle freigesetzt, welches Ca^{2+}-abhängige Kaliumkanäle in der Zellmembran aktiviert, was zu einem Ausstrom von Kalium und Wasser aus der Zelle führt [95]. Zum anderen geht Wasser durch den Cotransport von Kalium und Chlorid aus der Zelle verloren. Dieses Transportprotein ist bei Gesunden eigentlich nur in Retikulozyten aktiv, wird bei der Sichelzellanämie allerdings in Zellen mit hoher Dichte und niedrigem pH-Wert stimuliert [46].

Zusammen mit der reduzierten Membranelastizität führt die intrazelluläre Dehydration dann zu einer irreversiblen Versteifung der Erythrozyten. Der Anteil der dehydrierten und irreversibel deformierten Sichelzellen beeinflusst direkt die durchschnittliche Verformbarkeit der Erythrozyten und verschlechtert damit die gesamte Hämorheologie [67].

Erythrozytäre Verformbarkeit:

Die Fähigkeit der roten Blutkörperchen ihre Form unter gegebener Einwirkung von Scherkräften zu verändern, wird als erythrozytäre Verformbarkeit bezeichnet. Diese ist immens wichtig, da die feinsten Kapillaren mit 2-3µm einen geringeren Durchmesser besitzen als ein Erythrozyt mit durchschnittlich 7,5µm, so dass dieser ohne Veränderung seiner Form nicht durch das Gefäßlumen gelangen könnte [54].

Der Druck der Gefäßwand wirkt bei diesem Vorgang als Scherkraft auf die Zellen ein, was auch als Scherstress bezeichnet wird [211]. Die erythrozytäre Verformbarkeit befähigt die Zellen unter physiologischen Bedingungen dazu, sich diesem Stress dynamisch anzupassen, Flusswiderstände zu minimieren und dabei gleichzeitig ihre Stabilität zu bewahren [258].

Die Fähigkeit zum Formwechsel ist besonders in Regionen entscheidend, in denen die Scherkräfte hoch sind, also in Arterien, Arteriolen sowie in der Mikrozirkulation im Kapillar- und im retikulohistiozytären System [211]. Sinkt die Verformbarkeit der Erythrozyten, werden sie in den Sinusoiden der Milz frühzeitig von Makrophagen abgebaut, was zur hämolytischen Anämie führt [131].

Faktoren, die eine hohe Verformbarkeit begünstigen, sind eine niedrige Viskosität des Zytoplasmas, ein hohes Verhältnis zwischen Zelloberfläche und Zellvolumen sowie eine hohe Elastizität der Zellmembran [54; 195]. Die zytoplasmatische Viskosität ist vor allem abhängig von der Hydrierung der Zelle und der Menge an intrazellulärem Hämoglobin, welche klinisch als

mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC, *engl. mean corpuscular hemoglobin concentration*) gemessen werden kann. Bereits kleine Veränderungen des MCHC-Wertes führen zu einer deutlichen Zunahme der Viskosität und verschlechtern die Verformbarkeit der Zelle [54].

Diese wird ebenfalls beeinträchtigt, wenn das Volumen des Erythrozyten im Vergleich zu seiner Oberfläche ansteigt, wie es zum Beispiel bei der Transformation zu Sphärozyten geschieht. Die Zellen verlieren dann ihre bikonkave Form und sind nicht mehr in der Lage die Flusswiderstände in der Mikrozirkulation zu überwinden [27].

Für die Viskoelastizität der Membran zeichnen sich zytoskelettale Proteine verantwortlich, die mit der Lipiddoppelschicht ein funktionales Netzwerk formen. In diesem Netzwerk finden sich verschiedene Adapterproteine wie Glykophorine, Ankyrin, Bande 3, Protein 4.1 oder Aktin. An Letzteres binden flexible α- und β-Spektrinketten und formen einen Bindungskomplex. Die α- und β-Spektrin Moleküle liegen als umeinander gedrehte Dimere vor, von denen jeweils zwei ein Tetramer bilden, welche wiederum triangulär zueinander angeordnet sind (siehe Abb. 3) [8; 131].

Modifizierungen der genannten Strukturproteine, zum Beispiel durch eine Phosphor- oder Nitrosylierung der genannten Moleküle, beeinflussen die zytoskelettale Balance aus Stabilität und Flexibilität und damit die Funktionalität der gesamten Zellmembran [114; 131].

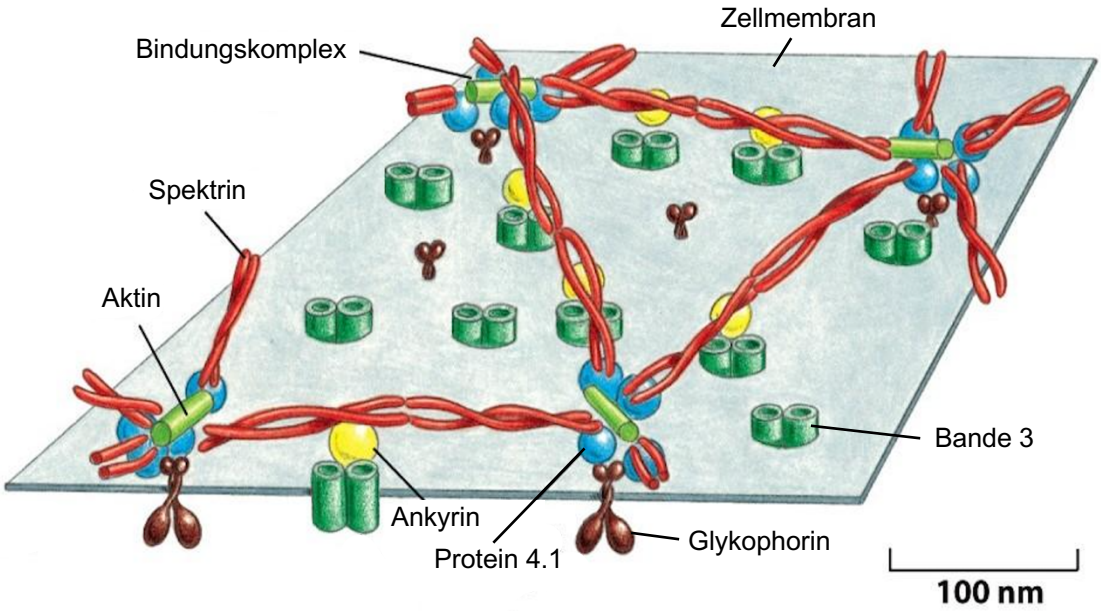


Abbildung 3: Zytoskelett der erythrozytären Zellmembran
Modifiziert nach Referenz [8].

Erythrozytäre Verformbarkeit bei der Sichelzellanämie:

Bei der Sichelzellanämie weisen die Erythrozyten als Ausdruck der beschriebenen HbS-Polymerisation und der damit einhergehenden Versteifung im Vergleich zu Gesunden eine signifikant reduzierte Verformbarkeit auf [25; 161; 196; 277]. Hierfür zeigen sich zwei Mechanismen hauptverantwortlich:

Zum einen ist dies die bereits beschriebene Dehydratation der Zellen, die zu einer Zunahme der Zelldichte und Plasmaviskosität sowie dementsprechend erhöhten MCHC-Werten führt [161]. Der Ca^{2+}-vermittelte abnorm hohe Kaliumverlust kann bei der Sichelzellanämie nicht

durch einen Einstrom anderer Kationen wie Na^+ ausgeglichen werden, was die Wahrscheinlichkeit von HbS-Polymerisation und Versteifung stark erhöht [131].

Zum anderen bedingen Modifikationen von membranständigen Proteinen der Zellen eine Destabilisierung der Biomechanik des Zytoskeletts. Hierbei scheint die Proteinkinase C eine wichtige Rolle zu spielen, deren Aktivität in SCA-Erythrozyten gesteigert ist und die verschiedene Proteine des Bindungskomplexes phosphoryliert, was wiederum eine Dissoziation der Spektrin- und Aktin-Moleküle bewirkt [101].

Zusätzlich verschlechtert wird die Verformbarkeit der Erythrozyten durch eine Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit sowie einer Zunahme von oxidativem Stress, was in den jeweiligen Kapiteln dargestellt wird (siehe 1.2.2 und 1.2.3).

Die reduzierte Verformbarkeit führt bei der Sichelzellanämie dazu, dass die Erythrozyten auch im oxygenierten Zustand seltener ins Kapillarsystem gelangen und dort, wenn sie eingetreten sind, länger verweilen [25]. Dies beeinträchtigt die Sauerstoffversorgung des distalen Gewebes beträchtlich. Zusätzlich stagnieren die Sichelzellen häufiger in der Mikrozirkulation, wodurch auf der einen Seite das Risiko für Gefäßverschlüsse steigt und auf der anderen Seite vermehrt Erythrozyten in den Gefäßen lysieren [62; 141].

Im komplikationsfreien Intervall besteht bei SCA-Patienten daher eine negative Korrelation zwischen Verformbarkeit und Hämolyse [64]. Im Verlauf einer akuten Schmerzkrise fällt die erythrozytäre Verformbarkeit zunächst unter ihren Ursprungswert ab und steigt erst mit der Besserung der Symptome wieder an [26]. Somit ist die erythrozytäre Verformbarkeit für die Krankheit der Sichelzellanämie ein wichtiger rheologischer Parameter, der in direktem Bezug zu klinischen Komplikationen wie Vasookklusionen und hämolytischer Anämie steht. In der Möglichkeit, die Biomechanik der Zellen zum Beispiel durch Modifikationen am Zytoskelett zu verbessern, liegt die Hoffnung, den Krankheitsverlauf der Sichelzellanämie positiv zu beeinflussen [114; 131; 195; 261].

Erythrozytäre Aggregation:

Unter erythrozytärer Aggregation versteht man die Eigenschaft der Erythrozyten, zwei- oder dreidimensionale multizellulare Aggregate zu formen, die auf Grund ihrer Ähnlichkeit zu aufeinander gestapelten Münzen auch als Rouleaux-Formationen bezeichnet werden [258]. Die Bildung dieser Formationen läuft ohne großen Energieaufwand ab, ist reversibel und beeinflusst direkt die Viskosität der gesamten Blutsuspension [195]. Für das Ausmaß der Aggregation sind die Adhäsionskräfte zwischen den Zellen, die durch verschiedene Plasmaproteine beeinflusst werden, die Abstoßungskräfte zwischen den Zellen, die durch die negative Ladung der Erythrozyten entstehen sowie Disaggregationsscherkräfte, die im Blutfluss auf die Zellen einwirken, entscheidend [27].

Physiologischerweise treten erythrozytäre Aggregate bei langsamen Flussraten und niedrigen Scherkräften auf, was durch die Anwesenheit des Akute-Phase-Proteins Fibrinogen noch verstärkt wird [62]. Bei hohen Flussgeschwindigkeiten und Gefäßdrücken jedoch kommt es vermittelt durch den steigenden Scherstress zur Disaggregation der Erythrozyten, so dass sie sich aus den Aggregaten lösen und parallel in laminarer Strömung fließen. Dieser Formwechsel

ist wichtig, um den Flusswiderstand in der Mikrozirkulation des Kapillarsystems zu reduzieren, damit Gefäßverschlüsse verhindert und die adäquate Gewebeperfusion gewährleistet werden können [62; 211].

Erythrozytäre Aggregation bei der Sichelzellanämie:

Die Aggregabilität der Erythrozyten, also die Tendenz zur Formung von Aggregaten, scheint bei der Sichelzellanämie im Vergleich zu Gesunden leicht erniedrigt zu sein, was vermutlich an der Unfähigkeit von irreversibel versteiften Zellen liegt, Aggregate zu bilden [64]. Einmal geformt zeigen die Aggregate allerdings eine zwei- bis dreifach erhöhte Festigkeit und lassen sich nur mit deutlich höherem Scherdruck wieder auflösen [270]. Dies hat zur Folge, dass der normale Blutfluss nicht mehr ausreicht, um eine Disaggregation der Zellen vor der Kapillarpassage zu bewirken, was zu verminderter Gewebeperfusion führt. Gleichzeitig steigt durch die persistierenden Aggregate die Blutviskosität, was sich negativ auf die gesamte Hämorheologie auswirkt [195].

Die direkten Auswirkungen von erythrozytärer Aggregation auf den Krankheitsverlauf der Sichelzellanämie sind bisher wenig untersucht worden [67]. In einigen Studien konnte allerdings gezeigt werden, dass ein Anstieg der Blutviskosität und ein Absinken der Sauerstoffsättigung in der Mikrozirkulation entscheidende Risikofaktoren für die Entstehung von Gefäßverschlüssen darstellen [20; 51]. Während vasookklusiver Krisen ließ sich zudem ebenfalls ein Anstieg der Blutviskosität sowie des Plasmaproteins Fibrinogen nachweisen [20]. Weiterhin konnten in einer Untersuchung mit SCA-Patienten Assoziationen von erhöhter Blutviskosität mit dem Auftreten von vasookklusiven Schmerzkrisen sowie von erhöhter Festigkeit erythrozytärer Aggregate mit dem akuten Thoraxsyndrom beschrieben werden [156].

Zusammengefasst stellen die erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation zwei wichtige hämorheologische Parameter der Sichelzellanämie dar und sind dabei Ausdruck der pathologischen Biomechanik der Erythrozyten. Aber auch weitere Faktoren modulieren nach neueren Erkenntnissen die mechanischen Eigenschaften der Erythrozyten, insbesondere Stickstoffmonoxid und oxidativer Stress, welche in den folgenden Kapiteln erläutert werden [114; 192].

1.2.2 Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses Gas und ein freies Radikal, welches als Signalstoff eine Vielzahl von physiologischen Funktionen im menschlichen Körper einnimmt. Es gehört zur Familie der Stickoxide und wird enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin hergestellt, die zusammen mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu L-Citrullin und NO reagiert [273]. Das katalysierende Enzym dieser Reaktion ist die NO-Synthase (NOS), von der verschiedene Isoformen existieren.

$$L\text{-}Arginin + 2NADPH + O_2 \xrightarrow{\text{NOS}} L\text{-}Citrullin + 2NADP^+ + NO^\bullet$$

Die Biosynthese von Stickstoffmonoxid ist somit abhängig von dem Vorliegen und der Funktionalität der NOS, aber auch von einer Reihe von Kofaktoren, für die das Enzym spezifische Bindungsstellen aufweist [44]. Dazu zählen Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavinmononucleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin (BH_4), Calmodulin und Häm [44].

Zusätzlich kann NO mit freiem Sauerstoff reagieren, wodurch u.a. Stickoxide wie Nitrit (NO_2^-) oder Nitrat (NO_3^-) entstehen. Dies ist für die Bioverfügbarkeit von NO relevant, da unter sauerstoffarmen Bedingungen NO wieder aus Nitrit gewonnen werden kann. Somit stellt Nitrit eine Art Reservespeicher für NO dar [145].

NO-Synthase:

In der ursprünglichen Nomenklatur wurden die Isoformen der NO-Synthase nach den Zellen benannt, in denen sie zuerst entdeckt wurden, so dass noch heute von neuronaler (nNOS oder NOS-1), von Makrophagen induzierbarer (iNOS oder NOS-2) und von endothelialer (eNOS oder NOS-3) NO-Synthase gesprochen wird. Die Forschung der letzten Jahre hat allerdings gezeigt, dass dieselben Zellen mehr als nur eine der Isoformen exprimieren können [44]. Zusätzlich finden sich NO-Synthasen auch in weiteren Geweben sowie in den Erythrozyten, die ebenfalls eine funktionale NO-Synthase (RBC-NOS) besitzen, die der eNOS ähnlich ist [70; 114; 147].

Wie viel NO in den Erythrozyten produziert wird, ist zum einen abhängig von der intrazellulären L-Arginin Konzentration und zum anderen vom Aktivierungszustand der RBC-NOS. Dieser kann durch verschiedene Mechanismen posttranslational modifiziert werden, insbesondere durch die Phosphorylierung.

Bei der Phosphorylierung werden durch Proteinkinasen Phosphatgruppen an Aminosäurereste des Enzyms gebunden, was eine Konformationsänderung der NO-Synthase zur Folge hat. Vor allem geschieht dies an Serin und Threonin, wie zum Beispiel Serin an Position 1177, welches bei der NO-Synthase eine besonders wichtige Rolle einnimmt. So konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Serin 1177 über den PI3K-Akt-Signalweg eine Aktivierung des Enzyms zur Folge hat [83; 114]. Dabei wird zunächst das Membranlipid PIP2 (Phopshatidylinositol-4,5-Bisphosphat) durch das Enzym PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat) phosphoryliert. Anschließend bindet die Serin/Threonin-Kinase Akt (auch Proteinkinase B genannt) an PIP3, was es dem Enzym ermöglicht, wiederum Serin 1177 zu phosphorylieren und damit die Aktivität der NO-Synthase zu steigern [83]. Im Gegensatz dazu führt die Phosphorylierung von anderen Aminosäureresten wie Serin 114 und Threonin 495 zu einer Inaktivierung des Enzyms [191; 192].

Hämorheologische Bedeutung von NO:

Stickstoffmonoxid ist an physiologischen Prozessen im gesamten Körper beteiligt. Neben seiner Rolle als Signalstoff im Nerven- und Immunsystem ist NO besonders wichtig im Herz- und Kreislaufsystem, da es zum einen über eine Herabsenkung des Gefäßtonus den Blutdruck und die vaskuläre Funktion reguliert, als auch direkt die erythrozytäre Verformbarkeit beeinflusst [114; 143].

Seine vasodilatatorische Wirkung entfaltet NO, indem es in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand das Enzym lösliche Guanylatzyklase (sGC, *engl. soluble guanylyl cyclase*) aktiviert, welches die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert [44]. Dafür bindet NO an die Häm-Untereinheit der sGC, was eine Konformationsänderung des Enzyms und eine vermehrte Umsetzung von GMP zu cGMP bewirkt. Der intrazelluläre Anstieg von cGMP führt dann zur Aktivierung der Proteinkinase G, die anschließend unterschiedliche regulierende Proteine phosphoryliert. Dadurch kommt es zu Veränderungen am Zytoskelett, an den Muskelfilamenten sowie an membranständigen Calciumkanälen, wodurch die Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle sinkt. Über diesen Mechanismus vermittelt NO eine Relaxation der glatten Muskulatur mit konsekutiver Reduktion des Gefäßtonus [164].

Die im vorigen Kapitel beschriebene Fähigkeit der Erythrozyten, sich zu verformen und Flusswiderständen anzupassen, wird ebenfalls von NO beeinflusst. So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass NO die Membranstruktur, die Verformbarkeit und damit die rheologischen Eigenschaften von Erythrozyten verbessert [38; 114; 261]. Es scheint wahrscheinlich, dass dies über eine direkte Modifizierung zytoskelettaler Proteine im Rahmen einer S-Nitrosylierung geschieht. Bei diesem Vorgang geht NO über die Thiol-Gruppe von Aminosäuren wie Cystein direkte reversible Bindungen mit Proteinen ein [44]. Dadurch kann NO vermutlich die Membranproteine α- und β-Spektrin aktivieren, was die Membranstruktur der Zelle verändert und ihre Verformbarkeit erhöht [114].

Aber nicht nur die Eigenschaften von Erythrozyten, sondern auch die von Thrombozyten und Leukozyten werden von NO beeinflusst. So inhibiert NO die Aggregation der Blutplättchen untereinander sowie deren Adhäsion am Endothel, was Thrombosen entgegenwirkt [44; 230]. Bereits geformte Thromben können durch NO disaggregiert und darunter liegendes dysfunktionales Endothel wiederhergestellt werden. Zusätzlich wirkt NO immunologisch hemmend auf Leukozyten und Monozyten, was ebenfalls deren Adhäsion am Endothel verringert [158].

Eine weitere interessante und protektive Funktion entfaltet NO dadurch, dass es als freies Radikal andere freie Radikale wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) binden und so Zellschädigungen verhindern kann (siehe 1.2.3) [296].

Als Botenstoff regelt Stickstoffmonoxid somit die Kommunikation zwischen Blutzellen und Gefäßen. Dabei entfaltet es antithrombotische, antiinflammatorische sowie vasodilatatorische Wirkungen und spielt dementsprechend eine wichtige protektive Rolle in der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen [143; 158]. Seine ausreichende Produktion und Bioverfügbarkeit ist essentiell für die gesamte Hämorheologie sowie insbesondere für das Verhindern von vasookklusiven Ereignissen.

<u>NO-Stoffwechsel bei der Sichelzellanämie:</u>

Wie bereits beschrieben bindet NO bevorzugt an Eisen von hämhaltigen Proteinen wie der sGC oder NOS und besitzt dementsprechend auch eine hohe Affinität für Hämoglobin. In einer extrem schnell ablaufenden Reaktion bindet NO an oxygeniertes Hb ($HbFe^{2+}O_2$), wobei Methämoglobin ($HbFe^{3+}$) und Nitrat (NO_3^-) entstehen [145; 276].

$$HbFe^{2+}O_2 + NO^{\bullet} \rightarrow HbFe^{3+} + NO_3^-$$

Dass NO nicht einfach permanent in die Erythrozyten diffundiert und dort verbraucht wird, verhindert die relativ langsame Diffusionsrate von NO durch die RBC-Membran. Dadurch läuft die Reaktion mit Hb bis zu 1000mal langsamer ab und die Verfügbarkeit von NO für andere Zellen bleibt gesichert [166]. Da es bei der Sichelzellanämie jedoch zu einer intravasalen Hämolyse kommt, gelangen Hämoglobin und weitere eigentlich intrazellulär vorliegenden Stoffe frei ins Blut, so dass die Bioverfügbarkeit von NO sinkt. Hierbei spielen drei verschiedene Mechanismen eine Rolle.

Zunächst kommt es bereits bei sehr geringen Konzentrationen von freiem Hb durch die oben beschriebene Reaktion zu einer deutlich messbaren Verringerung der NO-Spiegel. Es konnte gezeigt werden, dass schon Konzentrationen von 0,5µmol/l freiem Hb die NO-Bioverfügbarkeit signifikant reduzieren [81]. Die durchschnittliche Konzentration von extrazellulärem Hb von symptomfreien SCA-Patienten liegt bei ca. 6µmol/l, die bei akuten Krisen sogar auf bis zu ca. 40µmol/l ansteigen kann [198].

Des Weiteren wird aus den hämolysierten Zellen das Enzym Arginase 1 freigesetzt, welches eigentlich im Harnstoffzyklus die Umsetzung von L-Arginin zu Harnstoff und Ornithin katalysiert. Durch die hohe Aktivität der freien Arginase 1 geht der NO-Synthase das Substrat L-Arginin verloren, so dass weniger NO gebildet werden kann. SCA-Patienten besitzen daher erniedrigte Argininspiegel und die Aktivität der Arginase 1 korreliert mit vaskulärer Dysfunktion, pulmonaler Hypertension und auch der Mortalität [145; 189]. Zuletzt entstehen im Rahmen der Hämolyse freie Radikale wie Superoxid ($O_2^{-\bullet}$), die mit NO zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) reagieren, wodurch zusätzlich NO eliminiert wird (siehe 1.2.3) [17].

Der Verlust des wichtigen Signalstoffes NO führt so bei der Sichelzellanämie zu endothelialer Dysfunktion, beeinträchtigter Vasomotorik sowie gesteigerter Adhäsion von Leuko- und Thrombozyten an die Gefäßinnenwand [67]. Daher liegt in der Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit eine vielversprechende Möglichkeit, die Hämorheologie der Sichelzellanämie zu verbessern [33; 38; 114; 145]. Dies zeigt auch der effektive Einsatz von Hydroxyurea, das neben fetalem Hämoglobin (HbF) ebenfalls die Bereitstellung von NO erhöht [60]. Die Erythrozyten von SCA-Patienten, die Hydroxyurea einnehmen, weisen daher im Vergleich zu nicht behandelten Kontrollen höhere Nitritkonzentrationen auf und zeigen eine veränderte NOS-Aktivität [194].

Einschränkend muss gesagt werden, dass Therapieversuche mit inhaliertem NO und Arginin zwar in Tiermodellen und kleinen Fallstudien Erfolge verzeichnen konnten, sich in großen kontrollierten klinischen Studien bis jetzt allerdings keine signifikante Verbesserung des Krankheitsverlaufs zeigte [107; 260]. Interessanterweise zeigt die RBC-NOS bei SCA-Patienten zwar eine erhöhte Aktivität, die jedoch nicht notwendigerweise zu verbesserter vaskulärer Funktion und erythrozytärer Verformbarkeit führt [113]. So scheint eine isolierte Gabe von NO nicht den Einfluss weiterer pathophysiologisch relevanter Beeinträchtigungen, die sich zum Beispiel aus Hämolyse und oxidativem Stress ergeben, ausgleichen zu können [192].

1.2.3 Oxidativer Stress

Im menschlichen Körper laufen auf zellulärer Ebene permanent oxidative und reduktive Reaktionen ab, die im Gleichgewicht gehalten werden müssen. Kommt es zu einem Überschuss an oxidierenden Molekülen, spricht man von oxidativem Stress, der zu Strukturveränderungen an DNA, Proteinen sowie Lipiden führen kann. Diese Veränderungen können die Zelle schädigen und ihren Tod verursachen, so dass oxidativem Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese von verschiedensten Erkrankungen wie Krebs, Diabetes oder koronarer Herzkrankheit zugeschrieben wird [18; 97; 149].

Freie Radikale:

Als freie Radikale bezeichnet man instabile Atome oder Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron und dadurch eine hohe Reaktivität besitzen. Typische freie Radikale sind die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *engl. reactive oxygen species*) sowie die reaktiven Stickstoffspezies (RNS, *engl. reactive nitrogen species*), zu denen auch Stickstoffmonoxid gehört.

Die ROS werden in der Zelle kontinuierlich als Beiprodukte von normalen Stoffwechselvorgängen durch die partielle Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) gebildet. So entsteht Superoxid ($O_2^{-\bullet}$), welches anschließend durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. H_2O_2 ist zwar selbst kein Radikal, kann aber, wenn es nicht enzymatisch mittel Katalase oder Glutathionperoxidase zu Wasser umgesetzt wird, durch die sogenannte Fenton-Reaktion hochreaktive Hydroxyl-Radikale ($HO^{\bullet}$) bilden [18; 202].

$$O_2 \rightarrow O_2^{-\bullet} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \begin{cases} \xrightarrow{Katalase} H_2O + O_2 \\ \xrightarrow{Glutathionperoxidase} 2H_2O \\ \xrightarrow{Fenton\text{-}Reaktion} HO^{\bullet} \end{cases}$$

Ein Vertreter der RNS ist Peroxynitrit ($ONOO^-$), welches bei der Reaktion von $O_2^{-\bullet}$ mit NO entsteht und ebenfalls ein potentes Oxidans ist [202]. Durch Bindung von Peroxynitrit an proteinogenes Tyrosin entsteht Nitrotyrosin, welches als Marker für RNS und nitrosativen Stress herangezogen wird [149].

$$O_2^{-\bullet} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^-$$
$$ONOO^- + Tyrosin \rightarrow Nitrotyrosin$$

Physiologische Bildung von ROS:

Neben exogenen Faktoren wie ionisierender Strahlung, Luftverschmutzung, Zigarettenrauch und Alkohol gibt es eine Reihe endogener Mechanismen, die zu einem deutlichen Anstieg von freien Radikalen führen können [149]. So entsteht ein Großteil der ROS im Rahmen der Energiegewinnung in der mitochondrialen Atmungskette, wo durch oxidative Phosphorylierung Adenosintriphosphat (ATP) gebildet und 1-5% des konsumierten Sauerstoffes zu Superoxid

umgesetzt wird [93]. Der Anteil steigt abhängig vom Energiebedarf, so dass in Folge intensiver körperlicher Anstrengung deutlich mehr freie Radikale gebildet werden [75; 93].

Weiterhin bilden Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten im Rahmen der Immunabwehr Superoxid-Ionen, um Mikroorganismen zu zerstören. Werden die Abwehrzellen stimuliert, beginnt das Enzym NADPH-Oxidase enorme Mengen an Sauerstoff umzusetzen, was auch als „respiratory burst" bezeichnet wird [149]. Somit kann die Auseinandersetzung des Immunsystems mit Pathogenen ebenfalls zu einer erheblichen endogenen Produktion von freien Radikalen führen [202].

Ein weiterer Mechanismus, bei dem es zu einer erhöhten Produktion von ROS kommt, ist das sogenannte Ischämie/Reperfusions-Phänomen. Dieses tritt bei lokaler Ischämie, zum Beispiel im Rahmen von chirurgischen Eingriffen, erlittenem Schock oder auch exzessiver körperlicher Anstrengung auf [110]. Als Resultat einer Energiegewinnung unter hypoxischen Bedingungen entsteht durch das Enzym Xanthin-Oxidase (XO) wiederum $O_2^{-\bullet}$ [55; 110]. Eine rasche Reperfusion und Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff führt anschließend paradoxerweise nicht zu einer Verbesserung, sondern zu einem weiteren Anstieg von ROS durch die XO, was den oxidativen Stress vermehrt [93; 297].

Zuletzt entstehen ROS auch durch die langsam ablaufende Autooxidation von oxygeniertem Hämoglobin ($HbFe^{2+}O_2$) zu Methämoglobin ($HbFe^{3+}$), wobei ebenfalls $O_2^{-\bullet}$ entsteht [7; 276]. Da Methämoglobin nicht in der Lage ist, Sauerstoff zu binden, wird es in den Erythrozyten enzymatisch wieder in funktionales Hämoglobin umgewandelt. Sein Anteil am gesamten Hämoglobin liegt normalerweise bei unter 1%, kann aber unter hypoxischen Bedingungen und bei geringer Stabilität der Hb-Moleküle deutlich zunehmen, wodurch weitere ROS entstehen [215; 283].

Negative Auswirkungen von oxidativem Stress:

Freie Radikale werden durch Zellabwehrmechanismen eliminiert, an denen sogenannte Antioxidantien beteiligt sind. Dazu zählen auf der einen Seite großmolekulare Stoffe wie die genannten Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sowie auf der anderen Seite kleinmolekulare „Radikalfänger" wie Glutathion, Vitamin C und E [202]. Gelingt die Inaktivierung der freien Radikale nicht, kommt es durch deren Reaktion mit verschiedenen Zellbestandteilen zu oxidativem Stress mit negativen Folgen.

Bei der Lipidperoxidation oxidieren freie Radikale membranständige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA, *engl. polyunsaturated fatty acids*), wodurch die Elastizität und Fluidität der Lipiddoppelschicht abnimmt. Durch die gestörte Integrität der Zellmembran steigt deren Permeabilität, so dass es zum Ausstrom von Flüssigkeit sowie dem Verlust von intrazellulären Proteinen und Enzymen kommt [97; 202]. Durch die Oxidation der PUFA entstehen zusätzlich Peroxylradikale ($ROO^{\bullet}$) sowie sekundäre zytotoxischen Verbindungen wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal. Letztere können Proteine modifizieren, indem sie mit ihnen Addukte bilden, die anschließend Entzündungen auslösen und die DNA schädigen können [21]. Da MDA mit dem Ausmaß der Lipidperoxidation korreliert, wird es als Biomarker für oxidativen Stress herangezogen [93; 274].

Außerdem können freie Radikale intrazelluläre Proteine oxidieren, was u.a. zur Störung der Funktionalität von Enzymen führt [93]. Wie bereits beschrieben entsteht Methämoglobin bei der Oxidation von Hämoglobins, welches eine Versteifung der Erythrozyten begünstigt, so dass ihre Verformbarkeit sinkt [276]. Da Häm eine geringere Affinität zu $HbFe^{3+}$ als zu $HbFe^{2+}$ hat, kommt es zusätzlich zur Dissoziation des Häms aus dem Hb-Molekül (siehe 1.2.4) [7].

Neben der Oxidation von Proteinen können ROS auch DNA-Basen hydroxylieren, was zu Strangbrüchen und erhöhtem Bedarf an Reperaturenzymen führt. Übersteigt das Ausmaß der DNA-Schädigung die Kapazitäten des Reperatursystems, kommt es zu beschleunigter Zellalterung und Mutationen, so dass oxidativer Stress auch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Karzinomen spielt [35; 69].

Oxidativer Stress bei der Sichelzellanämie:

Es wird ersichtlich, dass das Risiko für Zellschädigungen steigt, je mehr freie Radikale gebildet werden. Im Rahmen der HbS-Polymerisation durchlaufen SCA-Erythrozyten repetitive Zyklen von Sichelung und Entsichelung mit gesteigertem Energieverbrauch, wodurch ca. doppelt so viele ROS wie bei Gesunden entstehen [6; 14]. Die ROS sind dabei sowohl Resultat als auch verstärkendes Element der Autooxidation des Hämoglobins, was wiederum die hypoxische Stoffwechsellage der Patienten verstärkt [7]. Weiterhin werden bei der Sichelzellanämie verschiedene Oxidasen wie die Xanthin-Oxidase vermehrt exprimiert, da das Ischämie-Reperfusions-Phänomen durch die Vasookklusionen bei der Sichelzellanämie häufig auftritt [17; 297].

Zusätzlich ist bei der Sichelzellanämie die Kapazität des antioxidativen Systems reduziert. So zeigen die Patienten erniedrigte Spiegel der Glutathion-Peroxidase, wodurch anfallendes Wasserstoffperoxid nicht ausreichend eliminiert werden kann und vermehrt gefährliche Hydroxyl-Radikale entstehen [14; 55]. Dementsprechend liegt auch Glutathion, welches ein Kofaktor der Glutathion-Reduktase ist, bei SCA-Patienten um ca. ein Drittel vermindert vor [7; 190]. Als Ausdruck des hohen Verbrauchs von Antioxidantien findet sich bei der Sichelzellanämie auch häufig ein Mangel an Vitamin E und C [252].

Da bei der Sichelzellanämie also auf der einen Seite die Bildung von ROS erhöht und auf der anderen Seite die totale antioxidative Kapazität erniedrigt ist, sind Sichelzellen erhöhten Raten von oxidativem Stress ausgesetzt [252; 297]. Es konnte gezeigt werden, dass SCA-Patienten chronisch erhöhte Werte an ROS aufweisen, die während vasookklusiver Krisen nochmals stark zunehmen können [6; 55; 128].

Oxidativer Stress ist somit ein wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der Sichelzellanämie. Einerseits vermittelt oxidativer Stress direkte Schäden an den Zellen wie zum Beispiel durch die Lipidperoxidation, andererseits verstärkt er aber auch weitere pathophysiologische Mechanismen [7]. So führen ROS zum Beispiel zu einer Verschlechterung der NO-Bioverfügbarkeit, da Superoxid mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagiert, welches zu einer Inaktivierung der NO-Synthase führt [55; 202]. Zusätzlich beeinflussen ROS die Morphologie der Erythrozyten und wirken sich negativ auf ihre Verformbarkeit aus [7; 82; 283]. Ganz wesentlich ist jedoch das

Wechselspiel von oxidativem Stress und Hämolyse, welche bei der Sichelzellanämie einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt.

1.2.4 Hämolyse

Sichelzellen sind auf Grund ihrer veränderten Morphologie, ihrer geringen Verformbarkeit und ihrer hohen Belastung durch oxidativen Stress äußerst instabil und fragil. Daher ist die mittlere Lebenserwartung der Erythrozyten von SCA-Patienten auf unter 20 Tage reduziert, wie Untersuchungen aus den 70er Jahren zeigen [178; 184]. Durch die medikamentöse Behandlung mit Hydroxyurea und der Erhöhung von intrazellulärem HbF liegt die Überlebenszeit der Zellen heutzutage bei ca. 30 Tagen, ist damit aber im Vergleich zu Gesunden immer noch um 75% erniedrigt [229].

Intravasale Hämolyse:

Physiologischerweise findet der Abbau der Erythrozyten extravasal, d.h. durch Phagozytose in der Milz und im retikulohistiozytären System statt [42]. Bei der Sichelzellanämie läuft die Hämolyse jedoch zu ca. einem Drittel in den Gefäßen ab, so dass Bestandteile der Erythrozyten direkt ins Plasma eintreten und mit anderen Stoffen und Zellen im Blut reagieren können [141; 236].

Die intravasale Hämolyse belastet zum einen durch Veränderungen im pH-Wert und Elektrolytmilieu die Bluthomöostase und zum anderen durch freigesetzte Proteine und Enzyme die vaskuläre Funktionalität. So kommt es u.a. durch die Arginase 1 zu einem Verbrauch von L-Arginin und damit einer Herabsetzung der NO-Bioverfügbarkeit (siehe 1.2.2) [145]. Zusätzlich gelangen aus den lysierten Erythrozyten hohe Mengen an asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA) ins Blut, welches auf die NO-Synthase der Endothelzellen inhibierend wirkt [141; 157].

Pathophysiologisch sehr bedeutsam sind die großen Mengen an freiwerdenden Hämoglobin- und Häm-Molekülen [141]. Bei gesunden Menschen wird extrazelluläres Hb an das Transportprotein Haptoglobin gebunden, welches im Blutplasma zirkuliert und eine hohe Affinität für Hämoglobin aufweist. Der geformte Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex wird dann von Makrophagen des retikulohistiozytären Systems erkannt und abgebaut [240]. Freies Häm wiederum bindet mit hoher Affinität an das Glycoprotein Hämopexin, welches in der Leber von Hepatozyten aufgenommen wird, wodurch das Molekül zersetzt wird und gelöstes Eisen wiederverwertet werden kann [240]. Haptoglobin und Hämopexin bilden damit ein wichtiges Schutzsystem, welches eine kontrollierte Eliminierung von freiem Hb und Häm ermöglicht. Werden jedoch die Bindekapazitäten von Haptoglobin und Hämopexin überschritten, können freies Hb und Häm eine pathologische Wirkung entfalten [49; 141; 243].

Freies Hämoglobin und Häm:

Wie bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben führt die Akkumulation von extrazellulärem Hb und Häm zu Gefäßschädigungen und hämorheologischen Beeinträchtigungen. Kommt es zur Freisetzung von Hämoglobin ins Blut, oxidiert dieses rasch zu Methämoglobin (Autooxidation), wodurch zunächst Superoxid und anschließend Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses kann zu

weiteren ROS wie Hydroxyl- und Ferryl-Radikalen reagieren, die erheblichen oxidativen Stress an Blut- und Endothelzellen generieren (siehe Kapitel 1.2.3) [7; 283].

Da Häm eine niedrige Affinität zu Methämoglobin aufweist, dissoziiert es leicht aus dem oxidierten $HbFe^{3+}$-Molekül. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass Häm daraufhin an verschiedene Stoffe wie zum Beispiel Mikropartikel der fragmentierten Erythrozytenmembran gebunden und zur Gefäßwand transportiert wird [49]. Dort interagiert es mit den Endothelzellen, was diese zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (*engl. intercellular adhesion molecule 1*), VCAM-1 (*engl. vascular cell adhesion molecule 1*) und E-Selektin veranlasst [284].

Zusätzlich aktiviert Häm über den TLR-4 Rezeptor (*engl. toll-like receptor*) den NF-κB-Signalweg (*engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), worüber das angeborene Immunsystem stimuliert und inflammatorische Zytokine gebildet werden. Dies führt zu einer gesteigerten Adhäsionsrate von Thrombo- und Leukozyten an das Endothel, so dass freiem Häm proinflammatorische und prothrombotische Wirkung zugesprochen werden [243].

Verschlechtert wird die vaskuläre Funktionalität weiterhin durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit freiem Hb, wodurch unfunktionales Nitrat entsteht. Dies führt zur Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit, was ebenfalls die Adhäsion von Thrombo- und Leukozyten ans Endothel begünstigt und zur Vasokonstriktion führt (siehe Kapitel 1.2.2).

<u>Auswirkungen der Hämolyse bei der Sichelzellanämie:</u>

Bei der Sichelzellanämie kommt es in Folge der exzessiven Hämolyse zu einer ausgeprägten hämolytischen Anämie und einem *circulus vitiosus* von Zelllyse, oxidativem Stress und reduzierter NO-Bioverfügbarkeit. Hämolyse und oxidativer Stress sind dabei nachteilig miteinander verbunden, da auf der einen Seite das hohe Maß von ROS die Lyse der Zellen verstärkt und auf der anderen Seite in Folge der Autooxidation des freien Hb weitere freie Radikale entstehen [7; 55].

Durch die Reaktion von freiem Hämoglobin mit Stickstoffmonoxid weisen SCA-Patienten zudem verminderte NO-Spiegel auf (siehe Kapitel 1.2.2) [236]. Die Freisetzung von Arginase 1 und ADMA aus lysierenden Erythrozyten, die beide inhibierend auf die NO-Synthase wirken, verstärkt das NO-Defizit zusätzlich. Arginase 1 und ADMA liegen besonders in Retikulozyten und jungen Erythrozyten hoch konzentriert vor, die wegen der kurzen erythrozytären Lebenszeit bei der Sichelzellanämie vermehrt lysieren [157; 190].

Auch in symptomfreien Intervallen kommt es bei SCA-Patienten zur intravasalen Hämolyse und zur Freisetzung von großen Mengen von freiem Hb und Häm. In einer Studie lag die Konzentration von extrazellulärem Häm durchschnittlich bei 4,2µmol/l im Vergleich zu 0,2µmol/l der gesunden Vergleichsgruppe und korrelierte dabei stark mit dem Verbrauch von Stickstoffmonoxid [236]. Haptoglobin konnte in derselben Untersuchung bei über 90% der SCA-Patienten nicht detektiert werden, so dass eine komplette Sättigung des Transportproteins vorlag.

Freies Hämoglobin im Plasma kann bei Gesunden dosis-abhängig u.a. zu renaler Dysfunktion, gastrointestinalen Schmerzen, pulmonaler Hypertension und Thrombosen führen [240]. So ist es nicht verwunderlich, dass auch bei der Sichelzellanämie Zusammenhänge zwischen gesteigerter Hämolyse und chronischen Organschäden aufgezeigt werden konnten. In

einer großen Kohortenstudie korrelierten erhöhte Hämolysemarker mit pulmonaler Hypertension und Mortalität [106]. In weiteren kleineren Studien konnten Assoziationen von gesteigerter Hämolyse mit Vaskulopathien, reduzierter NO-Bioverfügbarkeit und erhöhter Sterblichkeit beschrieben werden [138; 189].

Freies Häm scheint zudem als proinflammatorisches und prothrombotisches Molekül das Endothel zu aktivieren und Vasookklusionen zu provozieren [34]. In einer Studie mit an Sichelzellanämie erkrankten Kindern konnte ein Zusammenhang zwischen freiem Häm und vasookklusiven Krisen sowie dem akuten Thoraxsyndrom gezeigt werden [4]. In Tierversuchen provozierte die Infusion von Häm renale Gefäßverschlüsse und Nierenversagen, was durch die Gabe von Hämopexin wieder aufgehoben werden konnte [49].

Die exzessive Hämolyse spielt somit in der Pathophysiologie der Sichelzellanämie eine wichtige Rolle. Die Freisetzung von Hämoglobin und weiteren Stoffen aus den Erythrozyten führt zu Zellschädigungen durch oxidativen Stress, einer gesteigerten Zelladhäsion ans Endothel und einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit [141; 236]. Dadurch verstärkt die Hämolyse die vaskuläre Dysfunktion der Patienten, was akute klinische Komplikationen, chronische Organschäden und eine erhöhte Mortalität zur Folge hat.

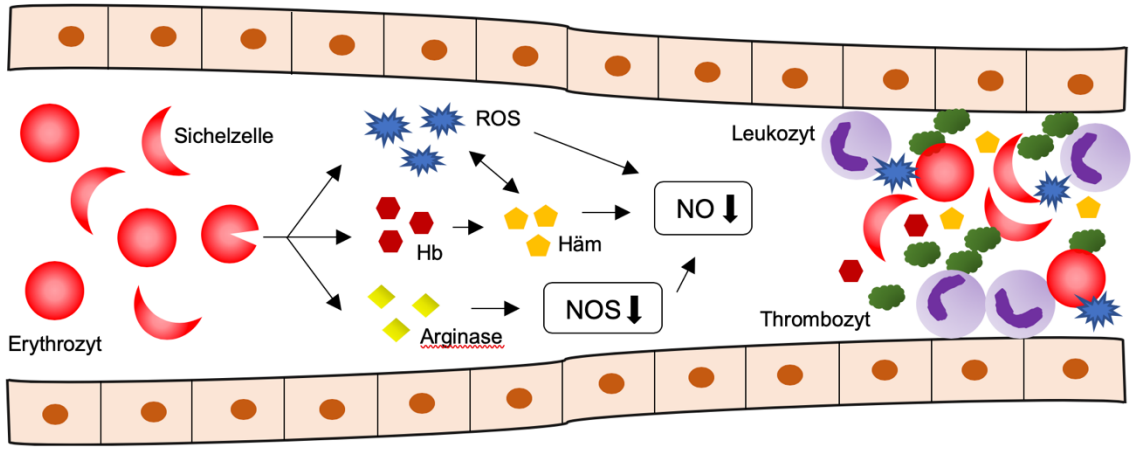


Abbildung 4: Übersicht Pathophysiologie der Sichelzellanämie

Als Folge von HbS-Polymerisation und reduzierter Verformbarkeit kommt es zur intravasalen Hämolyse der Erythrozyten. Die freigesetzten Stoffe bewirken eine Inaktivierung der NO-Synthase und eine Reduzierung der NO-Bioverfügbarkeit, was zur endothelialen Dysfunktion mit Vasokonstriktion führt. Dissoziiertes Häm stimuliert das Immunsystem, wodurch Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel binden und schlussendlich das Gefäßlumen verschlossen wird.

1.3 Krankheitsbild

1.3.1 Klinik

Auf Grund ihrer komplexen Pathophysiologie ist die Sichelzellanämie eine multisystemische Erkrankung, bei der nahezu jedes Organ betroffen sein kann [220]. Das klinische Bild entsteht durch das Zusammenspiel von hämolytischer Anämie, Infektionen und Vasookklusionen. Letztere sind verantwortlich für das Leitsymptom der SCA, die sogenannten Schmerzkrisen, bei denen ischämische Gewebeschäden in Folge von multiplen Gefäßverschlüssen entstehen. Sie sind der häufigste Grund für Hospitalisationen und werden von den Patienten als sehr belastend empfunden [235].

Vasookklusion:

Je nach Ort der Okklusion können verschiedene Körperteile betroffen sein. Die typischen Schmerzkrisen sind Ausdruck von Gefäßverschlüssen im Knochenmark mit konsekutiver Ischämie und Nozizeption. Sie äußern sich bei Kindern vor allem als Daktylitiden, welche als schmerzhafte Schwellungen der Finger und Zehen imponieren [200]. Im Verlauf treten auch (para-)sternale Schmerzen und Schmerzen in den Extremitäten auf.

Auch wenn der Großteil der Schmerzen zuhause behandelt wird, haben SCA-Patienten durchschnittlich 0,8 Schmerzkrisen pro Jahr, die einen Krankenhausaufenthalt bedingen [224]. In einer Studie mit 178 SCA-Patienten berichten mehr als 50% von täglichen Schmerzen, v.a. in den unteren Extremitäten und am Rücken [177]. Die Intensität und Frequenz unterscheiden sich allerdings deutlich von Patient zu Patient, wofür einige beeinflussende Faktoren identifiziert werden konnten [220; 224]. Dazu zählen genetische Besonderheiten wie die erhöhte Expression von fetalem Hämoglobin (HbF), welche sich günstig auf die Erkrankung auswirkt [5]. Klimatische Einflüsse, wie schlechte Luftqualität, eine sehr hohe oder niedrige Luftfeuchtigkeit sowie extrem heißes oder kaltes Wetter führen wiederum zu Verschlechterungen [267]. Häufig wird die Schmerzkrise von unspezifischen Allgemeinsymptomen begleitet wie Tachypnoe, Tachykardie, Hypertonie, Übelkeit, Erbrechen und Fieber [248].

Die Gefäßverschlüsse zeichnen sich verantwortlich für viele lebensbeeinträchtigende und auch lebensbedrohliche Komplikationen. Zu ersteren zählen Retinopathien in Folge von Infarkten am Augenhintergrund, an denen 10-20% der Patienten erkranken und die zur Erblindung führen können [61]. Durch Störungen in der Mikrozirkulation und dem Transport von Nährstoffen können kleinere und größere Hautdefekte entstehen, wie das Ulcus cruris. Bei Männern kann es zu erektiler Dysfunktion bis hin zur Impotenz kommen, die als Folge des Priapismus möglich sein kann, einer anhaltenden schmerzhaften Erektion des Penis [71]. Bei Frauen treten gehäuft Komplikationen in der Schwangerschaft auf [140].

Zu den lebensbedrohlichen Notfällen gehören u.a. zerebrale Infarkte und das akute Thoraxsyndrom [281]. Die Ursache des akuten Thoraxsyndroms sind multiple Gefäßverschlüsse in der Lunge, die oft gepaart mit einer pulmonalen Infektion auftreten, wodurch ein circulus vitiosus entsteht mit absinkendem Sauerstoffpartialdruck und zunehmender Sichelung der

Erythrozyten [182]. Ischämische oder hämorrhagische Hirninfarkte treten bei einem Viertel der Patienten bis zum 45. Lebensjahr auf [23]. Klinisch nicht apparente Ereignisse können die kognitive Leistungsfähigkeit deutlich verringern (s.u. „Neurokognitive und körperliche Entwicklung“) [278].

Weitere durch Vasookklusionen bedingte Komplikationen sind die pulmonale Hypertonie und die Kardiomyopathie. Beide entstehen durch Infarkte im Lungen- bzw. Herzgewebe. Kardiopulmonale Komplikationen spielen eine große Rolle im klinischen Verlauf der Sichelzellanämie und tragen in den entwickelten Ländern entscheidend zur verkürzten Lebenserwartung der Sichelzellanämiepatienten bei. In einer großen retrospektiven Studie wurden sie für 45% der Todesfälle verantwortlich gemacht [94].

Infektionen:

Die schlechte Durchblutung und die Schädigungen der Milz begünstigen Infektionen, so dass es gehäuft zu Bakteriämien, Meningitiden und Pneumonien kommt [290]. Typische Erreger sind Pneumokokken, für die SCA-Patienten ohne Prophylaxe ein 300fach erhöhtes Infektionsrisiko haben sowie Haemophilus influenzae b [42; 290]. Durch die funktionelle Asplenie verlaufen aber auch banale Gastroenteritiden oder Harnwegsinfektionen vermehrt fulminant und können zur Sepsis führen. In Endemiegebieten spielt zudem die Malaria eine wichtige Rolle, da homozygote SCA-Patienten schwerere Krankheitsverläufe zeigen als die Normalbevölkerung [247]. In Folge von Knochenmarksinfarkten leiden SCA-Patienten auch häufig an Osteomyelitiden, die klinisch manchmal schwer von Schmerzkrisen zu unterscheiden sind [12].

Die Prognose der Sichelzellanämie wird durch Infektionen stark beeinflusst, wie die hohe Kindersterblichkeit in weniger entwickelten Länder zeigt, wo Infektionsprophylaxen selten konsequent durchgeführt werden [235]. In diesen Ländern kommt es auf Grund der mangelhaften Testung von Blutprodukten bei Transfusionen auch vermehrt zu Infektionen von HIV, Hepatitis B und C und dem West Nil Virus [140].

Anämie:

Die Lebensdauer eines Erythrozyten liegt bei gesunden Menschen zwischen 100 und 120 Tagen, bei der Sichelzellanämie ist diese jedoch auf unter 20 Tage reduziert [178; 184]. Durch die permanente Hämolyse zeigt sich bei SCA-Patienten eine ausgeprägte Anämie mit einer durchschnittlichen Hämoglobinkonzentration von 7,6 g/dl, einem Hämatokrit von 21,8% und einer Erythrozytenzahl von $2{,}60\times10^{12}$/l, was sich deutlich unter den Referenzbereichen für gesunde Männer (14,0-17,5 g/dl, 36,0-48,2%, $4{,}5\text{-}5{,}9\times10^{12}$/l) und für gesunde Frauen (12,3-15,3g/dl, 33,5-43,1%, $4{,}1\text{-}5{,}1\times10^{12}$/l) befindet [10; 32]. Zu den Auslösern einer schweren akuten Anämie zählen die hyperhämolytische Krise, die aplastische Krise und die Milzsequestration.

Bei der Milzsequestration kommt es aus bislang noch unbekannten Gründen zur massenhaften Ansammlung von Blut in der Milz, was zum hypovolämischen Schock und zum Tod führen kann. Sie findet sich häufiger bei Kindern vor dem sechsten Lebensjahr und tritt bei bis zu 30% der SCA-Patienten im Laufe des Lebens auf [42]. Durch den hohen Bedarf an neu gebildeten Erythrozyten kann bereits eine kurzzeitige Unterbrechung der Hämotopoese die

Anämie dramatisch verschlimmern. Eine aplastische Krise wird bei SCA-Patienten zu ca. 70% durch die Infektion mit Parvovirus B19 ausgelöst, welches bevorzugt erythrozytäre Vorgängerzellen befällt [233]. Eine seltene Komplikation ist die hyperhämolytische Krise, bei der es simultan zu einem Absinken der Hb-Konzentration und einem Anstieg der Retikulozytenzahl kommt. Sie tritt häufig gepaart mit anderen Komplikationen auf, wie zum Beispiel im Rahmen einer Schmerzkrise [24].

Es gibt einige weitere Erkrankungen, die bei der Sichelzellanämie durch die chronische Hämolyse und Anämie vermehrt auftreten. Bei 30% der 18-jährigen SCA-Patienten finden sich Gallensteine, die durch ausfallendes Hämoglobin entstehen [23]. In der Niere kommt es durch die Hämolyse zu einem Ungleichgewicht von kortikaler Hyper- und medullärer Hypoperfusion [197]. Daraus resultieren Schäden am Nierenparenchym, wie zum Beispiel die papilläre Nekrose oder die fokal segmentale Glomerulosklerose. Schon früh zeigen die Patienten daher eine Hämaturie und Mikroalbuminurie und im Verlauf entwickeln 15-30% ein chronisches Nierenversagen [23].

Neurokognitive und körperliche Entwicklung:

Neben den üblichen Risikofaktoren, die bei Gesunden zu zerebralen Infarkten führen können, wie Bluthochdruck, Hyperlipidämie oder Diabetes, sind bei SCA-Patienten weitere Faktoren mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert. Dazu zählen eine niedrige Sauerstoffsättigung, eine ausgeprägte Anämie, erhöhte HbS-Spiegel, akute Infektionen und bereits erlittene zerebrale Schädigungen [78]. Ohne präventive Maßnahmen erleiden die Hälfte der Patienten einen zerebralen Infarkt bis zu ihrem 18. Lebensjahr, wovon ca. 20% klassische Schlaganfälle und 80% sogenannte „stumme“ Infarkte sind [78; 278]. Letztere zeichnen sich durch Schäden an kleinen Gefäßen aus, sind klinisch zunächst unauffällig, wirken sich aber negativ auf die kognitiven Fähigkeiten der Patienten aus. So zeigen Kinder mit Sichelzellanämie nach erlittenem stummem Infarkt signifikante Defizite in Intelligenztests und haben doppelt so häufig Schwierigkeiten in der Schule wie ihre gesunden Mitschüler [146; 244].

Neben der geistigen ist auch die körperliche Entwicklung von SCA-Patienten oft verlangsamt. So lagen in einer Studie 38% unterhalb der fünften Perzentile für Größe, Gewicht oder Body Mass Index im Vergleich zu gesunden jungen Erwachsenen [303]. Die Pubertät setzte ein bis zwei Jahre später ein und auch die skelettale Entwicklung war verzögert. Mit steigendem Alter wurden die Unterschiede zur Normalbevölkerung noch deutlicher. Zusätzlich wiesen die betroffen Kinder in zahlreichen Vergleichsstudien mit gesunden Kontrollen eine reduzierte Muskelmasse und körperliche Leistungsfähigkeit auf [84; 183; 188].

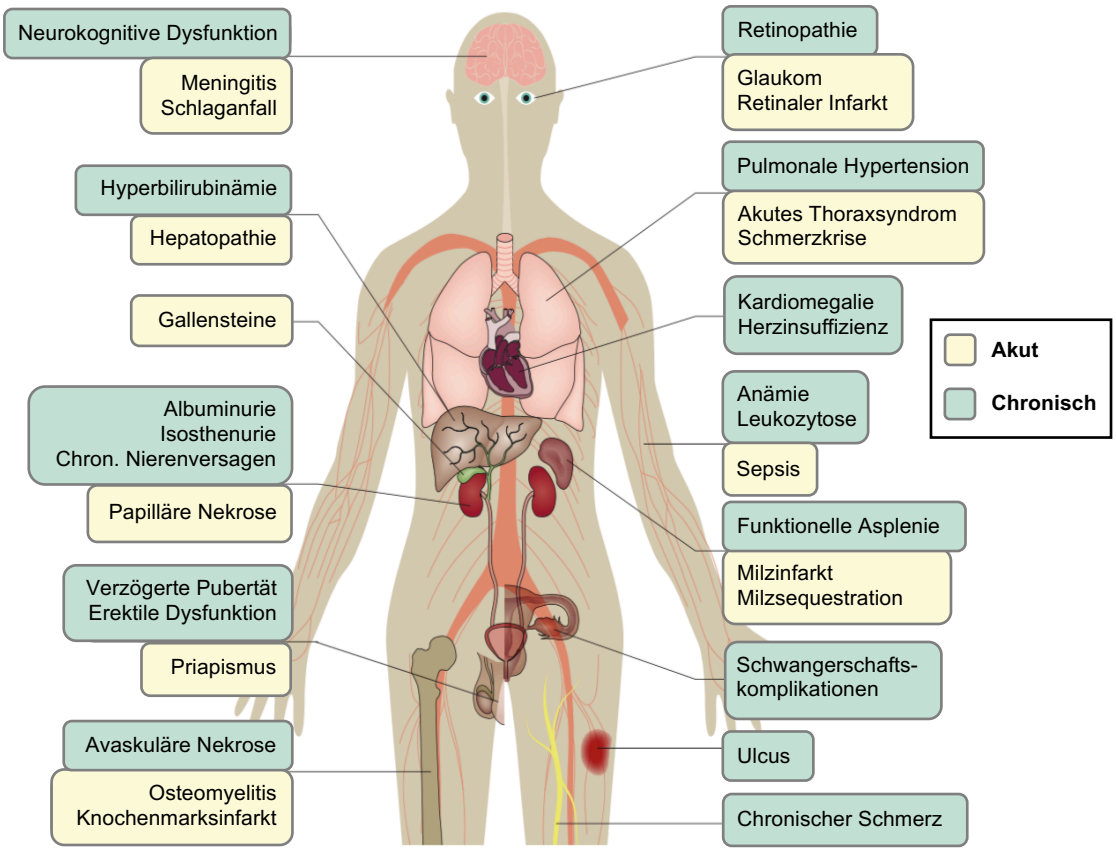


Abbildung 5: Akute und chronische Komplikationen der Sichelzellanämie

Modifiziert nach Referenz [140].

1.3.2 Therapie

Trotz der hohen Verbreitung und Schwere der Erkrankung sind die Behandlungsmöglichkeiten der Sichelzellanämie limitiert. So stehen lediglich drei etablierte therapeutische Strategien zur Verfügung. Als wirkungsvolle medikamentöse Dauertherapie wird das Zytostatikum Hydroxyurea eingesetzt, welches den Anteil von HbS senkt, indem mehr fetales Hämoglobin (HbF) gebildet wird [179]. Bei akuten Komplikationen und teilweise zur Schlaganfallprophylaxe erhalten die Patienten Bluttransfusionen, um die Anämie auszugleichen und den Körper vorübergehend mit funktionellem HbA zu versorgen [56]. Die hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt bis heute die einzige kurative Therapie dar, kommt jedoch wegen ihrer hohen Kosten und Toxizität sowie der geringen Verfügbarkeit passender Spender nur selten zum Einsatz [290].

Die genannten drei Strategien sind wichtige Pfeiler in der Behandlung der Sichelzellanämie. Den vielleicht wesentlichsten Effekt auf die Lebenserwartung der Patienten zeigen allerdings präventive und supportive Maßnahmen [140].

<u>Prävention und supportive Therapie:</u>

Die Anwendungen von Impfungen und die Abwendung von Infektionen reduziert die Kindersterblichkeit immens. So konnte in Studien gezeigt werden, dass die Zahl von allgemeinen

Bakteriämien durch die Penicillinprophylaxe um 84% und die pneumokokkaler Bakteriämien durch die Impfung gegen Streptococcus pneumoniae um 93% gesenkt werden konnte [98; 118].

Schlaganfälle ließen sich in einer weiteren Studie zu 92% vermeiden, wenn Risikopatienten mit Hilfe von transkranialem Ultraschall identifiziert werden konnten und anschließend Erythrozytentransfusionen erhielten [2]. Allerdings können mit dem Ultraschnall nur Veränderungen am Endothel größerer Gefäße detektiert werden. Stumme Infarkte, die kleinste Gefäße betreffen und zu neurokognitiven Beeinträchtigungen führen, lassen sich nur im Nachhinein im MRT erkennen [78]. Ihr Auftreten kann reduziert werden, indem die Patienten regelmäßig Transfusionen erhalten, welche jedoch reich an unerwünschten Nebenwirkungen sind (s.u. „Transfusionen“) [77]. Auch Hydroxyurea scheint die Zahl zerebraler Infarkte zu reduzieren. Der Vorteil gegenüber chronischen Transfusionen ist allerdings noch nicht abschließend untersucht, da eine kontrollierte Studie vorzeitig beendet werden musste [291].

Kardiale, pulmonale und renale Komplikationen beeinflussen die Mortalität deutlich, so dass regelmäßige Untersuchungen wie die Spirometrie, die Echokardiografie und die Untersuchungen des Harns auf Protein- sowie Hämaturie indiziert sind [140].

Zur Behandlung ischämischer Schmerzen sind eine ausreichende Versorgung mit Flüssigkeit und Sauerstoff sowie die Gabe von Analgetika wichtig. Dabei kommen gemäß des Stufenschemas der WHO zuerst nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs) und später bei Bedarf orale Opiode zum Einsatz [290].

Die genannten klinischen Manifestationen der Sichelzellanämie lassen sich auch durch eine nährstoffreiche Ernährung und gesunde Lebensweise beeinflussen. So kann zum Beispiel eine ausreichende Versorgung mit dem Spurenelement Zink die körperliche Entwicklung verbessern und das Auftreten von Infektionen senken [80].

Hydroxyurea:

Das Medikament Hydroxyurea, auch bekannt als Hydroxycarbamid, stellt die einzige gut erprobte sowie breit verfügbare pharmakologische Therapie dar, die nachgewiesenermaßen den Krankheitsverlauf der Sichelzellanämie verbessert. Das Harnstoffderivat fand in den 60er Jahren zunächst als Zytostatikum Einsatz bei myeloproliferativen Krebserkrankungen und später auch bei HIV [179]. 1987 konnte dann gezeigt werden, dass Hydroxyurea die Produktion von HbF bei SCA-Patienten induziert [223]. Die Erythrozyten werden dadurch größer und verformbarer, was die Hämorheologie verbessert [289]. Chronische Entzündungen werden reduziert, da die Hämatopoese im Knochenmark verlangsamt wird, so dass die Anzahl von Leukozyten und Thrombozyten sinkt [179]. Zusätzlich erhöht Hydroxycarbamid die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid [60; 194].

Durch diese Mechanismen werden Morbidität und Mortalität der Sichelzellanämie gesenkt, was in verschiedenen Langzeitstudien gezeigt werden konnte [256; 257; 282]. Intensität und Frequenz der Schmerzkrisen nehmen ab und auch das akute Thoraxsyndrom tritt seltener auf [50]. Da dieser Effekt auch bei zuvor asymptomatischen Säuglingen beobachtet werden konnte, empfiehlt die US-amerikanische Leitlinie allen SCA-Patienten die dauerhafte Gabe von Hydroxyurea ab einem Lebensalter von neun Monaten [302].

Die Nebenwirkungen des Chemotherapeutikums Hydroxyurea führten aber noch bis vor kurzem dazu, dass es in der Therapie der Sichelzellanämie eher verhalten eingesetzt wurde. Dosisabhängig kann es zu einer Myelosuppression mit Unterdrückung des Immunsystems und Neigung zu vermehrten Infekten kommen [179]. Einige Patienten haben gastrointestinale Symptome und Hautveränderungen [289]. Da das Medikament in Tierversuchen teratogen war, soll es bei Kinderwunsch und in der Schwangerschaft abgesetzt werden, was seine Einsatzmöglichkeiten limitiert [102]. Potentiell können durch Hydroxyurea auch vermehrt Malignome entstehen, wobei das Risiko bis heute jedoch nicht zuverlässig abzuschätzen ist [179]. Azoospermie und Infertilität sind möglich, was besonders bei jungen Erwachsenen ein Grund für mangelnde Compliance sein kann [76; 199].

In Bezug auf Fruchtbarkeit und Kanzerogenität ist die Behandlung eine Frage der Abwägung zwischen Risiko und Nutzen. Denn auch wenn Hydroxyurea viele positive Effekte auf den Verlauf der Sichelzellanämie aufweist, ist das Langzeitnebenwirkungsprofil noch nicht abschließend erforscht. Weiterhin kommt erschwerend hinzu, dass Patienten in Entwicklungsländern oft keinen Zugang zu dem Medikament haben. So bekommen in spezialisierten Kliniken in den USA mittlerweile zwar 63% der SCA-Patienten Hydroxyurea verschrieben, in Afrika geht diese Zahl jedoch gegen null [140].

Transfusionen:

Die Gabe von Erythrozytenkonzentraten ist ein wichtiger Baustein in der SCA-Therapie. So erhalten ca. 90% der SCA-Patienten mindestens einmal im Leben eine Bluttransfusion [56]. Man unterscheidet Transfusionen nach der Häufigkeit der Anwendung, also einmalig gegenüber dauerhaft, sowie nach der Art des Verfahrens, also der einfachen Gabe gegenüber der Austauschtransfusion, bei der das eigene Blut durch Spenderblut partiell oder total ersetzt wird.

Der positive Effekt auf die Krankheit begründet sich auf der Gabe von Erythrozyten mit funktionellem HbA, was die Oxygenierung des Gewebes erhöht und die Aktivität des Endothels sowie vasookklusive Ereignisse reduziert. Dies spielt besonders in der Schlaganfallprophylaxe eine wichtige Rolle [2; 132]. So konnte in einer Studie das zerebrale Infarktrisiko durch chronische Transfusionen um 92% reduziert werden [2]. In der Folgestudie wurde allerdings auch gezeigt, dass durch das Absetzen der Transfusionen, zum Beispiel wegen auftretender Nebenwirkungen, die Raten für zerebrale Infarkte sehr stark ansteigen können [1]. Indikationen für einmalige Transfusionen sind das akute Thoraxsyndrom, anämische Krisen mit Milzsequestration und anstehende größere Operationen [43; 130; 182].

Auch wenn Transfusionen in der Behandlung der Sichelzellanämie häufig Verwendung finden, basieren viele Empfehlungen eher auf Expertenmeinungen als auf klinischen Studien [56]. Da die Nebenwirkungen zahlreich sind, sollten sie nicht zu aggressiv und nur bei klarer Indikation genutzt werden. So besteht bei häufigen Transfusionen die Gefahr der Alloimmunisierung, wobei Antikörper gegen erythrozytäre Antigene der verschiedenen Blutgruppensysteme gebildet werden. Dies kann zu lebensbedrohlichen hämolytischen Krisen führen und tritt je nach Studie bei 18-76% der Empfänger auf, wenn die Blutkonserve nur auf das AB0- und Rhesussystem getestet wird [57]. Ein Grund für dieses hohe Risiko ist in Ländern wie Deutschland, dass Spender

und Empfänger ethnisch bedingt unterschiedliche Blutgruppenmerkmale aufweisen und daher vermehrt Antikörper gegen Antigene vom Typ K, E, C, und Jk^b gebildet werden [280].

Eine weitere Komplikation stellt die Überladung mit Eisen durch freiwerdendes Häm dar, welches bei der Sichelzellanämie pathophysiologisch an der Entstehung von Gewebeschäden beteiligt ist (siehe 1.2.4). Als Folge der Überladung kommt es zur sekundären Hämochromatose mit Eisenablagerungen u.a. in der Leber und im Herzen, was zu chronischer Leber- und Herzinsuffizienz führen kann [264]. In einer Autopsiestudie fand man bei ca. einem Drittel der SCA-Patienten eine Eisenüberladung, die bei 7% aller Patienten auch die Todesursache darstellte [74]. Daher wird bereits ab der zehnten Transfusion die Gabe von Eisenchelatoren empfohlen, die der Überladung entgegen wirken können, jedoch auch eine Reihe von renalen und gastrointestinalen Nebenwirkungen haben sowie teilweise ototoxisch sind [59].

Zuletzt ergeben sich durch verzögerte Transfusionsrekationen, Thromboembolien und übertragbare Infektionen mit HIV, Hepatitis B und C sowie dem West Nil Virus weitere Einschränkungen [56; 92]. Außerdem ist bei SCA-Patienten eine zu schnelle Anhebung des Hb-Wertes mit dem Hyperviskositätssyndrom assoziiert, was Endothelschäden und Vasookklusionen begünstigt [290]. Um also die Nebenwirkungen der an sich essentiell wichtigen Transfusionstherapie zu senken, bedarf es einer gründlichen Testung von Blutprodukten und der längerfristigen Kontrolle ihrer Empfänger. Dies ist jedoch besonders in den Ländern, in denen die Prävalenz der Sichelzellanämie am höchsten ist, selten möglich.

Stammzelltransplantation:

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist die einzige kausale Therapie der Sichelzellanämie und stellt bis heute die einzige Möglichkeit auf Heilung dar [285]. Für das Verfahren wird ein passender Spender benötigt, der mit dem Empfänger in den Merkmalen des humanen Leukozytenantigensystems (HLA) übereinstimmt, wodurch hauptsächlich gesunde Geschwisterkinder in Frage kommen. Vor der Transplantation erfolgt eine myeloablative Konditionierung, bei der das Blutbildungssystem im Knochenmark des Empfängers durch Bestrahlung oder Chemotherapie möglichst vollständig zerstört werden soll [72]. Nach der Transplantation muss der Patient immunsupprimiert werden, was das Risiko einer Abstoßungsreaktion (GVHD, *engl. graft vs. host disease*) vermindert, aber gleichzeitig das Risiko von Infektionen erhöht [285].

In den Industrieländern liegt die 5-Jahres-Überlebensquote der Stammzelltransplantation mittlerweile bei 90%, aber 7% versterben auch zumeist in Folge von besagten Infektionen [108]. Junge SCA-Patienten haben eine bessere Prognose als Ältere, die oftmals bereits im Rahmen von Transfusionen alloimmunisiert und eisenüberladen sind, was eine höhere Rate an GVHD verursacht [15]. Die transplantationsbedingte Mortalität und Toxizität stellen jedoch nicht die limitierenden Faktoren dieser Therapie dar, sondern vielmehr ökonomische Faktoren sowie der Mangel an passenden Spendern. Es wird davon ausgegangen, dass weniger als ein Fünftel der Patienten ein HLA-identes Geschwisterkind besitzen [180].

In den USA werden heutzutage auf Grund der genannten Hürden weit weniger als 1% der SCA-Patienten transplantiert [285]. Auch wenn es Bestrebungen gibt, die Anzahl und den

Erfolg der Stammzelltransplantation durch eine Veränderung der Konditionierung oder Reduzierung der HLA-Übereinstimmungen zu erhöhen, wird diese Art der Therapie auch in den nächsten Jahren nur einen sehr kleinen Teil der Patienten erreichen können [92].

Ausblick:

Zum heutigen Zeitpunkt stützt sich die Behandlung der Sichelzellanämie auf die drei Säulen Hydroxyurea, Transfusion und Stammzelltransplantation. Wegen der genannten Limitierungen und Nebenwirkungen dieser Therapien werden aber zurzeit viele weitere Ansätze evaluiert.

Neue Medikamente, die spezifisch den verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen entgegenwirken, befinden sich in klinischer Testung. Eine pharmakologische Mehrfachtherapie, wie sie zum Beispiel zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung eingesetzt wird, scheint in Zukunft wahrscheinlich [265; 266]. Jedoch benötigt deren Entwicklung noch Zeit und es ist fraglich, in wie weit eine kostenintensive Mehrfachbehandlung die Patienten in entwicklungsschwächeren Ländern erreichen kann.

Seit den 90er Jahren wird ebenfalls die Gentherapie als potentiell kurative Alternative diskutiert. Ein erster Fallbericht zeigt, wie einem SCA-Patienten mit Hilfe eines viralen Vektoren erfolgreich ein β-Globin Gen in autologe hämatopoetische Stammzellen eingefügt wurde, wodurch der Anteil von funktionalem Hb auch mittelfristig auf 50% erhöht werden konnte [237]. Die Langzeitfolgen dieser komplexen Behandlung, die nur in hochspezialisierten Kliniken durchgeführt werden kann, sind allerdings noch kaum untersucht. In jedem Fall scheint die Gentherapie zwar vielversprechend, für die Millionen von Patienten weltweit aber in den nächsten Jahren kaum zugänglich zu sein.

Die pharmakologische und gentechnische Forschung muss weiter vorangetrieben, gleichzeitig aber auch kostengünstige Alternativen entwickelt werden. Es bedarf neuer strategischer Konzepte, um die Lebensdauer der Erkrankten zu erhöhen und gleichzeitig die Lebensqualität zu verbessern.

1.3.3 Prognose

Die Prognose der Sichelzellanämie ist sehr variabel und abhängig von verschiedenen Faktoren. So können genetische Polymorphismen zu einer erhöhten Expression von HbF und damit zu einer Reduzierung von Schmerzkrisen führen [160]. Viel entscheidender für die Lebenserwartung und -qualität der Patienten ist jedoch ihr Geburtsort und sozioökonomischer Status. Dieser entscheidet mit darüber, ob die Krankheit früh erkannt und behandelt werden kann.

Lebenserwartung:

In den entwickelten Industrieländern erreichen heutzutage über 90% der Erkrankten das Erwachsenenalter [228]. Auch die mittlere Lebenserwartung ist bei optimaler Versorgung in den letzten Jahrzehnten rapide angestiegen. Lag das mediane Überleben 1994 noch bei 42 Jahren für Männer und 48 Jahren für Frauen, betrug es in einer aktuellen Studie aus England bereits 67

Jahre [96; 222]. Dennoch ist die mittlere Lebenserwartung von SCA-Patienten im Vergleich zur gesunden Bevölkerung auch heute noch um ca. 20 bis 30 Jahre reduziert [86; 96].

Ohne optimale Versorgung sinkt die Lebenserwartung massiv. So sterben unbehandelt bis zu 90% der betroffenen Kinder vor dem fünften Lebensjahr [115]. Dementsprechend wird in afrikanischen Ländern auch die mittlere Überlebenszeit auf unter fünf Jahre geschätzt [247]. In einer Kohortenstudie in Jamaika, in der die Patienten kein Hydroxyurea, aber eine ansonsten umfassende prophylaktische Versorgung erhielten, betrug das mittlere Überleben knapp über 40 Jahren und das akute Thoraxsyndrom sowie septische Bakteriämien zeigten sich als Todesursache hauptverantwortlich [249].

Lebensqualität:

In den letzten Jahren wurde vermehrt untersucht, inwiefern sich die Krankheit auf die Lebensqualität der Patienten auswirkt. In standardisierten Untersuchungen wiesen sowohl Kinder als auch Erwachsene mit Sichelzellanämie in nahezu allen Untersuchungspunkten signifikant erniedrigte Werte im Vergleich zur Normalbevölkerung auf [176]. Die Ergebnisse lagen gleich auf oder unter dem Niveau von chronischen Erkrankungen wie Mukoviszidose oder dialysepflichtigem Nierenversagen. Besonders die Schmerzen, die ein Drittel der Patienten täglich erfahren und die im Durchschnitt mehr als jeden zweiten Tag auftreten, beeinträchtigen die Lebensqualität enorm [255]. In einer großen Vergleichsstudie konnte gezeigt werden, dass die reduzierte körperliche Leistungsfähigkeit, die sich in Abgeschlagenheit und Müdigkeit ausdrückt, als sehr belastend wahrgenommen wird [210].

Die reduzierte Funktionalität der Patienten macht sich auch in psychosozialer Hinsicht bemerkbar. Bei SCA-Patienten finden sich erhöhte Raten an Depressionen, Angst und niedrigem Selbstwertgefühl, woraus leicht sozialer Rückzug resultieren kann [16]. Neurokognitive Einschränkungen, zum Beispiel in Folge stummer zerebraler Infarkte sowie vermehrte Krankenhausaufenthalte führen zu schlechten Schulleistungen und Arbeitslosigkeit im Erwachsenenalter [16; 244]. Dies wirkt sich wiederum negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus und erhöht auch die gesellschaftlichen Kosten der Krankheit [104]. Je stärker die Symptome der Sichelzellanämie und je körperlich eingeschränkter die Patienten sind, desto deutlicher sinkt deren emotionales Wohlbefinden und ihre Lebensqualität [73; 246].

1.4 Forschungsstand

Es ist heutzutage allgemein anerkannt, dass regelmäßige körperliche Aktivität die Gesundheit verbessern und das Mortalitätsrisiko senken kann [206; 288]. Die Weltgesundheitsorganisation sieht in körperlicher Inaktivität daher global den viertgrößten Risikofaktor für einen vorzeitigen Tod (nach Bluthochdruck, Rauchen und hoher Blutglukose) und empfiehlt regelmäßige Aktivität als Präventionsmaßnahme u.a. gegen koronare Herzkrankheit, Schlaganfall, Diabetes, Krebs und Depression [298].

Neben diesen präventiven Effekten lassen sich über körperliche Aktivität aber auch die Krankheitsverläufe einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen positiv beeinflussen. Dies geschieht im Speziellen über komplexe metabolische Prozesse und im Allgemeinen über eine Verbesserung des Blutflusses mit erhöhtem Sauerstoff- und Nährstofftransport. Wie genau Bewegung die Hämorheologie beeinflusst, ist dabei abhängig von der Art, der Dauer und der Intensität der Belastung [150; 254]. So kann eine akute Überbelastung bei untrainierten Personen auch schnell zu nachteiligen Effekten mit Hypoxie, Laktatazidose und dem Anstieg freier Radikale führen [172].

Da dies bei der Sichelzellanämie eine vermehrte Sichelung der Zellen mit konsekutiver Hämolyse provozieren könnte, sind sich viele behandelnde Ärzte unsicher, in wie weit sie ihren Patienten zu körperlicher Aktivität raten sollen [65; 175]. Das folgende Kapitel liefert deswegen einen Überblick über den wissenschaftlichen Forschungsstand zu Auswirkungen von Sport auf die Hämorheologie. Hierfür werden zunächst akute und chronische Effekte bei Gesunden beschrieben und anschließend die Ergebnisse bisheriger Sportinterventionen mit SCA-Patienten dargestellt.

1.4.1 Auswirkung von Sport auf die Hämorheologie bei Gesunden

Akute Effekte:

Zunächst kommt es im Rahmen körperlicher Anstrengung durch den Anstieg des Hämatokrits und der Plasmaviskosität zu einer Zunahme der gesamten Viskosität des Blutes. Dies beruht vor allem auf dem Verlust von Wasser durch Schwitzen zur Thermoregulation, der vermehrten Aufnahme von Wasser in die arbeitenden Muskelzellen und der Verschiebung von Plasmaflüssigkeit ins endotheliale Interstitium [85; 172]. Da ein Anstieg der Blutviskosität den Flusswiderstand erhöhen und damit den Blutfluss in engen Gefäßen beeinträchtigen kann, wirkt sich dies zumindest in der Theorie nachteilig auf die Hämorheologie aus. Allerdings konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass durch die steigende Blutviskosität eine Scherstress-vermittelte Steigerung der NO-Produktion mit konsekutiver Vasodilatation erreicht werden konnte, die zu einer Abnahme der vaskulären Resistenz sowie einer Verbesserung der Gewebeperfusion führte [47; 242].

Diesen Zusammenhang untersuchten auch Connes et al. und fanden in einer akuten submaximalen Sportintervention eine positive Korrelation zwischen Blutviskosität und NO-Produktion, eine negative Korrelation zwischen NO-Produktion und Flusswiderstand sowie eine

negative Korrelation zwischen Blutviskosität und systemischem Gefäßwiderstand [66]. Die Autoren diskutieren daher einen positiven Effekt von moderaten Belastungen auf die Hämorheologie, was allerdings ein funktionales Endothel voraussetze. Diese Einschätzung deckt sich mit in-vitro Untersuchungen, in denen die erythrozytäre NO-Synthase durch Scherstress aktiviert wurde und die NO-Bioverfügbarkeit sowie auch die erythrozytäre Verformbarkeit erhöht werden konnte [152; 275]. Suhr et al. konnten ebenfalls zeigen, dass nach moderatem Training auf dem Laufband die Proteinkinase Akt und die NO-Synthase aktiviert sowie die NO-Produktion und Verformbarkeit der Erythrozyten verbessert wurden [261].

Demgegenüber finden sich in der Literatur jedoch mehrheitlich Studien, die eine negative Auswirkung von akuter Belastung auf die erythrozytäre Verformbarkeit feststellen [45; 172]. Die Ergebnisse sind dabei allerdings uneinheitlich und sowohl abhängig von der untersuchten Population, als auch von der Messmethode [68]. Dass die Auswirkungen von akuter körperlicher Aktivität auf die Verformbarkeit komplex sind, zeigt sich auch daran, dass durch eine Sportintervention gebildetes Laktat bei Untrainierten eine Versteifung der Erythrozyten auslöste, diese bei Trainierten aber verhinderte [63]. In einer Studie mit Leistungssportlern wiederum veränderte sich die Verformbarkeit auch bei hochintensiver Belastung nicht [253]. Dies zeigt, dass intrinsische Faktoren des Individuums, wie zum Beispiel dessen Trainingszustand, den Effekt von akuter körperlicher Belastung auf die Verformbarkeit modulieren.

Die Energiegewinnung im Rahmen von körperlicher Aktivität geht weiterhin mit einer gesteigerten Bildung von freien Radikalen einher. Sowohl bei körperlicher Belastung im aeroben Bereich durch die mitochondriale Atmungskette als auch im anaeroben Bereich durch das Ischämie-Reperfusions-Phänomen kann es somit zu einem Anstieg des oxidativen Stresses kommen (siehe 1.2.3) [93; 226]. Die Bildung von ROS bei sportlicher Betätigung folgt dabei einer Dosis-Wirkungs-Beziehung, wie eine Untersuchung mit verschiedenen Belastungsintensitäten zeigt [168]. Die Autoren konnten eine Korrelation zwischen Laktat und MDA sowie einen deutlichen Anstieg der freien Radikale nachweisen, jedoch erst ab einer hohen Intensität von über 70% der maximalen Sauerstoffaufnahme. In weiteren Studien konnte ebenfalls dargestellt werden, dass eine akute Sportintervention den Zellschaden durch ROS erhöhte, dessen Ausmaß jedoch deutlich abhängig vom Trainings- bzw. antioxidativen Zustand der untersuchten Subjekte war [221; 301].

Chronische Effekte:

Regelmäßiges Ausdauertraining kann zu sogenannter „hämorheologischen Fitness“ führen [45]. In mehrwöchigen Sportinterventionen konnte gezeigt werden, dass sich der akute Anstieg des Hämatokrits und der Blutviskosität durch eine chronische Zunahme des Plasmavolumens umkehrte [144; 238]. Dieses auch als „Autohämodilution“ bezeichnete Phänomen tritt bei gut gesteuerter Belastung auf, wohingegen eine Überbelastung wiederum zu einer hohen Blutviskosität und Entzündungsreaktionen führt [45; 68].

Der hämorheologisch günstige Effekt einer Abnahme der Viskosität in Ruhe wird zusätzlich von einer Zunahme der erythrozytären Verformbarkeit verstärkt. So konnte gezeigt werden, dass Ausdauerleistungssportler im Vergleich zur Normalbevölkerung und anderen

Leistungssportlern deutlich verformbarere Erythrozyten besitzen [254; 269]. In einer anderen Vergleichsstudie wiesen männliche Athleten zu Beginn ebenfalls eine niedrigere Blutviskosität und höhere Verformbarkeit auf als Probanden mit bewegungsarmer Lebensweise [87]. Letzteren gelang es allerdings, beide Parameter durch eine dreimonatige Sportintervention progressiv zu verbessern.

In weiteren Untersuchungen mit Gesunden konnte ebenfalls gezeigt werden, dass regelmäßiges Ausdauertraining die endotheliale Funktion und die NO-Bioverfügbarkeit steigern kann [58; 150]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der bereits beschriebenen Erkenntnis, dass die NO-Synthase durch Scherstress moduliert wird, wobei das Ausmaß der Aktivierung bzw. Inaktivierung abhängig von der Intensität der Belastung zu sein scheint [66; 262]. Neben der NO-vermittelten Vasodilatation wird die Sauerstoffversorgung des Gewebes durch chronisches Training auch über eine optimierte Affinität des Hämoglobins zu bzw. Transportkapazität von O_2 verbessert [172].

Regelmäßige körperliche Aktivität moduliert sowohl die Produktion freier Radikale als auch die antioxidative Kapazität des Körpers und limitiert damit die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Zellen [93; 225]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass bei untrainierten Ratten die Lipidperoxidation 24h nach einer anstrengenden Schwimmbelastung signifikant zunahm, wohingegen sich bei trainierten Ratten keine Zunahme zeigte [301]. Der antioxidative Effekt von Training führte in einer Studie mit Leistungssportlern soweit, dass sich nicht einmal nach Beendigung eines bis zu achtstündigen Triathlons oxidative Schädigung der Zellen nachweisen ließen [174]. Aber auch bereits Amateursportler zeigten eine erhöhte antioxidative Kapazität und eine erniedrigte Produktion freier Radikale nach Belastung im Vergleich zu untrainierten Probanden [90]. Dieser Anpassungsmechanismus des Körpers nach chronischem Ausdauertraining konnte in Form einer Upregulation des antioxidativen Systems in den Erythrozyten auch in weiteren Studien belegt werden [185; 209].

Zusammengefasst wirkt sich regelmäßige körperliche Aktivität positiv auf die hämorheologischen Eigenschaften des Blutes aus. Der Trainingszustand des Individuums beeinflusst dabei auch die Auswirkungen von akuter körperlicher Belastung, welche abhängig von ihrer Art und Intensität sowohl positive als auch negative Effekte auf die Hämorheologie entfalten kann [68; 172]. Hierbei scheint die Scherstress-vermittelte Steigerung der NO-Produktion eine wichtige Rolle zu spielen. Diese wirkt einer Versteifung der Erythrozyten entgegen und schützt die Zellen vor Schädigungen durch oxidativen Stress [114; 152; 261; 275].

1.4.2 Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten

In einer aktuellen Umfrage aus den USA gaben 90% der an Sichelzellanämie erkrankten Kinder an, dass sie am schulischen Sportunterricht teilnahmen und 67%, dass sie sich mindestens einmal am Tag körperlich betätigten [208]. Damit sind die jungen Patienten im Allgemeinen durchaus aktiv, wenn auch in verschiedenen Vergleichsstudien gezeigt werden konnte, dass ihre körperliche Leistungsfähigkeit deutlich unter der von Gesunden liegt. Neben einer

unterdurchschnittlichen körperlichen Entwicklung mit reduzierter Muskelmasse, zeigten Kinder und Jugendliche mit Sichelzellanämie sowohl beim Schwimmen und Laufen (aerobe Energiegewinnung) als auch am Handdynanometer (anaerob) erniedrigte Leistungsgrenzen, die sich u.a. in erhöhter Herzfrequenz und Laktatproduktion ausdrückten [84; 183; 188].

Callahan et al. konnten bei einer Untersuchung auf dem Fahrradergometer mit 17 Patientinnen zeigen, dass sie in der Spirometrie eine verminderte Sauerstoffaufnahme, eine hohes Residualvolumen und Abnormitäten im Gasaustausch aufwiesen [48]. Als hämorheologische Determinanten für eine schlechtere körperliche Leistungsfähigkeit konnten Waltz et al. eine ausgeprägte Anämie, einen niedrigen Anteil an HbF und eine erniedrigte erythrozytäre Verformbarkeit identifizieren [287].

Auf Grund der geringen Belastungstoleranz und den potentiell negativen Auswirkungen von Sport auf die Erkrankung wurden Sportinterventionen mit SCA-Patienten lange Zeit nicht durchgeführt [175; 195]. Auslöser für ein erhöhtes Interesse an den Auswirkungen von Sport auf die Erkrankung waren neue pathophysiologische Erkenntnisse und vereinzelte positive Fallberichte. So zeigten Tinti et al., dass bei einem Patienten durch regelmäßige Aquagymnastik Muskelmasse aufgebaut, chronische Schmerzen reduziert und die Lebensqualität verbessert werden konnte [268]. Bereits zuvor gelang es Alcorn et al. bei 30 erkrankten Kindern durch ein gemischtes Ausdauer- und Krafttraining die Dauer von Krankenhausaufenthalten bei vasookklusiven Krisen zu verkürzen [9].

Mit der Hoffnung, die im Allgemeinen positiven Effekte von regelmäßiger körperlicher Aktivität auch bei SCA-Patienten zu erzielen, ohne dabei jedoch klinische Komplikationen zu provozieren, wurden in den letzten Jahren die ersten akuten und chronischen Sportinterventionen durchgeführt, welche im Folgenden beschrieben werden.

Akute Interventionen:

Die Mehrheit der akuten Sportinterventionen mit SCA-Patienten wurden auf dem Fahrradergometer bei milder bis moderater Belastung durchgeführt. Balayssac et al. untersuchten 2011 mit 17 SCA-Patienten sowie 21 gesunden Kontrollen die Auswirkungen eines 20-minütigen Ausdauertrainings bei ca. 43 Watt auf hämatologische, hämorheologische und vitale Parameter [22]. In der Intervention zeigte die SCA-Gruppe eine signifikant erhöhte Herzfrequenz und Ventilation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Abgesehen von einer Zunahme des Anteils von Erythrozyten mit hoher Dichte, ergaben sich in der SCA-Gruppe jedoch keine weiteren Veränderungen. Da Parameter wie Sauerstoffsättigung, Blutviskosität und Hämatokrit konstant blieben, folgern die Autoren, dass ein moderates Ausdauertraining für Sichelzellanämiepatienten nicht schädlich ist.

Ein Jahr später führten Waltz et al. mit 8 SCA-Patienten und 13 gesunden Kontrollen einen Stufentest mit steigender Belastung bis zum Erreichen der ersten ventilatorischen Schwelle (VT1, siehe 2.3.1) durch [286]. Wie zuvor unterschieden sich die beiden Gruppen signifikant bezüglich der Leistungsparameter, so dass die SCA-Gruppe die VT1 bei ca. 54W und die Kontrollgruppe bei ca. 117W erreichte. Durch die Intervention kam es in der SCA-Gruppe zu keiner Veränderung der Blutviskosität und der erythrozytären Verformbarkeit. Allerdings zeigten

die Patienten 36h und 60h nach der Intervention eine signifikante Abnahme der Aggregations-Disaggregations-Scherrate (siehe 2.3.7) und dementsprechend eine Verbesserung des Aggregationsverhaltens der Erythrozyten. Die Autoren diskutieren daher einen verzögerten positiven Einfluss von Ausdauersport auf die Hämorheologie der Patienten.

Die Auswirkungen eines 20-minütigen Ausdauertrainings bei ca. 43W auf den oxidativen Stress, Stickstoffmonoxid und die Zelladhäsion untersuchten Faes et al. im Jahre 2014 mit 11 SCA-Patienten und 15 Kontrollen [88]. Dabei zeigten sich durch die Intervention in den Gruppen keine Veränderungen der NO-Spiegel, der antioxidativen Kapazität, der oxidativen Stressmarker Nitrotyrosin und AOPP (*engl. advanced oxidation protein products*) sowie der löslichen Plasmamoleküle E-Selektin und P-Selektin, die die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten ans Endothel vermitteln. Beide Gruppen zeigten einen vergleichbaren Anstieg des Malondialdehyds sowie des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. Zusätzlich kam es bei der SCA-Gruppe zu einer Abnahme des löslichen L-Selektins sowie einer Zunahme des löslichen ICAM-1. Der Hämolysemarker LDH (Laktatdehydrogenase) blieb in der SCA-Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe konstant. Anhand der Daten empfehlen die Autoren im Allgemeinen moderate körperliche Betätigung, auch wenn in Einzelfällen durch oxidativen Stress und die Aktivierung des Endothels zu Vorsicht geraten sei.

Eine Studie mit maximaler Belastung führten Liem et al. 2015 mit 60 an homozygoter Sichelzellanämie oder HbSβ-Thalassämie erkrankten Probanden sowie 30 gesunden Kontrollen durch, wobei jedoch keine hämorheologischen Parameter erhoben wurden [163]. Die SCA/ HbSβ-Gruppe erreichte die Ausbelastung bei ca. 108W und die Kontrollgruppe bei ca. 153W. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Erkrankten in der Spiroergometrie erneut eine signifikant reduzierte Fitness und eine eingeschränkte ventilatorische Effizienz.

Da es in keiner der beschriebenen Studien zu akuten klinischen Komplikationen kam, herrscht bei den Autoren Einigkeit über die Sicherheit von Training mit moderater Intensität. Im Allgemeinen zeigen die Untersuchungen allenfalls milde Veränderungen auf die erhobenen hämatologischen und hämorheologischen Parameter. Die einzige Studie, die den Effekt der akuten Intervention über die anschließenden Tage kontrollierte, konnte darüber hinaus einen verzögerten positiven Einfluss auf das erythrozytäre Aggregationsverhalten feststellen.

Chronische Interventionen:

Auf die vielversprechenden Ergebnisse der akuten Sportinterventionen aufbauend, wurde neuerdings begonnen, die Effekte von chronischem Training auf die Sichelzellanämie zu untersuchen, wobei die Mehrzahl der Studien im Tiermodell mit transgenen SAD (S-Antilles-D Punjab) bzw. Townes Mäusen durchgeführt wurde.

Das SAD Transgen führt zu Hämolyse und systemischen mikrovaskulären Okklusionen und reproduziert bei Hypoxie die typischen Gefäßverschlüsse, wie sie bei menschlichen Sichelzellanämiepatienten vorkommen [271]. Beim Townes Modell besitzen Knock-Out Mäuse ausschließlich humanes HbS und weisen irreversibel gesichelte Zellen, eine hämolytische Anämie sowie ebenfalls typische Organschädigungen auf [241].

Aufradet et al. verglichen im Jahre 2014 zwei Gruppen transgener SAD Mäuse, die für acht Wochen entweder in normalen Käfigen oder in Käfigen mit Laufrad gehalten wurden [19]. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der Gruppe direkt euthanasiert oder vorher vierstündigem hypoxischem Stress ausgesetzt. Die physisch aktiven Tiere zeigten niedrigere Konzentrationen verschiedener Adhäsionsmoleküle und eine um 63% höhere NO-Konzentration in den Lungengefäßen. Nach Hypoxie kam es bei den inaktiven Tieren zu einem Anstieg der Hämolyseparameters LDH, welcher bei den trainierten Tieren ausblieb. Die Autoren folgern daher, dass körperliche Aktivität bei Sichelzellanämie die endotheliale Funktion verbessern und negative Folgen von hypoxischem Stress abmildern könnte.

In einem ähnlichen Modell mit SAD Mäusen untersuchten Charrin et al. 2015 die Auswirkungen von gesteigerter 8-wöchiger körperlicher Aktivität auf den oxidativen Stress und den NO-Stoffwechsel [52]. Dabei stellten sie erhöhte Nitrit- und Nitratkonzentrationen sowie eine erhöhte Expression und Aktivität der NO-Synthase nach hypoxischem Stress der körperlich aktiven Mäuse im Vergleich zur inaktiven Vergleichsgruppe fest. Weiterhin wiesen die aktiven Mäuse in Ruhe eine höhere Aktivität antioxidativer Enzyme sowie niedrigere Konzentrationen von Hämolysemarkern auf. Im Gegensatz zur Vergleichsgruppe zeigten sie außerdem nach hypoxischem Stress keine gesteigerte Lipidperoxidation in den Herzmuskelzellen, woraus die Autoren ableiten, dass regelmäßige körperliche Aktivität die negativen Effekte von hypoxischem Stress bei der Sichelzellanämie begrenzen könne.

Im gleichen Jahr gelang es Faes et al. in einer ebenfalls 8-wöchigen Studie mit SAD Mäusen zu zeigen, dass physische Aktivität die Blutviskosität verringerte, was laut den Autoren zu einem erniedrigtem Gefäßwiderstand und einer verbesserten Gewebeperfusion führen könne [89]. Zusätzlich führten Charrin et al. im Jahre 2017 ein kontrolliertes achtwöchiges Laufbandtraining im Townes Modell durch, welches bei Mäusen mit HbS das Ausmaß an Milzsequestrationen begrenzte, die Blutoxygenierung verbesserte sowie die Konzentrationen proinflammatorischer Botenstoffe reduzierte [53].

Die einzige mehrwöchige Sportintervention mit menschlichen SCA-Patienten führten Gellen et al. erst im Jahre 2018 durch [100]. Für diese Studie wurden sowohl homozygot an Sichelzellanämie als auch heterozygot an HbSβ-Thalassämie erkrankte Erwachsene ohne schwerere chronische Komplikationen rekrutiert, die anschließend randomisiert in eine Trainings- sowie eine Kontrollgruppe aufgeteilt wurden. Nach einem ergometrischen Eingangstest zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit bei einer Laktatkonzentration im Blut von 4mmol/l begannen die 15 Probanden der Trainingsgruppe mit einem achtwöchigen Ausdauertraining auf dem Fahrradergometer. Dabei trainierten sie dreimal pro Woche für 45min, wohingegen mit den 18 Probanden der Kontrollgruppe kein Training durchgeführt wurde. Die individuelle Belastung des Trainings war moderat und belief sich auf eine Leistung, die einer Blutlaktatkonzentration von 2,5mmol/l des jeweiligen Probanden entsprach. Abschließend wurden in einem Ausgangstest Veränderungen in der Leistungsfähigkeit der Probanden ermittelt sowie ein ausführlicher Fragebogen zu körperlicher und geistiger Gesundheit ausgefüllt. Die Trainingsgruppe konnte durch die Sportintervention ihre Sauerstoffaufnahme verbessern und ihre Leistungsfähigkeit bei einer Laktatkonzentration von 4mmol/l um 11,7% von 70,4W auf 77,6W steigern, während sich

bei der Kontrollgruppe keine Unterschiede zeigten. In den Fragebögen gaben die Probanden der Trainingsgruppe an, seltener müde zu sein und wiesen eine signifikant höhere Vitalität und mentale Gesundheit auf als die Kontrollgruppe. Weiterhin kam es in der Trainingsgruppe zu keinen klinischen Komplikationen, wohingegen in der Kontrollgruppe fünf Krankenhausaufenthalte vor allem wegen vasookklusiver Schmerzkrisen registriert wurden. Die Autoren gehen davon aus, dass regelmäßige körperliche Aktivität die funktionelle Kapazität von SCA-Patienten verbessern kann und moderater Ausdauersport eine neue therapeutische Strategie in der Behandlung der Sichelzellanämie darstellen könnte.

Tabelle 1 liefert einen Überblick über die Veränderungen hämorheologisch relevanter Parameter bei akuter und chronischer Belastung in bisherigen Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten.

	Akut	Chronisch
Viskosität	→	(↓) *
Verformbarkeit	→	?
Aggregation	→ (↓ verzögert)	?
NO	→	(↑) *
Hämolyse	→	(→) *
Oxidativer Stress	↑ / →	(↓) *

* = nur im Mausmodell

Tabelle 1: Ergebnisse von Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten

Zusammenfassung bisheriger Forschungsergebnisse zu akuten und chronischen Auswirkungen auf verschiedene hämorheologische Parameter der Sichelzellanämie.

1.5 Zielsetzung

Nach anfänglicher Skepsis konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass moderates Ausdauertraining von SCA-Patienten gut toleriert wird und keine klinischen Komplikationen provoziert [22; 100]. Weiterhin legen die beschriebenen Studien nahe, dass körperliche Aktivität zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führen und die Funktionalität der Patienten im Alltag steigern könnte. Sport scheint somit als kostengünstige und leicht durchführbare Maßnahme ein großes therapeutisches Potenzial zu bergen, von dem insbesondere Millionen von Patienten in einkommensschwachen Regionen weltweit profitieren könnten [175].

Allerdings sind sowohl die akuten als auch die chronischen Auswirkungen von körperlicher Aktivität auf die Hämorheologie von SCA-Patienten bisher nur unzureichend untersucht worden [137]. Ein besonderer Mangel besteht diesbezüglich an chronischen Sportinterventionen, da diese bisher fast ausschließlich in Tiermodellen durchgeführt wurden, deren Ergebnisse sich nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen lassen. Auch fehlen Untersuchungen über die zugrundeliegenden hämorheologischen Mechanismen wie zum Beispiel den Signalweg von NO in den Erythrozyten. Um diese Mechanismen nachvollziehen zu können und die vermuteten positiven Effekte von Sport auf die Hämorheologie, die bei Gesunden bereits vielfach belegt werden konnten, auch bei der Sichelzellanämie zu untersuchen, bedarf es folglich weiterer Studien. Die vorliegende Arbeit möchte hier neue Erkenntnisse liefern und einen Beitrag für die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien zur Behandlung der Sichelzellanämie leisten.

Anhand pathophysiologisch relevanter Parameter sollen die Auswirkungen sowohl eines definierten akuten Belastungstests, als auch von kontrolliertem chronischem Training auf junge SCA-Patienten untersucht werden [62; 195]. Mit Hilfe der Spiroergometrie und umfassender Blutuntersuchungen sollen zum einen die körperliche Leistungsfähigkeit der Probanden überprüft und zum anderen die hämorheologischen Veränderungen durch Sport analysiert werden. Hierbei werden die Parameter erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation, die Verfügbarkeit und Produktion von Stickstoffmonoxid sowie das Ausmaß von oxidativem Stress und Hämolyse untersucht, welche allesamt die Klinik sowie die Prognose der Sichelzellanämie entscheidend beeinflussen [7; 67; 141; 145].

Nach ausführlicher Literaturrecherche ist die vorliegende Arbeit vermutlich die erste Untersuchung, die sowohl akute als auch chronische Auswirkungen von moderatem Ausdauertraining auf die Sichelzellanämie untersucht. Im Idealfall sollen aus den Erkenntnissen dieser Studie Empfehlungen abgeleitet werden können, die es den Patienten in Zukunft ermöglichen, ein Leben mit weniger Schmerzen, weniger Krankenhausaufenthalten und mehr gesellschaftlicher Teilhabe zu führen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Verbauchsmaterialien

Material	Name	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	BD Vacutainer (Natrium-Heparin) BD Vacutainer (EDTA)	Becton Dickinson, Heidelberg
Blutentnahmeset	BD Vacutainer Safety-Lok	Becton Dickinson, Heidelberg
Deckgläser	Microscope Cover Glass	VWR International, Darmstadt
Einmalpipetten	Standard-Serie	VWR International, Darmstadt
Einmalspritzen	Injekt Solo LL	B. Braun Melsungen, Melsungen
Fettstift	Super PAP Pen Liquid Blocker	Science Services, München
Glasflaschen	Borosilicate 3.3	VWR International, Darmstadt
Glasspritze (gasdicht)	1000 Series	Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz
Hautdesinfektionsmittel	Cutasept F	BODE Chemie, Hamburg
Kapillarröhrchen	20µl End-zu-End	EKF-diagnostics, Barleben
Laktatreaktionsgefäß	EKF ‘Safe-Lock’	EKF-diagnostics, Barleben
Messzylinder	Blaubrand, Klasse A, Boro 3.3	Brand, Wertheim
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf Tubes 3810X	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatte	96-Deep-Well-Platte	VWR International, Darmstadt
Objektträger	Microscope Slides	VWR International, Darmstadt
Pipetten	Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.	Eppendorf, Hamburg
Rollenpflaster	Leukosilk	BSN medical, Hamburg
Spatel	PE-HD	Brand, Wertheim
Spritzflasche	PE-LD	Brand, Wertheim
Zellstofftupfer	Pur-Zellin	Paul Hartmann, Heidenheim
Zentrifugenröhrchen	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialen

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck, Darmstadt
Aqua dest.	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
CELLPACK (Verdünnungslösung für Sysmex)	Sysmex, Kobe, Japan
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	VWR International, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($Na_2HPO_4*2H_2O$)	Merck, Darmstadt
Entellan (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Essigsäure (CH_3COOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (unvergällt) (C_2H_5OH)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt) (C_2H_5OH)	Schmittmann, Düsseldorf
Glucoseoxidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Helium (He)	Linde, Pullach
Iod (I)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumferricyanid ($C_6FeK_3N_6$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumiodid (KI)	Merck, Darmstadt
Meerrettichperoxidase (HRP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (CH_3OH)	VWR International, Darmstadt
Milchpulver	Reformhaus, Zarrentin
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid ($NaCl$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4*H_2O$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid ($NaOH$)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit ($NaNO2$)	Merck, Darmstadt
Nickel-II-Sulfat ($NiSO_4$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet P-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normal Goat Serum (NGS)	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande
Stickstoff, flüssig (N)	Linde, Pullach
Stromatolyser-WH (Zelllyse für Sysmex)	Sysmex Deutschland, Norderstedt
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck, Darmstadt
Xylol (C_8H_{10})	VWR International, Darmstadt

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Lösung	Herstellung
Diaminobenzidin (DAB)-Lösung	15ml 0,1mol/l PBS + 150µl Ammoniumchlorid + 300µl Nickel-II-Sulfat + 300µl D-Glucose + 150µl Diaminobenzidin + 50µl Glucoseoxidase Lösung filtrieren und innerhalb von 30min verbrauchen
Dreifach gepufferte Salzlösung (TBS) 0,05M	6,057g TRIS in 250ml Aqua dest. lösen + 8,766g NaCl Mit HCl auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen
Meerrettichperoxidase (HRP)-Lösung	3µl HRP + 1200µl TBS
Milchpulver 0,3% / Tween20 0,03%-Lösung	200µl 3% Milchpulverlösung + 1,8µl Tween20 + 1800µl TBS
Milchpulverlösung 3%	0,23g Milchpulver + 8ml TBS
Natronlauge (NaOH) 1M	200g NaOH + 500ml Aqua dest.
Normal Goat Serum (NGS) 3%	36µl NGS + 1200µl TBS
Paraformaldehyd (PFA) 4%	2g PFA + 20ml Aqua dest. (60°C) Tropfenweise mit 1mol/l NaOH klären, erkalten lassen und filtrieren + 25ml 0,2mol/l PBS Auf pH 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 50ml unter pH-Kontrolle auffüllen
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 0,1M	0,2mol/l PBS zu gleichen Teilen (1:1) mit Aqua dest. verdünnen und auf pH 7,4 einstellen
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 0,2M	28,8g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat + 2,6g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat +17,532g NaCl Mit Aqua dest. auf 1000ml auffüllen und auf pH 7,4 einstellen
Sekundärantikörper der Immunhistochemie	3µl Antikörper + 1200µl TBS
Trypsin 0,1%	1g Trypsin + 1000ml Aqua dest.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen

2.1.3 Antikörper und Kits

Antikörper	Hersteller
Anti-Akt1/PKBα	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Anti-eNOS/NOS Type III	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Anti-Nitrotyrosine	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Anti-phospho-Akt(Ser473)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho-eNOS(Ser114)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-phospho-eNOS(Ser1177)	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
Anti-phospho-eNOS(Thr495)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Goat anti-rabbit antibody	Dako Denmark, Glostrup, Dänemark

Tabelle 5: Verwendete Antikörper

Kit	Hersteller
Hemoglobin Human ELISA Kit	Abcam PLC, Cambridge, UK
IDK Arginin ELISA	Immundiagnostik AG, Bensheim
OxiSelect In Vitro ROS/RNS Assay Kit	Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA
TBARS Assay Kit	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Colorimetric)	Abcam PLC, Cambridge, UK

Tabelle 6: Verwendete Kits

2.1.4 Geräte und Software

Gerät	Name	Hersteller
Bunsenbrenner	Fireboy	Integra Biosciences, Biebertal
Chemilumineszenz-Analysator	CLD 88e	EcoPhysics, Kürnten, Schweiz
Ektazyotmeter / Syllektometer	LORCA (Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer), V.2.1	RR Mechatronics, Zwaag, Niederlande
Fahrradergometer	ergoselect 150	ergoline, Bitz
Feinwaage	Quintix 224-1s	Sartorius, Göttingen
Hämatologieanalysator	Sysmex KX-21N	Sysmex, Kobe, Japan
Horizontalschüttelgerät	Titramax 101	Heidolph Instruments, Schwabach
Inkubator	Brutschrank IN30	Memmert, Schwabach
Labor-Gefrierschrank	GFL 6483	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Laktatanalysegerät	Biosen S-Line Lab+	EKF-diagnostic, Barleben
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Mikroskop-Kamera	DXC-1850P	Sony, Tokio, Japan
NO-Analysator	CLD 88et	EcoPhysics, Kürnten, Schweiz
Plate Reader	Thermo Scan Multiscan FC 357	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Pulsoxymeter	ri-fox N	Rudolf Riester, Jungingen
Reagenzglasschüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Reinstwassergerät	GenPure Standard	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Rollbank	RM-810	Sysmex, Kobe, Japan
Spiroergometrie-System	Metalyzer 3B	Cortex Biophysik, Leipzig
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC300T	VWR, Radnor, PA, USA
Wasserbad	Julabo 20B	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge (klein)	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 7: Verwendete Geräte

Software	Name	Hersteller
Bildverarbeitungsprogramm	Image J v.1.8.0	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Chemilumineszenz-Software	Chart FIA	ExoPhysics, Kürnten, Schweiz
Ektazytometer-Software	LORCA Elongation V2.1	Academic Medical Center, Amsterdam, Niederlande
Plate Reader Software	SkanIt Software 5.0	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Spirometriesoftware	MetaSoft Studio	Cortex Biophysik, Leizipg
Statistiksoftware	GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft Excel 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
Textverarbeitungsprogramm	Microsoft Word 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA

Tabelle 8: Verwendete Software

2.2 Studiendesign

2.2.1 Studienprotokoll

Die verschiedenen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit folgten einem definierten Studienprotokoll, welches am 16.07.2014 von der Ethikkommission der Deutschen Sporthochschule geprüft und genehmigt wurde. Das Studienprotokoll entsprach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki und alle Studienteilnehmer gaben, entweder persönlich oder bei Minderjährigkeit durch die Erziehungsberechtigten, vor Beginn der Untersuchungen ihre schriftliche Einwilligung. Die Probanden wurden ausführlich über den Inhalt und Zweck der Studie aufgeklärt und alle Dokumente (Einwilligungserklärung, Probandenaufklärung, Informationsmaterial) waren in deutscher, englischer sowie französischer Sprache verfügbar.

In der Studie sollten akute (Zeitpunkt T0) und chronische Effekte (Zeitpunkt T1) von Sport auf die Hämorheologie von Sichelzellanämiepatienten untersucht werden. Dafür wurde ein Studienprotokoll entwickelt, dass eine spiroergometrische Eingangsuntersuchung, ein sich anschließendes sechswöchiges Ausdauertraining auf dem Fahrradergometer und eine erneute spiroergometrische Ausgangsuntersuchung umfasste. Zur Messung akuter Effekte wurde jeweils eine Blutentnahme (BE) in Ruhe vor (pre) und direkt nach (post) der Eingangsspirometrie durchgeführt. Für die Bestimmung chronischer Effekte erfolgte eine Blutentnahme in Ruhe vor der Ausgangsspirometrie (siehe Abb. 6).

Während der Spiroergometrien sowie bei jedem Training standen die Probanden unter ärztlicher Überwachung und ihre Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wurde mittels Pulsoxymetrie kontinuierlich gemessen. Vor und nach jeder Belastung wurden die Probanden nach ihrem Wohlbefinden befragt und alle Untersuchungen wurden nur durchgeführt, wenn die Probanden schmerzfrei waren und keine Analgetika eingenommen hatten.

T0							**T1**
Woche 0	W1	W2	W3	W4	W5	W6	Woche 7
Eingangstest	Training	Training	Training	Training	Training	Training	Ausgangstest
BE (pre) Spiroergometrie BE (post) Fragebogen	Mo: 15min Do: 15min	Mo: 15min Do: 15min	Mo: 20min Do: 20min	Mo: 20min Do: 20min	Mo: 30min Do: 30min	Mo: 30min Do: 30min	BE (pre) Spiroergometrie

Abbildung 6: Ablauf der Sportintervention

Eingangstest:

Beim ersten Termin wurde gemäß dem Protokoll von Liem et al. [163] mit jedem Probanden ein spiroergometrischer Belastungstest durchgeführt. Die Probanden fuhren dabei auf einem speziellen Fahrradergometer, dass sowohl für Belastungsuntersuchung von Kleinkindern als

auch Erwachsenen einsetzbar ist. Während der gesamten Testdauer wurde ihr pulmonaler Gasaustausch per breath-by-breath Analyse spirometrisch überwacht.

Die Messung begann mit einer zweiminütigen Ruhephase ohne Bewegung zur Gewöhnung der Probanden an die Spirometriemaske. Anschließend starteten die Probanden abhängig von ihrer Größe mit einer initialen Belastung von 10, 15 oder 20 Watt bei 50 bis 60 Umdrehungen pro Minute und die Belastung wurde alle 2min gesteigert (siehe Tab. 9).

Größe:	Startbelastung:	Erhöhung alle 2min um:
<120cm	10W	10W
120cm-150cm	15W	15W
>150cm	20W	20W

Tabelle 9: Größenabhängige Belastung des Stufentests

Der Stufentest wurde beendet, sobald die Probanden die erste ventilatorische Schwelle (VT1, *engl. ventilatory threshold*) erreichten, was spirometrisch detektiert wurde. Die VT1 ist definiert als der Zeitpunkt, an dem der Körper vom aeroben zum gemischt aerob-anaeroben Energiestoffwechsel umschaltet [292; 295]. Die Kenntnis dieser Größe ist wichtig, um für jeden Probanden ein individuelles Training im aeroben Bereich festlegen zu können und keine nachteiligen Effekte in Folge von sinkendem Sauerstoffpartialdruck oder anaerober Stoffwechselprodukte wie Laktat zu provozieren. Das Verfahren der Spirometrie und die Messung der VT1 sind in Kapitel 2.3.1 detailliert dargestellt.

Beim Eingangstest erfolgte zudem jeweils eine Blutentnahme in Ruhe vor sowie drei Minuten nach Ende der Belastung, um akute Effekte der Intervention auf die Blutparameter nachweisen und eine korrekte Messung des Laktatspiegels gewährleisten zu können [109].

Zum Schluss füllten die Probanden noch einen Aktivitätsfragebogen (siehe 8.3) aus, in dem sie zu ihrem Aktivitäts- und Belastbarkeitsniveau und ihrem alltäglichen Wohlbefinden befragt wurden. Dieser Fragebogen wurde aus dem Motorik-Modul Aktivitätsfragebogen (MoMo-AFB) adaptiert [245]. Ein Jahr nach Abschluss der Untersuchungen wurde der Fragebogen erneut ausgefüllt, um zu untersuchen, ob die Studie langfristig zu einer Steigerung der körperlichen Aktivität bei den Probanden geführt hatte.

Training:

In der darauffolgenden Woche begannen die Probanden mit dem sechswöchigen Ausdauertraining, dass zwei Mal pro Woche auf dem Fahrradergometer durchgeführt wurde. Die Intensität des Trainings wurde auf 70% der Leistung der VT1 festgelegt. Die Dauer des Trainings belief sich auf 15 Minuten in den ersten zwei Wochen, 20 Minuten in Woche drei und vier sowie 30 Minuten in den letzten zwei Wochen. Die Trittfrequenz lag zwischen 50 und 60 Umdrehungen pro Minute. In dieser Zeit erfolgten keine Messungen oder Blutentnahmen.

Ausgangstest:

Eine Woche nach Abschluss des sechswöchigen Ausdauertrainings erfolgte ein erneuter spiroergometrischer Stufentest mit einer Blutentnahme. Dieser Ausgangstest entsprach vom Ablauf her genau dem Eingangstest und wurde wieder bis zum Erreichen der VT1 durchgeführt. Es wurde festgelegt, dass die Testung nur mit Probanden erfolgte, die mindestens 80% der Trainingseinheiten absolviert hatten.

Vor dem Ausgangstest erfolgte zudem eine Blutentnahme in Ruhe, um chronische Effekte des Ausdauertrainings nachweisen zu können.

2.2.2 Probandenkollektiv

Für die vorliegende Studie wurden zwei Gruppen rekrutiert, wovon eine aus Sichelzellanämiepatienten (SCA-Gruppe) und die andere aus gesunden Kontrollen (AA-Gruppe) bestand.

SCA-Gruppe:

Für die vorliegende Studie wurden homozygote Sichelzellanämiepatienten über das Kinderkrankenhaus Amsterdamer Straße in Köln rekrutiert, welches eine Sichelzellsprechstunde für Kinder und Jugendliche anbietet. Die Diagnose wurde dort mittels Hämoglobinelektrophorese gestellt und bei Unklarheit durch die genetische Untersuchung der β-Globin-Gen-Sequenzierung bestätigt. Die Probanden stammten allesamt aus Ländern Afrikas südlich der Sahara oder des mittleren Ostens.

Vor Beginn wurden die aktuelle Medikation, bisherige Schmerzkrisen, Transfusionen sowie Hospitalisationen erfasst. Die Untersuchungen der SCA-Gruppe erfolgten in den Räumen der Physiotherapie im Kinderkrankhaus Amsterdamer Straße in Köln

Als Ausschlusskriterium wurde festgelegt, dass nur Patienten ohne akute Komplikationen, die in den letzten drei Monaten keine Bluttransfusion erhalten hatten, in die Studie aufgenommen werden sollten. Die SCA-Gruppe absolvierte das gesamte sechswöchige Protokoll inkl. Ausgangstests zur Überprüfung akuter (T0) und chronischer (T1) Effekte.

AA-Gruppe:

Zum Vergleich der akuten Auswirkungen der Sportintervention wurde eine Kontrollgruppe aus gesunden Kindern und Jugendlichen rekrutiert. Zunächst wurde versucht, gesunde Geschwisterkinder der erkrankten Probanden zu gewinnen. Da dies nicht im ausreichenden Maße möglich war, wurden anschließend über Kölner Vereine, die sich für Geflüchtete und Migranten engagieren, weitere Kinder und Jugendliche rekrutiert, die ebenfalls aus afrikanischen Ländern südlich der Sahara sowie dem mittleren Osten stammten. Hierdurch sollte ein Matching erreicht werden, damit die beiden Gruppen hinsichtlich der Blut- und Leistungsparameter verglichen werden konnten. Die Untersuchungen der AA-Gruppe erfolgten im Institutsgebäude der Deutschen Sporthochschule Köln.

Ausschlusskriterien der Kontrollgruppe waren chronische Krankheiten und regelmäßige Medikamenteneinnahme. Die AA-Gruppe absolvierte nur den Eingangstest zum Vergleich akuter Effekte der Sportintervention.

Anthropometrische Daten:

Für die Studie konnten insgesamt 13 SCA-Patienten rekrutiert werden, wovon eine Patientin noch vor der Aufnahme des Trainings auf Grund einer erhaltenen Bluttransfusion von der Studie ausgeschlossen werden musste. Die restlichen zwölf Probanden beendeten das sechswöchige Training und absolvierten erfolgreich den Abschlusstest, so dass sich für die chronischen Effekte die anthropometrischen Daten in Tabelle 11 ergeben (gemittelt mit Standardabweichung, BMI = Body Mass Index). Von den zwölf Patienten erhielten sieben zu Trainingsbeginn Hydroxyurea (HU) mit einer Dosis von 20-40mg/kg Körpergewicht. Zwei weitere starteten mit der Einnahme von Hydroxyurea in der ersten Trainingswoche, so dass zum Trainingsabschluss insgesamt neun Patienten das Medikament erhielten.

Bei vier dieser zwölf Probanden war es nicht möglich, die zweite Blutentnahme nach Absolvierung des Eingangstests durchzuführen. Dies lag hauptsächlich an der Aufgeregtheit dieser mitunter sehr jungen Patienten, die zwischen fünf und acht Jahre alt waren. Daher flossen in die Auswertung der akuten Effekte der Sportintervention nur die Daten der verbleibenden acht SCA-Patienten ein, bei denen die Blutentnahme gelang, sowie die von acht rekrutierten gesunden Kontrollen. Die anthropometrischen Daten beider Untersuchungsgruppen sind in Tabelle 10 aufgeführt. Fünf der acht Probanden der SCA-Gruppe erhielten Hydroxyurea über die gesamte Dauer der Intervention in einer Dosis von 20-40mg/kg Körpergewicht.

	Anzahl	HU	Geschlecht	Alter (y)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m^2)
SCA	8	5	4m/4w	17,4 ± 3,6	166 ± 6,0	53,0 ± 6,5	19,2 ± 1,5
AA	8	0	5m/3w	19,1 ± 1,6	171 ± 9,4	63,3 ± 12,0	21,5 ± 2,6

Tabelle 10: Anthropometrische Daten für die Auswertung akuter Effekte

	Anzahl	HU	Geschlecht	Alter (y)	Größe (cm)	Gewicht (kg)	BMI (kg/m^2)
SCA	12	9	4m/8w	13,4 ± 6,4	146 ± 2,2	38,3 ± 14,5	17,3 ± 2,4

Tabelle 11: Anthropometrische Daten für die Auswertung chronischer Effekte

2.2.3 Blutentnahmen

Die venösen Punktionen wurden vorzugsweise kubital, in Ausnahmefällen am Handrücken, durchgeführt. Pro Blutentnahme wurden zwei 8ml Natrium-Heparin Vacutainer sowie ein 3ml EDTA Vacutainer mit Vollblut befüllt und antikoaguliert. Das EDTA-Blut wurde anschließend in Zentrifugenröhrchen überführt, direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die spätere Bestimmung der Hämoglobinfraktionen bei -80°C gelagert. Die Natrium-Heparin-Blut wurde bei 3600g und 4°C für zwei Minuten zentrifugiert, die Plasmaüberstande ebenfalls schockgefroren

und bei -80°C gelagert. Die Erythrozytensedimente wurden gemäß den Anforderungen der jeweiligen Parameter entsprechend bearbeitet, eingefroren und gelagert (siehe 2.3).

2.3 Parameter

2.3.1 Leistungsmessung

Mit Hilfe des spiroergometrischen Stufentests nach dem Protokoll von Liem et al. [163] konnte die erste ventilatorische Schwelle (VT1) für jeden Probanden bestimmt werden. Die Belastung wurde am Fahrradergometer gesteuert und die Gasaustauschraten via breath-by-breath Analyse in der Spirometrie überwacht. Als Leistungsparameter wurden Sauerstoffaufnahme bei VT1 (ml/min/kg), Zeit bis VT1 (s) und Leistung bei VT1 (W) gemessen. Zusätzlich wurde mit Hilfe der Atemäquivalente die ventilatorische Effizienz für jede Belastungsstufe der Spiroergometrie berechnet.

Messprinzip:

Die Energiegewinnung des Körpers läuft in Ruhe durch aerobe, mit steigender Belastung zunächst durch gemischt aerob-anaerobe und schließlich durch anaerobe Stoffwechselprozesse ab. Aus physiologischer Sicht ist der Übergang zwischen den drei Belastungsbereichen zwar fließend, da ein rein aerober bzw. anaerober Stoffwechsel nicht existiert, jedoch ist es in sportmedizinischen Untersuchungen üblich, die drei Bereiche durch die erste sowie zweite ventilatorische Schwelle voneinander abzugrenzen [36; 295]. Die VT1 bezeichnet demnach den Zeitpunkt, an dem Energie zunehmend gemischt aerob-anaerob bereitgestellt wird und die CO_2-Produktion durch die Pufferung vermehrt anfallenden Laktats aus anaerober Glykolyse steigt [204; 293]. Als nicht-invasive Methode bietet die Spirometrie verschiedene Möglichkeiten, die VT1 zu detektieren, wobei die V-Slope-Methode sowie die V'E/V'O2-Kurve für diese Arbeit verwendet wurden (siehe Abb. 7).

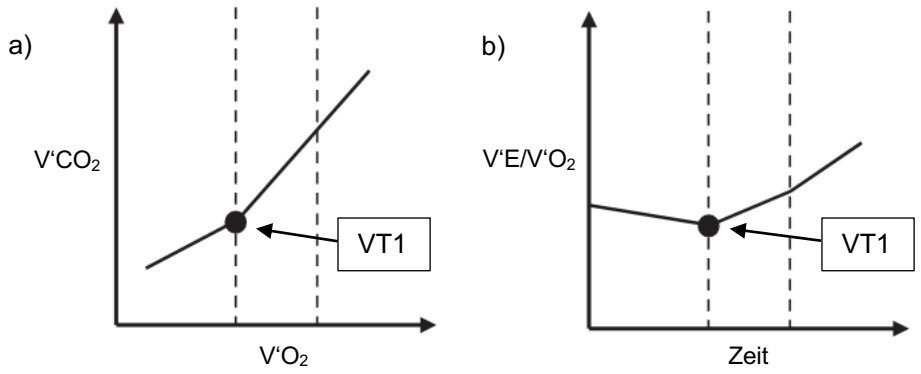


Abbildung 7: V-Slope-Methode (a) und V'E/V'O2-Kurve (b) zur Bestimmung der VT1

$V'CO_2$ = CO_2-Abgabe, $V'O_2$ = O_2-Aufnahme, $V'E/V'O_2$ = Atemäquivalent für O_2. Erklärung siehe Text unten. Modifiziert nach Referenz [36].

Bei der häufig gebrauchten V-Slope-Methode werden die Volumina der CO_2-Abgabe ($V'CO_2$) gegen die der O_2-Aufnahme ($V'O_2$) aufgetragen. Im Bereich niedriger Belastung steigt V'CO2 zunächst als eine lineare Funktion von V'O2 an, wobei die Steigung der Kurve unter 1 liegt. Bei Erreichen der VT1 kommt es, als Ausdruck der exzessiven CO_2-Produktion aus der

Laktatpufferung, zu einem Wechsel der Kurvensteigung auf >1. Durch Teilung der Kurve in zwei Regionen und Bildung von zwei Regressionsgeraden lässt sich die VT1 in deren Schnittpunkt bestimmen [36; 293; 295].

Für eine weitere valide Methode zur Bestimmung der VT1 werden die Atemäquivalente herangezogen [13]. Diese beschreiben die Menge an Atemluft, die benötigt wird, um 1l Sauerstoff aufzunehmen bzw. 1l Kohlendioxid abzugeben. Die Atemäquivalente werden aus dem Quotienten von Atemminutenvolumen (V'E) und O_2-Aufnahme bzw. CO_2-Abgabe berechnet. Für die Bestimmung der VT1 werden die V'E/V'O_2 und die V'E/V'CO_2 gegen die Zeit aufgetragen. Durch physiologische Veränderungen im Totraum- sowie Atemzugvolumen sinkt V'E/V'O_2 zum Start der Belastung zunächst leicht ab. Beim Erreichen der VT1 steigt die Ventilation überdurchschnittlich im Vergleich zu V'O_2, so dass die Kurve steigt. Der Kurvenverlauf von V'E/V'CO_2 bleibt währenddessen noch konstant. Die VT1 kann also abgelesen werden am tiefsten Punkt vor dem Anstieg (Nadir) von V'E/V'O_2 ohne gleichzeitigen Anstieg von V'E/V'CO_2 [36; 293; 295].

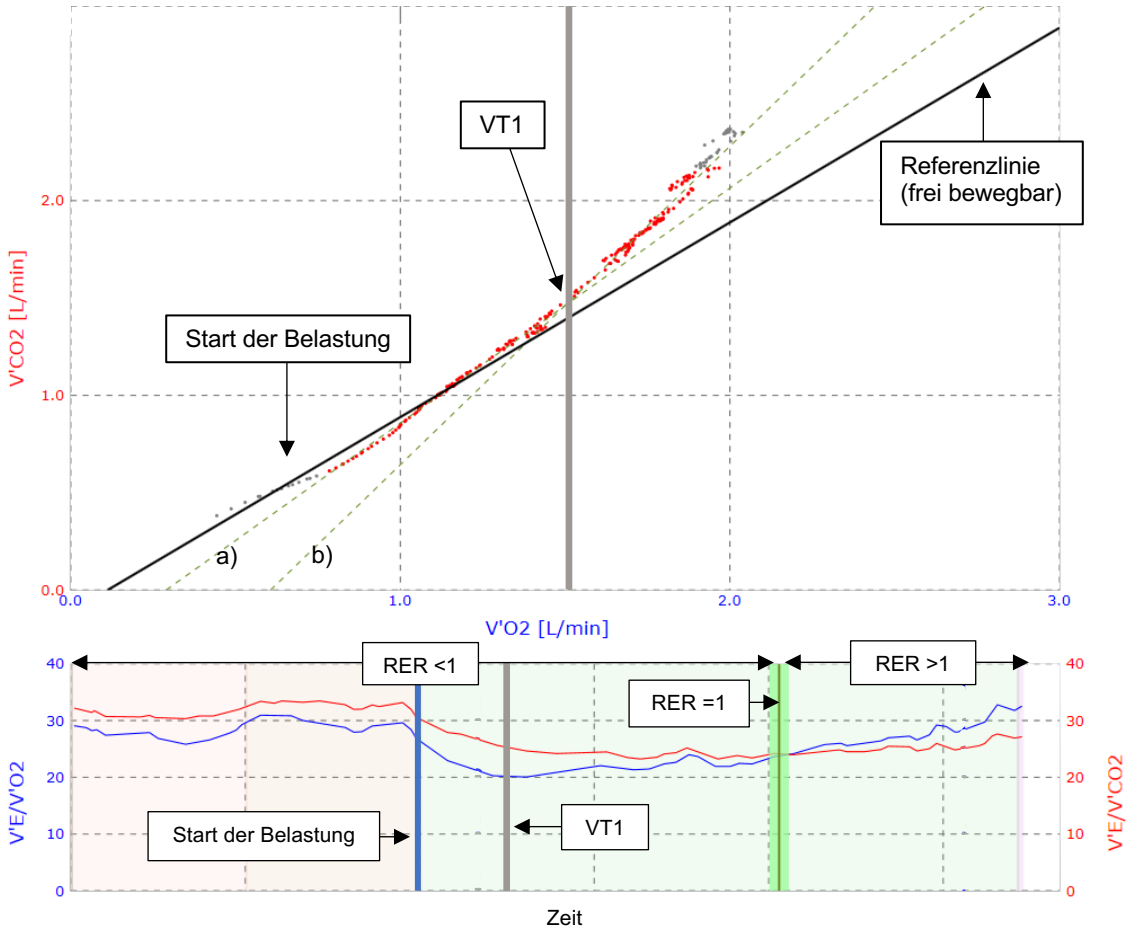


Abbildung 8: Erkennen der ersten ventilatorischen Schwelle in der Spirometriesoftware

Im oberen Punktdiagramm sinken die Messwerte (rote Punkte) nach der Ruhephase zunächst ab und streuen dann bis zum Erreichen der VT1 um die Gerade a). Nach Erreichen der VT1 verlassen die Messwerte diese Gerade a) und streuen um die steilere Gerade b). Die VT1 liegt dann im Schnittpunkt der beiden Geraden (V-Slope-Methode). Im unteren Diagramm sinkt die blaue O_2-Äquivalentskurve (V'E/V'O_2-Kurve) nach dem Start der Belastung zunächst ab und beschreibt dann ein Tal, während die rote CO_2-Äquivalentskurve konstant fällt. Die VT1 befindet sich dann am Nadir der V'E/V'O_2-Kurve.

Weitere wichtige Größen der spiroergometrischen Messung sind die RER (*engl. respiratory exchange ratio*) und die ventilatorische Effizienz. Die RER wird aus dem Quotienten der Atemäquivalente V'E/V'O_2 und V'E/V'CO_2 gebildet. Da sie zum Beginn der Belastung zunächst abnimmt, liegt sie beim Erreichen der VT1 immer unter 1 [295].

Die ventilatorische Effizienz beschreibt, wie „ökonomisch" die Sauerstoffaufnahme bzw. Kohlendioxidabgabe in der Lunge abläuft und wird direkt aus den Atemäquivalenten abgelesen [293]. Beim Stufentest kann die ventilatorische Effizienz mit Hilfe der Spirometrie für jede Belastungsstufe bestimmt und ein Diagramm zum Vergleich von chronischen Trainingseffekten erstellt werden.

Durchführung:

Vor jeder Messung wurde das Fahrradergometer für die Probanden individuell angepasst und der Atemsensor der Spirometrie computergestützt kalibriert. Die Messung begann mit einer zweiminütigen Ruhephase ohne Bewegung zur Gewöhnung der Probanden an die Spirometriemaske. Die Probanden wurden angehalten regelmäßig zu atmen und nicht zu sprechen. Anschließend wurde der Stufentest gemäß des Studienprotokolls (siehe 2.2.1) durchgeführt, bis am Monitor das Erreichen der VT1 erkennbar wurde. Der Test wurde spätestens beendet, wenn die RER den Wert 1 überschritt. Die Leistungsparameter zum Zeitpunkt der VT1 wurden dann in der Computersoftware bestimmt und dokumentiert. Zur Messung der ventilatorischen Effizienz wurden zusätzlich für jede Belastungsstufe die Atemäquivalente V'E/V'O_2 und V'E/V'CO_2 ausgelesen.

2.3.2 Laktat

Die Bestimmung der Laktatspiegel wurde automatisiert mit Hilfe des Laktatanalysegerätes EKF-Biosen S-Line Lab+ durchgeführt. Dieses ist geeignet für die Laktatmessung aus venösem Vollblut und basiert auf einem enzymatisch-amperometrischen Messverfahren mit speziellem Chipsensor.

Messprinzip:

Das in der Probe enthaltene L-Laktat wird im Laktatanalysegerät zunächst durch eine immobilisierte Laktatoxidase (LOD) zu Pyruvat umgesetzt, wodurch das Enzym reduziert wird. In Anwesenheit von Sauerstoff kommt es anschließend zu einer Reoxidation des Enzyms, wobei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet wird. Durch die Oxidation von H_2O_2 an der Elektrodenoberfläche werden Elektronen freigesetzt und ein messbarer Stromfluss entsteht, dessen Stärke direkt proportional zur Konzentration des umgesetzten Laktats ist. Durch vorherige Kalibrierung mit einer definierten Standardlösung bekannter Konzentration, kann das Gerät so die Laktatspiegel der Proben bestimmen [234; 239].

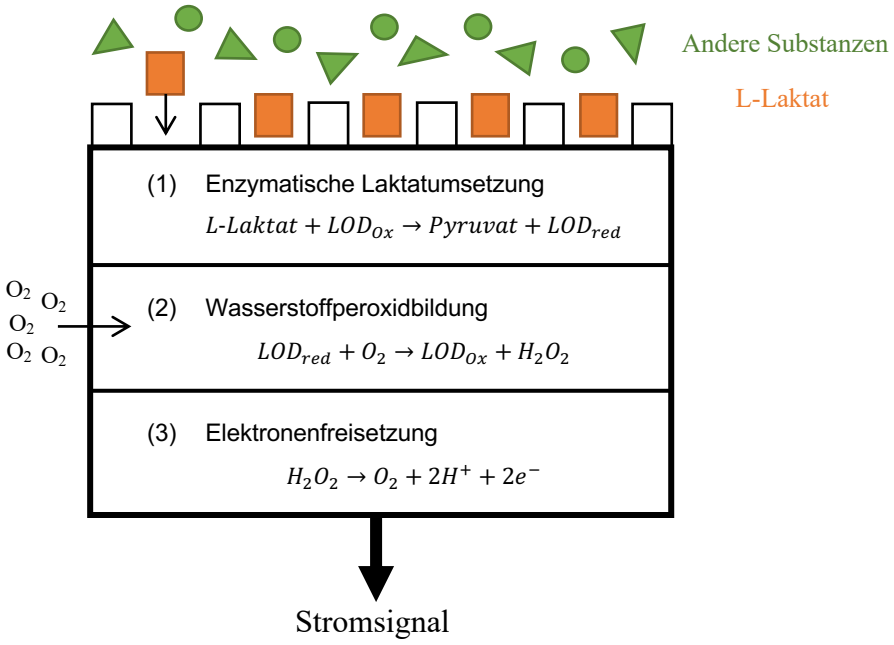


Abbildung 9: Enzymatisch-amperometrisches Messprinzip

Durchführung:

Damit die Laktatproduktion der akuten Belastung korrekt gemessen werden konnte, wurden die Blutentnahmen in Ruhe vor und exakt 3min nach dem Stufentest durchgeführt [109]. Nach der Blutentnahme wurden direkt 20µl Vollblut in ein Kapillarröhrchen aufgenommen und in ein 1000µl EKF 'Safe-Lock' Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß war bereits mit einer Hämolyselösung vorbefüllt, so dass sich eine Verdünnung von 1:50 ergab. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß in den Probenteller des Laktatanalysegerätes gegeben und die Messung automatisiert durchgeführt.

2.3.3 Blutbild

Die Bestimmung verschiedener hämatologischen Parameter wurde mit dem automatisierten Hämatologieanalysator Sysmex KX-21N durchgeführt. Dieses Gerät ist für die Messung des sogenannten „kleinen Blutbildes" aus Vollblutproben geeignet, welches acht verschiedene Parameter umfasst (siehe Tab. 12).

Parameter	Einheit	Bedeutung
WBC	10^3/µl	Anzahl der Leukozyten
RBC	10^6/µl	Anzahl der Erythrozyten
HGB	g/dl	Hämoglobin-Konzentration
HCT	%	Hämatokrit: Anteil der Zellen am gesamten Blutvolumen
MCV	fl	Mittleres Erythrozytenvolumen
MCH	pg	Mittlerer Hämoglobingehalt pro Erythrozyt
MCHC	g/dl	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten
PLT	10^3/µl	Anzahl der Thrombozyten

Tabelle 12: Parameter des kleinen Blutbildes

Messprinzip:

Vor der Messung wird der Hämatologieanalysator mit einer mitgelieferten Verdünnungslösung sowie einem Reagenz zur Zelllyse befüllt. Über ein Probendosierventil wird die Probe aufgenommen und mit einer definierten Menge Verdünnungslösung in die Messkammern transportiert. In der RBC-Messkammer werden Größe und Anzahl der Erythrozyten und Thrombozyten mit Hilfe des Widerstandsmessverfahrens bestimmt. Bei dieser Methode treten die Zellen durch eine winzige Kapillaröffnung in ein elektrisches Feld ein und verdrängen entsprechend ihrer Größe ein Elektrolytvolumen. Aus den auftretenden Widerstandsänderungen können die Zellzahlen berechnet werden [3; 105]. In der WBC-Messkammer werden die Erythrozyten zunächst mit der Lysereagenz aufgelöst und anschließend die Leukozyten ebenfalls per Widerstandsmessung gemessen. Das aus den lysierten Erythrozyten austretende Hämoglobin wandelt sich in rotes Methämoglobin um, wird aus der WBC-Messkammer in eine Durchflussküvette geleitet und dort fotometrisch bestimmt. Zum Schluss werden die restlichen Parameter mathematisch aus den vorliegenden Größen berechnet.

Durchführung:

Direkt nach der Blutentnahme wurden 50µl Vollblut in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert, gründlich gemischt und dem Hämatologieanalysator über dessen Ansaugnadel zugeführt. Die Analyse wurde dann vom Gerät automatisch durchgeführt und die Ergebnisse ausgedruckt.

2.3.4 Freies Hämoglobin

Die Messung des freien Hämoglobins (Hb) im Plasma wurde mit Hilfe des Hemoglobin Human ELISA Kits gemessen. Dieses ist für die Bestimmung des freien Hämoglobins in Serum und Plasma geeignet. Im Lieferumfang des Kits ist ein Verfahrensprotokoll enthalten, nach dessen Anleitung der Assay durchgeführt wurde.

Messprinzip:

Ein ELISA (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*) bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem in vitro verschiedene Stoffe wie zum Beispiel Proteine über eine enzymatische Farbreaktion quantitativ bestimmt werden können. Bei der Messung des freien Hämoglobins mit dem Hemoglobin Human ELISA Kits wird dafür die zu bestimmende Plasmaprobe in die Kavitäten (*engl. wells*) einer mitgelieferten Mikrotiterplatte aus Polystyrol gegeben, auf deren Oberfläche Hb-Antikörper vorhanden sind, wodurch das Hämoglobin fixiert wird. Ungebundene Proteine werden herausgewaschen und ein zweiter Hb-Antikörper hinzugefügt, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *engl. horseradish peroxidase*) markiert ist. Dieser Zweitantikörper formt nun einen Komplex mit dem fixierten Hämoglobin. Nach einem weiteren Waschvorgang wird das Farbstoffsubstrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben, welches von der HRP umgesetzt wird. Der entstehende Farbstoff kann nun mit einem Photometer bei 450nm gemessen und die Hämoglobinkonzentration mit Hilfe einer Standardreihe bestimmt werden [129; 205; 250].

Durchführung:

Am Versuchstag wurden die Plasmaproben auf Eis aufgetaut, die im Kit mitgelieferten Chemikalien auf Raumtemperatur erwärmt und die konzentrierten Lösungen wie in Tabelle 13 dargestellt vorbereitet. Aus dem Verdünnungskonzentrat wurde zunächst die Verdünnungslösung hergestellt, mit der dann wiederum der HRP-konjugierte Hb-Antikörper verdünnt wurde.

Name	Vorbereitung
Verdünnungskonzentrat	Verdünnung 1:5 in Aqua dest.
Waschpufferkonzentrat	Verdünnung 1:20 in Aqua dest.
Humaner Hämoglobin Kalibrator	Lösung in 1ml Aqua dest.
HRP-konjugierter anti-human-Hb Antikörper	Verdünnung 1:100 in Verdünnungslösung
Chromogen-Substrat-Lösung	gebrauchsfertig
Stopplösung	gebrauchsfertig

Tabelle 13: Mitgelieferte Reagenzien des Hemoglobin Human ELISA Kits

Durch die Verdünnung des Hb Kalibrators mit 1ml Aqua dest. erhielt man eine Konzentration von 897ng/ml, für die Herstellung des ersten Standards der Standardreihe wurde jedoch eine Konzentration von 200ng/ml benötigt. Um diese zu erhalten, wurden daher nach mathematischer Berechnung 150µl Hämoglobin Kalibrator mit 523µl Verdünnungslösung gemischt. Für den zweiten Standard wurden 300µl von Standard 1 entnommen und zu 300µl Verdünnungslösung gegeben, um eine Konzentration von 100ng/ml zu erhalten. Nach dem gleichen Verfahren wurden die restlichen Standards gebildet (siehe Tab. 14). 300µl der reinen Verdünnungslösung dienten als Nullstandard.

Standard	Konzentration (ng/ml)	Herstellung
0	0	300µl Verdünnungslösung
1	200	150µl Hb Kalibrator (897ng/ml) + 523µl Verdünnungslösung
2	100	300µl Standard 1 + 300µl Verdünnungslösung
3	50	300µl Standard 2 + 300µl Verdünnungslösung
4	25	300µl Standard 3 + 300µl Verdünnungslösung
5	12,5	300µl Standard 4 + 300µl Verdünnungslösung
6	6,25	300µl Standard 5 + 300µl Verdünnungslösung

Tabelle 14: Standardreihe des Hemoglobin Human ELISA

Bevor der Assay begonnen werden konnte, mussten die aufgetauten Plasmaproben 1:1000 verdünnt werden. Dafür wurden je 5µl der Proben mit 495µl Verdünnungslösung und hiervon anschließend erneut 25µl mit 225µl Verdünnungslösung versetzt. Nun wurden jeweils 100µl einer jeden Probe bzw. Standards in zwei Wells der Mikrotiterplatte pipettiert, um jede Messung doppelt durchführen zu können. Dann wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Inhalte aller Wells abpipettiert und viermal mit der Waschpufferlösung gespült. Jedem Well wurden 100µl des HRP-konjugierten anti-human Hb-Antikörpers hinzugegeben und die Mikrotiterplatte erneut 20min im Dunkeln inkubiert.

Hiernach wurden die Inhalte abermals wie im vorherigen Schritt abpipettiert und die Wells viermal gespült. Nun wurde das Farbsubstrat in Form von 100µl der Chromogen-Substrat-Lösung in die Wells gegeben. Nach einer exakten Inkubationszeit von 10min in Dunkelheit wurden 100µl der Stopplösung hinzugefügt, um die Farbreaktion zu beenden. Die Messung der Absorption erfolgte dann im Plate Reader bei 450nm.

Für die Berechnung der Hb-Konzentrationen wurden zunächst von allen doppelten Messungen die Mittelwerte gebildet und die Konzentration des Standards 0 (blank) von den Werten abgezogen. Am Computer wurden die bekannten Konzentrationen der Standards gegen die gemessene Absorption aufgetragen und mittels 4-Parameter Algorithmus eine Standardkurve gebildet (siehe Abb. 10). Die Hb-Konzentrationen der Proben konnten dann softwaregestützt extrapoliert werden.

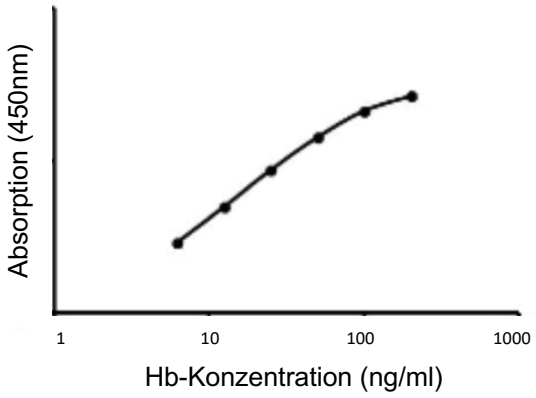


Abbildung 10: Beispielhafte Standardkurve des Hemoglobin Human ELISA
modifiziert nach Hemoglobin Human ELISA Kit-Booklet.

2.3.5 L-Arginin im Erythrozyten

Die Messung der erythrozytären Konzentration von L-Arginin wurde mit Hilfe des IDK Arginin ELISA Kits gemessen, welches in der hämorheologischen Forschung bereits mehrfach für die quantitative Bestimmung von L-Arginin im Erythrozyten eingesetzt wurde [37; 111]. Im Lieferumfang des Kits ist ein Verfahrensprotokoll enthalten, nach dessen Anleitung der Assay durchgeführt wurde.

Messprinzip:
Das Verfahren basiert auf der Methode eines kompetitiven Enzymimmunoassays. Hierbei konkurriert das in den Proben befindliche L-Arginin mit einem sogenannten Tracer um die Bindung von Antikörpern. Der Tracer ist auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte fixiert, in die sowohl Proben als auch polyklonalen L-Arginin-Antikörper gegeben werden. Nach deren Inkubation wird ein Sekundärantikörper hinzugefügt, an den das Enzym Peroxidase gekoppelt ist und der an die polyklonalen Antikörper bindet. Durch einen Waschschritt werden zunächst alle an L-Arginin gebundenen Primärantikörper entfernt und anschließend das Farbstoffsubstrat TMB aufgebracht. TMB wird nun von der verbliebenen Peroxidase umgesetzt und der Farbumschlag

im Photometer bei 450nm gemessen. Seine Intensität ist umgekehrt proportional zur Konzentration des L-Arginin in den Proben, welche abschließend mit Hilfe einer Standardreihe bestimmt werden kann [129; 250].

Durchführung:

Am Versuchstag wurden die eingefrorenen Erythrozytensedimente in einem kalten Ultraschallbad für 20min lysiert und anschließend bei 21000g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Währenddessen wurden die im Kit mitgelieferten Chemikalien auf Raumtemperatur erwärmt und wie in Tabelle 15 dargestellt vorbereitet.

Name	Vorbereitung
Probenverdünnungspuffer	gebrauchsfertig
Waschpufferkonzentrat	Verdünnung 1:10 in Aqua dest.
Assaypuffer	gebrauchsfertig
L-Arginin-Antikörper	Verdünnung in 9ml Waschpufferlösung
Konjugat	gebrauchsfertig
Dimethylsulfoxid	gebrauchsfertig
Tetramethylbenzidin	gebrauchsfertig
Derivatisierungsreagenz	Lösung in 3ml DMSO
Stopplösung	gebrauchsfertig
Kontrollen	gebrauchsfertig
Standards (0; 12,5; 30; 60; 120; 300µmol/l)	gebrauchsfertig

Tabelle 15: Mitgelieferte Reagenzien des IDK Arginin ELISA Kits

Aus den Überständen der zentrifugierten Proben wurden 25µl entnommen und im Verhältnis 1:40 mit 1ml Probenverdünnungspuffer verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100µl der verdünnten Proben, Standards sowie Kontrollen in neue Mikroreaktionsgefäße pipettiert, mit 25µl Derivatisierungsreagenz versetzt und gründlich durchmischt. Es folgte die Inkubation aller Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur für 45min auf dem Horizontalschüttler. Zwischenzeitlich wurden noch die Vertiefungen der Mikrotiterplatte fünfmal mit jeweils 250µl Waschpufferlösung gereinigt und die Reste durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt.

Nach der Inkubation wurde jedem Reaktionsgefäß 1250µl des Assaypuffers hinzugegeben und der Inhalt gemischt. Zur Doppelbestimmung jeder Probe, Standards oder Kontrolle wurden zweimal 50µl eines jeden Reaktionsgefäßes in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und zusätzlich 150µl des L-Arginin-Antikörpers hinzugegeben. Daraufhin wurde die Platte luftdicht abgedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen, jede Vertiefung erneut fünfmal mit 250µl Waschpufferlösung gewaschen und die Reste mit saugfähigem Papier entfernt. In jede Vertiefung wurden 100µl des Antikörper-Enzym-Konjugats pipettiert und die abgedeckte Platte 1h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert.

Wie zuvor wurde anschließend der Inhalt verworfen, die Vertiefungen fünfmal gewaschen und die Reste entfernt. Dann wurden 100µl des Substrats in die Vertiefungen pipettiert und die Platte 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Farbreaktion durch

Zugabe von 100µl der Stopplösung beendet und der Farbumschlag sofort bei 450nm im Plate Reader gemessen.

Die bestimmten Absorptionen wurden in der Photometersoftware ausgewertet. Mittels 4-Parameter-Algorhythmus wurde zunächst aus den Standards eine Standardkurve gebildet (siehe Abb. 11). Dazu wurden die Konzentrationen der Standards in µmol/l (logarithmische Abszisse) gegen die Absorption (lineare Ordinate) aufgetragen. Die L-Arginin-Konzentrationen der Proben konnten dann softwaregestützt ermittelt werden.

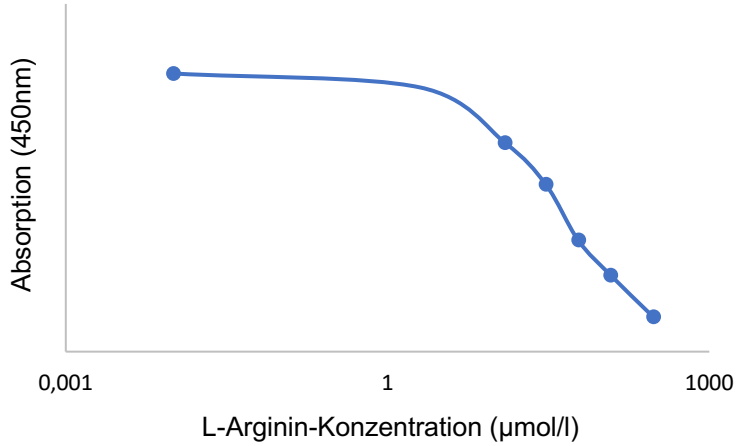


Abbildung 11: Beispielhafte Standardkurve des IDK Arginin ELISA Kits

2.3.6 Erythrozytäre Verformbarkeit

Die Fähigkeit der roten Blutkörperchen, sich unter definiertem Scherstress zu verformen, wurde mit Hilfe eines Ektazytometers vom Typ LORCA (*engl. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer*) gemessen.

Messprinzip:

Das Instrument besteht aus einem statischen inneren und einem rotierenden äußeren Zylinder, zwischen denen ein schmaler Zwischenraum besteht (siehe Abb. 12). In diesen wird die zu untersuchende Erythrozytensuspension gefüllt und verschiedenen Scherkräften ausgesetzt. Weisen die Erythrozyten in Ruhe noch eine zirkuläre Form auf, nehmen sie bei steigender Rotation eine elliptische Form an, was als Elongation bezeichnet wird [279]. Trifft nun ein 5mW Helium-Neon Laserstrahl auf die Erythrozytensuspension, wird er, abhängig vom Grad der Verformung der Erythrozyten, einer Beugung (Diffraktion) ausgesetzt. Die entstehenden unterschiedlichen Diffraktionsmuster werden auf einen Bildschirm projiziert und von einer Kamera aufgezeichnet [121; 122].

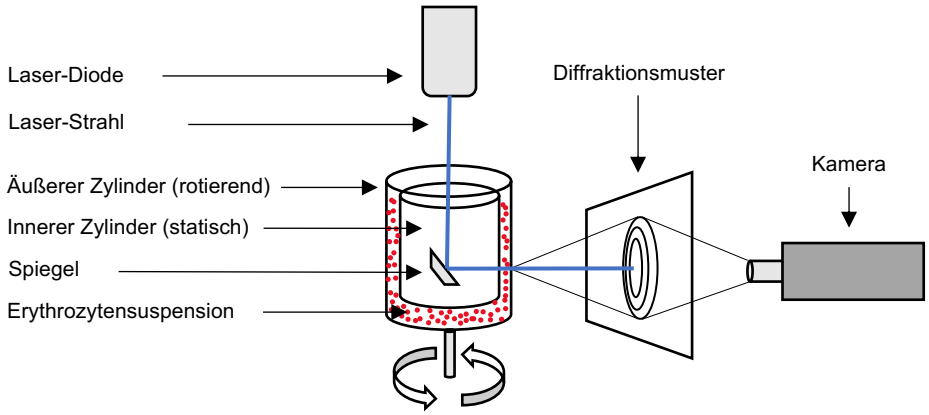


Abbildung 12: Prinzip der Ektazytometrie mit LORCA

Eigene Darstellung in Anlehnung an LORCA User's Manual.

Da Vollblut kein newtonsches Fluid, sondern eine Suspension aus dem hauptsächlich wasserhaltigen Plasma und zellulären Bestandteilen ist, verändert sich seine Viskosität in Abhängigkeit des Hämatokrits und der Strömungsgeschwindigkeit [165; 279]. Um die Verformbarkeit der Erythrozyten mit LORCA zuverlässig messen zu können, müssen die Proben daher mit hochvisköser Polyvinylpyrrolidon-Lösung (PVP) versetzt werden. Die Blut-PVP-Lösung verhält sich dann ähnlich eines newtonschen Fluids und weist eine konstante Viskosität bei verschiedenen Rotationsgeschwindigkeiten des äußeren Zylinders auf [121]. Die Scherrate ist proportional zu dieser Geschwindigkeit und kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\dot{\gamma} = \frac{4\pi \cdot r_b \cdot r_c}{60 \cdot (r_c^2 \cdot r_b^2)} \cdot N$$

$\dot{\gamma}$	Scherrate (s^{-1})
r_b	äußerer Radius des inneren Zylinders
r_c	innerer Radius des äußeren Zylinders
N	Rotationsgeschwindigkeit

Durchführung:

Nach der Blutentnahme wurden 20µl Vollblut aus den Na-Heparin Röhrchen entnommen und mit 5ml der PVP-Lösung im Verhältnis 1:250 verdünnt. Zur Verformbarkeitsmessung wurde die Blut-PVP-Lösung auf 37°C erwärmt, das Ektazytometer abgedunkelt und sichergestellt, dass sich keine Luftbläschen im Zylinderzwischenspalt befanden. Dadurch sollten in-vivo Bedingungen nachgeahmt und die Laserdiffraktion ohne Störung aufgezeichnet werden. Computergestützt wurde jede Probe neun definierten Scherspannungen (0.3Pa, 0.57Pa, 1.08Pa, 2.04Pa, 3.87Pa, 7.34Pa, 13.92Pa, 26.38Pa, 50.00Pa) ausgesetzt und eine Verformbarkeitskurve erstellt. In dieser wurden die neun Scherspannungen logarithmisch gegen den Elongationsindex (EI) aufgetragen, so dass sich ein sigmoider Kurvenverlauf ergab (siehe Abb. 13) [122]. Der EI wurde softwaregestützt aus den sich verändernden Achsenlängen der Erythrozyten gemessen, die bei steigendem Scherstress von der zirkulären in die elliptische Form übergehen.

$$EI = \frac{A - B}{A + B}$$

EI	Elongationsindex
A	Vertikale (lange) Achse
B	Horizontale (kurze) Achse

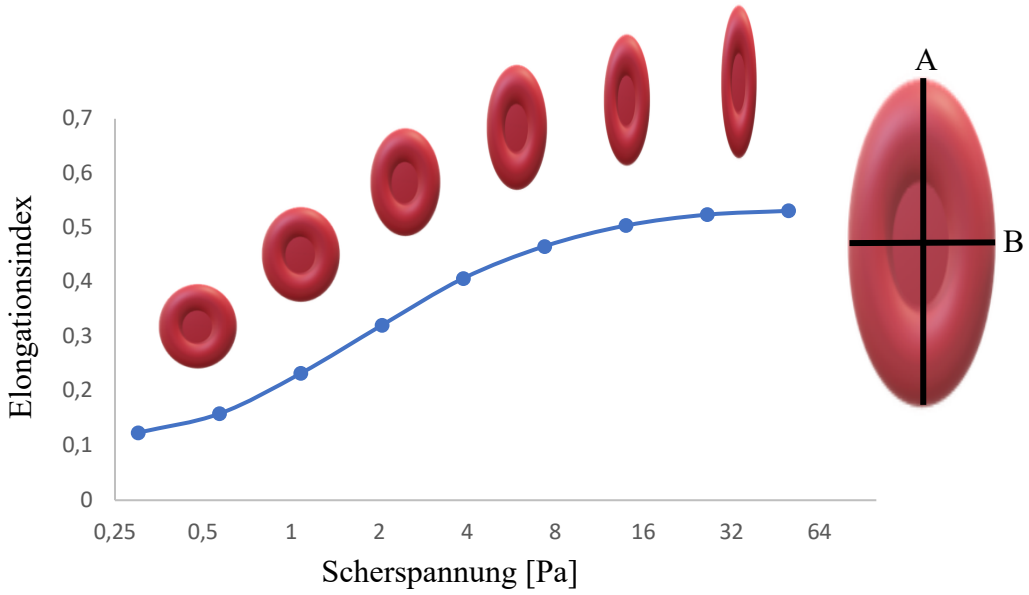


Abbildung 13: Logarithmische Verformbarkeitskurve und Elongationsindex

2.3.7 Erythrozytäre Aggregation

Zur Messung der erythrozytären Kinetik von Aggregation und Disaggregation wurde ebenfalls LORCA (*engl. Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer*) verwendet (siehe 2.3.6). Zur Bestimmung der Aggregabilität der Erythrozyten kam das Verfahren der Syllektometrie zum Einsatz.

Messprinzip:

Bei der Syllektometrie mit LORCA wird der Laserstrahl über den Spiegel im inneren Zylinder auf die Erythrozytensuspension im Zylinderzwischenspalt gelenkt und dort reflektiert (siehe Abb. 14). Das Rückstreuungsmuster wird dann von einer Fotodiode registriert und in ein elektrisches Signal umgewandelt [28; 120].

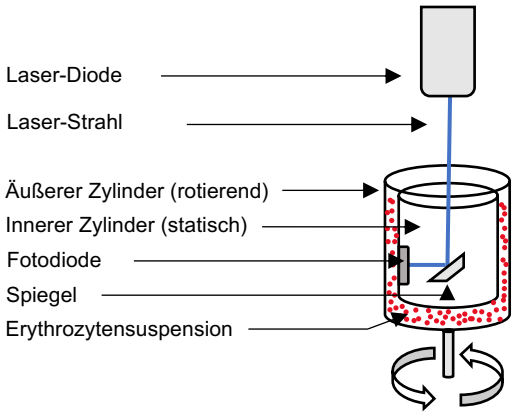


Abbildung 14: Prinzip der Syllektometrie mit LORCA

Eigene Darstellung in Anlehnung an LORCA User's Manual.

Die Messung läuft in vier Phasen ab und beginnt mit einer kurzen intensiven Rotation des inneren Zylinders, die eine Verformung und komplette Disaggregation der Erythrozyten bewirkt (I). Danach stoppt der Motor abrupt, so dass die Scherkraft aussetzt und die elongierten Zellen wieder ihre ursprüngliche bikonkave Form annehmen, was zu einer exponentiellen Zunahme des reflektierten Lichts auf dem Sensor der Fotodiode führt (II). Nach kurzer Zeit kommt es anschließend zur Aggregation der Erythrozyten, die einsträngige Rouleaux-Formationen bilden, wodurch das reflektierte Licht wieder abnimmt (III). Zuletzt verbinden sich langsam mehrere dieser Rouleaux-Stränge zu dreidimensionalen Strukturen (IV) [165].

Die Lichtintensität (in au, *engl. arbitrary units*) kann dann gegen die Zeit in einem Syllektogramm dargestellt werden, woraus sich verschiedene Aggregationsparameter wie der Aggregationsindex (AI) bestimmen lassen, der das Aggregationsverhalten der Suspension beschreibt (siehe Abb. 15). Der AI wird aus dem Quotienten der Flächen A und A+B gebildet, die sich als Integrale oberhalb (A) sowie unterhalb (B) der Kurve vom Zeitpunkt t_{top} bis zum Zeitpunkt $t_{top+10s}$ (also in einem Zeitraum von 10s) berechnen lassen. Er wird in Prozent angegeben und nimmt desto größere Werte an, je schneller die Erythrozyten aggregieren [28; 120].

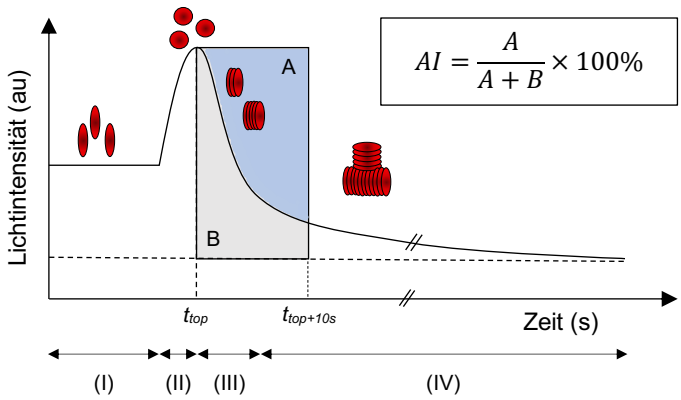


Abbildung 15: Die vier Phasen des Syllektogramms

Eigene Darstellung in Anlehnung an LORCA User's Manual.

Ein weiterer wichtiger Parameter der Aggregationsmessung ist die Aggregations-Disaggregationsscherrate, die allerdings nicht direkt aus dem Syllektogramm abgelesen werden kann. Sie ist definiert als die minimale Scherkraft, die auf die Erythrozyten einwirken muss, um deren Aggregation zu verhindern [120]. Die Aggregations-Disaggregationsscherrate kann mit Hilfe eines Iterationsverfahrens ermittelt werden, bei dem durch wiederholende Messungen der Zeitpunkt bestimmt wird, bei dem die Veränderung der Intensität des rückgestreuten Lichtes (Isc, *engl. laser backscatter intensity*) minimal ist. Die Scherrate an diesem Zeitpunkt kann dann als $\gamma_{dIsc\ min}$ mit der Einheit 1/s ausgegeben werden. Die Aggregations-Disaggregationsscherrate ist also ein Maß für die Tendenz der Zellen zu aggregieren und ihr Wert steigt, je höher die Aggregationskräfte der Zellen sind.

Durchführung:

Vor der Messung der Aggregation wurden die Proben zunächst aufgetaut und bei 36rpm auf der Rollbank für 15min oxygeniert. Nach Erwärmung des Syllektometers auf 37°C wurde anschließend jeweils 1ml einer jeden Probe in den Zylinderzwischenspalt pipettiert und sichergestellt, dass sich keine Luftbläschen in der Suspension befanden. Die Messungen wurden dann automatisiert am Computer mit Hilfe der LORCA-Software wie folgt durchgeführt.

Das Verfahren startete mit der Syllektometrie und der Messung des reflektierten Lichts für 120s. Im Anschluss daran, also nach erneuter maximaler Aggregation der Zellen zu 2D- und 3D-Rouleaux-Formationen, wurde die Suspension verschiedenen steigenden Scherraten ausgesetzt und das Iterationsverfahren durchgeführt. Die Software erstellte abschließend das Syllektogramm und gab den Aggregationsindex sowie die Aggregations-Disaggregations-scherrate aus.

2.3.8 Nitrit im Plasma und Nitrit/RSNO/Fe-NO im Erythrozyten

Zur Bestimmung der NO-Konzentrationen in Erythrozyten und Plasma wurde das Verfahren der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion (CLD) angewendet. Der Nachweis des mit einer Halbwertszeit von deutlich unter einer Sekunde sehr instabilen NO erfolgt bei dieser Methode indirekt aus der Detektion von NO_2^-, welches unter aeroben Bedingungen aus NO durch Oxidation gebildet wird [143; 273]. Die CLD zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität für NO in Plasma und Erythrozyten aus und erfasst neben freiem NO auch dessen Speicherformen sowie Abbauprodukte. So wird bei diesem Verfahren auch NO detektiert, welches in Erythrozyten an Hämoglobin (Fe-NO) oder an freie Thiolgruppen von erythrozytären Proteinen als S-Nitrosothiole (RSNO) gebunden ist [126].

Messprinzip:

Das Verfahren der CLD beruht auf der Messung von Lichtquanten, welche durch die chemische Reaktion von NO mit Ozon (O_3) emittiert werden. Hierbei entsteht Stickstoffdioxid in einem angeregten instabilen Zustand (NO_2*), das bei seiner Rückkehr in den Grundzustand Energie in Form von Photonen (E_{Photon}) bzw. Licht abgibt. Die Intensität dieses Lichts ist direkt proportional

zur NO-Konzentration und kann aufgezeichnet werden [31; 214].

(1) $NO + O_3 \rightarrow NO_2^* + O_2$

(2) $NO_2^* \rightarrow NO_2 + \mathrm{E}_{Photon}$

Die CLD besteht aus einer vorgeschalteten Glasapparatur und einem NO-Analysator, der die Werte an den Computer überträgt (siehe Abb. 16). Um das in der Probe befindliche NO mit der CLD messen zu können, muss es zunächst aus seinen Verbindungen gelöst und in einen gasförmigen Aggregatzustand versetzt werden. Dies geschieht durch eine triiodhaltige Reduktionslösung, die sich in einem Glasreaktionsgefäß befindet. Aus Nitrit werden so zunächst Nitrosoniumionen (NO^+) freigesetzt, die anschließend mit Iodid zu NO reagieren. Durch eine Warmwasserkammer wird das Gefäß auf 60°C erwärmt, was die Reduktion von Nitrit zu NO beschleunigt [91; 214].

(1) $NO_2^- + 2H^+ \rightarrow NO^+ + H_2O$

(2) $NO^+ + I^- \rightarrow ONI$

(3) $2ONI \rightarrow 2NO + I_2$

Gleichzeitig wird das Gefäß konstant mit Helium durchströmt. Mit Hilfe dieses Trägergases steigt das frei gewordene NO in eine zweite Kammer auf, in der es auf 4°C abgekühlt wird. In einer sich anschließenden NaOH-Falle werden Säuren, Proteine und höhere Stickoxide abgefangen. Nun strömt das NO an einem Druckmesser vorbei in die Reaktionskammer des NO-Analysators. In einem Ozongenerator wird durch elektrische Entladung O_3 produziert und per Vakuumpumpe dem NO hinzugefügt. Durch die eingangs beschriebene Reaktion von NO mit O_3 kommt es zur Chemilumineszenz, die vom Photomultiplier verstärkt und auf einer photosensitiven Oberfläche registriert wird. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von mehr als 600nm und liegt überwiegend im nahen Infrarotspektrum. Ein Rot-cut-off-Filter eliminiert Licht im blauen und ultravioletten Bereich unter 500nm [31]. Weitere beeinflussende Faktoren wie Temperatur oder Stromstärke werden vom NO-Analysator automatisch konstant gehalten. Abschließend werden die Daten aufgezeichnet und an den Computer weitergeleitet, wo sie ausgewertet werden können.

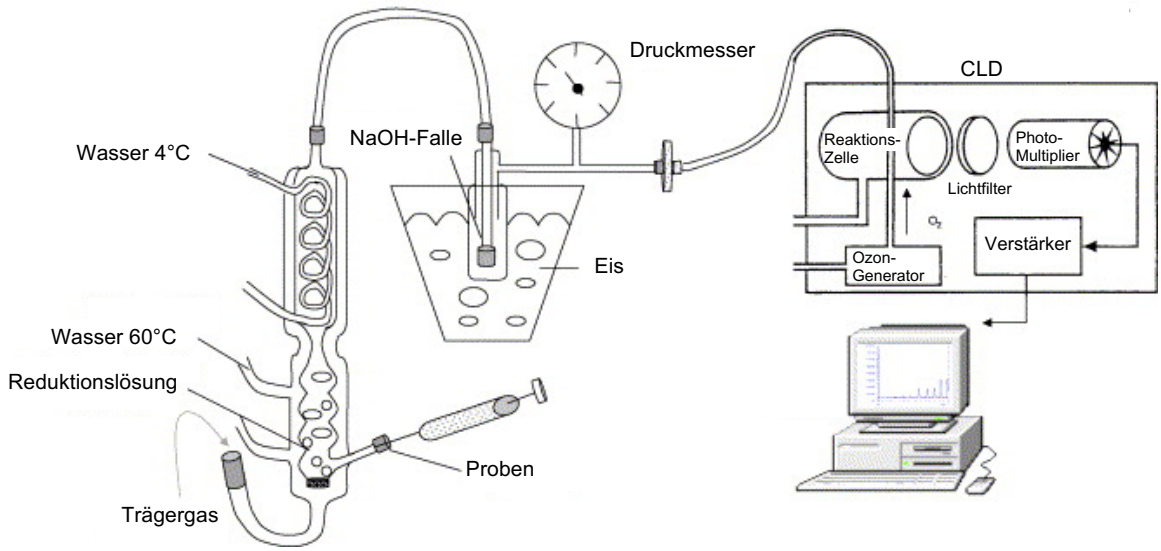


Abbildung 16: Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion

modifiziert nach Referenz [112].

Probenaufarbeitung:

Nach der Blutentnahme wurde das Erythrozytensediment direkt mit einer NO_2^--stabilisierenden Konservierungslösung versetzt. Dies ist notwendig, da die Halbwertszeit von Nitrit im Volllblut ca. 10min beträgt und es mit Hb unter sauerstoffreichen Bedingungen zu Nitrat bzw. unter sauerstoffarmen Bedingungen zu Nitrosyl-Hb reagiert [79; 214]. Daher wurden 400µl Erythrozytensediment sowie 100µl der Konservierungslösung in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Plasmaüberstände wurden direkt nach der Blutentnahme eingefroren und mussten nicht vorbehandelt werden.

Die Konservierungslösung bestand aus 800mmol/l Kaliumferricyanid, 100mmol/l N-Ethylmaleinimid (NEM) sowie 10% Nonidet P-40 (NP-40). Um diese Konzentrationen zu erhalten, wurden 1,32g Kaliumferricyanid und 0,065g NEM in 4,5ml destilliertem Wasser aufgelöst und anschließend mit 0,5ml NP-40 sorgfältig gemischt.

Ferricyanid stabilisiert das Nitrit, indem es mit Hämoglobin zu Methämoglobin reagiert und damit die Umwandlung von Nitrit zu Nitrat bzw. Nitrosyl-Hb verhindert. NEM blockiert Proteine durch die Alkylierung freier Thiolgruppen, so dass diese nicht mehr nitrosiert werden können. Die Wirkkraft beider Agenzen wurde durch NP-40 verstärkt, welches die Zellmembran der Erythrozyten lysiert und das Zytosol freilegt [171; 214].

Durchführung:

Am Versuchstag wurde zunächst 1h vor der Messung die Apparatur inkl. Kalt- und Warmwasserbäder vorbereitet und der NO-Analysator in Betrieb genommen, um stabile Temperatur- und Drucksollwerte zu erreichen. Die Fritte der NaOH-Falle wurde mit 1mol/l NaOH-Lösung bedeckt und die Gasflasche zur Durchströmung der Apparatur mit Helium angeschlossen. Die Proben wurden währenddessen aufgetaut und die RBC-Pellets im Verhältnis 1:1 mit 500µl eiskaltem Methanol gründlich vermischt. Dadurch wurden die in der Probe befindlichen Proteine

präzipitiert, so dass sie anschließend nach zehnminütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000rpm entfernt werden konnten [214].

Zur Bestimmung der NO-Konzentrationen der Proben, wurde eine Eichreihe vorbereitet. Hierfür wurde zunächst 69mg Nitrit in 1ml PBS gelöst, so dass sich eine Konzentration von 1mol/l NO_2^- ergab. Diese wurde anschließend dreimal im Verhältnis 1:100 mit PBS verdünnt, um die 1µmol/l Nitritstammlösung (NSL) herzustellen, mit Hilfe welcher die Standardreihe erstellt werden konnte (siehe Tab. 16).

Standard	Konzentration	Herstellung
0	0mol/l	1000µl PBS
1	50nmol/l	950µl PBS + 50µl NSL
2	100nmol/l	900µl PBS + 100µl NSL
3	150nmol/l	850µl PBS + 150µl NSL
4	200nmol/l	800µl PBS + 200µl NSL

Tabelle 16: Nitritkonzentrationen der CLD-Standardreihe

Als letzter Schritt vor der Messung wurde die Reduktionslösung hergestellt. 810mg Kaliumiodid (KI) sowie 285mg Iod (I_2) wurden in 7,5ml destilliertem Wasser und 100ml Essigsäure gelöst, um Konzentrationen von 45mmol/l KI und 10mmol/l I_2 zu erhalten. Von dieser Triiodlösung wurden mit einer gasdichten Spritze 40ml durch eine Silikonmembran in das Glasreaktionsgefäß appliziert.

Nun wurden zur Mehrfachbestimmung jeweils dreimal 100µl der Eichreihenproben in das Glasreaktionsgefäß gespritzt und die NO-Konzentration gemessen. Mit der Computersoftware wurden von jeder Konzentration die Mittelwerte der Fläche unter der Kurve (AUC, *engl. area under the curve*) berechnet und durch lineare Regression die Standardgerade gebildet (siehe Abb. 17).

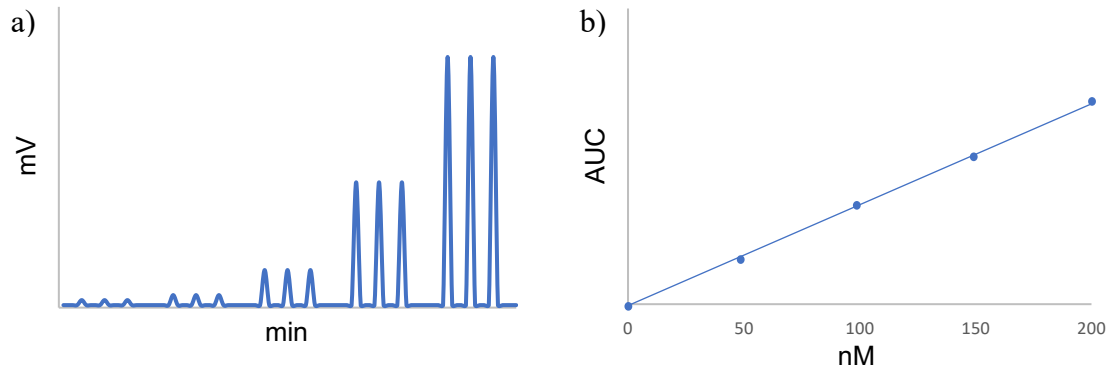


Abbildung 17: Beispielhafte NO_2^--Konzentrationen der Eichreihe (a) und Standardgerade (b)

Es folgte die ebenfalls dreifache Messung aller Proben, wobei bei jeder Probe die Reduktionslösung erneuert wurde. Um aus der AUC der CLD-Signale die Nitritkonzentration zu errechnen, wurde die AUC durch die Steigung der Standardkurve und das Probenvolumen geteilt. Da die Triiodidlösung auch aus den zugegebenen Reagenzien NO freisetzen kann, wurden

abschließend die korrigierten Nitritkonzentrationen der Konservierungslösung und des Methanols bestimmt und im entsprechenden Verhältnis von der erythrozytären Probenkonzentration abgezogen [171].

(1) $$c_{Probe} = \frac{AUC}{B \times V}$$

c Nitritkonzentration
B Steigung der Standardgerade
V Probenvolumen

(2) $$c_{korrigiert} = (c_{Probe} - (0{,}1 \times c_{Konservierungslösung} + 0{,}5 \times c_{Methanol})) \times 2{,}5$$

2.3.9 Erythrozytäre NO-Synthase, Akt und Nitrotyrosin

Zur Bestimmung der Konzentrationen der erythrozytären Stickstoffmonoxid-Synthase (RBC-NOS), der Proteinkinase Akt, von Nitrotyrosin sowie zur Messung der Aktivitätszustände von RBC-NOS und Akt wurde das Verfahren der indirekten Immunhistochemie angewendet. Die immunhistochemische Färbung folgt einem etablierten Protokoll, welches in der Literatur bereits vielfach zum Nachweis von erythrozytärer NO-Synthase sowie deren Phosphorylierungsstellen verwendet wurde [148; 169; 262; 275].

Messprinzip:

Mit der Immunhistochemie können bestimmte Proteine mit Hilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht werden. Der Nachweis beruht dabei auf der Affinität von Antikörpern zu einer spezifischen Struktur (Epitop) an der Oberfläche des zu detektierenden Antigens [232]. Bei der indirekten Methode läuft das Verfahren in zwei Schritten mit zwei verschiedenen Antikörpern ab. Zunächst wird ein primärer Antikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht, der spezifisch an das Epitop bindet. Anschließend wird der Probe ein Sekundärantikörper zugefügt, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Dieser Sekundärantikörper besitzt eine freie Biotin-Bindungsstelle, welche eine hohe Affinität für Avidin aufweist, so dass ein nahezu irreversibler Komplex geformt wird [117]. Über diesen Mechanismus wird das Enzym Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP, *engl. horseradish peroxidase*) an den Sekundärantikörper gekoppelt. Durch die Zugabe eines Farbsubstrats löst die HRP eine Reaktion aus, wodurch sich die Probe an den Stellen dunkel verfärbt, an denen das Epitop lokalisiert ist. Die Intensität der Färbung kann am Computer berechnet und das Vorhandensein des Epitops mit Hilfe einer Kontrollmessung quantifiziert werden.

Durchführung:

Für die Aufbereitung der Proben wurde im direkten Anschluss an die Blutentnahme 400µl Vollblut mit 400µl 4%igem Paraformaldehyd (PFA) versetzt, um die Phosphorylierungen für die Immunhistochemie zu fixieren [261]. Nach einer Inkubationszeit von 20min bei Raumtemperatur wurden die Proben anschließend bei 800rpm (=132,6g) für drei Minuten zentrifugiert und der Überstand, bestehend aus PFA und Plasma, abpippetiert. Es folgte die Zugabe von 800µl 0,1mol/l PBS, ein fünfminütiger Waschvorgang und eine erneute dreiminütige Zentrifugation mit

Verwerfung des Überstands. Dann wurde jeder Probe 400µl 0,1mol/l PBS zugegeben und sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Für die Durchführung der Immunhistochemie wurden jeweils 10µl der fixierten und gewaschenen Proben auf Objektträgern ausgestrichen, gleichmäßig verteilt und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Proben auf den Objektträgern mit einem Bunsenbrenner kurz (ca. 3s) hitzefixiert und die Erythrozyten am Lichtmikroskop auf Unversehrtheit und Zelldichte kontrolliert. Jeder Objektträger wurde durch einen Fettstift in ein Testfeld zur Analyse der Antigen-Antikörper-Reaktion sowie ein Kontrollfeld aufgeteilt, auf das kein Primärantikörper gegeben wurde und das zur späteren Überprüfung des Färbeergebnisses dienen sollte (siehe Abb. 18).

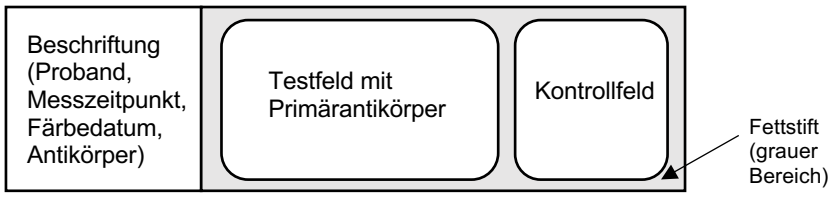


Abbildung 18: Schematische Darstellung eines Objektträgers der Immunhistochemie

Zum Reinigen und Befeuchten der Proben wurden Test- und Kontrollfeld jeweils zweimal 2min mit TBS gewaschen. Um die Permeabilität der Erythrozytenmembran zu erhöhen und damit das Eintreten der Antikörper in die Zellen zu ermöglichen, wurden die Felder mit einer 0,1%igen Trypsinlösung bedeckt und die Objektträger bei 37°C für 45min inkubiert [261]. Anschließend wurde das Trypsin abgesaugt und Wasser zum Stoppen der Reaktion auf die Felder pipettiert.

Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit TBS für jeweils 2min erfolgte eine Inkubation von 30min mit einer Lösung aus 80% Methanol, 18% Aqua-Dest. und 2% Wasserstoffperoxid (H_2O_2), um bereits vorhandene endogene Peroxidasen zu blockieren und eine spätere unverfälschte Farbreaktion sicherzustellen [231]. Wegen der hohen Flüchtigkeit von H_2O_2 wurde die Lösung jeweils unmittelbar vor ihrer Verwendung frisch angesetzt. Um freie Proteinbindestellen zu blockieren und damit die Spezifität des Primärantikörpers zu erhöhen, wurde in einem weiteren Schritt 3%ige Milchpulverlösung aufgetragen und die Proben mit dieser für 30min bei Raumtemperatur inkubiert [231].

Nach dieser Vorbereitung konnte nun der jeweilige primäre Antikörper (siehe Tab. 17) auf die Objektträger aufgetragen werden. Dafür wurde er in 0,3% Milchpulverlösung und 0,03% Tween20 verdünnt und auf das Testfeld pipettiert. Auf die Kontrollfelder wurden Milchpulverlösung und Tween20 in gleicher Konzentration, aber kein Antikörper gegeben.

Name	Bedeutung der Bindungsstelle	Verdünnung
Primärantikörper:		
Anti-eNOS/NOS Type III	Absolute Menge von RBC-NOS	1:700
Anti-phospho-eNOS(Thr495)	RBC-NOS inhibierend	1:400
Anti-phospho-eNOS(Ser114)	RBC-NOS inhibierend	1:500
Anti-phospho-eNOS(Ser1177)	RBC-NOS aktivierend	1:150
Anti-Akt1/PKBα	Absolute Menge von Akt	1:500
Anti-phospho-Akt (Ser473)	Akt aktivierend	1:500
Anti-Nitrotyrosine	Marker für RNS	1:500
Sekundärantikörper:		
Goat anti-rabbit antibody	Unspezifisch	1:400

Tabelle 17: Verwendete Antikörper der Immunhistochemie

Es folgte eine 60-minütige Inkubation mit anschließendem 2-minütigem Waschen mit TBS. Dann wurden die Felder mit 3% Normal Goat Serum bedeckt und erneut 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt diente erneut der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, diesmal allerdings für den sekundären Antikörper, wodurch seine Bindung an den Primärantikörper erhöht werden sollte. Test- und Kontrollfeld wurden zunächst für 30min mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend 2min mit TBS gespült. Das Enzym HRP wurde auf die Testfelder gegeben und für 30min inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde die Lösung mit dem Farbsubstrat 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB-Lösung) frisch angesetzt. Die Umsetzung des DAB durch die HRP wurde unter dem Mikroskop beobachtet, bis eine braune Verfärbung der Erythrozyten im Testfeld sichtbar war, welches je nach Antikörper zwischen 5min und 25min dauerte. Dann wurde die Reaktion durch einen dreimaligen 5-minütigen Waschvorgang mit TBS gestoppt und die Objektträger nacheinander für jeweils 3s in 70%-, 96%- und 100%-igem Ethanol sowie Xylol entwässert. Zum Schluss wurden die noch leicht feuchten Objektträger mit Entellan und Deckgläsern luftblasenfrei bedeckt.

Zur Auswertung wurden die Proben unter dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung mit einer angeschlossenen CCD-Kamera (*engl. charge coupled device*) fotografiert und mit der Software Image J analysiert. Zunächst wurden für jedes Bild die Graustufenwerte des Hintergrundes bestimmt, die bei 220 ± 5 densitometrischen Einheiten liegen mussten. Dazu wurde der Mittelwert von Messungen an drei verschiedenen zellfreien Stellen berechnet. Nun wurden die Grauwerte von insgesamt 50 Erythrozyten des Testfeldes bzw. 10 Erythrozyten des Kontrollfeldes bestimmt. Dafür wurden pro Testfeld mindestens vier Bilder und pro Kontrollfeld mindestens zwei Bilder ausgewertet. Die Farbintensität des Bildhintergrundes wurde zunächst von den gemessenen Werten abgezogen und dann von jeder Probe ein Mittelwert für das Test- sowie Kontrollfeld berechnet. Zum Schluss konnte die Färbeintensität einer Probe bestimmt werden, indem der Wert des Kontrollfeldes vom Wert des Testfeldes subtrahiert wurde.

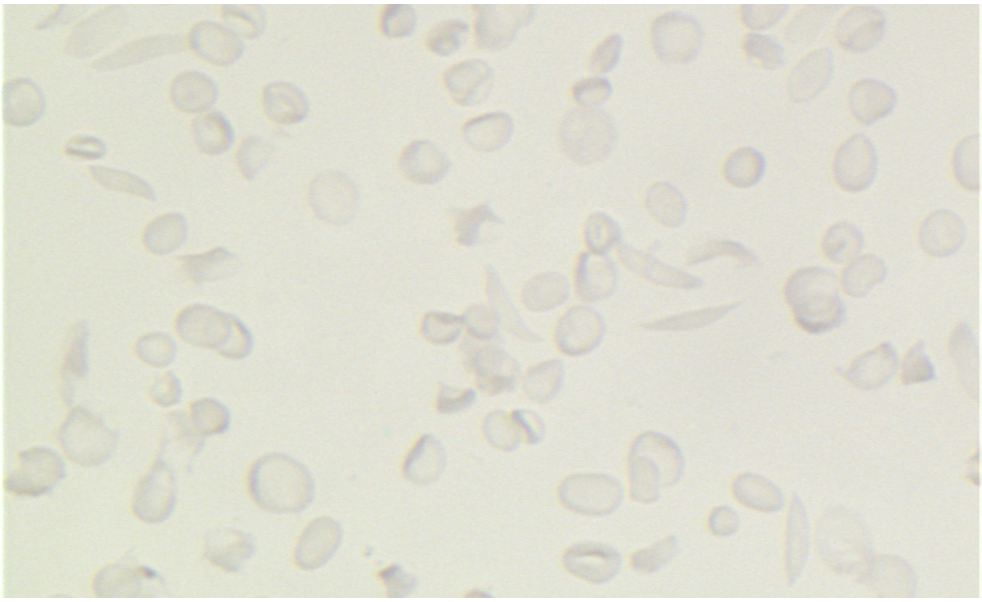
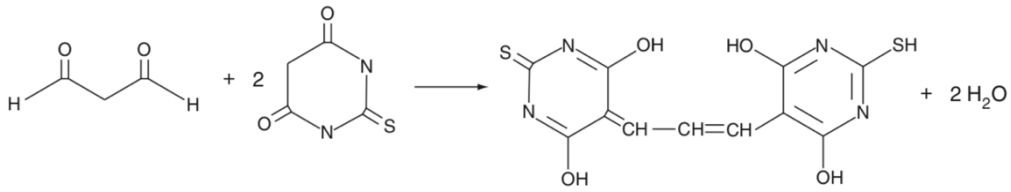


Abbildung 19: Immunhistochemische Färbung von Erythrozyten eines Sichelzellanämiepatienten
Aufnahme mit 400-facher Vergrößerung.

2.3.10 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS)

Zur Bestimmung des oxidativen Status der Erythrozyten wurde das TBARS Assay Kit verwendet, welches für die Messung von oxidativem Stress in Zelllysaten geeignet ist. Das Verfahren wurde nach den Anweisungen des mitgelieferten Versuchsprotokolls durchgeführt.

Messprinzip:
Befindet sich eine Zelle unter dem oxidativen Einfluss freier Radikale wie zum Beispiel reaktiven Sauerstoffspezies, reagieren diese mit in der Zellmembran lokalisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, was als Lipidperoxidation bezeichnet wird (siehe 1.2.3) [97]. Bei diesem chemischen Prozess entsteht als natürliches Produkt Malondialdehyd (MDA), welches unter hohen Temperaturen an Thiobarbitursäure (TBA) bindet (siehe Abb. 20). Die Konzentration des MDA-TBA Addukts kann kolorimetrisch mit einem Plate Reader bestimmt und als Indikator für stattgefundene Lipidperoxidation sowie daraus resultierenden zellulären Schaden genutzt werden [274; 300]. Auch wenn die Spezifität des TBARS Assays mitunter kontrovers diskutiert wird, gilt er als etabliertes und effizientes Verfahren zur Quantifizierung oxidativen Stresses [201; 274].



MDA TBA MDA-TBA Addukt

Abbildung 20: Verbindung von MDA und TBA bei 90-100°C

modifiziert nach TBARS Assay Kit Booklet.

Durchführung:

Nach der Blutentnahme wurde das Erythrozytenpellet in ein sauberes Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 0,1mol PBS (pH 7,4) verdünnt, um eine Konzentration von $5*10^7$ RBC/ml zu erhalten. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am Tag der Messung wurden sie dann auf Eis aufgetaut und die auf Raumtemperatur aufgewärmten mitgelieferten Reagenzien des Assays wie in Tabelle 18 beschrieben vorbereitet.

Reagenz	Vorbereitung
Thiobarbitursäure (TBA)	gebrauchsfertig
Essigsäure (CH_3COOH)	Verdünnung 1:5 in destilliertem Wasser
Natriumhydroxid (NaOH)	Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser
Malondialdehyd (MDA)	gebrauchsfertig
Natriumlaurylsulfat (SDS)	gebrauchsfertig

Tabelle 18: Vorbereitung der Reagenzien des TBARS Assay Kits

Zur Herstellung der Farbreagenz für 48 Proben wurde 1,06g TBA auf der Feinwaage abgewogen und mit 100ml Essigsäurelösung sowie 100ml Natriumhydroxidlösung in einer 250ml Laborglasflasche gemischt, bis sich die TBA komplett gelöst hatte. Die aufgetauten Proben wurden nun dreimal 40s in ein Ultraschallbad gegeben, um eine Lyse der Zellen und damit eine Freilegung des MDA herbeizuführen. Anschließend wurden 250µl des MDA Standards mit 750µl destilliertem Wasser verdünnt, um eine Konzentration von 125µmol/l zu erhalten. Für die Erstellung der Standardreihe wurden dann acht Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5ml dieser Stocklösung wie in Tabelle 19 beschrieben befüllt.

Standard	MDA 125µmol/l Stocklösung (µl)	Wasser (µl)	MDA Endkonzentration (µmol/l)
1	0	1000	0
2	20	980	2,5
3	40	960	5
4	80	920	10
5	200	800	25
6	400	600	50

Tabelle 19: Erstellung der Standardreihe zur TBARS Messung

Nun wurden die Röhrchen mit der Standard- bzw. Probennummer beschriftet und anschließend mit 100µl der jeweiligen Standard- bzw. Probenlösung befüllt. Jedem Röhrchen wurden 100µl SDS-Lösung hinzugegeben und der Inhalt gemischt. Um eine optimale Verteilung des Farbstoffs zu gewährleisten, wurden 4ml der hergestellten Farbreagenz kräftig an den unteren Röhrchenrand pipettiert. Dann wurden alle Proben und Standards aufrecht für 1h in ein 100°C heißes Wasserbad gestellt, um die Bildung des MDA-TBARS Addukts sicherzustellen. Anschließend wurden die Röhrchen direkt 10min auf Eis inkubiert und danach 10min bei 1600g und 4°C zentrifugiert. Zur kolorimetrischen Auswertung wurden aus jedem Röhrchen jeweils zweimal 150µl entnommen und in zwei Wells der im Assay Kit enthaltenen Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Farbabsorption wurde dann bei 535nm im Plate Reader gemessen und softwaregestützt am Computer ein Mittelwert eines jeden Proben- oder Standardduplikats errechnet. Die Absorption des Standards A (0µmol/l) wurde von allen anderen Messwerten abgezogen, um die korrigierte Absorption zu erhalten. Nun wurde in der Computersoftware mittels linearer Regression eine Standardkurve erstellt (siehe Abb. 21). Da die Absorption jeder Probe bekannt war, konnte deren jeweilige MDA Konzentration anhand der Regressionsgeraden mit folgender Formel bestimmt werden:

$$MDA\ (\mu\text{mol/l}) = \frac{(Korrigierte\ Absorption) - (y\text{-}Schnittpunkt\ der\ Geraden)}{Steigung}$$

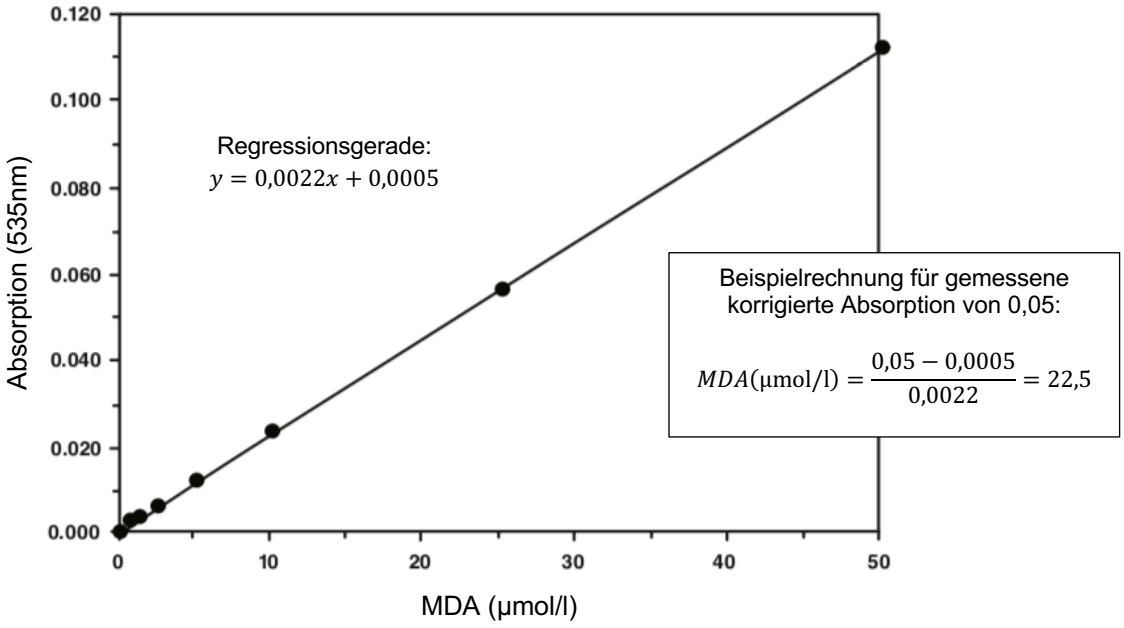


Abbildung 21: Beispielhafte TBARS Standardkurve mit MDA Konzentrationsberechnung
modifiziert nach TBARS Assay Kit Booklet.

2.3.11 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Das Ausmaß des oxidativen und nitrosativen Stresses, dem die Erythrozyten in Form von freien Radikalen ausgesetzt sind, wurde mit Hilfe des OxiSelect In Vitro ROS/RNS Assay Kits bestimmt. Das Verfahren basiert auf dem fluorometrischen Nachweis reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) und ist für die Messung von Zelllysaten geeignet. Im Kit enthalten ist ein Versuchsprotokoll, nach dem alle Arbeitsschritte durchgeführt wurden.

Messprinzip:

Freie Radikale in Form von ROS entstehen in den Zellen physiologischerweise durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Dabei wird zunächst Superoxid ($O_2^{-\bullet}$) gebildet, welches enzymatisch zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgesetzt wird. Kann H_2O_2 anschließend nicht in ausreichendem Maße durch zelluläre Antioxidantien eliminiert werden, entstehen u.a. hochreaktive Hydroxyl-Radikale ($HO^{\bullet}$), die oxidativen Stress induzieren und verschiedenste Zellmoleküle schädigen (siehe 1.2.3) [18; 202].

$$O_2 \rightarrow {O_2}^{-*} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^*$$

O_2^{-*}	Superoxidanion-Radikal
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
OH^*	Hydroxyl-Radikal

Der vorliegende Assay beinhaltet die inaktivierte fluorogene Reagenz Dichlorodihydrofluorescin-DiOxyQ (DCFH-DiOxyQ), die spezifische Bindungsstellen für ROS und RNS aufweist. In einem ersten Schritt wird die Inaktivierung von DCFH-DiOxyQ aufgehoben und DCFH-DiOxy entsteht (siehe Abb. 22). Anschließend wird durch eine Stabilisierungslösung hochreaktives DCFH gebildet, das bei Anwesenheit von H_2O_2 sofort oxidiert. Hierdurch entsteht DCF und es kommt zur Fluoreszenz. Die Lichtintensität ist dann proportional zur ROS/RNS Aktivität in der untersuchten Probe und kann im Fluoreszenz Plate Reader gemessen werden. Die ROS/RNS-Konzentration wird zum Schluss mit Hilfe einer H_2O_2-Standardreihe bestimmt [30; 40; 136].

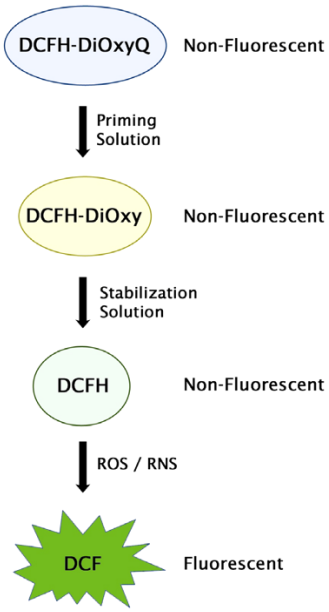


Abbildung 22: Messprinzip des ROS/RNS Assays

Modifiziert nach OxiSelect In Vitro ROS/RNS Assay Kit Booklet.

Durchführung:

Nach der Blutentnahme wurde das Erythrozytensediment mit 0.1mol PBS (pH 7,4) verdünnt, so dass sich eine Konzentration von $2*10^7$ RBC/ml ergab. Die Suspension wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Versuchstag bei -80°C gelagert. Vor der Durchführung des Assays wurden die Proben auf Eis aufgetaut und die im Kit mitgelieferten Reagenzien wie in Tabelle 20 beschrieben vorbereitet.

Reagenz:	Vorbereitung:
Primingreagenz	gebrauchsfertig
Stabilisierungslösungskonzentrat	Verdünnung 1:10 in destilliertem Wasser
Katalysator	Verdünnung 1:250 in PBS
8,821mol/l H_2O_2	gebrauchsfertig
1mmol/l DCF-DiOxyQ	s.u.

Tabelle 20: Vorbereitung der Reagenzien des ROS/RNS Assays

Da Licht eine Autooxidation der DCF-DiOxyQ-Lösung bewirken kann, wurde die Reagenz lichtgeschützt in mit Aluminiumfolie ummantelten Röhrchen bearbeitet. Zunächst wurde sie im Verhältnis 1:5 mit der Primingreagenz verdünnt und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Verdünnung im Verhältnis 1:40 mit der Stabilisierungslösung und anschließender Homogenisierung auf dem Schüttelgerät. Nun wurden die aufgetauten Proben bei 10000g für 5min zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen.

Gleichzeitig wurde eine H_2O_2 Standardreihe vorbereitet. Dafür wurde 8,821mol/l H_2O_2 im Verhältnis 1:4400 in Aqua dest. verdünnt, um eine Konzentration von 2mmol/l zu erhalten. Anschließend wurden die Standards durch Verdünnung mit PBS erstellt (siehe Tab. 21).

Standard	Herstellung	H_2O_2-Konzentration (µmol/l)
1	10µl H_2O_2 (2mmol/l) + 990µl PBS	20
2	500µl Standard 1 + 500µl PBS	10
3	500µl Standard 2 + 500µl PBS	5
4	500µl Standard 3 + 500µl PBS	2,5
5	500µl Standard 4 + 500µl PBS	1,25
6	500µl Standard 5 + 500µl PBS	0,625
7	500µl Standard 6 + 500µl PBS	0,313
8	500µl Standard 7 + 500µl PBS	0,156
9	500µl Standard 8 + 500µl PBS	0,078
10	500µl Standard 9 + 500µl PBS	0,039
11	1000µl PBS	0

Tabelle 21: H_2O_2-Standardreihe des ROS/RNS Assays

Nun wurden 50µl einer jeden Probe bzw. Standards in jeweils zwei Wells einer Mikrotiterplatte gegeben, um jede Messung doppelt ausführen zu können. Dann wurde jedem Well 50µl des Katalysators hinzugefügt, der Inhalt gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 100µl DCFH-Lösung und die Inkubation der abgedeckten lichtgeschützten Mikrotiterplatte für 30min.

Abschließend wurden die Fluoreszenzen im Plate Reader bei einer Anregung von 480nm und einer Emission von 530nm gemessen. Am Computer wurden die Mittelwerte der Doppelmessungen gebildet und eine Standardkurve erstellt, in der die Konzentrationen der Standards gegen Relative Fluorescence Units (RFU) aufgetragen wurden (siehe Abb. 23). Abschließend konnten in der Plate Reader Software die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

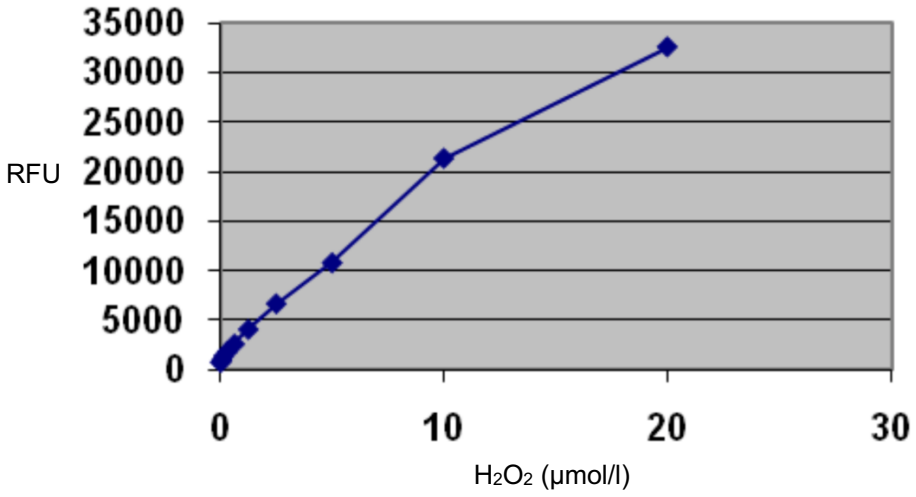


Abbildung 23: Beispielhafte Standardkurve des ROS/RNS Assays

Modifiziert nach OxiSelect In Vitro ROS/RNS Assay Kit Booklet.

2.3.12 Totale Antioxidative Kapazität

Die Fähigkeit der Erythrozyten freie Radikale zu inaktivieren und damit oxidativen Stress zu reduzieren wurde mit dem Total Antioxidant Capacity Assay Kit bestimmt. Das Verfahren wurde gemäß den Anweisungen des mitgelieferten Versuchsprotokolls durchgeführt.

Messprinzip:

Antioxidantien sind Stoffe, die durch verschiedene Wirkmechanismen Zellsubstrate vor einem oxidativen Angriff durch zum Beispiel ROS schützen und damit Zellschäden abwenden [227]. Es gibt enzymatische Antioxidantien wie die Katalase, Peroxidase oder Glutathion-Reduktase und nicht-enzymatische Antioxidantien, zu denen sowohl Proteine wie Albumin, Caeruloplasmin oder Transferrin, als auch kleinmolekulare Stoffe wie Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherole (Vitamin E), Glutathion oder Harnsäure gezählt werden [133; 202].

Mit dem vorliegenden Assay Kit ist es möglich, die kumulative nicht-enzymatische antioxidative Kapazität einer Zellprobe zu erfassen und kolorimetrisch als sogenannte Trolox-Äquivalente zu messen. Trolox ist ein Derivat des Vitamin E und dient als Referenzsubstrat, um die Vielzahl antioxidativer Stoffe, die in Wirkstärke sowie -mechanismus variieren, zu standardisieren [119]. Das Testprinzip des Assays basiert dabei auf der messbaren Reaktion von Cu^{2+}-Kupferionen, die sowohl durch kleinmolekulare als auch proteinäre Antioxidantien zu Cu^{+} reduziert werden. Die Cu^{+}-Ionen formen einen Chelatkomplex mit einer mitgelieferten Farbreagenz, was zu unterschiedlich starken Lichtabsorptionen führt. Diese kann abschließend mit einem Plate Reader bestimmt werden.

Durchführung:

Nach der Blutentnahme wurden die Erythrozytenpellets in einem Mikroreaktionsgefäß mit 0,1mol PBS im Verhältnis 1:1000 verdünnt, um eine Konzentration von $1*10^7$ RBC/ml zu erhalten. Im direkten Anschluss wurden die Proben in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Am Versuchstag wurden die Proben auf Eis aufgetaut und anschließend erneut im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Die im Assay Kit mitgelieferten Reagenzien wurden auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Trolox Standardlösung vorbereitet (siehe Tab. 22).

Reagenz	Vorbereitung
Verdünnungslösung	gebrauchsfertig
Cu^{2+}-Reagenz	gebrauchsfertig
Trolox Standard	Lösung in 20µl DMSO und Durchmischung auf dem Reagenzschüttler. Anschließend Verdünnung 1:50 in Aqua dest.

Tabelle 22: Mitgelieferte Reagenzien des TAK Assay Kits

Mit der so hergestellten 1mmol/l Trolox Standardlösung konnte nun die Standardreihe erstellt werden (siehe Tab. 23).

Röhrchen	Trolox Standardlösung (µl)	Aqua dest. (µl)	Trolox Endkonzentration (nmol/100µl)
1	0	300	0
2	12	288	4
3	24	276	8
4	36	264	12
5	48	252	16
6	60	240	20

Tabelle 23: Erstellung der Standardreihe zur TAK Messung

Anschließend wurde die CU^{2+}-Reagenz mit der Verdünnungslösung 1:50 verdünnt und vermischt, um die CU^{2+}-Arbeitslösung zu erhalten. Auf einer Mikrotiterplatte wurde nun in jeweils zwei Wells entweder 100µl der Standardlösungen oder der verdünnten Proben gegeben, um alle Werte doppelt messen zu können. Dann wurden in jedem Well 100µl der CU^{2+}-Arbeitslösung gemischt und die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 90min lichtgeschützt auf einem Horizontal-Schüttelgerät bei 100rpm inkubiert.

Die Kolometrie wurde abschließend im Plate Reader bei 570nm durchgeführt. Anhand der Ergebnisse der Standardreihe konnte softwaregestützt eine Standardkurve erstellt werden (siehe Abb. 24). Dafür wurde zunächst die Absorption des Nullstandards von allen Messwerten subtrahiert, um die korrigierte Absorption zu erhalten. Von allen korrigierten Messwertduplikaten wurde nun ein Mittelwert gebildet und mit Hilfe linearer Regression aus der Standardreihe die Trolox Standardkurve erstellt. Die verdünnungsunabhängige Totale Antioxidative Kapazität der Proben konnte dann mit folgender Formel berechnet werden:

$$TAK_{Probe} = \left(\frac{Ts}{Sv}\right) \times D$$

Ts	Troloxkonzentration in der verdünnten Probe (aus Standardkurve berechnet)
Sv	Probenvolumen im Well (= 100µl)
D	Probenverdünnungsfaktor (= 10.000)

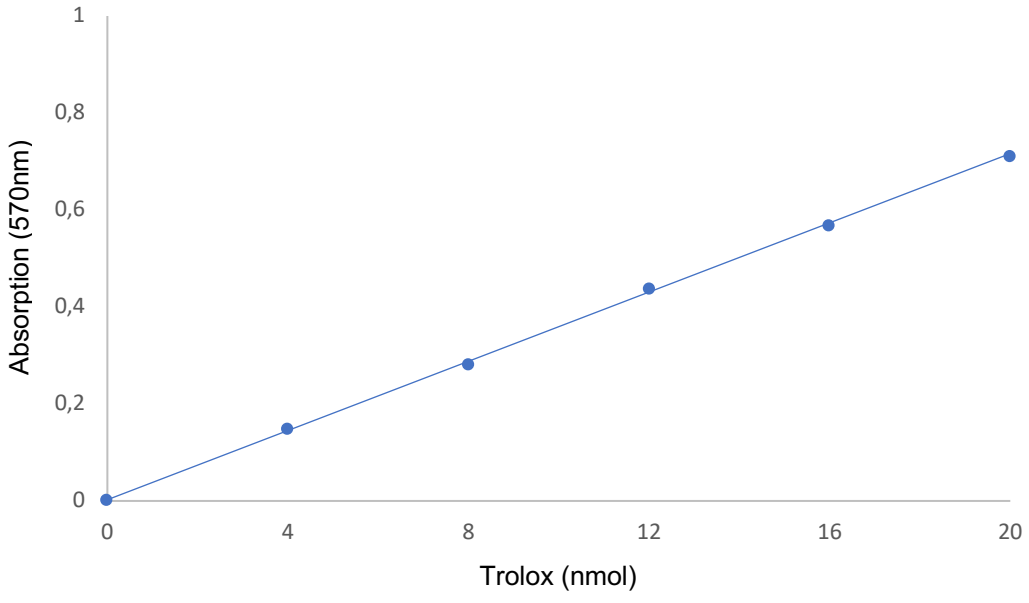


Abbildung 24: Beispielhafte Trolox Standard Kurve

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und grafische Darstellung der Daten wurden mit der Statistiksoftware GraphPad Prism erstellt. Dabei wurden alle Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Die Daten wurden zunächst mittels D'Agostino-Pearson-Test auf Normalverteilung überprüft. Anschließend wurden verschiedene Signifikanztests durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu detektieren. Es wurden die Daten der beiden Interventionsgruppen (SCA- vs. AA-Gruppe), in Ruhe und nach der Belastung (pre vs. post) sowie zwischen akutem und chronischem Training (Zeitpunkt T0 vs. T1) verglichen.

Die Leistungsparameter zwischen SCA- und AA-Gruppe wurden mittels Mann-Whitney-U-Test geprüft, der als Rangsummentest für nicht normalverteilte Daten benutzt werden kann [99]. Für die restlichen Parameter wurden mehrfache Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Ergaben sich hierbei signifikanten Ergebnisse, wurden diese mit Bonferroni Post-Hoc-Tests untersucht, um zu erkennen, zwischen welchen Gruppen sich die Unterschiede befanden. Da dieselben Daten mehrfach getestet wurden, wurde das Signifikanzniveau mit der Bonferroni Methode entsprechend der Gruppenzahl adjustiert, damit eine Alphafehler-Kumulierung vermieden werden konnte [125].

Für die beschriebenen Tests wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$) gewählt und signifikante Unterschiede mit einem Symbol (*, #) gekennzeichnet. Weiterhin wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 1% ($p < 0,01$) mit zwei Symbolen (**, ##) sowie von unter 0,1% ($p < 0,001$) mit drei Symbolen (***, ###) markiert.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse aller erhobenen spiroergometrischen, hämatologischen und hämorheologischen Parameter dargestellt. Es erfolgt dabei eine Einteilung in akute Effekte des Eingangstests (siehe 3.1) sowie chronische Effekte des sechswöchigen Ausdauertrainings (siehe 3.2). Auf Grund der hohen Anzahl unterschiedlicher Blutparameter und der Begrenztheit des Probenmaterials wurden einige Messungen priorisiert, um möglichst viele relevante Ergebnisse zu gewinnen. Daher sind einige Parameter nur für die Messung entweder akuter oder chronischer Effekte erhoben worden.

3.1 Akute Effekte

Zunächst werden die Unterschiede im spiroergometrischen Eingangstest zum Zeitpunkt T0 zwischen der SCA- und AA-Gruppe beschrieben. Anschließend werden die akuten Effekte des Eingangstests auf die Blutparameter, also die Veränderung zwischen der Messung in Ruhe vor sowie nach der akuten Belastung (zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1), dargestellt und Unterschiede zwischen SCA- und AA-Gruppe aufgezeigt.

3.1.1 Leistungsparameter und Laktat

Zum Vergleich der Leistungsfähigkeit zwischen den Sichelzellanämiepatienten und den gesunden Kontrollen wurden drei Parameter der spiroergometrischen Messung herangezogen. Diese waren die Sauerstoffaufnahme zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1, die vergangene Zeit vom Start der Belastung bis zum Erreichen der VT1 und die erbrachte Leistung zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1. Weiterhin wurden die Konzentrationen von Laktat vor und nach der Spiroergometrie bestimmt.

In allen drei spiroergometrisch bestimmten Leistungsparametern wies die SCA-Gruppe signifikant niedrigere Werte als die AA-Gruppe auf. Zum Zeitpunkt der VT1 lag die Sauerstoffaufnahme der SCA-Gruppe signifikant unter der der AA-Gruppe (p = 0,03, siehe Abb. 25a). Die VT1 wurde von der SCA-Gruppe signifikant früher erreicht (p = 0,02, siehe Abb. 25b) und die erbrachte Leistung der SCA-Gruppe bei Erreichen der VT1 lag ebenfalls signifikant unter der der AA-Gruppe (p = 0,02, siehe Abb. 25c).

Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich bei der Messung der Laktatkonzentrationen (siehe Tab. 24).

	AA		**SCA**	
Zeitpunkt	Ruhe	VT1	Ruhe	VT1
Laktat (mmol)	2.69 ± 2.06	3.08 ± 1.44	2.02 ± 0.93	2.48 ± 0.94

Tabelle 24: Laktatmessung im Eingangstest von SCA- und AA-Gruppe

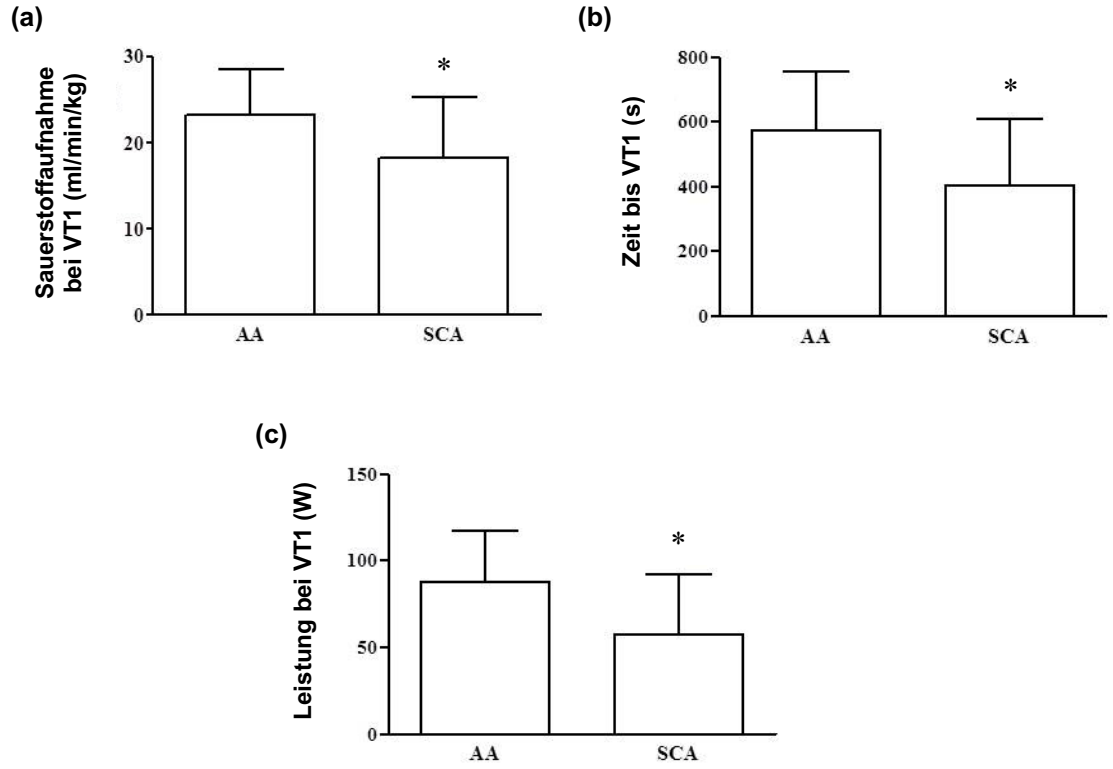


Abbildung 25: Leistungsparameter im Eingangstest von SCA- und AA-Gruppe

Signifikant erniedrigte Leistungsfähigkeit von Sichelzellanämiepatienten (SCA) im Vergleich zu Gesunden (AA) gemessen anhand der Parameter (a) Sauerstoffaufnahme zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1, (b) vergangene Zeit vom Start der Belastung bis zum Erreichen der VT1 und (c) erbrachte Leistung zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1.

3.1.2 Blutbild

Die akuten Auswirkungen des Eingangstest auf das Blutbild von SCA- und AA-Gruppe wurden anhand der hämatologischen Parameter Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Volumen eines Erythrozyten (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt eines Erythrozyten (MCH) und mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) gemessen.

Sowohl bei der Messung in Ruhe (p^*) als auch nach Erreichen der VT1 ($p^{\#}$) zeigten sich signifikante Unterschiede der hämatologischen Parameter des Blutbildes zwischen der SCA- und der AA-Gruppe (siehe Tab. 25). Die SCA-Gruppe wies im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedrigere Werte der Erythrozytenzahl ($p^* = 0{,}001$ bzw. $p^{\#} < 0{,}001$), des Hämoglobins ($p^* < 0{,}001$ bzw. $p^{\#} < 0{,}001$) und des Hämatokrits ($p^* < 0{,}001$ bzw. $p^{\#} < 0{,}001$) auf. Erhöhte Werte der SCA-Gruppe fanden sich dagegen bei der Leukozytenzahl ($p^* = 0{,}03$ bzw. $p^{\#} = 0{,}03$), dem MCH-Wert ($p^* = 0{,}02$ bzw. $p^{\#} = 0{,}01$) sowie dem MCHC-Wert ($p^* = 0{,}02$ bzw. $p^{\#} = 0{,}03$).

Die akute Belastung des Eingangstests verursachte keine signifikanten Veränderungen der Werte des Blutbildes. Weder innerhalb der AA-Gruppe noch innerhalb der SCA-Gruppe zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Messung in Ruhe und nach Erreichen der VT1.

	AA		SCA	
Zeitpunkt	Ruhe	VT1	Ruhe	VT1
WBC [*10^3/µl]	7.3 ± 2.3	6.9 ± 2.5	10.5 ± 2.7 *	9.9 ± 3.3 #
RBC [*10^6/µl]	5.5 ± 0.9	5.3 ± 0.9	3.1 ± 1.4 **	2.7 ± 1.3 ###
PLT [*10^3/µl]	199.9 ± 82.2	210.6 ± 104.8	88.9 ± 58.6	175.9 ± 194.8
Hb [g/dl]	15.2 ± 1.5	15.3 ± 1.3	10.3 ± 2.8 ***	9.7 ± 2.4 ###
Hct [%]	46.4 ± 5.9	44.5 ± 7.5	27.0 ± 7.7 ***	24.1 ± 8.4 ###
MCV [fl]	84.7 ± 5.5	84.3 ± 5.8	91.3 ± 12.8	91.6 ± 12.9
MCH [pg]	27.9 ± 2.6	29.6 ± 4.8	35.5 ± 9.0 *	38.3 ± 8.9 #
MCHC [g/dl]	32.9 ± 3.1	33.5 ± 9.5	38.4 ± 4.4 *	41.4 ± 6.2 #

Tabelle 25: Akute Veränderungen der Parameter des Blutbildes von SCA- und AA-Gruppe

Keine signifikanten Veränderungen der Blutparameter durch die akute Belastung innerhalb der SCA- und AA-Gruppe. Zwischen SCA- und AA-Gruppe signifikante Unterschiede sowohl bei der Blutentnahme vor (*) als auch nach (#) der Belastung. WBC = Leukozytenzahl, RBC = Erythrozytenzahl, PLT = Thrombozytenzahl, Hb = Hämoglobin, Hct = Hämatokrit, MCV = Mittleres Volumen eines Erythrozyten, MCH = Mittlerer Hämoglobingehalt eines Erythrozyten, MCHC = Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten.

3.1.3 Freies Hämoglobin

Die Konzentration des freien Hämoglobins im Plasma von Sichelzellanämiepatienten und gesunden Kontrollen wurde mittels Immunoassay bestimmt. Sie war in der SCA-Gruppe sowohl in Ruhe vor (p^* = 0,02) als auch nach der akuten Belastung bei Erreichen der VT1 ($p^{\#}$ = 0,04) signifikant höher als in der AA-Gruppe (siehe Abb. 26).

Innerhalb der Gruppen zeigten sich zwischen der Messung in Ruhe und nach Erreichen der VT1 jedoch keine signifikanten Unterschiede, d.h. nach Absolvierung der Sportintervention kam es zu keiner signifikanten Zunahme des freien Hämoglobins.

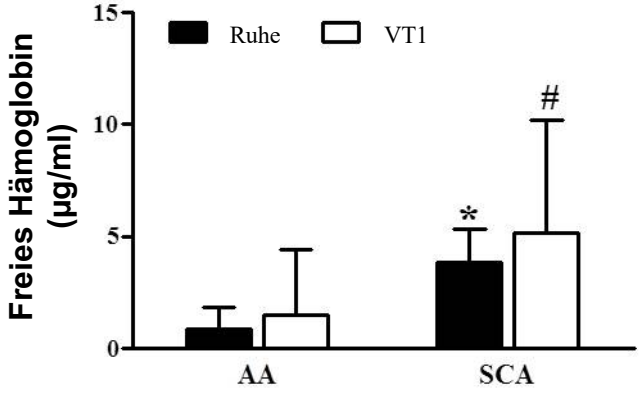


Abbildung 26: Akute Veränderungen des freien Hämoglobins im Plasma von SCA- und AA-Gruppe

Signifikant höhere Konzentrationen von freiem Hb der SCA-Gruppe vor (*) und nach (#) dem Eingangstest im Vergleich zur AA-Gruppe, aber keine signifikante Veränderung durch die akute Belastung.

3.1.4 Erythrozytäre Verformbarkeit

Zur Messung der Verformbarkeit der Erythrozyten von SCA-Patienten und gesunden Probanden wurde das Verfahren der Ektazytometrie angewendet und der Elongationsindex bei neun verschiedenen Scherstressen berechnet.

Die SCA-Gruppe wies dabei im Vergleich zur AA-Gruppe eine deutlich verringerte erythrozytäre Verformbarkeit auf (siehe Abb. 27). Signifikant niedrigere Werte des Elongationsindexes zeigten sich für alle Messungen bei Scherstressen von 1,08Pa bis 50Pa (jeweils $p < 0{,}001$). Lediglich bei minimalen Scherstress von 0,3Pa zeigte die SCA-Gruppe eine höhere erythrozytäre Verformbarkeit als die AA-Gruppe ($p = 0{,}008$).

Die akute Belastung hatte keinen direkten Effekt auf die Verformbarkeit der Erythrozyten. Weder innerhalb der SCA- noch der AA-Gruppe konnten signifikante Unterschiede zwischen den Messungen vor und nach der Spiroergometrie detektiert werden.

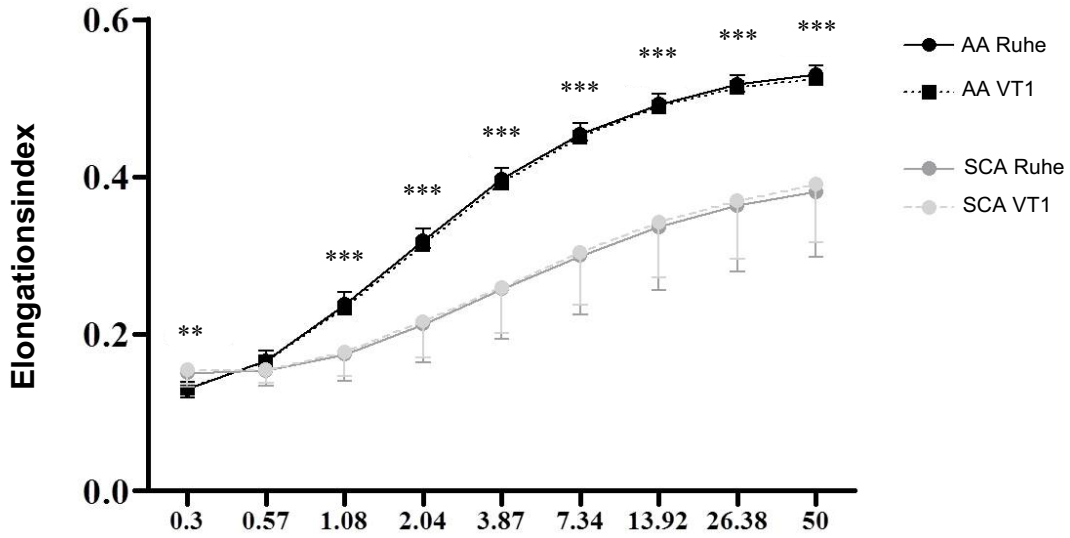


Abbildung 27: Akute Veränderungen der erythrozytären Verformbarkeit von SCA- und AA-Gruppe
Signifikant niedrigere Verformbarkeit der Erythrozyten der SCA-Gruppe im Vergleich zur AA-Gruppe bei Scherstressen ab 1,08Pa sowie höhere Verformbarkeit der SCA-Gruppe bei 0,3Pa. Keine signifikanten Veränderungen durch die akute Belastung innerhalb der Gruppen.

3.1.5 Erythrozytäres NO

Zur Messung des erythrozytären Stickstoffmonoxids wurden die Konzentrationen von Nitrit/RSNO/Fe-NO in den Erythrozyten mit Hilfe der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion bestimmt. Die SCA-Gruppe wies hierbei sowohl in Ruhe ($p^{*1} = 0{,}04$) als auch nach der Belastung ($p^{*2} = 0{,}04$) signifikant höhere Konzentrationen von Nitrit/RSNO/Fe-NO auf als die AA-Gruppe (siehe Abb. 28).

Innerhalb der SCA-Gruppe zeigte sich außerdem eine Veränderung durch die akute Belastung des Eingangstests. Die erythrozytäre Konzentration von Nitrit/RSNO/Fe-NO nahm nach Erreichen der VT1 im Vergleich zu den in Ruhe gemessenen Werten signifikant ab ($p^{\#} = 0{,}03$). Die Kontrollgruppe wies diesen Effekt nicht auf.

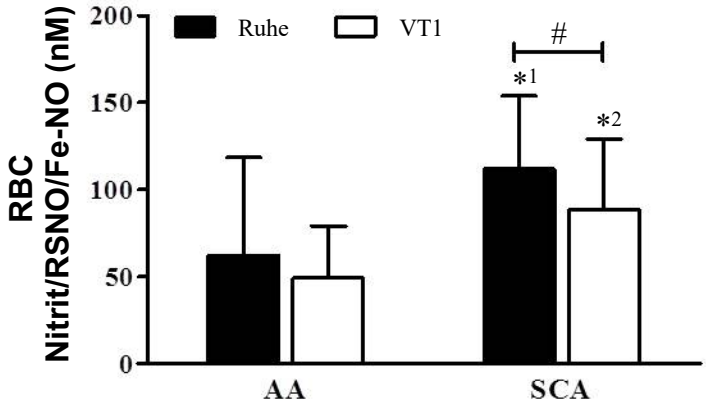


Abbildung 28: Akute Veränderungen des erythrozytären NO von SCA- und AA-Gruppe

In der SCA-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen von RBC Nitrit/RSNO/Fe-NO vor (*[1]) und nach (*[2]) dem Eingangstest im Vergleich zur AA-Gruppe. Innerhalb der SCA-Gruppe signifikante Abnahme der RBC Nitrit/RSNO/Fe-NO Konzentrationen durch die akute Belastung (#).

3.1.6 Erythrozytäre NO-Synthase

Die Bestimmung der erythrozytären NO-Produktion wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen von total RBC-NOS durchgeführt. Hierbei zeigten sich weder zwischen der SCA- und der AA-Gruppe ein signifikanter Unterschied, noch veränderten sich die Werte innerhalb der Gruppen durch den Eingangstest (siehe Abb. 29a).

Die Aktivität der erythrozytären NO-Synthase wurde ebenfalls immunhistochemisch durch Färbungen der Phosphorylierungsstellen Serin1177, Serin114 und Threonin495 gemessen. Zwischen der SCA-Gruppe und der Kontrollgruppe zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 29b-d).

Innerhalb der SCA-Gruppe konnte durch die akute Belastung jedoch eine signifikante Reduktion der aktivierenden Phosphorylierungsstelle Serin1177 ($p = 0{,}04$; siehe Abb. 29b) detektiert werden. Kein Effekt durch die Intervention zeigte sich dagegen an den inhibitorischen Phosphorylierungsstellen Serin114 sowie Threonin495 (siehe Abb. 29c und 29d).

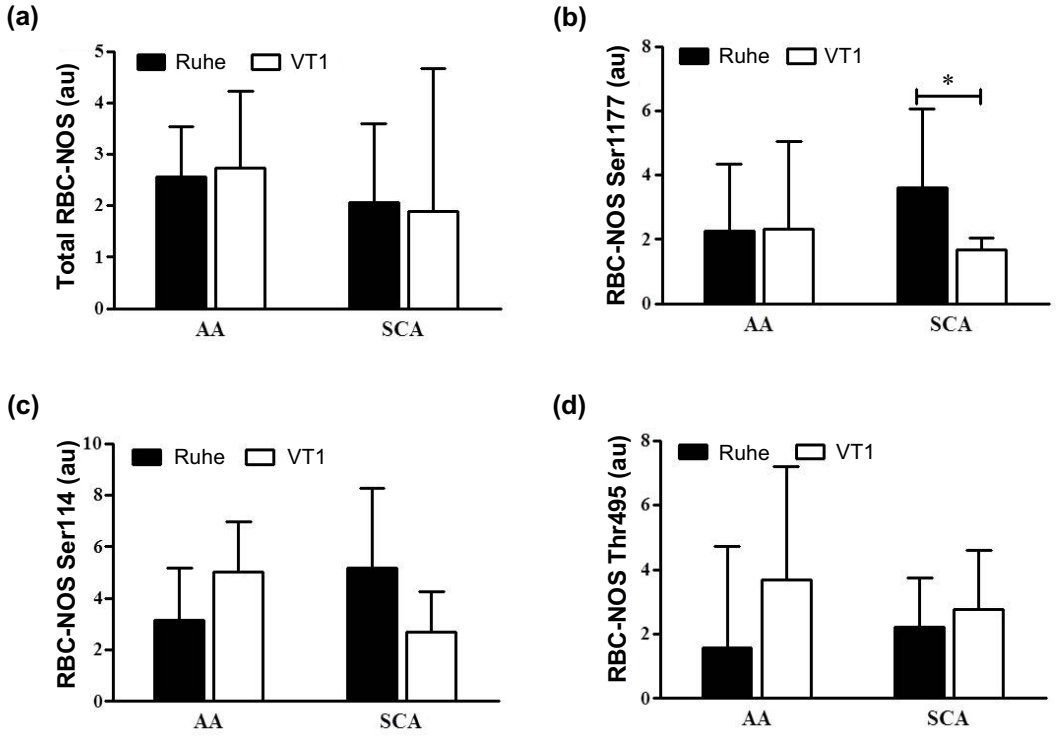


Abbildung 29: Akute Veränderungen der erythrozytären NO-Produktion und der Aktivität der erythrozytären NO-Synthase von SCA- und AA-Gruppe

Keine signifikanten Unterschiede zwischen der SCA- und der AA-Gruppe weder der erythrozytären NO-Produktion, gemessen anhand der Färbung von Total RBC-NOS (a), noch der NO-Synthase Aktivität, gemessen anhand der Färbungen der inhibitorischen Phosphorylierungsstellen Serin114 (c) und Threonin495 (d). In der SCA-Gruppe signifikante Abnahme der Aktivität der NO-Synthase durch die akute Belastung, gemessen anhand der Färbung der aktivierenden Phosphorylierungsstelle Serin1177 (b).

3.1.7 Oxidativer Stress

Zur Messung des oxidativen Stresses der Erythrozyten durch den Eingangstest wurden die akuten Veränderungen der Lipidperoxidation (gemessen in TBARS), der freien Radikale (gemessen in freien ROS/RNS) und der totalen antioxidativen Kapazität (gemessen in Trolox) mit Hilfe von Immunoassays untersucht.

Im Vergleich zur AA-Gruppe konnten in der SCA-Gruppe sowohl vor ($p^* < 0{,}001$) als auch nach dem Eingangstest ($p^{\#} < 0{,}001$) signifikant höhere Konzentrationen von freien Radikalen detektiert werden (siehe Abb. 30a). Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich bei der Lipidperoxidation (siehe Abb. 30b) und der totalen antioxidativen Kapazität (siehe Abb. 30c).

Die akute Belastung hatte keine direkten Auswirkungen auf den oxidativen Status der beiden Gruppen. Weder innerhalb der SCA- noch innerhalb der AA-Gruppe zeigten sich signifikante Veränderungen der Werte vor und nach dem Eingangstest.

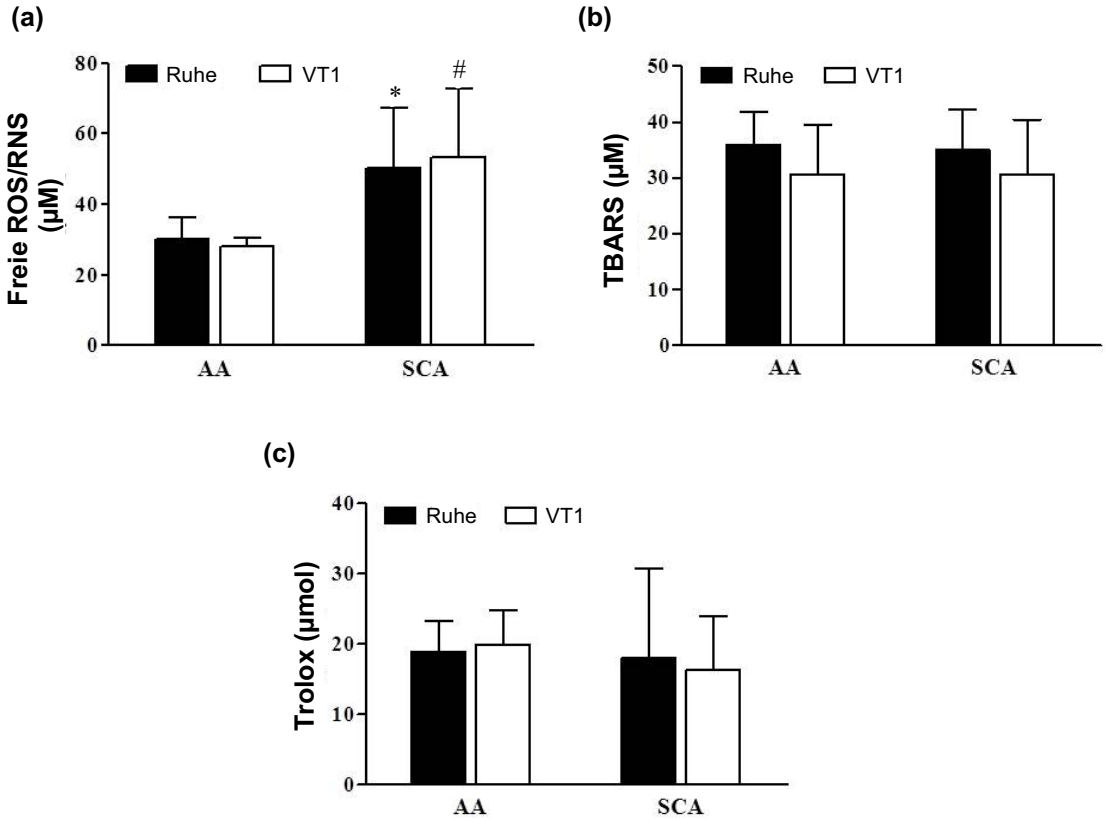


Abbildung 30: Akute Veränderungen des oxidativen Stresses von SCA- und AA-Gruppe

Im Vergleich zur AA-Gruppe signifikant höhere Konzentrationen von freien Radikalen, gemessen in freien ROS/RNS (a), in der SCA-Gruppe vor (*) und nach (#) der akuten Belastung. Keine signifikanten Unterschiede der Lipidperoxidation, gemessen in TBARS (b) und der totalen antioxidativen Kapazität, gemessen in Trolox (c), zwischen den Gruppen. Innerhalb der SCA- und AA-Gruppe keine signifikanten Veränderungen durch die akute Belastung.

3.2 Chronische Effekte

Im Folgenden werden die chronischen Auswirkungen des sechswöchigen Ausdauertrainings auf die SCA-Gruppe dargestellt. Für die spiroergometrischen Parameter der Leitungsmessung werden dafür die Ergebnisse des Eingangstest zum Zeitpunkt T0 mit dem Ausgangstest zum Zeitpunkt T1 verglichen. Für die weiteren Parameter erfolgt ebenfalls ein Vergleich der Werte der Blutentnahmen jeweils in Ruhe vor den Spiroergometrien zum Zeitpunkt T0 und T1.

3.2.1 Leistungsparameter

Zur Messung der Auswirkungen des sechswöchigen Ausdauertrainings auf die Leistungsfähigkeit der SCA-Probanden wurden die Parameter Sauerstoffaufnahme zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1 (siehe Abb. 31a), die vergangene Zeit vom Start der Belastung bis zum Erreichen der VT1 (siehe Abb. 31b) und die Leistung zum Zeitpunkt des Erreichens der VT1 (siehe Abb. 31c) erhoben.

Die SCA-Probanden zeigten in allen drei Parametern eine Zunahme der Werte nach dem sechswöchigen Training, wie zum Beispiel eine Erhöhung der Leistung von 44,17W auf 49,55W, allerdings war keine dieser Verbesserungen statistisch signifikant.

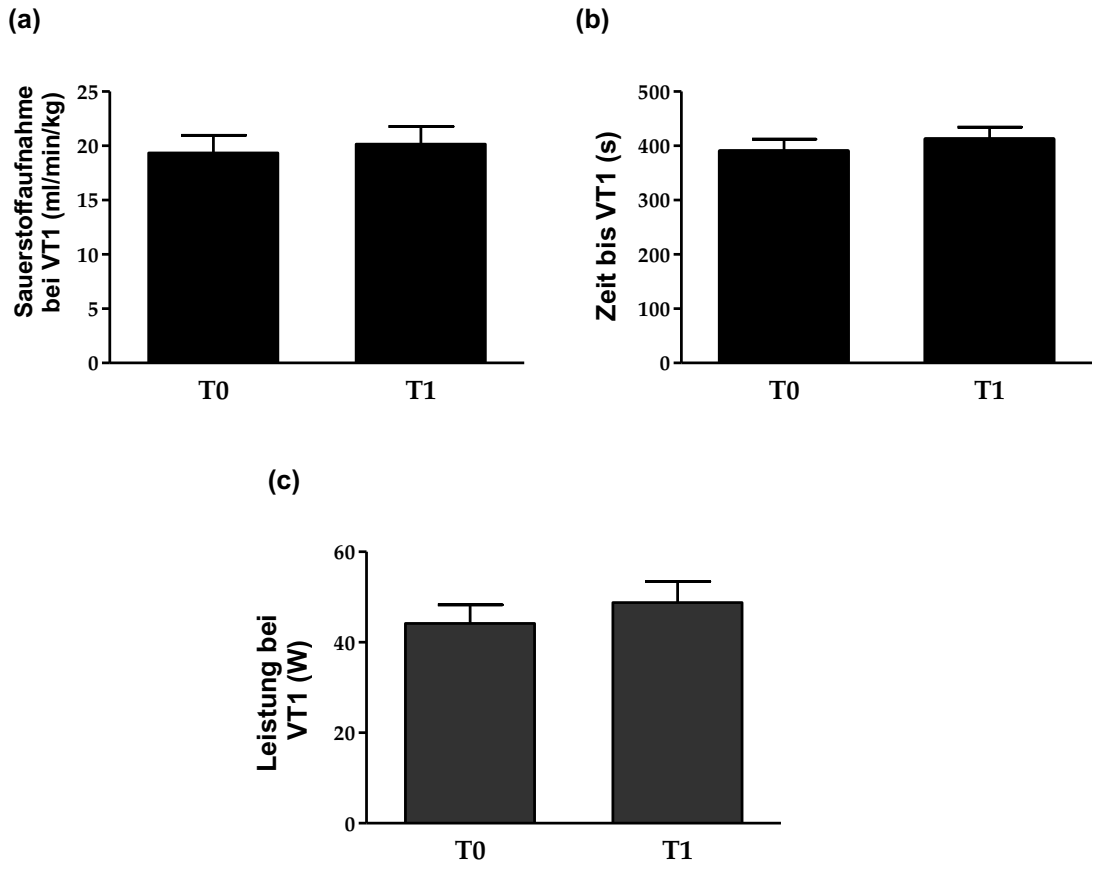


Abbildung 31: Chronische Veränderungen der Leistungsparameter der SCA-Gruppe

Nicht-signifikanter Anstieg (a) der Sauerstoffaufnahme, (b) der vergangenen Zeit sowie (c) der erbrachten Leistung bei Erreichen der VT1 nach der sechswöchigen Sportintervention.

3.2.2 Ventilatorische Effizienz

Für die Messung der Auswirkungen des sechswöchigen Ausdauertrainings auf die ventilatorische Effizienz wurden die Atemäquivalente für Sauerstoff (VE/VO_2) und Kohlendioxid (VE/VCO_2) berechnet. Im Vergleich zum Eingangstest zeigten die SCA-Probanden dabei im Ausgangstest sowohl eine signifikante Reduktion des O_2-Verbrauchs ($p = 0{,}02$, siehe Abb. 32a) als auch der CO_2-Produktion ($p = 0{,}02$, siehe Abb. 32b). Dieser Trainingseffekt beschreibt die Veränderungen der gesamten Messung zwischen den Zeitpunkten T0 und T1.

Abgesehen davon zeigten sich auch innerhalb der Spiroergometrien zwischen den einzelnen Belastungsstufen (Steps) signifikant unterschiedliche Werte der Atemäquivalente VE/VO_2 ($p < 0{,}001$, siehe Abb. 32a) und VE/VCO_2 ($p < 0{,}001$, siehe Abb. 32b). Die Steps bezeichnen dabei die Erhöhung der Leistung im Stufentest alle 2min (siehe Kapitel 2.2.1).

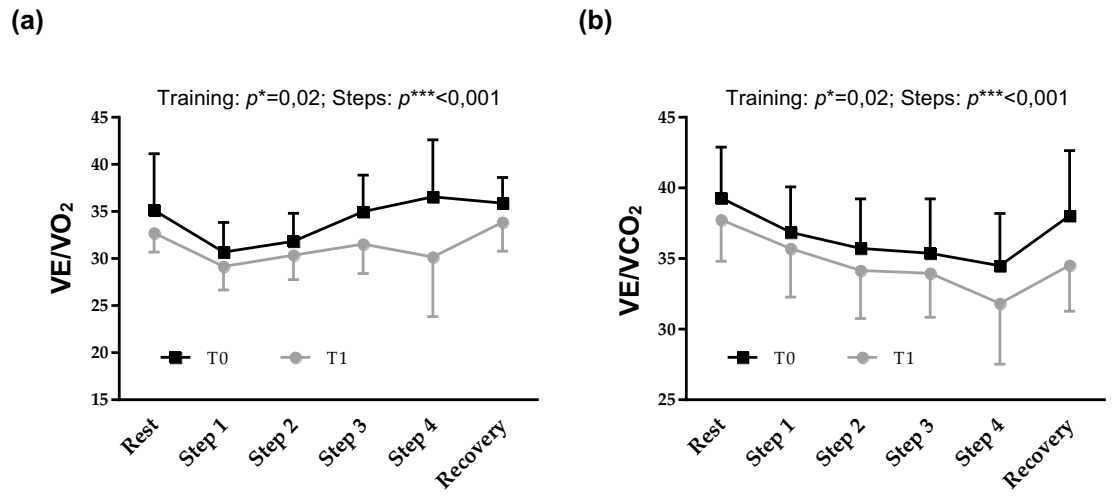


Abbildung 32: Chronische Veränderung der ventilatorischen Effizienz der SCA-Gruppe

Verbesserung der ventilatorischen Effizienz durch signifikante Abnahme sowohl (a) des Sauerstoffverbrauchs (VE/VO_2) als auch (b) der Kohlendioxidproduktion (VE/VCO_2) nach dem sechswöchigen Ausdauertraining. Innerhalb der einzelnen Spiroergometrien signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Belastungsstufen (Steps). Rest = Ruhephase vor Beginn der Spiroergometrie, Recovery = Erholungsphase nach Beendigung der Spiroergometrie.

3.2.3 Blutbild

Die Auswirkungen der sechswöchigen Sportintervention auf das Blutbild wurden anhand der hämatologischen Parameter Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres Volumen eines Erythrozyten (MCV), mittlerer Hämoglobingehalt eines Erythrozyten (MCH) und mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC) untersucht (siehe Tab. 26).

Dabei wies die SCA-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der Erythrozytenzahl, des Hämoglobinwertes sowie des Hämatokrits auf. Im Vergleich zum Zeitpunkt T0 ließen sich zum Zeitpunkt T1 eine signifikant verminderte Leukozytenzahl ($p = 0{,}04$) sowie eine erhöhte

Thrombozytenzahl (p = 0,02) finden. Die weiteren erythrozytären Verhältnisgrößen MCV, MCH und MCHC zeigten zum Zeitpunkt T1 keine signifikanten Veränderungen.

	SCA	
Zeitpunkt	**T0**	**T1**
WBC [*10^3/µl]	11.5 ± 2.7	9.0 ± 3.5 *
RBC [*10^6/µl]	2.8 ± 0.7	2.4 ± 0.7
PLT [*10^3/µl]	75.0 ± 49.0	135.3 ± 89.8 *
Hb [g/dl]	9.2 ± 2.2	8.8 ± 1.6
Hct [%]	25.1 ± 5.2	22.1 ± 6.3
MCV [fl]	92.1 ± 13.8	91.5 ± 11.9
MCH [pg]	34.3 ± 8.0	35.9 ± 7.2
MCHC [g/dl]	36.9 ± 4.0	39.9 ± 8.5

Tabelle 26: Chronische Veränderungen des Blutbildes der SCA-Gruppe

Signifikante Abnahme der Leukozytenzahl bzw. Zunahme der Thrombozytenzahl nach der sechswöchigen Sportintervention. Ansonsten keine signifikanten Veränderungen. WBC = Leukozytenzahl, RBC = Erythrozytenzahl, PLT = Thrombozytenzahl, Hb = Hämoglobin, Hct = Hämatokrit, MCV = Mittleres Volumen eines Erythrozyten, MCH = Mittlerer Hämoglobingehalt eines Erythrozyten, MCHC = Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten.

3.2.4 Freies Hämoglobin

Die Veränderung der Konzentration des freien Hämoglobins im Plasma vor und nach der sechswöchigen Sportintervention wurde mittels Immunoassay untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Abnahme (p = 0,01) der Konzentration des freien Hämoglobins im Plasma bei den SCA-Probanden detektiert werden (siehe Abb. 33).

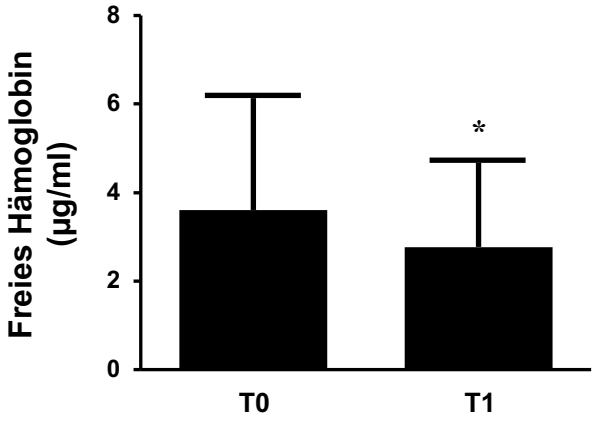


Abbildung 33: Chronische Veränderung des freien Hämoglobins der SCA-Gruppe

Signifikante Abnahme des freien Hämoglobins nach der sechswöchigen Sportintervention.

3.2.5 Erythrozytäre Verformbarkeit

Die Veränderungen der erythrozytären Verformbarkeit durch die sechswöchige Sportintervention wurden ektazytometrisch anhand des Elongationsindexes bei neun definierten Scherstressen

gemessen (siehe Abb. 34). Zum Zeitpunkt T1 zeigten die Erythrozyten der SCA-Probanden eine signifikant verminderte Verformbarkeit bei 0.3Pa (p = 0.02), 7.34Pa (p = 0.04), 13.92Pa (p = 0.04), 26.38Pa (p = 0.03) und 50Pa (p = 0.03) im Vergleich mit dem Ausgangswert zum Zeitpunkt T0. Die prozentualen Veränderungen der Verformbarkeit von T0 zu T1 waren −5.95% bei 0.3Pa, −2% bei 0.57 Pa, −1.84% bei 1.08 Pa, −3.67% bei 2.04 Pa, −4.22% bei 3.87Pa, −4.51% bei 7.34Pa, −4.84% bei 13.92Pa, −5.58% bei 26.38Pa und −5.39% bei 50Pa.

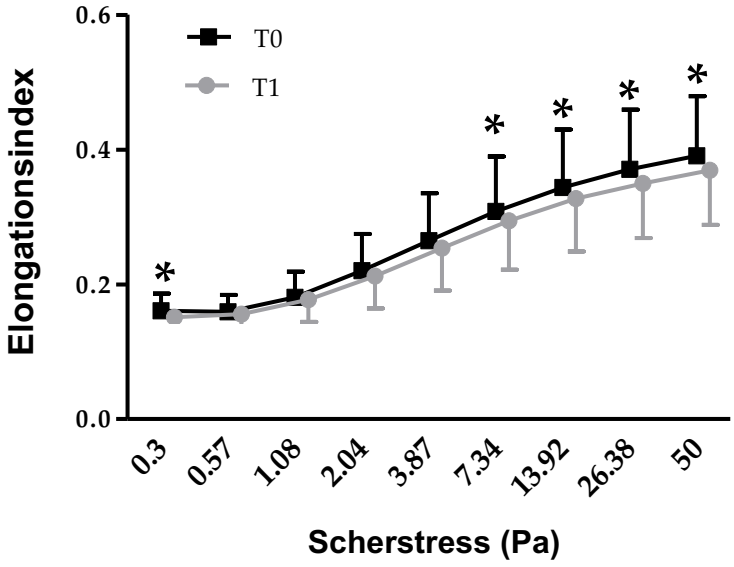


Abbildung 34: Chronische Veränderung der erythrozytären Verformbarkeit der SCA-Gruppe
Signifikante Abnahme des Elongationsindex bei 0,3Pa, 7,34Pa, 13,92Pa, 26,38Pa und 50Pa nach der sechswöchigen Sportintervention.

3.2.6 Erythrozytäre Aggregation

Für die Messung der erythrozytären Aggregation der SCA-Probanden wurden der Aggregationsindex (AI) und die Aggregations-Disaggregationsscherrate ($\gamma_{dlsc\ min}$) syllektometrisch bestimmt.

Nach der sechswöchigen Sportintervention kam es zu einer Reduktion des Aggregationsindex, allerdings war diese nicht signifikant (p = 0,2, siehe Abb. 35a). Die Aggregations-Disaggregationsscherrate, also der minimale Scherstress, der benötigt wird, um gebildete erythrozytären Aggregate zu dissoziieren, sank signifikant (p = 0.01) im Vergleich zum Ausgangswert T0 (siehe Abb. 35b).

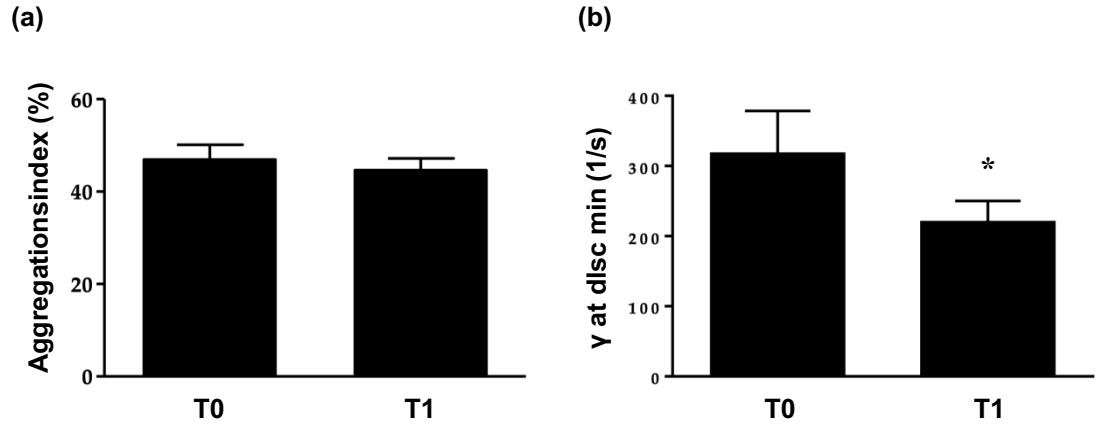


Abbildung 35: Chronische Veränderungen der erythrozytären Aggregation der SCA-Gruppe

Signifikante Abnahme der Aggregations-Disaggregationsscherrate ($\gamma_{dlsc\ min}$) (b) und nicht-signifikante Abnahme des Aggregationsindex (a) nach der sechswöchigen Sportintervention.

3.2.7 Erythrozytäres NO und NO im Plasma

Zur Untersuchung der endothelialen NO-Produktion und der Bioverfügbarkeit von NO wurde die Konzentration von Nitrit im Plasma der SCA-Probanden mit Hilfe der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion bestimmt. Hierbei zeigte sich nach dem sechswöchigen Ausdauertraining ein signifikanter Anstieg (p = 0,04, siehe Abb. 36a).

Das gleiche Verfahren wurde für die Messung von erythrozytärem NO angewendet, wofür die Konzentration von Nitrit/RSNO/Fe-NO in den Erythrozyten bestimmt wurde. Diese veränderten sich durch die Sportintervention nicht (siehe Abb. 36b).

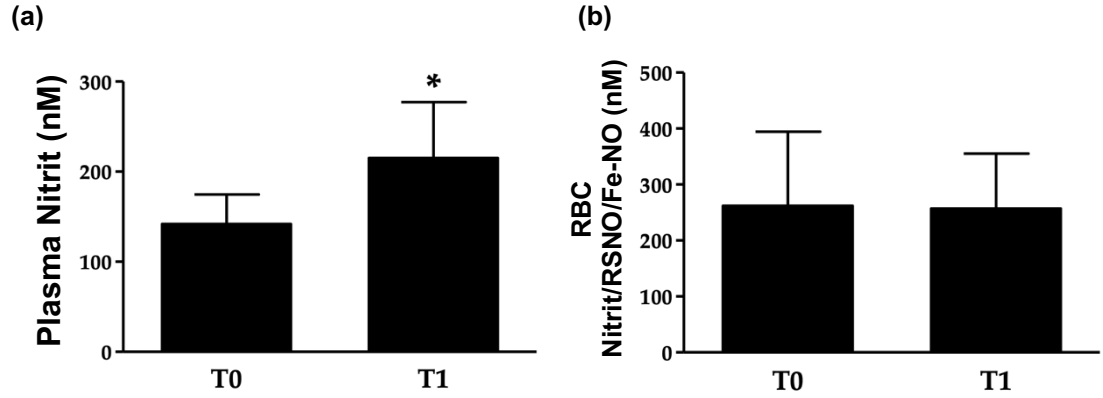


Abbildung 36: Chronische Veränderung von NO in Plasma und Erythrozyten der SCA-Gruppe

Signifikanter Anstieg der Konzentration von plasmatischem Nitrit (a) nach der sechswöchigen Sportintervention. Keine Veränderung des erythrozytären Nitrit/RSNO/Fe-NO (b).

3.2.8 Erythrozytäre NO-Produktion, Akt und L-Arginin

Die Bestimmung der erythrozytären NO-Produktion wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Färbungen von Total RBC-NOS durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zum Zeitpunkt T0 keine signifikante Veränderung nach dem sechswöchigen Training (siehe Abb. 37a).

Die Aktivität der erythrozytären NO-Synthase wurde ebenfalls immunhistochemisch untersucht und anhand der Färbeintensität der aktivierenden Phosphorylierungsstelle Serin1177 gemessen. Hierbei kam es nach der Sportintervention zu einer signifikanten Abnahme (p = 0,03, siehe Abb. 37b).

Weiterhin wurde die für den Aktivierungszustand der NO-Synthase wichtige Proteinkinase Akt durch die Färbung von Total Akt (siehe Abb. 37c) sowie deren aktivierende Phosphorylierungsstelle an Serin473 (siehe Abb. 37d) mit der Immunhistochemie bestimmt. Bei beiden Parametern kam es zu keinen signifikanten Veränderungen zwischen den Messzeitpunkten T0 und T1.

Zuletzt wurde die Konzentration von L-Arginin in den Erythrozyten, dem Substrat der NO-Synthase zur Stickstoffmonoxidproduktion mittels Immunoassay gemessen (siehe Abb. 37e). Im Vergleich zum Ausgangswert konnte durch das Ausdauertraining keine signifikante Veränderung detektiert werden.

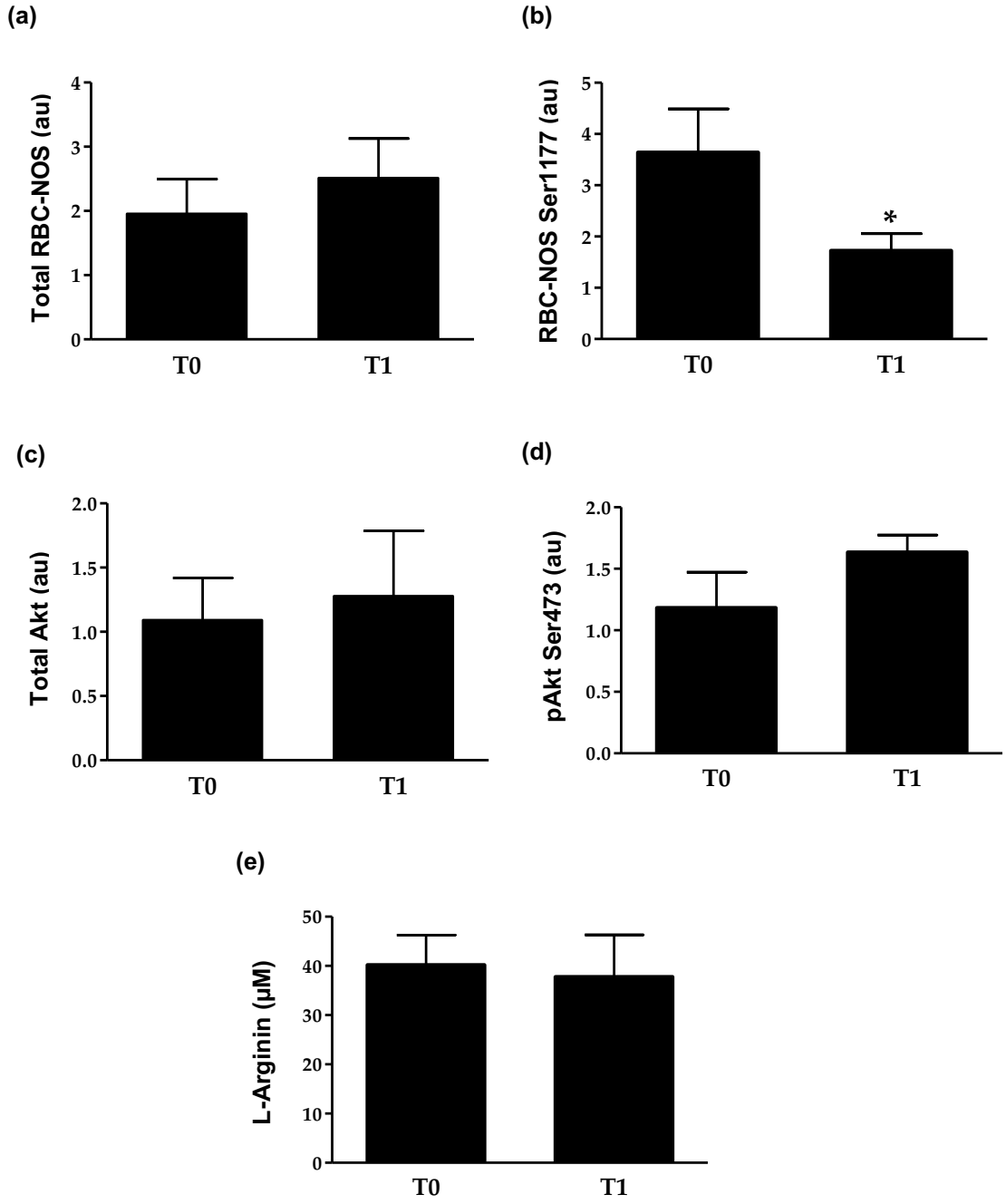


Abbildung 37: Chronische Veränderungen der erythrozytären NO-Produktion, der erythrozytären NOS-Aktivität und von erythrozytärem L-Arginin der SCA-Gruppe

Signifikante Abnahme der Aktivierung der erythrozytären NO-Synthase, gemessen anhand der Phosphorylierungsstelle Serin1177 (b), nach Absolvierung des sechswöchigen Ausdauertrainings. Keine signifikanten Veränderungen der Färbeintensitäten von erythrozytärer NO-Synthase (a), erythrozytärer Proteinkinase Akt (c), dem Aktivierungszustand der Proteinkinase Akt, gemessen anhand der Phosphorylierungsstelle Serin473 (d) sowie der Konzentration von erythrozytärem L-Arginin (e).

3.2.9 Oxidativer Stress

Zur Messung des oxidativen Stresses der Erythrozyten wurden die chronischen Veränderungen der Lipidperoxidation (gemessen in TBARS) und der totalen antioxidativen Kapazität (TAK,

gemessen in Trolox) mittels Immunoassays untersucht. Weiterhin wurde Nitrotyrosin als Marker für das Ausmaß von oxidativem Stress durch RNS immunhistochemisch bestimmt.

Im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt T0 zeigten sich nach Absolvierung des sechswöchigen Ausdauertrainings zum Zeitpunkt T1 keine signifikanten Veränderungen der Lipidperoxidation (siehe Abb. 38a) und der totalen antioxidativen Kapazität (siehe Abb. 38b). Allerdings konnte eine signifikante Abnahme der Färbung von Nitrotyrosin nach der Sportintervention detektiert werden (p = 0,04, siehe Abb. 38c).

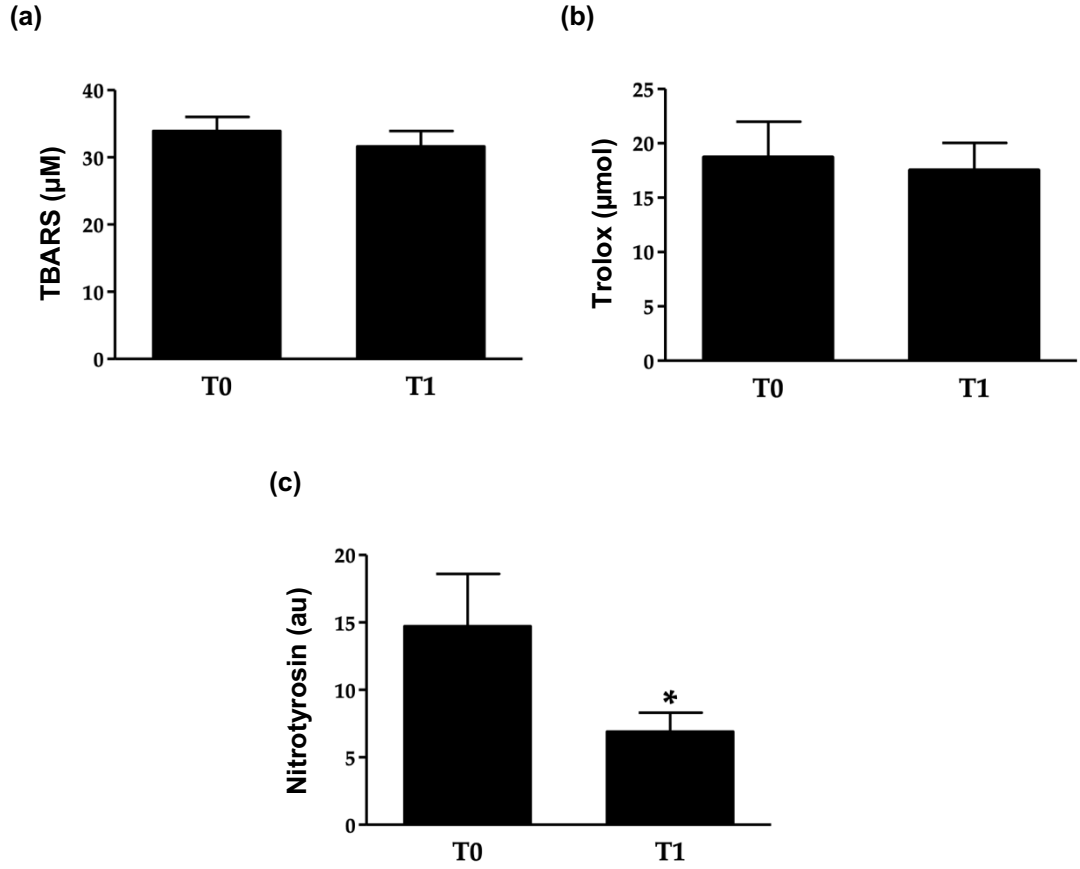


Abbildung 38: Chronische Veränderungen der Marker für oxidativen Stress der SCA-Gruppe
Signifikante Abnahme von RNS, gemessen durch Färbung von Nitrotyrosin (c), nach dem sechswöchigen Ausdauertraining. Keine signifikanten Veränderungen der Lipidperoxidation, gemessen in TBARS (a) sowie der antioxidativen Kapazität, gemessen in Trolox (b).

3.2.10 Aktivitätsfragebogen

Zur Evaluation der körperlichen Aktivität der SCA-Probanden vor und ein Jahr nach der Studie wurde der adaptierte Motorik-Modul Aktivitätsfragebogen ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Probanden zu Beginn der Studie an 1.4 ± 0.9 Tagen in der Woche mindestens 60min körperlich aktiv waren, wozu neben sportlicher Betätigung auch Freizeitaktivitäten wie Spielen oder der Weg zur Schule mit dem Fahrrad oder zu Fuß gezählt wurden. Das Interesse an Sport wurde von den Teilnehmern als moderat angegeben. So nutzten 100% der Befragten für den Schulweg öffentliche Verkehrsmittel. Am Schulsport nahmen 60% der SCA-Patienten teil und verausgabten

sich dabei moderat bis stark bis hin zu heftigem Schwitzen und Kurzatmigkeit. Nach körperlich anstrengenden Freizeitaktivitäten berichteten 20% der Patienten von Schwindel, Schmerzen oder Müdigkeit in der Vergangenheit und 40% hatten bereits einen Krankenhausaufenthalt nach freizeitlicher Aktivität.

Ein Jahr nach der Beendigung der Studie gaben 80% der Teilnehmer an, dass sich ihre körperliche Aktivität gesteigert hätte. Dies äußerte sich in einem nicht-signifikanten Anstieg auf 3.0 ± 2.5 Tagen pro Woche, an denen die Probanden mindestens 60min körperlich aktiv waren. Für den Weg zur Schule benutzten 80% die öffentlichen Verkehrsmittel und 20% gingen zu Fuß. Die Teilnehmer gaben an, beim Schulsport moderat zu schwitzen und gelegentlich kurzatmig zu sein. Weiterhin berichteten 40% von Schwindel, Schmerzen oder Müdigkeit nach körperlicher Aktivität in der Vergangenheit. Keiner der Studienteilnehmer musste über den Zeitraum der sechswöchigen Sportintervention und nach dem Eingangs- und Ausgangstest stationär behandelt werden.

4. Diskussion

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Um den Einfluss von akuter und chronischer körperlicher Aktivität auf die Hämorheologie der Sichelzellanämie zu untersuchen, wurde ein akuter Belastungstest mit jeweils acht SCA-Probanden und gesunden Kontrollen sowie anschließend ein sechswöchiges Ausdauertraining mit zwölf SCA-Probanden durchgeführt.

Dabei zeigte die SCA-Gruppe in der akuten Testung eine Reihe von Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe. So war die Leistungsfähigkeit der Patienten erniedrigt, da sie die erste ventilatorische Schwelle früher erreichten und ihre Sauerstoffaufnahme sowie die erbrachte Leistung deutlich niedriger waren. Sie wiesen eine reduzierte Erythrozytenzahl, niedrigere Hämoglobin- und Hämatokritwerte sowie eine erhöhte Konzentration von freiem Hämoglobin auf. Ihre erythrozytäre Verformbarkeit war reduziert, aber ihre erythrozytären NO-Spiegel erhöht. Weiterhin zeigte die SCA-Gruppe eine höhere Konzentration freier Radikale, aber keine Unterschiede in der Lipidperoxidation und der totalen antioxidativen Kapazität (siehe Tab. 27).

	SCA-Gruppe (im Vergleich zu AA)
Leistung	↓
Blutbild (RBC, Hb, Hct)	↓
Freies Hb	↑
Erythrozytäre Verformbarkeit	↓
NO im Erythrozyten	↑
NO-Synthase Aktivität	→
Freie Radikale	↑
Lipidperoxidation	→
TAK	→

Tabelle 27: Übersicht der Unterschiede zwischen SCA- und AA-Gruppe in der akuten Intervention
RBC = Erythrozytenzahl, Hb = Hämoglobin, Hct = Hämatokrit, ROS/RNS = freie Radikale, TAK = totale antioxidative Kapazität.

Von all diesen Parametern veränderte sich bei den Patienten durch die akute Intervention nur der erythrozytäre NO-Signalweg, und zwar in Form einer Abnahme der NO-Synthase Aktivität (siehe Tab. 28). Dies äußerte sich direkt in einer Abnahme der erythrozytären NO-Spiegel der Patienten, die aber nach wie vor höher als in der Kontrollgruppe waren. Alle weiteren Werte blieben nach der akuten Belastung in der SCA-Gruppe konstant und die Kontrollgruppe zeigte überhaupt keine akuten Veränderungen.

Nach Absolvierung des sechswöchigen Trainings konnten in der SCA-Gruppe einige Veränderungen der gemessenen Parameter detektiert werden. So kam es zwar zu keinem signifikanten Anstieg von Sauerstoffaufnahme, vergangener Zeit und erbrachter Leistung zum

Zeitpunkt der VT1, allerdings zeigten die Probanden eine verbesserte ventilatorische Effizienz in Form einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs sowie der Kohlendioxidproduktion.

Im Blutbild blieben Erythrozytenzahl, Hämoglobin- und Hämatokritwert unverändert, aber die Konzentration von freiem Hämoglobin im Plasma nahm nach der Intervention deutlich ab. Bei der erythrozytären Verformbarkeit kam es bei höheren Scherstressen zu einer Abnahme, wohingegen sich die erythrozytäre Aggregation verbesserte.

Die Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von NO zeigten eine Zunahme der Konzentration von Nitrit im Plasma, aber keine Veränderung von Nitrit/RSNO/Fe-NO in den Erythrozyten. Beim erythrozytären NO-Signalweg kam es zu einer Abnahme der NO-Synthase Aktivität, aber zu keiner Veränderung ihrer Gesamtmenge. Weiterhin zeigte sich kein Einfluss der Intervention auf die Konzentration von erythrozytärem L-Arginin.

Bei den Parametern des oxidativen Stresses wiesen die Probanden eine Abnahme von Nitrotyrosin nach der Intervention auf, während die Marker für Lipidperoxidation und totale antioxidative Kapazität keine Veränderungen zeigten.

Während der gesamten Dauer des sechswöchigen Trainings kam es bei keinem der Probanden zu akuter klinischer Symptomatik oder Krankenhausaufenthalten. Zuletzt dokumentierten die Aktivitätsfragebögen ein Jahr nach Beendigung der Studie eine nicht-signifikante Zunahme der körperlichen Aktivität. Tabelle 28 liefert eine Übersicht über die Ergebnisse der SCA-Gruppe in der vorliegenden Untersuchung.

	SCA-Gruppe	
	Akute Effekte	Chronische Effekte
Leistung	-	→
Ventilatorische Effizienz	-	↑
Blutbild (RBC, Hb, Hct)	→	→
Freies Hb	→	↓
Erythrozytäre Verformbarkeit	→	↓
Erythrozytäre Aggregation	n.g.	↓
NO im Plasma	n.g.	↑
NO im Erythrozyten	↓	→
NO-Synthase Aktivität	↓	↓
L-Arginin	n.g.	→
Freie Radikale	→	↓
Lipideroxidation	→	→
TAK	→	→

Tabelle 28: Übersicht der akuten und chronischen Effekte der Sportintervention

RBC = Erythrozytenzahl, Hb = Hämoglobin, Hct = Hämatokrit, TAK = totale antioxidative Kapazität, n.g.= nicht gemessen.

4.1 Akute Effekte

In der vorliegenden Studie wiesen die heranwachsenden Sichelzellanämiepatienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine reduzierte Fitness und körperliche Leistungsfähigkeit auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen früherer Vergleichsstudien, in denen SCA-Patienten ebenfalls unterdurchschnittliche Leistungen in Sportarten wie Schwimmen, Radfahren oder Laufen erzielten und Belastungsgrenzen schneller erreichten als gesunde Gleichaltrige [163; 183; 188]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass die körperliche Entwicklung von Sichelzellanämiepatienten verzögert abläuft und sie Veränderungen des Körperbaus aufweisen, zu denen häufig eine verminderte Muskelmasse zählt [84; 303]. Nach neueren Erkenntnissen unterläuft die Skelettmuskulatur der Patienten einen Umbauprozess auf zellulärer Ebene (Remodeling), welcher zu strukturellen Defiziten führt, die funktionale Muskelkapazität einschränkt und zur geringen körperlichen Belastbarkeit beiträgt [181]. Als weitere limitierende Faktoren der körperlichen Leistungsfähigkeit von Sichelzellanämiepatienten konnten in Studien eine eingeschränkte kardiopulmonale Funktion nachgewiesen werden, welche sich in einem hohen Residualvolumen, Anomalien des Gasaustausches und reduzierter maximaler Sauerstoffaufnahme äußert [48; 65]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten der vorliegenden Untersuchung, in der die SCA-Probanden ebenfalls eine reduzierte maximale Sauerstoffaufnahme beim Erreichen der ersten ventilatorischen Schwelle zeigten.

Natürlich ist das Studienergebnis der reduzierten körperlichen Leistungsfähigkeit auch Ausdruck der chronisch hämolytischen Anämie der Erkrankten, welche ein Hauptmerkmal der Sichelzellanämie darstellt und direkt mit erniedrigter Fitness assoziiert ist [178; 287]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Erythrozyten der Patienten auch in symptomfreien Intervallen vermehrt lysieren, was das Risiko für chronische Organschäden erhöht und die Mortalität steigert [106; 138]. In der vorliegenden Studie waren Erythrozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobinwert der SCA-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig zeigten die SCA-Probanden einen signifikant höheren mittleren Hämoglobingehalt pro Erythrozyten (MCV) und eine signifikant höhere mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC). Die Konzentration von freiem Hämoglobin im Plasma war in der SCA-Gruppe ebenfalls signifikant erhöht und lag vor bzw. nach der Intervention ca. 5-fach bzw. 3,5-fach höher als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ist Folge der intravasalen Hämolyse der Sichelzellanämie, wodurch die Patienten permanent erhöhte Konzentrationen von freiem Hämoglobin im Plasma aufweisen [141; 198]. Interessanterweise veränderten sich alle genannten sowie auch die weiteren hämatologischen Parameter des Blutbildes durch die akute Belastung nicht. Dies ist wichtig, da ein Anstieg des MCHC-Wertes Ausdruck einer Dehydratation der Zelle sein kann, der mit einer Zunahme der zytoplasmatischen Viskosität einhergeht, was bei der Sichelzellanämie das Risiko von HbS-Polymerisation und Versteifung der Erythrozyten erhöhen würde [131; 161]. Ein Anstieg des Hämatokrits wiederum würde im Allgemeinen zu einer Zunahme der Viskosität der gesamten Blutsuspension führen [172]. Dies würde sich prognostisch ungünstig auf die Erkrankung auswirken, da eine erhöhte Blutviskosität bei der Sichelzellanämie das Risiko von vasookklusiven Krisen steigert [51]. Weil in der vorliegenden Untersuchung ferner die

Konzentration von freiem Hämoglobin im Plasma vor und nach der Belastung konstant blieb, scheint es wahrscheinlich, dass die akute Intervention keine Zunahme der intravasalen Hämolyse verursachte und die Anämie nicht verstärkte.

Die erythrozytäre Verformbarkeit der SCA-Gruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Scherstressen zwischen 1,08Pa und 50Pa signifikant erniedrigt, was auch bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte [113; 196; 277]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Erythrozyten bei der Sichelzellanämie häufig in Folge des Ca^{2+}-vermittelten Kationenverlust dehydriert sind, was die Wahrscheinlichkeit von HbS-Polymerisation und Versteifung stark erhöht [161]. Außerdem bewirken Modifikationen an membranständigen Proteinen eine Dissoziation von Spektrin- und Aktin-Molekülen und damit eine Abnahme der Elastizität der Zellmembran [101]. In der Folge verschlechtert sich die Biomechanik des erythrozytären Zytoskeletts, was zur Destabilisierung der Zellen führt und die ausgeprägte Hämolyse der Patienten verstärkt. Gleichzeitig stagnieren die Erythrozyten häufiger in der Mikrozirkulation, wodurch die Sauerstoffversorgung des distalen Gewebes beeinträchtigt wird und das Risiko für Gefäßverschlüsse steigt [62]. Die höhere erythrozytäre Verformbarkeit der SCA-Gruppe bei einem Scherstress von 0,3Pa ist vermutlich auf eine atypische Verformung durch die dysfunktionale Membran der Zellen beim Schervorgang zurückzuführen, wodurch die Aufnahme des Diffraktionsmusters in der Ektazytometrie beeinflusst wurde. Da der physiologische Scherstress in der Mikrozirkulation in-vivo deutlich über 0,3Pa liegt, (in den kleinen Kapillaren der menschlichen Konjunktiva beträgt er ca. 10Pa [151]), ist eine klinische Relevanz dieses Ergebnisses unwahrscheinlich [211]. Interessant für den Verlauf der Erkrankung ist vielmehr, dass sich die erythrozytäre Verformbarkeit durch die akute Belastung bei allen neun gemessenen Scherstressen nicht veränderte. So scheint moderate körperliche Aktivität auch bei untrainierten Sichelzellanämiepatienten keinen negativen Einfluss auf die erythrozytäre Verformbarkeit auszuüben.

Als weitere pathophysiologische Größe, die sich negativ auf die erythrozytäre Verformbarkeit und die intravasale Hämolyse auswirkt, wurden der oxidative Stress und die totale antioxidative Kapazität der SCA-Probanden untersucht. Hierbei zeigte die SCA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen von freien Radikalen. Das Ausmaß an Zellschäden und die totale antioxidative Kapazität unterschied sich dagegen zwischen den Gruppen nicht. Zu den vielfältigen Mechanismen, die zur Produktion von freien Radikalen bei der Sichelzellanämie führen, zählen vor allem der hohe Energieverbrauch der Zellen durch repetitive Zyklen von Sichelung und Entsichelung, die Autooxidation des freien Hämoglobins sowie das Ischämie-Reperfusions-Phänomen [55]. SCA-Patienten weisen daher chronisch erhöhte Raten an ROS/RNS auf, die im Rahmen von vasookklusiven Krisen exorbitant ansteigen [6; 128]. In der vorliegenden Studie blieben alle Parameter des oxidativen Stresses nach der akuten Belastung konstant. Dies ist bemerkenswert, da die Energiegewinnung des Körpers bei sportlicher Aktivität physiologischerweise in einer Dosis-Wirkungs-Beziehung mit der gesteigerten Bildung von freien Radikalen einhergeht [93; 168]. Das Ergebnis legt also nahe, dass die akute moderate Belastung von den SCA-Patienten gut toleriert wurde und keine signifikanten Zellschädigungen durch neu gebildete freie Radikale auftraten.

In der Pathogenese von vasookklusiven Schmerzkrisen nimmt auch Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle ein. Der Signalstoff vermittelt prognostisch günstige Effekte auf die Erkrankung, und zwar zunächst durch seine vasodilatatorische Wirkung, indem NO eine Relaxation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand vermittelt [164]. Darüber hinaus verbessert NO auch die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten, indem es die Membranstruktur und die Verformbarkeit der Zellen modifiziert [38]. Bei Untersuchungen mit gesunden Probanden konnte bereits gezeigt werden, dass körperliche Aktivität eine Steigerung der erythrozytären NO-Produktion bewirkte und die erythrozytäre Verformbarkeit verbesserte, was vermutlich durch eine S-Nitrosylierung von zytoskelettalen Proteinen erreicht wird [114; 261].

Die NO-Produktion in den Erythrozyten ist dabei abhängig von der Funktionalität der erythrozytären NO-Synthase (RBC-NOS) [147]. In der vorliegenden Untersuchung war der Gehalt von RBC-NOS in den Erythrozyten und die Phosphorylierung des Enzyms an den inhibierenden Bindungsstellen Serin114 und Threonin495 in der SCA- und der Kontrollgruppe ähnlich hoch, was im Einklang mit den Ergebnissen aus einer früheren Studie steht [113]. Auch zeigten sich nach Absolvierung der akuten Intervention in diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Aktivierung der erythrozytären NO-Synthase durch eine Phosphorylierung an Serin1177 war zwischen Erkrankten und gesunden Kontrollen ebenfalls vergleichbar, allerdings wies die SCA-Gruppe nach der akuten Belastung eine signifikante Abnahme der Färbeintensität an Serin1177 auf. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von RBC-NOS durch die Einnahme des Medikamentes Hydroxyurea beeinflusst wird. So wiesen SCA-Probanden, die kein Hydroxyurea einnahmen, in einer Studie von Grau et al. eine höhere Aktivität der erythrozytären NO-Synthase auf als die gesunde Kontrollgruppe [113]. Demgegenüber ließ sich in einer neueren Studie von Nader et al. bei SCA-Probanden, die Hydroxyurea erhielten, eine niedrigere Aktivität des Enzyms detektieren als bei der Kontrollgruppe sowie auch bei SCA-Probanden, die das Medikament nicht einnahmen [194]. Der nicht-signifikante Unterschied zwischen der SCA- und der AA-Gruppe in der vorliegenden Untersuchung mag somit darauf zurückzuführen sein, dass fünf der acht SCA-Patienten Hydroxyurea erhielten, aber drei weitere Probanden nicht. Die geringe Gruppengröße erlaubt es allerdings nicht, die SCA-Gruppe zu unterteilen, um die Effekte von Hydroxyurea auf erythrozytäres NO gesondert zu untersuchen (siehe 4.3).

Durch die akute Belastung kam es innerhalb der SCA-Gruppe zu einer Abnahme der Phosphorylierung an Serin1177 der RBC-NOS, was sich in der Kontrollgruppe nicht zeigte. Die reduzierte Aktivität des Enzyms nach der Intervention führte in der SCA-Gruppe unmittelbar zu einer Verringerung der erythrozytären Konzentration von Nitrit/RSNO/Fe-NO. Die Einschränkung der Bioverfügbarkeit von NO in den Zellen wurde allerdings nicht von einer Veränderung des oxidativen Status oder Verformbarkeit der Erythrozyten begleitet, was physiologischerweise zu erwarten gewesen wäre [114; 296]. In einer Untersuchung mit gesunden Probanden konnten Suhr et al. zeigen, dass durch eine einstündige moderate Belastung die Aktivität der erythrozytären NO-Synthase, die NO-Produktion und die erythrozytäre Verformbarkeit gesteigert werden konnte [261]. Es ist fraglich, in welchem Ausmaß NO diesen Effekt auf die erythrozytäre Verformbarkeit bei der Sichelzellanämie vermitteln kann. So nahm in einer in-vitro Untersuchung,

in der Erythrozyten von SCA-Patienten mit hohen Scherraten behandelt wurden, die den Scherstress bei körperlicher Aktivität simulieren sollten, zwar die Aktivierung der RBC-NOS zu, es zeigte sich aber kein Anstieg der erythrozytären Verformbarkeit [113]. Es ist wahrscheinlich, dass das Wechselspiel zwischen NO, der erythrozytären NO-Synthase und der erythrozytären Verformbarkeit bei der Sichelzellanämie komplexer ist als bei gesunden Menschen, die kein HbS exprimieren. So läuft zum Beispiel die Reduktion von Nitrit, was als eine Art Reservespeicher von NO angesehen werden kann, bei der Sichelzellanämie durch das Hämoglobin S im oxygenierten Zustand zunächst schneller, aber im polymerisierten Zustand deutlich langsamer ab als bei Gesunden mit Hämoglobin A [116]. Da die genauen Mechanismen des NO-Stoffwechsels in den Erythrozyten der Patienten noch unzureichend verstanden sind, bedarf es weiterer Untersuchungen, um die genauen Veränderungen des NO-Signalweges in der vorliegenden Studie durch körperliche Aktivität erklären zu können.

Trotz der Abnahme der erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit in der SCA-Gruppe nach der akuten Intervention blieben alle weiteren Parameter der Hämolyse, der erythrozytären Verformbarkeit und des oxidativen Stresses konstant. Die Intensität der Belastung war moderat bei ca. 60 Watt und einer Belastungszeit von ca. 7min, was auch zu einer nur sehr geringfügigen Zunahme der Laktatkonzentration führte. Bei keinem der Probanden kam es während und nach der Intervention zu einem Absinken der Sauerstoffsättigung in der Pulsoxymetrie oder klinischen Symptomen. Dies legt nahe, dass die akute Belastung keine relevanten hämorheologischen Ereignisse provozierte und von den Patienten gut vertragen wurde. Auch wenn die Polymerisation des HbS in der Studie nicht direkt gemessen wurde, scheint eine klinisch relevante Zunahme der erythrozytären Sichelung unwahrscheinlich, so dass eine akute körperliche Belastung bis zum Erreichen der ersten ventilatorischen Schwelle für stabile SCA-Patienten vermutlich sicher ist. Diese Einschätzung deckt sich mit denen von Studienautoren anderer akuter Sportinterventionen mit SCA-Probanden bei moderater Belastung [22; 88; 286]. Einschränkend muss betont werden, dass die Gewinnung der Blutparameter zwar in direktem Anschluss an die Intervention durchgeführt wurde, diese die unmittelbaren Veränderungen des Blutfließverhaltens während der Belastung aber nicht komplett widerspiegeln.

Positive Effekte einer akuten Belastung auf die Hämorheologie, die bei gesunden Probanden bereits nachgewiesen werden konnten, ließen sich in der vorliegenden Untersuchung allerdings weder in der SCA- noch in der AA-Gruppe detektieren. So zeigte sich auch in der Kontrollgruppe keine Scherstress-vermittelte Aktivierung der NO-Synthase und auch keine Verbesserung der erythrozytären Verformbarkeit, wie sie in früheren in-vitro Untersuchungen mit gesunden Erythrozyten nachgewiesen werden konnte [152; 275]. Vermutlich waren die Intensität und Dauer der Belastung für die gesunden Probanden zu gering, um vorteilhafte Veränderungen der rheologischen Parameter zu bewirken. Ob jedoch eine Erhöhung der Intensität der akuten Belastung eher positive oder doch vermehrt negative Effekte auf die Sichelzellanämiepatienten entfaltet hätte, ist spekulativ. In einer Untersuchung mit maximaler Intensität, in denen die SCA-Probanden eine Leistung von über 100W erzielten, traten zwar keine klinischen Symptome auf, allerdings wurden hier auch keine hämorheologischen Parameter erhoben [163]. In der vorliegenden Studie gibt der nicht-signifikante Anstieg des MCHC-Wertes aber zumindest einen

Hinweis darauf, dass eine leichte Dehydratation der Erythrozyten nach der akuten Belastung auftrat, was in höherem Ausmaß eine Sichelung der Zellen hätte auslösen und das Risiko für Vasookklusionen steigern können.

4.2 Chronische Effekte

Die Auswirkungen von regelmäßiger körperlicher Aktivität auf die Sichelzellanämie wurden mit menschlichen Probanden bisher kaum untersucht. So finden sich in der Literatur einige wenige Fallberichte, die beschreiben, wie Patienten durch regelmäßiges Kraft- und Ausdauertraining sowohl chronische als auch akute Schmerzen reduzieren und ihre Lebensqualität verbessern konnten [9; 268]. Die einzige mehrwöchige kontrollierte Sportintervention mit homozygot an Sichelzellanämie und heterozygot an HbSβ-Thalassämie erkrankten Erwachsenen führten Gellen et al. im Jahre 2018 durch und zeigten dabei, dass die Probanden innerhalb von acht Wochen ihre Sauerstoffaufnahme und Leistungsfähigkeit steigern konnten [100]. Die Intervention bestand aus drei 45-minütigen Ausdauertrainings pro Woche auf dem Fahrradergometer mit moderater Intensität, was bei den Teilnehmern keine klinischen Komplikationen auslöste. Die Autoren folgerten, dass moderates Ausdauertraining für Sichelzellanämiepatienten wahrscheinlich sicher ist, allerdings wurden in der Studie keine hämorheologischen Parameter erhoben.

In der vorliegenden Untersuchung trainierten die SCA-Probanden individuell über sechs Wochen zweimal 15 bis 30min pro Woche ebenfalls auf dem Fahrradergometer bei moderater Intensität, die 70% ihrer Leistung aus dem Eingangstest zur Bestimmung der ersten ventilatorischen Schwelle (VT1) entsprach. Durch das Bestimmen der VT1 konnte erreicht werden, dass die Probanden im hauptsächlich aeroben Bereich trainierten und ihre Leistungsfähigkeit verglichen werden konnte, da eine Steigerung der kardiopulmonalen Fitness mit einem späteren Erreichen der VT1 einhergeht [204; 295]. Nach Absolvierung des sechswöchigen Ausdauertrainings zeigten die Sichelzellanämiepatienten eine leichte nicht-signifikante Zunahme der vergangenen Zeit bis Erreichen der VT1, ebenso wie eine nicht-signifikant erhöhte Leistung und Sauerstoffaufnahme. Durch das Training konnten die Probanden zusätzlich ihre ventilatorische Effizienz verbessern und zeigten eine signifikante Reduktion des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlenstoffdioxidproduktion sowohl vor als auch nach dem Ausgangstest. Dies ist ein für die Prognose der Erkrankung vorteilhaftes Ergebnis, da die ventilatorische Effizienz abhängig vom Ventilation-Perfusions-Verhältnis der Lunge sowie von der kardialen Leistung ist und die „Ökonomie“ des Gasaustauschs an der alveolär-vaskulären Barriere beschreibt [293]. Eine Reihe von Untersuchungen konnte bereits zeigen, dass die ventilatorische Effizienz bei SCA-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen eingeschränkt ist [48; 163; 286]. Physiologische Werte des Atemäquivalents für Kohlendioxid (VE/VCO_2) bei Erreichen der VT1 lagen in Untersuchungen bei 28-32, wohingegen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz und COPD Werte über 40 aufwiesen [204]. In der vorliegenden Studie konnten die Probanden ihren VE/VCO_2-Wert nach Erreichen der VT1 durch das sechswöchige Training signifikant verbessern (von 38,04 auf 34,52), was vermutlich auf eine Reduzierung des Totraumvolumens zurückzuführen ist. Auch wenn die Intensität oder Dauer des Trainings nicht ausreichte, um die Leistungsparameter der SCA-Probanden signifikant zu steigern, zeigt dieses Ergebnis dennoch, dass eine moderate regelmäßige Betätigung die funktionale Kapazität der Patienten steigern kann.

Im Vergleich der hämatologischen Parameter des Blutbildes vor und nach dem sechswöchigen Ausdauertraining zeigten sich außer einer Abnahme der Leukozytenzahl und einer Zunahme der Thrombozytenzahl keine signifikanten Veränderungen. Per se wäre ein Anstieg der Thrombozyten kein wünschenswertes Ergebnis für Sichelzellanämiepatienten, da diese Zellen in der Pathogenese von Vasookklusionen durch ihre Adhäsion ans Gefäßendothel eine entscheidende Rolle spielen [140]. Da der Wert von $135{,}3*10^3/\mu l$ nach der Intervention jedoch immer noch im unteren Bereich der Referenzskala lag und deutlich unter den Werten, die untrainierte SCA-Patienten im Allgemeinen aufweisen, ist hiervon kein negativer Einfluss auf den Krankheitsverlauf zu erwarten [32; 88; 100]. Zusätzlich fand sich eine nicht-signifikante Zunahme des MCHC-Wertes sowie eine Abnahme des Hämatokrits. Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, könnte der gestiegene MCHC-Wert Ausdruck einer Hydratation der Erythrozyten sein, die sich nachteilig auf die erythrozytäre Verformbarkeit auswirken würde [131]. Der gesunkene Hämatokrit wiederum könnte entweder auf eine reduzierte Blutviskosität in Folge eines gestiegenen Plasmavolumens der Probanden hinweisen, was als „Autohämodilution“ bezeichnet wird und sich rheologisch günstig auf die Erkrankung auswirken würde [45; 62]. Oder der niedrigere Anteil von Zellen an der gesamten Blutsuspension könnte auf eine vermehrte Hämolyse der Erythrozyten schließen lassen, was allerdings durch die nahezu konstante Erythrozytenzahl und den Hämoglobinwert unwahrscheinlich sein dürfte. Gegen eine gesteigerte intravasale Hämolyse spricht vor allem die signifikante Abnahme des freien Hämoglobins im Plasma, die die Probanden nach Beendigung der chronischen Intervention zeigten. Dies legt nahe, dass die Intensität der Sportintervention keine Überbelastung der untrainierten Probanden darstellte, bei der in Folge von Hypoxie, Laktatazidose und dem Anstieg freier Radikale mit einem Anstieg der Hämolyse zu rechnen gewesen wäre [141; 172]. Stattdessen nahm die Fragilität der Zellen durch die regelmäßige körperliche Aktivität ab. Dies ist ein prognostisch sehr günstiges Ergebnis der vorliegenden Studie, da eine Verschlechterung der hämolytischen Anämie bei der Sichelzellanämie mit chronischen Organschäden und erhöhter Mortalität assoziiert ist [106; 138]. Freies Häm im Plasma, welches aus den Hb-Molekülen dissoziiert, wirkt zusätzlich prothrombotisch und erhöht dadurch das Risiko akuter Komplikationen wie vasookklusiver Schmerzkrisen und des akuten Thoraxsyndroms [4; 243].

Die Abnahme des freien Hämoglobins im Plasma nach der chronischen Intervention äußerte sich auch direkt in einem signifikanten Anstieg der plasmatischen NO-Bioverfügbarkeit. Da NO bevorzugt an Eisen von hämhaltigen Proteinen bindet, besitzt es dementsprechend auch eine hohe Affinität für Hämoglobin. Durch die Bindung an freies Hämoglobin im Plasma entsteht unfunktionales Nitrat, wodurch NO eliminiert wird [145]. Zusätzlich wird aus den lysierten Zellen das Enzym Arginase 1 freigesetzt, welches der NO-Synthase ihr Substrat L-Arginin entzieht, so dass weniger NO gebildet werden kann [189]. Dementsprechend weisen Sichelzellanämiepatienten in Folge der hämolytischen Anämie ein chronisches NO-Defizit auf, was zu endothelialer Dysfunktion, beeinträchtigter Vasomotorik sowie gesteigerter Adhäsion von Leuko- und Thrombozyten an die Gefäßinnenwand führt und mit pulmonaler Hypertension und erhöhter Mortalität assoziiert ist [139; 145; 236]. In einer Untersuchung zum Einfluss von extrazellulärem Hb auf den NO Stoffwechsel konnte gezeigt werden, dass bereits ein minimaler

Anstieg des extrazellulären Hämoglobins um 0,5µmol/l den NO-Spiegel signifikant reduziert [81]. Dies entspricht bei einer durchschnittlich gemessenen Konzentration von extrazellulärem Hämoglobin von ca. 6µmol/l einer Zunahme von weniger als 10%, wobei in akuten Krisen bereits Konzentrationen von über 40µmol/l gemessen wurden [198]. Inwieweit die Verbesserung der plasmatischen NO-Bioverfügbarkeit in der vorliegenden Studie auf die Reduzierung des freien Hämoglobins im Plasma zurückzuführen ist oder welchen Anteil zum Beispiel eine Scherstress-vermittelte Aktivierung der endothelialen NO-Synthase an diesem Ergebnis hatte, kann nur gemutmaßt werden, da Modifizierungen des Enzyms nicht gemessen wurden. In jedem Fall stellt die Zunahme des plasmatischen Nitrits um ca. 50% nach regelmäßiger körperlicher Aktivität ein rheologisch sehr günstiges Ergebnis für die Sichelzellanämie dar.

Im Gegensatz zur chronischen Zunahme des plasmatischen NO-Spiegels zeigten sich bei der Messung der Konzentration von erythrozytärem NO (gemessen in Nitrit/RSNO/Fe-NO) sowie des Gehalts der erythrozytären NO-Synthase keine signifikanten Steigerungen. Die Untersuchungen der Proteinkinase Akt, welche über den PI3K-Akt-Signalweg eine Konformationsänderung mit konsekutiver Aktivierung der RBC-NOS auslöst, wiesen nach der sechswöchigen Intervention keine Veränderungen auf [83]. Allerdings konnte, wie auch bereits nach der akuten Intervention beobachtet, eine Abnahme der Phosphorylierung an der aktivierenden Bindungsstelle Serin1177 detektiert werden. Dies überrascht, da in Studien mit gesunden Probanden sportliche Betätigung zu einer Zunahme der Phosphorylierung an Serin1177 und der NO-Produktion in den Erythrozyten führte [261]. Bei der Sichelzellanämie konnte allerdings ebenfalls gezeigt werden, dass der Aktivierungsgrad der RBC-NOS im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ist [113]. Da sich in der vorliegenden Untersuchung nach Absolvierung der chronischen Intervention weder das Substrat L-Arginin der RBC-NOS verringerte noch die erythrozytäre NO-Bioverfügbarkeit sank, scheint es wahrscheinlich, dass die NO-Produktion über andere Stoffwechselwege aufrechterhalten werden konnte. In diesem Sinne stellt der Rückgang der zuvor erhöhten Phosphorylierung des Enzyms auf ein physiologisches Niveau einen Anpassungsmechanismus der Erythrozyten dar. Dieser könnte es den Zellen in Zukunft erlauben, die NO-Produktion über eine erneute Aktivierung der RBC-NOS flexibel zu steigern, um auf Flusswiderstände adäquater reagieren zu können.

Die Stoffwechselwege von NO in den Erythrozyten sind komplex und abhängig von vielen Faktoren, wie zum Beispiel dem oxidativen Status der Zelle. So reagiert NO mit dem freien Radikal Superoxid zu Peroxynitrit, welches als äußerst potenter Vertreter der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) verschiedene Zellbestandteile wie Membranlipide, Proteine und DNA-Basen schädigen kann [202]. Durch die Bindung von Peroxynitrit an proteinogenes Tyrosin entsteht Nitrotyrosin, dessen Ausmaß ein Ausdruck des nitrosativen Stresses ist, unter dem die Zelle steht [149]. In der vorliegenden Studie konnten die SCA-Probanden ihre Nitrotyrosinspiegel in den Erythrozyten nach dem sechswöchigen Ausdauertraining signifikant reduzieren, was sehr wahrscheinlich zu einer Verbesserung der intrazellulären NO-Bioverfügbarkeit beigetragen hat. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Sichelzellanämiepatienten erhöhte Werte von RNS im Plasma aufwiesen, die positiv mit der intravasalen Hämolyse und negativ mit der vaskulären Funktion korrelierten [154; 186]. Weiterhin wurde das Ausmaß von

Membranschädigungen anhand der Lipidperoxidation sowie die totale antioxidative Kapazität der Zellen bestimmt. Dabei wiesen die Sichelzellanämiepatienten keine Veränderungen auf. Physiologischerweise kommt es bei gesunden untrainierten Personen durch regelmäßige körperliche Aktivität zur einer Upregulation des antioxidativen Systems und einer Einschränkung der Produktion freier Radikale [93; 225]. Dies führt dazu, dass Trainierte besser auf oxidativen Stress reagieren und Zellschädigungen auch nach intensiver akuter Belastung deutlich reduzieren können [90; 174; 185]. Vermutlich reichten in der vorliegenden Studie die Trainingsintensität und -dauer nicht aus, um eine Reduktion der Zellschädigung sowie eine Verbesserung der antioxidativen Kapazität zu erreichen. Allerdings wurden die Auswirkungen von freien Radikalen auf intrazelluläre Proteine und DNA sowie die Funktionalität von enzymatischen Antioxidantien nicht gemessen. Ob die Probanden in der Zukunft, zum Beispiel im Alltag nach einem Sprint zum Erreichen des Schulbusses, ebenfalls wie Gesunde von den positiven Effekten des Ausdauertrainings auf oxidativen Stress profitieren könnten, kann nicht abschließend geklärt werden.

Auch wenn das Ausmaß der Lipidperoxidation, welche sich negativ auf die Elastizität der Zellmembran auswirkt [97], nach der chronischen Intervention konstant blieb, konnte in der vorliegenden Untersuchung überraschenderweise ein signifikanter Rückgang der erythrozytären Verformbarkeit bei Scherstressen zwischen 7,34Pa und 50Pa beobachtet werden. Der Großteil des physiologischen Scherstresses, dem die Zellen im menschlichen Körper ausgesetzt sind, liegt zwar deutlich unter 7Pa, in der Mikrozirkulation, zum Beispiel an Bifurkationen kleinster Kapillaren, können jedoch auch höhere Scherstresse auftreten [211]. Abgesehen von der Beschaffenheit der Zellmembran ist die erythrozytäre Verformbarkeit abhängig vom Verhältnis zwischen Zelloberfläche und Zellvolumen sowie der zytoplasmatischen Viskosität [131]. Letztere sinkt bei einer Dehydratation der Zelle, was sich durch eine steigende intrazelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC) bemerkbar macht. In der vorliegenden Studie konnte ein Anstieg des MCHC-Wertes nach der chronischen Intervention beobachtet werden, jedoch war dieser nicht signifikant. In Untersuchungen zur Verformbarkeit und Alterung von gesunden Erythrozyten konnte gezeigt werden, dass die Dehydratation mit steigendem Zellalter zu- und die Verformbarkeit abnimmt [39; 170]. In diesem Sinne könnte die Abnahme des nitrosativen Stresses und der intravasalen Hämolyse zu einem Anstieg des mittleren Zellalters geführt haben, welches bei der Sichelzellanämie bei ca. 30 Tagen liegt [228]. Dies könnte den Flüssigkeitsverlust und die Abnahme der erythrozytären Verformbarkeit in der vorliegenden Studie erklären. Da die Trinkmenge der Probanden zu den Messzeitpunkten nicht explizit abgefragt und das Training in den warmen Sommermonaten durchgeführt wurde, könnten einzelne Probanden zum Zeitpunkt T1 natürlich auch dehydrierter gewesen sein, was eine Zunahme der zytoplasmatischen Viskosität verursacht haben könnte. In jedem Fall waren wie bereits genannt die Intensität und Dauer des Trainings vermutlich nicht hoch genug, um eine Verbesserung der erythrozytären Verformbarkeit zu erreichen, wie sie bei gesunden Probanden beschrieben werden konnte [87; 254]. Es ist unbestritten, dass im Allgemeinen eine sinkende erythrozytäre Verformbarkeit die Sauerstoffversorgung des distalen Gewebes einschränkt und das Risiko einer Hypoxie in der Mikrozirkulation erhöht [54; 212]. Gleichzeitig ist es allerdings fraglich, in welcher Dosis-

Wirkungs-Beziehung dies im menschlichen Körper geschieht. Die gemessenen Abnahmen der erythrozytären Verformbarkeit zwischen 7,34Pa und 50Pa nach der chronischen Intervention waren zwar signifikant, allerdings relativ gesehen mit ca. 5% eher gering. Im Tiermodell zeigte eine Reduktion der erythrozytären Verformbarkeit um weniger als 10% nur minimale Auswirkungen auf die periphere Gewebeperfusion, bei einer Reduktion um ca. 15% erhöhte sich der Flusswiderstandes aber um fast 80% [29]. Dadurch, dass sich weitere Parameter in der vorliegenden Studie wie das freie Hämoglobin und die NO-Bioverfügbarkeit im Plasma sowie der oxidative Stress in den Erythrozyten prognostisch günstig verbesserten, wirkt eine klinisch relevante Zunahme der Fragilität der Zellen insgesamt jedoch unwahrscheinlich.

Als weitere hämorheologisch bedeutsame Größe wurde in der chronischen Intervention das Aggregationsverhalten der Erythrozyten untersucht, welches direkt die Viskosität der gesamten Blutsuspension beeinflusst [195]. Physiologischerweise treten erythrozytäre Aggregate im menschlichen Blutkreislauf bei langsamen Flussraten und niedrigen Scherkräften auf. Bei steigenden Gefäßdrücken und Scherstressen disaggregieren die Zellen jedoch wieder, um den Flusswiderstand zu reduzieren [211]. In Sportinterventionen mit gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Training zu einer Abnahme der erythrozytären Aggregation und der Blutviskosität führte [144]. Die Sichelzellanämiepatienten wiesen in der vorliegenden Untersuchung nach Absolvierung des sechswöchigen Trainings keine Veränderung des Aggregationsindexes, allerdings eine signifikante Abnahme der Aggregations-Disaggregationsscherrate um ca. 30% auf. Diese beschreibt die minimale Scherkraft, die auf die Erythrozyten einwirken muss, um deren Aggregate komplett aufzulösen [120]. In früheren Studien mit SCA-Probanden konnte bereits gezeigt werden, dass deren Erythrozyten eine leicht erniedrigte Tendenz besitzen, Aggregate zu formen, diese allerdings, wenn sie einmal gebildet wurden, nur deutlich schwerer wieder aufgelöst werden können [64; 270]. Dementsprechend ist das Ergebnis der verbesserten Disaggregation für die Patienten ein prognostisch günstiges, da bei der Sichelzellanämie eine Assoziation zwischen erhöhter Festigkeit der Aggregate mit dem akuten Thoraxsyndrom beschrieben werden konnte [156]. Zusätzlich wurde bereits mehrfach beobachtet, dass der Anstieg der Blutviskosität einen entscheidenden Risikofaktor für die Entstehung von Gefäßverschlüssen und vasookklusiven Schmerzkrisen darstellt [20; 51; 156].

Die Auswertung des Fragebogens zur körperlichen Aktivität vor der Intervention ergab, dass die Patienten ein durchschnittliches Interesse am Sport besaßen, allerdings im Alltag viele Anstrengungen vermieden. Vermutlich sind sich die Patienten unsicher, welche Belastungen sie gut vertragen, und aus diesem Grund vorsichtig, da bereits für 40% ein Krankenhausaufenthalt nach freizeitlicher Aktivität notwendig wurde. So nutzten alle Befragten öffentliche Verkehrsmittel für den Schulweg und niemand fuhr Rad oder ging zu Fuß. Ein Jahr nach Absolvierung des Ausdauertrainings gaben allerdings 80% der Teilnehmer an, dass sich ihre körperliche Aktivität im Alltag gesteigert habe, so dass sie an mehr als doppelt so vielen Tagen in der Woche aktiv waren als zuvor. Auch gingen nun 20% zu Fuß zur Schule. Dies legt nahe, dass die Patienten vom komplikationslosen Training in der vorliegenden Studie motiviert wurden, ihr Leben aktiver zu gestalten und sich mehr zu bewegen. In der bereits zitierten Studie von Gellen et al. wiesen die SCA-Probanden nach Beendigung des achtwöchigen Ausdauertrainings eine erhöhte Vitalität

und verbesserte mentale Gesundheit auf [100]. Dass Sichelzellanämiepatienten nach Anleitung eine hohe Compliance bei sportlichen Übungen auch im eigenen Zuhause zeigen, konnten Liem et al. beobachten [162]. Es scheint sinnvoll, die Patienten zu unterrichten, wie sie Belastungen zum Beispiel anhand von einfach zu messenden Vitalparametern wie der Herzfrequenz steuern können, um sie zu mehr gesellschaftlicher Teilhabe zu befähigen. So könnten mehr Patienten von den in der vorliegenden Untersuchung beschriebenen positiven Effekten eines kostengünstigen Ausdauertrainings auf die Hämorheologie und die funktionale Kapazität profitieren.

4.3 Limitationen und Ausblick

Auf Grund des Mangels an praktischer Forschung zu den akuten und chronischen Auswirkungen von Sport auf die Hämorheologie von Sichelzellanämiepatienten kann die vorliegende Untersuchung als Pilotstudie charakterisiert werden. Auch wenn die Studie insgesamt erfolgreich verlaufen ist und neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten, ergeben sich bezüglich des Studiendesigns in der Nachbetrachtung einige Limitierungen, welche im Folgenden dargestellt werden sollen.

Hydroxyurea:

In Bezug auf die Einnahme des Medikamentes Hydroxyurea wies die Studiengruppe der Sichelzellanämiepatienten eine gewisse Heterogenität auf. Sieben der zwölf Probanden nahmen das Medikament bereits vor Beginn der Untersuchung ein und zwei weitere begannen in der ersten Trainingswoche mit der Einnahme, so dass zum Trainingsabschluss insgesamt neun von zwölf Probanden das Medikament erhielten. Dementsprechend könnten sich einige der positiven Ergebnisse nach Absolvierung des chronischen Trainings auch auf die Einleitung der medikamentösen Therapie zurückführen lassen. So konnte in vorausgegangen Studien bereits gezeigt werden, dass Hydroxyurea zum Beispiel die Hämolyse der Patienten reduziert, die erythrozytäre Verformbarkeit verbessert und den oxidativen Stress sowie die NO-Bioverfügbarkeit moduliert [159; 194; 203].

Die geringe Anzahl der Probanden in der vorliegenden Untersuchung ließ keine Unterteilung der SCA-Gruppe mit anschließender statistischer Auswertung zu. In einer gesonderten Betrachtung jedoch zeigten die beiden Probanden, die während des Trainings mit der Einnahme von Hydroxyurea begannen, nur minimalste Veränderungen des prozentualen Anteils von HbS (-2,1% bzw. +1,3%) und HbF (+2,2% bzw. -1,2%) am Gesamthämoglobin zwischen den Zeitpunkten T0 und T1. Da der positive Einfluss von Hydroxyurea auf die Hämorheologie und Klinik der Patienten auf einer Zunahme der HbF-Fraktion des Gesamthämoglobins beruht, dürfte die Medikamenteneinnahme für die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht relevant gewesen sein [194; 223].

Dementsprechend zeigten sich bei allen in dieser Studie erhobenen Parametern auch die gleichen Tendenzen einer Zu- bzw. Abnahme sowohl bei den Probanden mit und ohne Hydroxyureatherapie als auch bei den Probanden, die mit der Einnahme des Medikaments während des Trainings begannen. Die Verbesserung der funktionalen Kapazität schien darüber hinaus sogar etwas stärker bei den Probanden ausgeprägt zu sein, die das Medikament über den gesamten Zeitraum nicht erhielten. Daher sind die positiven Ergebnisse der vorliegenden Studie mit hoher Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Einnahme des Hydroxyurea und können dem chronischen Ausdauertraining zugeschrieben werden.

Für zukünftige Untersuchungen wäre eine Unterteilung der SCA-Probanden in eine Gruppe mit und eine Gruppe ohne Hydroxyureaeinnahme dennoch wünschenswert, auch um der Frage nachzugehen, ob besonders Patienten ohne medikamentöse Therapie von regelmäßiger körperlicher Aktivität profitieren.

Trainingsintensität und -dauer:

Das Studiendesign der vorliegenden Sportintervention sah ein zweimaliges Ausdauertraining pro Woche über einen Zeitraum von sechs Wochen vor. Die Dauer der einzelnen Trainingseinheiten wurde auf 15 bis 30min und die Intensität der Belastung auf 70% der erzielten Leistung beim Erreichen der ersten ventilatorischen Schwelle festgelegt. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Probanden hauptsächlich aerobe Energiegewinnung betrieben und keine nachteiligen Effekte durch anaerobe Stoffwechselprodukte, Laktatazidose und Hypoxie provoziert wurden, was bei der Erkrankung eine Polymerisation des HbS hätte auslösen können [140; 172].

Da keiner der Probanden über die Zeitdauer der Intervention klinische Symptome oder einen Abfall der Sauerstoffsättigung zeigte, scheint ein derartiges Training von Sichelzellanämiepatienten gut vertragen zu werden. Die relativ kurze Zeitdauer der einzelnen Trainingseinheiten reichte bereits aus, um bei den Probanden sowohl eine Verbesserung der ventilatorischen Kapazität als auch einiger hämorheologischer Parameter zu detektieren. Allerdings zeigten die Probanden keine signifikante Zunahme ihrer Leistungsfähigkeit und die erythrozytäre Verformbarkeit sowie die NO-Bioverfügbarkeit in den Erythrozyten konnten nicht gesteigert werden. Dies wäre bei gesunden Probanden in Folge eines effektiven Trainings möglich gewesen [58; 87; 150; 254]. Auch wiesen die Patienten keine Verbesserung ihrer antioxidativen Kapazität und der oxidativen Zellschädigung auf, was ebenfalls bei Gesunden zu erwarten gewesen wäre [90; 174; 185]. Auf Grund dieser Beobachtungen scheint es plausibel, dass das milde bis moderate Training sowohl in Bezug auf die Dauer als auch auf die Intensität nicht ausreichte, um mehr positive Effekte zu erzielen.

In der persönlichen Beobachtung schien die akute Intervention für einen Großteil der Probanden anspruchsvoll, das chronische Training allerdings unterfordernd zu sein. Dies betraf insbesondere diejenigen Probanden, die auch im Alltag aktiv waren und regelmäßig am Schulsport teilnahmen. Von den Erkenntnissen der vorliegenden Untersuchung ausgehend könnten in zukünftigen Sportinterventionen zunächst die Dauer und Regelmäßigkeit der Trainingseinheiten variiert werden. So scheint eine Verlängerung der Trainingsdauer auf 45min denkbar oder auch eine Steigerung der Trainingsfrequenz auf dreimal pro Woche wie Gellen et al. sie bereits komplikationslos mit Sichelzellanämiepatienten durchführen konnten [100]. Eine entscheidende Frage wird dabei für zukünftige Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten sein, bis zu welcher Intensität körperliche Aktivität das Potenzial bietet, den Krankheitsverlauf und die Hämorheologie zu verbessern, ohne dabei für die Patienten gefährlich zu werden.

Rekrutierung und Compliance:

Eine Verlängerung des Trainingszeitraums und eine Erhöhung der wöchentlichen Trainingseinheiten ließe sich allerdings nur bei entsprechender Compliance der Studienteilnehmer durchführen. In der vorliegenden Untersuchung gestaltete es sich trotz direkter Rekrutierung aus der Sichelzellsprechstunde des Kinderkrankenhauses bereits als schwierig, eine ausreichende Anzahl an Probanden mit Sichelzellanämie zu gewinnen. Viele der Probanden, die zunächst Interesse bekundeten, an der Studie teilzunehmen, erschienen nicht zum ausgemachten ersten Termin und waren telefonisch nicht zu erreichen. Es entstand der

Eindruck, dass den erziehungsberechtigten Familienangehörigen der Patienten die Bedeutung der Erkrankung sowie von wissenschaftlicher Forschung im Allgemeinen kaum zu vermitteln waren. Bei den Probanden, die an der gesamten Studie teilnahmen, war die Terminvereinbarung und -einhaltung mit einem hohen organisatorischen Aufwand, vielen Telefonaten und kurzfristigen Verschiebungen verbunden. Dementsprechend musste auch von dem Plan abgerückt werden, gesunde Geschwisterkinder der Probanden als Kontrollgruppe zu rekrutieren, da bei diesen kein ausreichendes Interesse an einer Teilnahme bestand.

Durch die zeitaufwändige Rekrutierung der SCA- und Kontrollgruppe konnten nicht alle Studienteilnehmer die Sportintervention in der gleichen Jahreszeit absolvieren. Da die Trinkmenge nicht explizit abgefragt wurde, könnte es sein, dass dadurch in den heißen Sommermonaten einige Probanden dehydrierter zum Ein- und Ausgangstest erschienen, was einen Einfluss auf verschiedene Parameter wie die erythrozytäre Verformbarkeit gehabt haben könnte.

Bei der Rekrutierung und Compliance von Sichelzellanämiepatienten spielen sprachliche Schwierigkeiten und kulturelle Barrieren eine große Rolle. Diese ergeben sich daraus, dass die Erkrankung in Deutschland hauptsächlich bei Immigranten aus Afrika südlich der Sahara sowie dem mittleren Osten auftritt [153]. Besonders bei minderjährigen Probanden ist die intensive Kommunikation mit den Familienangehörigen für eine erfolgreiche Studienteilnahme essentiell. Diese gestaltete sich allerdings bei den Familien, die sich noch nicht lange in Deutschland aufhielten, als äußerst kompliziert. Auf der anderen Seite zeigten einige Probanden eine besonders hohe Motivation und schienen das regelmäßige Training und die ihnen zuteilwerdende Aufmerksamkeit zu genießen. Da ein Studiendesign wie das vorliegende von der Motivation und Bereitschaft zur regelmäßigen Teilnahme abhängig ist, wird es für zukünftige Untersuchungen mit minderjährigen Sichelzellanämiepatienten wichtig sein, nicht nur die Studienteilnehmer selbst zu motivieren, sondern sich auch der Unterstützung der Erziehungsberechtigten durch intensive Kommunikation zu versichern.

5. Zusammenfassung

Die Sichelzellanämie ist eine der häufigsten genetischen Erkrankungen der Welt, bei der die Patienten durch die Bildung des dysfunktionalen Hämoglobin S an hämolytischer Anämie, Infektionen und Vasookklusionen leiden. Letztere zeichnen sich verantwortlich für das Leitsymptom der Erkrankung, die sogenannten Schmerzkrisen, bei denen ischämische Gewebeschäden in Folge von multiplen Gefäßverschlüssen entstehen. Pathophysiologisch spielen hierbei die erythrozytäre Verformbarkeit und Aggregation, die NO-Bioverfügbarkeit, der oxidative Stress sowie die Hämolyse eine wichtige Rolle.

Trotz der im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erniedrigten Lebenserwartung und -qualität sowie der hohen globalen Prävalenz sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung der Sichelzellanämie limitiert. Da regelmäßige körperliche Aktivität die Fließeigenschaften des Blutes bei Gesunden und die Prognose einer Vielzahl von chronischen Erkrankungen verbessert, wurde in den letzten Jahren zunehmend diskutiert, ob auch Sichelzellanämiepatienten von sportlicher Betätigung profitieren könnten.

Die vorliegende Studie untersuchte daher sowohl akute als auch chronische Effekte von moderatem Ausdauertraining auf spirometrische, hämatologische und hämorheologische Parameter der Sichelzellanämie. Zwölf erkrankte Kinder und Jugendliche absolvierten ein sechswöchiges Ausdauertraining auf dem Fahrradergometer bei einer moderaten Belastung. Zusätzlich wurden bei acht Patienten und acht gesunden Kontrollen die Effekte einer akuten Belastung bis zum Erreichen der ersten ventilatorischen Schwelle gemessen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe wiesen die Patienten eine reduzierte Leistungsfähigkeit und erythrozytäre Verformbarkeit sowie erhöhte Werte von freien Radikalen, freiem Hämoglobin im Plasma sowie von NO in den Erythrozyten auf. Durch die akute Belastung kam es bei den Patienten abgesehen von einer Modulierung des erythrozytären NO-Stoffwechselweges zu keinen negativen Auswirkungen auf die getesteten Parameter.

Nach Absolvierung des sechswöchigen Trainings ließen sich bei den Patienten einige prognostisch günstige Effekte wie eine verbesserte ventilatorische Effizienz, eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit im Plasma sowie eine Reduktion von freien Radikalen und freiem Hämoglobin nachweisen. Die Erythrozyten zeigten verschiedene rheologische Veränderungen wie ein verbessertes Aggregationsverhaltens, aber auch eine verschlechterte Verformbarkeit.

Über den gesamten Zeitraum der Untersuchung kam es bei den Probanden weder zu Hospitalisierungen noch zum Auftreten von klinischer Symptomatik. Ein Jahr nach Beendigung der Intervention berichteten die Probanden in Fragebögen von einer Zunahme der körperlichen Aktivität im Alltag.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass ein moderates Ausdauertraining von jungen Sichelzellanämiepatienten gut vertragen wird und sich bereits geringe Belastungen günstig auf die funktionale Kapazität und Hämorheologie auswirken. Als kostengünstige therapeutische Strategie birgt sportliche Betätigung dementsprechend das Potenzial, den Krankheitsverlauf der Sichelzellanämie positiv zu beeinflussen und den Patienten mehr Teilhabe am gesellschaftlichen Leben zu ermöglichen.

6. Literaturverzeichnis

[1] Adams RJ, Brambilla D, Optimizing Primary Stroke Prevention in Sickle Cell Anemia (STOP 2) Trial Investigators (2005). Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. N Engl J Med, 353(26), 2769-2778.

[2] Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C, Abboud M, Gallagher D, Kutlar A, Nichols FT, Bonds DR, Brambilla D (1998). Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. N Engl J Med, 339(1), 5-11.

[3] Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. Crit Rev Biotechnol, 37(2), 163-176.

[4] Adisa OA, Hu Y, Ghosh S, Aryee D, Osunkwo I, Ofori-Acquah SF (2013). Association between plasma free haem and incidence of vaso-occlusive episodes and acute chest syndrome in children with sickle cell disease. Br J Haematol, 162(5), 702-705.

[5] Akinsheye I, Alsultan A, Solovieff N, Ngo D, Baldwin CT, Sebastiani P, Chui DH, Steinberg MH (2011). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. Blood, 118(1), 19-27.

[6] Akohoue SA, Shankar S, Milne GL, Morrow J, Chen KY, Ajayi WU, Buchowski MS (2007). Energy expenditure, inflammation, and oxidative stress in steady-state adolescents with sickle cell anemia. Pediatr Res, 61(2), 233-238.

[7] Alayash AI (2018). Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. Blood Cells Mol Dis, 70, 78-86.

[8] Alberts B, Hunt T, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J (2015). Molecular biology of the cell (Sixth edition ed.). New York, NY: Garland Science.

[9] Alcorn R, Bowser B, Henley EJ, Holloway V (1984). Fluidotherapy and exercise in the management of sickle cell anemia. A clinical report. Phys Ther, 64(10), 1520-1522.

[10] Aleluia MM, Fonseca TCC, Souza RQ, Neves FI, da Guarda CC, Santiago RP, Cunha BLA, Figueiredo CVB, Santana SS, da Paz SS, Ferreira JRD, Cerqueira BAV, Gonçalves MdS (2017). Comparative study of sickle cell anemia and hemoglobin SC disease: clinical characterization, laboratory biomarkers and genetic profiles. BMC hematology, 17, 15-15.

[11] Allison AC (1954). Protection afforded by sickle-cell trait against subtertian malareal infection. Br Med J, 1(4857), 290-294.

[12] Almeida A, Roberts I (2005). Bone involvement in sickle cell disease. Br J Haematol, 129(4), 482-490.

[13] Amann M, Subudhi AW, Foster C (2006). Predictive validity of ventilatory and lactate thresholds for cycling time trial performance. Scand J Med Sci Sports, 16(1), 27-34.

[14] Amer J, Ghoti H, Rachmilewitz E, Koren A, Levin C, Fibach E (2006). Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. Br J Haematol, 132(1), 108-113.

[15] Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D, Bernaudin F, Bonanomi S, Cappellini MD, Dalle J-H, Di Bartolomeo P, de Heredia CD, Dickerhoff R, Giardini C, Gluckman E, Hussein AA, Kamani N, Minkov M, Locatelli F, Rocha V, Sedlacek P, Smiers F, Thuret I, Yaniv I, Cavazzana M, Peters C (2014). Hematopoietic stem cell transplantation in

thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. Haematologica, 99(5), 811.

[16] Anie KA (2005). Psychological complications in sickle cell disease. Br J Haematol, 129(6), 723-729.

[17] Aslan M, Ryan TM, Adler B, Townes TM, Parks DA, Thompson JA, Tousson A, Gladwin MT, Patel RP, Tarpey MM, Batinic-Haberle I, White CR, Freeman BA (2001). Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(26), 15215-15220.

[18] Asmus K-D, Bonifačić M (2000). Part I • Chapter 1 - Free radical chemistry. In Sen CK, Packer L, Hänninen OOP (Eds.), Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (pp. 3-54). Amsterdam: Elsevier Science B.V.

[19] Aufradet E, Douillard A, Charrin E, Romdhani A, De Souza G, Bessaad A, Faes C, Bourgeaux V, Chirico EN, Canet-Soulas E, Pialoux V, Martin C (2014). Physical activity limits pulmonary endothelial activation in sickle cell SAD mice. Blood, 123(17), 2745-2747.

[20] Awodu OA, Famodu AA, Ajayi OI, Enosolease ME, Olufemi OY, Olayemi E (2009). Using serial haemorheological parameters to assess clinical status in sickle cell anaemia patients in vaso-occlussive crisis. Clin Hemorheol Microcirc, 41(2), 143-148.

[21] Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev, 2014, 360438-360438.

[22] Balayssac-Siransy E, Connes P, Tuo N, Danho C, Diaw M, Sanogo I, Hardy-Dessources MD, Samb A, Ballas SK, Bogui P (2011). Mild haemorheological changes induced by a moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia. Br J Haematol, 154(3), 398-407.

[23] Ballas SK, Kesen MR, Goldberg MF, Lutty GA, Dampier C, Osunkwo I, Wang WC, Hoppe C, Hagar W, Darbari DS, Malik P (2012). Beyond the definitions of the phenotypic complications of sickle cell disease: an update on management. ScientificWorldJournal, 2012, 949535.

[24] Ballas SK, Marcolina MJ (2006). Hyperhemolysis during the evolution of uncomplicated acute painful episodes in patients with sickle cell anemia. Transfusion, 46(1), 105-110.

[25] Ballas SK, Mohandas N (2004). Sickle red cell microrheology and sickle blood rheology. Microcirculation (New York, N.Y. : 1994), 11(2), 209-225.

[26] Ballas SK, Smith ED (1992). Red blood cell changes during the evolution of the sickle cell painful crisis. Blood, 79(8), 2154-2163.

[27] Baskurt OK, Meiselman HJ (2003). Blood Rheology and Hemodynamics. Semin Thromb Hemost, 29(05), 435-450.

[28] Baskurt OK, Uyuklu M, Ulker P, Cengiz M, Nemeth N, Alexy T, Shin S, Hardeman MR, Meiselman HJ (2009). Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation. Clin Hemorheol Microcirc, 43(4), 283-298.

[29] Baskurt OK, Yalcin O, Meiselman HJ (2004). Hemorheology and vascular control mechanisms. Clin Hemorheol Microcirc, 30(3-4), 169-178.

[30] Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M (2016). Pillars Article: Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils: A Graded Response to Membrane Stimulation. J. Immunol. 1983. 130: 1910-1917. J Immunol, 197(3), 683-690.

[31] Bates JN (1992). Nitric oxide measurement by chemiluminescence detection. Neuroprotocols, 1(2), 141-149.

[32] Baum H (2018). Blutbild, kleines. In Gressner AM, Arndt T (Eds.), Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik (pp. 1-1). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

[33] Belanger AM, Keggi C, Kanias T, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB (2015). Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability. Transfusion, 55(10), 2464-2472.

[34] Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, Smith A, Nath KA, Hebbel RP, Vercellotti GM (2014). Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. Blood, 123(3), 377-390.

[35] Berlett BS, Stadtman ER (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem, 272(33), 20313-20316.

[36] Binder RK, Wonisch M, Corra U, Cohen-Solal A, Vanhees L, Saner H, Schmid JP (2008). Methodological approach to the first and second lactate threshold in incremental cardiopulmonary exercise testing. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 15(6), 726-734.

[37] Bizjak DA, Brinkmann C, Bloch W, Grau M (2015). Increase in Red Blood Cell-Nitric Oxide Synthase Dependent Nitric Oxide Production during Red Blood Cell Aging in Health and Disease: A Study on Age Dependent Changes of Rheologic and Enzymatic Properties in Red Blood Cells. PLoS One, 10(4), e0125206-e0125206.

[38] Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK (2003). Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 284(5), H1577-1584.

[39] Bosch FH, Werre JM, Schipper L, Roerdinkholderstoelwinder B, Huls T, Willekens FLA, Wichers G, Halie MR (1994). Determinants of Red-Blood-Cell Deformability in Relation to Cell Age. Eur J Haematol, 52(1), 35-41.

[40] Brandt R, Keston AS (1965). Synthesis of Diacetyldichlorofluorescin: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. Anal Biochem, 11, 6-9.

[41] Brittenham GM, Schechter AN, Noguchi CT (1985). Hemoglobin S polymerization: primary determinant of the hemolytic and clinical severity of the sickling syndromes. Blood, 65(1), 183-189.

[42] Brousse V, Buffet P, Rees D (2014). The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. Br J Haematol, 166(2), 165-176.

[43] Brousse V, Elie C, Benkerrou M, Odievre M-H, Lesprit E, Bernaudin F, Grimaud M, Guitton C, Quinet B, Dangiolo S, de Montalembert M (2012). Acute splenic sequestration crisis in sickle cell disease: cohort study of 190 paediatric patients. Br J Haematol, 156(5), 643-648.

[44] Bruckdorfer R (2005). The basics about nitric oxide. Mol Aspects Med, 26(1-2), 3-31.

[45] Brun JF, Varlet-Marie E, Connes P, Aloulou I (2010). Hemorheological alterations related to training and overtraining. Biorheology, 47(2), 95-115.

[46] Bunn HF (1997). Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. N Engl J Med, 337(11), 762-769.

[47] Cabrales P, Martini J, Intaglietta M, Tsai AG (2006). Blood viscosity maintains microvascular conditions during normovolemic anemia independent of blood oxygen-carrying capacity. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 291(2), H581-H590.

[48] Callahan LA, Woods KF, Mensah GA, Ramsey LT, Barbeau P, Gutin B (2002). Cardiopulmonary responses to exercise in women with sickle cell anemia. Am J Respir Crit Care Med, 165(9), 1309-1316.

[49] Camus SM, De Moraes JA, Bonnin P, Abbyad P, Le Jeune S, Lionnet F, Loufrani L, Grimaud L, Lambry J-C, Charue D, Kiger L, Renard J-M, Larroque C, Le Clésiau H, Tedgui A, Bruneval P, Barja-Fidalgo C, Alexandrou A, Tharaux P-L, Boulanger CM, Blanc-Brude OP (2015). Circulating cell membrane microparticles transfer heme to endothelial cells and trigger vasoocclusions in sickle cell disease. Blood, 125(24), 3805-3814.

[50] Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, McMahon RP, Bonds DR (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. N Engl J Med, 332(20), 1317-1322.

[51] Charlot K, Romana M, Moeckesch B, Jumet S, Waltz X, Divialle-Doumdo L, Hardy-Dessources M-D, Petras M, Tressières B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S, Connes P (2016). Which side of the balance determines the frequency of vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia: Blood viscosity or microvascular dysfunction? Blood Cells Mol Dis, 56(1), 41-45.

[52] Charrin E, Aufradet E, Douillard A, Romdhani A, Souza GD, Bessaad A, Faes C, Chirico EN, Pialoux V, Martin C (2015). Oxidative stress is decreased in physically active sickle cell SAD mice. Br J Haematol, 168(5), 747-756.

[53] Charrin E, Dubé JJ, Connes P, Pialoux V, Ghosh S, Faes C, Ofori-Acquah SF, Martin C (2017). Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice. Blood cells, molecules & diseases, 69, 45-52.

[54] Chien S (1987). Red Cell Deformability and its Relevance to Blood Flow. Annu Rev Physiol, 49(1), 177-192.

[55] Chirico EN, Pialoux V (2012). Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. IUBMB Life, 64(1), 72-80.

[56] Chou ST (2013). Transfusion therapy for sickle cell disease: a balancing act. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2013, 439-446.

[57] Chou ST, Liem RI, Thompson AA (2012). Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. Br J Haematol, 159(4), 394-404.

[58] Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubb M, World M, Deanfield JE (1999). Exercise training enhances endothelial function in young men. J Am Coll Cardiol, 33(5), 1379-1385.

[59] Coates TD, Wood JC (2017). How we manage iron overload in sickle cell patients. Br J Haematol, 177(5), 703-716.

[60] Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN (2003). Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. The Journal of clinical investigation, 111(2), 231-239.

[61] Condon PI, Serjeant GR (1980). Behaviour of untreated proliferative sickle retinopathy. Br J Ophthalmol, 64(6), 404-411.

[62] Connes P, Alexy T, Detterich J, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Ballas SK (2016). The role of blood rheology in sickle cell disease. Blood Rev, 30(2), 111-118.

[63] Connes P, Bouix D, Py G, Prefaut C, Mercier J, Brun JF, Caillaud C (2004). Opposite effects of in vitro lactate on erythrocyte deformability in athletes and untrained subjects. Clin Hemorheol Microcirc, 31(4), 311-318.

[64] Connes P, Lamarre Y, Waltz X, Ballas SK, Lemonne N, Etienne-Julan M, Hue O, Hardy-Dessources M-D, Romana M (2014). Haemolysis and abnormal haemorheology in sickle cell anaemia. Br J Haematol, 165(4), 564-572.

[65] Connes P, Machado R, Hue O, Reid H (2011). Exercise limitation, exercise testing and exercise recommendations in sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc, 49(1-4), 151-163.

[66] Connes P, Pichon A, Hardy-Dessources MD, Waltz X, Lamarre Y, Simmonds MJ, Tripette J (2012). Blood viscosity and hemodynamics during exercise. Clin Hemorheol Microcirc, 51(2), 101-109.

[67] Connes P, Renoux C, Romana M, Abkarian M, Joly P, Martin C, Hardy-Dessources MD, Ballas SK (2018). Blood rheological abnormalities in sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc, 68(2-3), 165-172.

[68] Connes P, Simmonds MJ, Brun JF, Baskurt OK (2013). Exercise hemorheology: classical data, recent findings and unresolved issues. Clin Hemorheol Microcirc, 53(1-2), 187-199.

[69] Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. The FASEB Journal, 17(10), 1195-1214.

[70] Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GGC, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiß C, Kröncke K-D, Hogg N, Feelisch M, Kelm M (2012). Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease. Blood, 120(20), 4229-4237.

[71] Costa FF, Fertrin KY (2016). Clinical Manifestations and Treatment of Adult Sickle Cell Disease. In Costa FF, Conran N (Eds.), Sickle Cell Anemia: From Basic Science to Clinical Practice (pp. 285-318). Cham: Springer International Publishing.

[72] Dallas MH, Triplett B, Shook DR, Hartford C, Srinivasan A, Laver J, Ware R, Leung W (2013). Long-Term Outcome and Evaluation of Organ Function in Pediatric Patients Undergoing Haploidentical and Matched Related Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. Biol Blood Marrow Transplant, 19(5), 820-830.

[73] Dampier C, LeBeau P, Rhee S, Lieff S, Kesler K, Ballas S, Rogers Z, Wang W, Comprehensive Sickle Cell Centers Clinical Trial Consortium Site I (2011). Health-related quality of life in adults with sickle cell disease (SCD): a report from the comprehensive sickle cell centers clinical trial consortium. Am J Hematol, 86(2), 203-205.

[74] Darbari DS, Kple-Faget P, Kwagyan J, Rana S, Gordeuk VR, Castro O (2006). Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. Am J Hematol, 81(11), 858-863.

[75] Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem Biophys Res Commun, 107(4), 1198-1205.

[76] DeBaun MR (2014). Hydroxyurea therapy contributes to infertility in adult men with sickle cell disease: a review. Expert Rev Hematol, 7(6), 767-773.

[77] DeBaun MR, Gordon M, McKinstry RC, Noetzel MJ, White DA, Sarnaik SA, Meier ER, Howard TH, Majumdar S, Inusa BPD, Telfer PT, Kirby-Allen M, McCavit TL, Kamdem A, Airewele G, Woods GM, Berman B, Panepinto JA, Fuh BR, Kwiatkowski JL, King AA, Fixler JM, Rhodes MM, Thompson AA, Heiny ME, Redding-Lallinger RC, Kirkham FJ, Dixon N, Gonzalez CE, Kalinyak KA, Quinn CT, Strouse JJ, Miller JP, Lehmann H,

Kraut MA, Ball WS, Jr., Hirtz D, Casella JF (2014). Controlled trial of transfusions for silent cerebral infarcts in sickle cell anemia. The New England journal of medicine, 371(8), 699-710.

[78] DeBaun MR, Kirkham FJ (2016). Central nervous system complications and management in sickle cell disease. Blood, 127(7), 829.

[79] Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN (2005). Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. Blood, 106(2), 734-739.

[80] Dekker LH, Fijnvandraat K, Brabin BJ, van Hensbroek MB (2012). Micronutrients and sickle cell disease, effects on growth, infection and vaso-occlusive crisis: a systematic review. Pediatr Blood Cancer, 59(2), 211-215.

[81] Deonikar P, Kavdia M (2012). Low micromolar intravascular cell-free hemoglobin concentration affects vascular NO bioavailability in sickle cell disease: a computational analysis. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 112(8), 1383-1392.

[82] Diederich L, Suvorava T, Sansone R, Keller TCSt, Barbarino F, Sutton TR, Kramer CM, Lückstädt W, Isakson BE, Gohlke H, Feelisch M, Kelm M, Cortese-Krott MM (2018). On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability. Front Physiol, 9, 332-332.

[83] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. Nature, 399(6736), 601-605.

[84] Dougherty KA, Schall JI, Rovner AJ, Stallings VA, Zemel BS (2011). Attenuated maximal muscle strength and peak power in children with sickle cell disease. J Pediatr Hematol Oncol, 33(2), 93-97.

[85] El-Sayed MS, Ali N, Ali ZE-S (2005). Haemorheology in Exercise and Training. Sports Med, 35(8), 649-670.

[86] Elmariah H, Garrett ME, De Castro LM, Jonassaint JC, Ataga KI, Eckman JR, Ashley-Koch AE, Telen MJ (2014). Factors associated with survival in a contemporary adult sickle cell disease cohort. Am J Hematol, 89(5), 530-535.

[87] Ernst E (1987). Influence of regular physical activity on blood rheology. Eur Heart J, 8(suppl_G), 59-62.

[88] Faes C, Balayssac-Siransy E, Connes P, Hivert L, Danho C, Bogui P, Martin C, Pialoux V (2014). Moderate endurance exercise in patients with sickle cell anaemia: effects on oxidative stress and endothelial activation. Br J Haematol, 164(1), 124-130.

[89] Faes C, Charrin E, Connes P, Pialoux V, Martin C (2015). Chronic physical activity limits blood rheology alterations in transgenic SAD mice. Am J Hematol, 90(2), E32-33.

[90] Falone S, Mirabilio A, Pennelli A, Cacchio M, Di Baldassarre A, Gallina S, Passerini A, Amicarelli F (2010). Differential impact of acute bout of exercise on redox-and oxidative damage-related profiles between untrained subjects and amateur runners. Physiol Res, 59(6), 953-961.

[91] Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourd'Heuil D, Kelm M (2002). Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. FASEB J, 16(13), 1775-1785.

[92] Fernandes Q (2017). Therapeutic strategies in Sickle Cell Anemia: The past present and future. Life Sci, 178, 100-108.

[93] Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative Stress. Sports Med, 36(4), 327-358.

[94] Fitzhugh CD, Lauder N, Jonassaint JC, Telen MJ, Zhao X, Wright EC, Gilliam FR, De Castro LM (2010). Cardiopulmonary complications leading to premature deaths in adult patients with sickle cell disease. Am J Hematol, 85(1), 36-40.

[95] Gallagher PG, Joiner C (2009). The erythrocyte membrane. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, Second Edition, 158-184.

[96] Gardner K, Douiri A, Drasar E, Allman M, Mwirigi A, Awogbade M, Thein SL (2016). Survival in adults with sickle cell disease in a high-income setting. Blood, 128(10), 1436-1438.

[97] Gaschler MM, Stockwell BR (2017). Lipid peroxidation in cell death. Biochem Biophys Res Commun, 482(3), 419-425.

[98] Gaston MH, Verter JI, Woods G, Pegelow C, Kelleher J, Presbury G, Zarkowsky H, Vichinsky E, Iyer R, Lobel JS, Diamond S, Holbrook CT, Gill FM, Ritchey K, Falletta JM (1986). Prophylaxis with Oral Penicillin in Children with Sickle Cell Anemia. N Engl J Med, 314(25), 1593-1599.

[99] Gaus W, Muche R (2017). Medizinische Statistik angewandte Biometrie für Ärzte und Gesundheitsberufe (2., überarbeitete Auflage ed.). Stuttgart: Schattauer.

[100] Gellen B, Messonnier LA, Galactéros F, Audureau E, Merlet AN, Rupp T, Peyrot S, Martin C, Féasson L, Bartolucci P, Habibi A, Guillet E, Gellen-Dautremer J, Ribeil J-A, Arlet J-B, Mattioni S, Berkenou J, Delrieux N, Lionnet F, Grenot J-F, Mira J, Peyrard A, Lacroix R, Garcin A, Di Liberto G, Hourdé C (2018). Moderate-intensity endurance-exercise training in patients with sickle-cell disease without severe chronic complications (EXDRE): an open-label randomised controlled trial. The Lancet Haematology, 5(11), e554-e562.

[101] George A, Pushkaran S, Li L, An X, Zheng Y, Mohandas N, Joiner CH, Kalfa TA (2010). Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species. Blood cells, molecules & diseases, 45(1), 41-45.

[102] Ghafuri DL, Stimpson S-J, Day ME, James A, DeBaun MR, Sharma D (2017). Fertility challenges for women with sickle cell disease. Expert Rev Hematol, 10(10), 891-901.

[103] Gibson JS, Rees DC (2016). How benign is sickle cell trait? EBioMedicine, 11, 21-22.

[104] Gil KM, Carson JW, Porter LS, Ready J, Valrie C, Redding-Lallinger R, Daeschner C (2003). Daily Stress and Mood and Their Association With Pain, Health-Care Use, and School Activity in Adolescents With Sickle Cell Disease. J Pediatr Psychol, 28(5), 363-373.

[105] Givan AL (2004). Flow cytometry: an introduction. Methods Mol Biol, 263, 1-32.

[106] Gladwin MT, Barst RJ, Gibbs JSR, Hildesheim M, Sachdev V, Nouraie M, Hassell KL, Little JA, Schraufnagel DE, Krishnamurti L, Novelli E, Girgis RE, Morris CR, Berman Rosenzweig E, Badesch DB, Lanzkron S, Castro OL, Taylor JGt, Goldsmith JC, Kato GJ, Gordeuk VR, Machado RF, walk PI, Patients (2014). Risk factors for death in 632 patients with sickle cell disease in the United States and United Kingdom. PLoS One, 9(7), e99489-e99489.

[107] Gladwin MT, Kato GJ, Weiner D, Onyekwere OC, Dampier C, Hsu L, Hagar RW, Howard T, Nuss R, Okam MM, Tremonti CK, Berman B, Villella A, Krishnamurti L, Lanzkron S, Castro O, Gordeuk VR, Coles WA, Peters-Lawrence M, Nichols J, Hall MK, Hildesheim M, Blackwelder WC, Baldassarre J, Casella JF, De NI (2011). Nitric oxide for inhalation in the acute treatment of sickle cell pain crisis: a randomized controlled trial. JAMA, 305(9), 893-902.

[108] Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F, Labopin M, Volt F, Carreras J, Pinto Simões B, Ferster A, Dupont S, de la Fuente J, Dalle J-H, Zecca M, Walters MC, Krishnamurti L, Bhatia M, Leung K, Yanik G, Kurtzberg J, Dhedin N, Kuentz M, Michel G, Apperley J, Lutz P, Neven B, Bertrand Y, Vannier JP, Ayas M, Cavazzana M, Matthes-Martin S, Rocha V, Elayoubi H, Kenzey C, Bader P, Locatelli F, Ruggeri A, Eapen M (2017). Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. Blood, 129(11), 1548.

[109] Goodwin ML, Harris JE, Hernandez A, Gladden LB (2007). Blood lactate measurements and analysis during exercise: a guide for clinicians. J Diabetes Sci Technol, 1(4), 558-569.

[110] Granger DN, Kvietys PR (2015). Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. Redox biology, 6, 524-551.

[111] Grau M, Cremer JM, Schmeichel S, Kunkel M, Bloch W (2018). Comparisons of Blood Parameters, Red Blood Cell Deformability and Circulating Nitric Oxide Between Males and Females Considering Hormonal Contraception: A Longitudinal Gender Study. Front Physiol, 9, 1835-1835.

[112] Grau M, Hendgen-Cotta UB, Brouzos P, Drexhage C, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Kelm M, Kleinbongard P (2007). Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 851(1-2), 106-123.

[113] Grau M, Mozar A, Charlot K, Lamarre Y, Weyel L, Suhr F, Collins B, Jumet S, Hardy-Dessources M-D, Romana M, Lemonne N, Etienne-Julan M, Antoine-Jonville S, Bloch W, Connes P (2015). High red blood cell nitric oxide synthase activation is not associated with improved vascular function and red blood cell deformability in sickle cell anaemia. Br J Haematol, 168(5), 728-736.

[114] Grau M, Pauly S, Ali J, Walpurgis K, Thevis M, Bloch W, Suhr F (2013). RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability. PLoS One, 8(2), e56759-e56759.

[115] Grosse SD, Odame I, Atrash HK, Amendah DD, Piel FB, Williams TN (2011). Sickle cell disease in Africa: a neglected cause of early childhood mortality. Am J Prev Med, 41(6 Suppl 4), S398-405.

[116] Grubina R, Basu S, Tiso M, Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2008). Nitrite reductase activity of hemoglobin S (sickle) provides insight into contributions of heme redox potential versus ligand affinity. J Biol Chem, 283(6), 3628-3638.

[117] Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem, 27(8), 1131-1139.

[118] Halasa NB, Shankar SM, Talbot TR, Arbogast PG, Mitchel EF, Wang WC, Schaffner W, Craig AS, Griffin MR (2007). Incidence of Invasive Pneumococcal Disease among Individuals with Sickle Cell Disease before and after the Introduction of the Pneumococcal Conjugate Vaccine. Clin Infect Dis, 44(11), 1428-1433.

[119] Han D, Loukianoff S, McLaughlin L (2000). Part VII • Chapter 17 - Oxidative stress indices: analytical aspects and significance. In Sen CK, Packer L, Hänninen OOP (Eds.), Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (pp. 433-483). Amsterdam: Elsevier Science B.V.

[120] Hardeman MR, Dobbe JG, Ince C (2001). The Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) as red blood cell aggregometer. Clin Hemorheol Microcirc, 25(1), 1-11.

[121] Hardeman MR, Goedhart P, Breederveld D (1987). Laser diffraction ellipsometry of erythrocytes under controlled shear stress using a rotational viscosimeter. Clin Chim Acta, 165(2), 227-234.

[122] Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP (1994). Laser-Assisted Optical Rotational Cell Analyzer (Lorca); 1. A New Instrument for Measurement of Various Structural Hemorheological Parameters. Clin Hemorheol, 14(4), 605-618.

[123] Hassell KL (2010). Population estimates of sickle cell disease in the U.S. Am J Prev Med, 38(4 Suppl), S512-521.

[124] Hebbel RP (1991). Beyond hemoglobin polymerization: the red blood cell membrane and sickle disease pathophysiology. Blood, 77(2), 214.

[125] Held L, Rufibach K, Seifert B (2013). Medizinische Statistik Konzepte, Methoden, Anwendungen. München u.a.: Pearson.

[126] Hendgen-Cotta U, Grau M, Rassaf T, Gharini P, Kelm M, Kleinbongard P (2008). Reductive gas-phase chemiluminescence and flow injection analysis for measurement of the nitric oxide pool in biological matrices. Methods Enzymol, 441, 295-315.

[127] Herrick JB (2001). Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. Yale J Biol Med, 74(3), 179-184.

[128] Hierso R, Lemonne N, Villaescusa R, Lalanne-Mistrih M-L, Charlot K, Etienne-Julan M, Tressières B, Lamarre Y, Tarer V, Garnier Y, Hernandez AA, Ferracci S, Connes P, Romana M, Hardy-Dessources M-D (2017). Exacerbation of oxidative stress during sickle vaso-occlusive crisis is associated with decreased anti-band 3 autoantibodies rate and increased red blood cell-derived microparticle level: a prospective study. Br J Haematol, 176(5), 805-813.

[129] Hornbeck PV (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. Curr Protoc Immunol, 110, 2 1 1-23.

[130] Howard J, Malfroy M, Llewelyn C, Choo L, Hodge R, Johnson T, Purohit S, Rees DC, Tillyer L, Walker I, Fijnvandraat K, Kirby-Allen M, Spackman E, Davies SC, Williamson LM (2013). The Transfusion Alternatives Preoperatively in Sickle Cell Disease (TAPS) study: a randomised, controlled, multicentre clinical trial. The Lancet, 381(9870), 930-938.

[131] Huisjes R, Bogdanova A, van Solinge WW, Schiffelers RM, Kaestner L, van Wijk R (2018). Squeezing for Life - Properties of Red Blood Cell Deformability. Front Physiol, 9, 656.

[132] Hyacinth HI, Adams RJ, Voeks JH, Hibbert JM, Gee BE (2014). Frequent red cell transfusions reduced vascular endothelial activation and thrombogenicity in children with sickle cell anemia and high stroke risk. Am J Hematol, 89(1), 47-51.

[133] Ialongo C (2017). Preanalytic of total antioxidant capacity assays performed in serum, plasma, urine and saliva. Clin Biochem, 50(6), 356-363.

[134] Ingram VM (1957). Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. Nature, 180(4581), 326-328.

[135] Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT, 3rd (1984). Bone-marrow transplantation in a patient with sickle-cell anemia. N Engl J Med, 311(12), 780-783.

[136] Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, 2nd, Ischiropoulos H (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. Free Radic Biol Med, 52(1), 1-6.

[137] Kato GJ (2018). Exercise training: a prescription for sickle-cell disease? Lancet Haematol, 5(11), e502-e503.

[138] Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor Jt, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM, Jr., Gladwin MT (2006). Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. Blood, 107(6), 2279-2285.

[139] Kato GJ, Onyekwere OC, Gladwin MT (2007). Pulmonary hypertension in sickle cell disease: relevance to children. Pediatr Hematol Oncol, 24(3), 159-170.

[140] Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, Smith WR, Panepinto JA, Weatherall DJ, Costa FF, Vichinsky EP (2018). Sickle cell disease. Nat Rev Dis Primers, 4, 18010.

[141] Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT (2017). Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. The Journal of clinical investigation, 127(3), 750-760.

[142] Kauf TL, Coates TD, Huazhi L, Mody-Patel N, Hartzema AG (2009). The cost of health care for children and adults with sickle cell disease. Am J Hematol, 84(6), 323-327.

[143] Kelm M, Schrader J (1990). Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Circ Res, 66(6), 1561-1575.

[144] Kilic-Toprak E, Ardic F, Erken G, Unver-Kocak F, Kucukatay V, Bor-Kucukatay M (2012). Hemorheological responses to progressive resistance exercise training in healthy young males. Med Sci Monit, 18(6), CR351-360.

[145] Kim-Shapiro DB, Gladwin MT (2018). Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. Clin Hemorheol Microcirc, 68(2-3), 223-237.

[146] King AA, Strouse JJ, Rodeghier MJ, Compas BE, Casella JF, McKinstry RC, Noetzel MJ, Quinn CT, Ichord R, Dowling MM, Miller JP, Debaun MR (2014). Parent education and biologic factors influence on cognition in sickle cell anemia. Am J Hematol, 89(2), 162-167.

[147] Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Özüyaman B, Schnürch H-G, Gödecke A, Weber A-A, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. Blood, 107(7), 2943-2951.

[148] Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozuyaman B, Schnurch HG, Godecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rosen P, Kelm M (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. Blood, 107(7), 2943-2951.

[149] Kohen R, Nyska A (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol Pathol, 30(6), 620-650.

[150] Koliamitra C, Holtkamp B, Zimmer P, Bloch W, Grau M (2017). Impact of training volume and intensity on RBC-NOS/NO pathway and endurance capacity. Biorheology, 54(1), 37-50.

[151] Koutsiaris AG, Tachmitzi SV, Batis N, Kotoula MG, Karabatsas CH, Tsironi E, Chatzoulis DZ (2007). Volume flow and wall shear stress quantification in the human conjunctival capillaries and post-capillary venules in vivo. Biorheology, 44(5-6), 375-386.

[152] Kuck L, Grau M, Bloch W, Simmonds MJ (2019). Shear Stress Ameliorates Superoxide Impairment to Erythrocyte Deformability With Concurrent Nitric Oxide Synthase Activation. Front Physiol, 10, 36-36.

[153] Kunz JB, Cario H, Grosse R, Jarisch A, Lobitz S, Kulozik AE (2017). The epidemiology of sickle cell disease in Germany following recent large-scale immigration. Pediatr Blood Cancer, 64(7).

[154] Kupesiz A, Celmeli G, Dogan S, Antmen B, Aslan M (2012). The effect of hemolysis on plasma oxidation and nitration in patients with sickle cell disease. Free Radic Res, 46(7), 883-890.

[155] Kuypers FA (2014). Hemoglobin S Polymerization and Red Cell Membrane Changes. Hematol Oncol Clin North Am, 28(2), 155-179.

[156] Lamarre Y, Romana M, Waltz X, Lalanne-Mistrih M-L, Tressières B, Divialle-Doumdo L, Hardy-Dessources M-D, Vent-Schmidt J, Petras M, Broquere C, Maillard F, Tarer V, Etienne-Julan M, Connes P (2012). Hemorheological risk factors of acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crisis in children with sickle cell disease. Haematologica, 97(11), 1641-1647.

[157] Landburg PP, Teerlink T, Biemond BJ, Brandjes DPM, Muskiet FAJ, Duits AJ, Schnog JB (2010). Plasma asymmetric dimethylarginine concentrations in sickle cell disease are related to the hemolytic phenotype. Blood Cells Mol Dis, 44(4), 229-232.

[158] Lei J, Vodovotz Y, Tzeng E, Billiar TR (2013). Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system. Nitric Oxide, 35, 175-185.

[159] Lemonne N, Charlot K, Waltz X, Ballas SK, Lamarre Y, Lee K, Hierso R, Connes C, Etienne-Julan M, Romana M, Connes P (2015). Hydroxyurea treatment does not increase blood viscosity and improves red blood cell rheology in sickle cell anemia. Haematologica, 100(10), e383-e386.

[160] Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araujo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH (2008). DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(33), 11869-11874.

[161] Li X, Dao M, Lykotrafitis G, Karniadakis GE (2017). Biomechanics and biorheology of red blood cells in sickle cell anemia. J Biomech, 50, 34-41.

[162] Liem RI, Akinosun M, Muntz DS, Thompson AA (2017). Feasibility and safety of home exercise training in children with sickle cell anemia. Pediatr Blood Cancer, 64(12).

[163] Liem RI, Reddy M, Pelligra SA, Savant AP, Fernhall B, Rodeghier M, Thompson AA (2015). Reduced fitness and abnormal cardiopulmonary responses to maximal exercise testing in children and young adults with sickle cell anemia. Physiol Rep, 3(4).

[164] Lincoln TM, Dey N, Sellak H (2001). Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. J Appl Physiol (1985), 91(3), 1421-1430.

[165] Lipowsky HH (2005). Microvascular rheology and hemodynamics. Microcirculation, 12(1), 5-15.

[166] Liu X, Samouilov A, Lancaster JR, Jr., Zweier JL (2002). Nitric oxide uptake by erythrocytes is primarily limited by extracellular diffusion not membrane resistance. The Journal of biological chemistry, 277(29), 26194-26199.

[167] Lobitz S, Telfer P, Cela E, Allaf B, Angastiniotis M, Backman Johansson C, Badens C, Bento C, Bouva MJ, Canatan D, Charlton M, Coppinger C, Daniel Y, de Montalembert M, Ducoroy P, Dulin E, Fingerhut R, Frommel C, Garcia-Morin M, Gulbis B, Holtkamp

U, Inusa B, James J, Kleanthous M, Klein J, Kunz JB, Langabeer L, Lapoumeroulie C, Marcao A, Marin Soria JL, McMahon C, Ohene-Frempong K, Perini JM, Piel FB, Russo G, Sainati L, Schmugge M, Streetly A, Tshilolo L, Turner C, Venturelli D, Vilarinho L, Yahyaoui R, Elion J, Colombatti R, with the endorsement of EuroBloodNet tERNiRHD (2018). Newborn screening for sickle cell disease in Europe: recommendations from a Pan-European Consensus Conference. Br J Haematol, 183(4), 648-660.

[168] Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 56(3), 313-316.

[169] Ludolph B, Bloch W, Kelm M, Schulz R, Kleinbongard P (2007). Short-term effect of the HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on erythrocyte nitric oxide synthase activity. Vasc Health Risk Manag, 3(6), 1069-1073.

[170] Lutz HU, Stammler P, Fasler S, Ingold M, Fehr J (1992). Density separation of human red blood cells on self forming PercollR gradients: correlation with cell age. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 1116(1), 1-10.

[171] MacArthur PH, Shiva S, Gladwin MT (2007). Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 851(1-2), 93-105.

[172] Mairbaurl H (2013). Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. Front Physiol, 4, 332.

[173] Makani J, Williams TN, Marsh K (2007). Sickle cell disease in Africa: burden and research priorities. Ann Trop Med Parasitol, 101(1), 3-14.

[174] Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P (1997). No Evidence of Oxidative Stress After a Triathlon Race in Highly Trained Competitors. Int J Sports Med, 18(03), 186-190.

[175] Martin C, Pialoux V, Faes C, Charrin E, Skinner S, Connes P (2018). Does physical activity increase or decrease the risk of sickle cell disease complications? Br J Sports Med, 52(4), 214.

[176] McClish DK, Penberthy LT, Bovbjerg VE, Roberts JD, Aisiku IP, Levenson JL, Roseff SD, Smith WR (2005). Health related quality of life in sickle cell patients: the PiSCES project. Health and quality of life outcomes, 3, 50-50.

[177] McClish DK, Smith WR, Dahman BA, Levenson JL, Roberts JD, Penberthy LT, Aisiku IP, Roseff SD, Bovbjerg VE (2009). Pain site frequency and location in sickle cell disease: the PiSCES project. Pain, 145(1-2), 246-251.

[178] McCurdy PR, Sherman AS (1978). Irreversibly sickled cells and red cell survival in sickle cell anemia: A Study with Both DF32P and 51CR. The American Journal of Medicine, 64(2), 253-258.

[179] McGann PT, Ware RE (2015). Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. Expert Opin Drug Saf, 14(11), 1749-1758.

[180] Mentzer WC, Heller S, Pearle PR, Hackney E, Vichinsky E (1994). Availability of related donors for bone marrow transplantation in sickle cell anemia. Am J Pediatr Hematol Oncol, 16(1), 27-29.

[181] Merlet AN, Chatel B, Hourdé C, Ravelojaona M, Bendahan D, Féasson L, Messonnier LA (2018). How Sickle Cell Disease Impairs Skeletal Muscle Function: Implications in Daily Life. Med Sci Sports Exerc, 51(1), 4-11.

[182] Miller ST (2011). How I treat acute chest syndrome in children with sickle cell disease. Blood, 117(20), 5297-5305.

[183] Millis RM, Baker FW, Ertugrul L, Douglas RM, Sexcius L (1994). Physical performance decrements in children with sickle cell anemia. J Natl Med Assoc, 86(2), 113-116.

[184] Milner PF, Charache S (1973). Life span of carbamylated red cells in sickle cell anemia. The Journal of clinical investigation, 52(12), 3161-3171.

[185] Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. Eur J Appl Physiol, 84(1), 1-6.

[186] Mockesch B, Connes P, Charlot K, Skinner S, Hardy-Dessources MD, Romana M, Jumet S, Petras M, Divialle-Doumdo L, Martin C, Tressieres B, Tarer V, Hue O, Etienne-Julan M, Antoine S, Pialoux V (2017). Association between oxidative stress and vascular reactivity in children with sickle cell anaemia and sickle haemoglobin C disease. Br J Haematol, 178(3), 468-475.

[187] Modell B, Darlison M (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. Bull World Health Organ, 86(6), 480-487.

[188] Moheeb H, Wali YA, El-Sayed MS (2007). Physical fitness indices and anthropometrics profiles in schoolchildren with sickle cell trait/disease. Am J Hematol, 82(2), 91-97.

[189] Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT (2005). Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. JAMA, 294(1), 81-90.

[190] Morris CR, Suh JH, Hagar W, Larkin S, Bland DA, Steinberg MH, Vichinsky EP, Shigenaga M, Ames B, Kuypers FA, Klings ES (2008). Erythrocyte glutamine depletion, altered redox environment, and pulmonary hypertension in sickle cell disease. Blood, 111(1), 402-410.

[191] Mount PF, Kemp BE, Power DA (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. J Mol Cell Cardiol, 42(2), 271-279.

[192] Mozar A, Connes P, Collins B, Hardy-Dessources MD, Romana M, Lemonne N, Bloch W, Grau M (2016). Red blood cell nitric oxide synthase modulates red blood cell deformability in sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc, 64(1), 47-53.

[193] Murayama M (1966). Molecular mechanism of red cell "sickling". Science, 153(3732), 145-149.

[194] Nader E, Grau M, Fort R, Collins B, Cannas G, Gauthier A, Walpurgis K, Martin C, Bloch W, Poutrel S, Hot A, Renoux C, Thevis M, Joly P, Romana M, Guillot N, Connes P (2018). Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. Nitric Oxide, 81, 28-35.

[195] Nader E, Skinner S, Romana M, Fort R, Lemonne N, Guillot N, Gauthier A, Antoine-Jonville S, Renoux C, Hardy-Dessources M-D, Stauffer E, Joly P, Bertrand Y, Connes P (2019). Blood Rheology: Key Parameters, Impact on Blood Flow, Role in Sickle Cell Disease and Effects of Exercise. Front Physiol, 10, 1329-1329.

[196] Nash GB, Johnson CS, Meiselman HJ (1988). Rheologic impairment of sickle RBCs induced by repetitive cycles of deoxygenation-reoxygenation. Blood, 72(2), 539.

[197] Nath KA, Hebbel RP (2015). Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. Nature Reviews Nephrology, 11, 161.

[198] Naumann HN, Diggs LW, Barreras L, Williams BJ (1971). Plasma hemoglobin and hemoglobin fractions in sickle cell crisis. Am J Clin Pathol, 56(2), 137-147.

[199] Nevitt SJ, Jones AP, Howard J (2017). Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. The Cochrane database of systematic reviews, 4(4), CD002202-CD002202.

[200] Nickel RS, Hsu LL (2016). Clinical Manifestations of Sickle Cell Anemia: Infants and Children. In Costa FF, Conran N (Eds.), Sickle Cell Anemia: From Basic Science to Clinical Practice (pp. 213-229). Cham: Springer International Publishing.

[201] Niki E (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. Biochim Biophys Acta, 1840(2), 809-817.

[202] Nimse SB, Pal D (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. Rsc Advances, 5(35), 27986-28006.

[203] Nouraie M, Lee JS, Zhang Y, Kanias T, Zhao X, Xiong Z, Oriss TB, Zeng Q, Kato GJ, Gibbs JSR, Hildesheim ME, Sachdev V, Barst RJ, Machado RF, Hassell KL, Little JA, Schraufnagel DE, Krishnamurti L, Novelli E, Girgis RE, Morris CR, Rosenzweig EB, Badesch DB, Lanzkron S, Castro OL, Goldsmith JC, Gordeuk VR, Gladwin MT, Walk PI, Patients (2013). The relationship between the severity of hemolysis, clinical manifestations and risk of death in 415 patients with sickle cell anemia in the US and Europe. Haematologica, 98(3), 464-472.

[204] Nusair S (2017). Interpreting the Incremental Cardiopulmonary Exercise Test. Am J Cardiol, 119(3), 497-500.

[205] Oh JY, Hamm J, Xu X, Genschmer K, Zhong M, Lebensburger J, Marques MB, Kerby JD, Pittet JF, Gaggar A, Patel RP (2016). Absorbance and redox based approaches for measuring free heme and free hemoglobin in biological matrices. Redox Biol, 9, 167-177.

[206] Ojiambo RM (2013). Physical Activity and Well-being A Review of the Health Benefits of Physical Activity on Health Outcomes: Scienpress Ltd.

[207] Onwubalili JK (1983). Sickle-cell anaemia: an explanation for the ancient myth of reincarnation in Nigeria. Lancet, 2(8348), 503-505.

[208] Osarhiemen AO, Devin SM, Soyang K, Simone M, Opeyemi K, Lewis LH, Alexis AT, Robert IL (2017). Self-Reported Physical Activity and Exercise Patterns in Children With Sickle Cell Disease. Pediatr Exerc Sci, 29(3), 388-395.

[209] Oztasan N, Taysi S, Gumustekin K, Altinkaynak K, Aktas O, Timur H, Siktar E, Keles S, Akar S, Akcay F, Dane S, Gul M (2004). Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. Eur J Appl Physiol, 91(5), 622-627.

[210] Panepinto JA, Bonner M (2012). Health-related quality of life in sickle cell disease: Past, present, and future. Pediatr Blood Cancer, 59(2), 377-385.

[211] Papaioannou TG, Stefanadis C (2005). Vascular wall shear stress: basic principles and methods. Hellenic J Cardiol, 46(1), 9-15.

[212] Parthasarathi K, Lipowsky HH (1999). Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 277(6), H2145-H2157.

[213] Pauling L, Itano HA, et al. (1949). Sickle cell anemia a molecular disease. Science, 110(2865), 543-548.

[214] Pelletier MM, Kleinbongard P, Ringwood L, Hito R, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT, Dejam A (2006). The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: Pitfalls and solutions. Free Radic Biol Med, 41(4), 541-548.

[215] Percy MJ, McFerran NV, Lappin TRJ (2005). Disorders of oxidised haemoglobin. Blood Rev, 19(2), 61-68.

[216] Perutz RR, Liquori AM, Eirich F (1951). X-ray and solubility studies of the haemoglobin of sickle-cell anaemia patients. Nature, 167(4258), 929-931.

[217] Piel FB, Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN (2013). Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. PLoS Med, 10(7), e1001484.

[218] Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, Temperley WH, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI (2013). Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. Lancet, 381(9861), 142-151.

[219] Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Williams TN, Weatherall DJ, Hay SI (2010). Global distribution of the sickle cell gene and geographical confirmation of the malaria hypothesis. Nat Commun, 1, 104.

[220] Piel FB, Steinberg MH, Rees DC (2017). Sickle Cell Disease. N Engl J Med, 376(16), 1561-1573.

[221] Pingitore A, Lima GPP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C (2015). Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. Nutrition, 31(7), 916-922.

[222] Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, Klug PP (1994). Mortality In Sickle Cell Disease -- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. N Engl J Med, 330(23), 1639-1644.

[223] Platt OS, Orkin SH, Dover G, Beardsley GP, Miller B, Nathan DG (1984). Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. The Journal of clinical investigation, 74(2), 652-656.

[224] Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, Kinney TR (1991). Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. N Engl J Med, 325(1), 11-16.

[225] Powers SK, Jackson MJ (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. Physiol Rev, 88(4), 1243-1276.

[226] Powers SK, Nelson WB, Hudson MB (2011). Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. Free Radic Biol Med, 51(5), 942-950.

[227] Powers SK, Sen CK (2000). Part IV • Chapter 10 - Physiological antioxidants and exercise training. In Sen CK, Packer L, Hänninen OOP (Eds.), Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise (pp. 221-242). Amsterdam: Elsevier Science B.V.

[228] Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL, Buchanan GR (2010). Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. Blood, 115(17), 3447.

[229] Quinn CT, Smith EP, Arbabi S, Khera PK, Lindsell CJ, Niss O, Joiner CH, Franco RS, Cohen RM (2016). Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sickle cell anemia. Am J Hematol, 91(12), 1195-1201.

[230] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet, 2(8567), 1057-1058.

[231] Ramos-Vara JA (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol, 42(4), 405-426.

[232] Ramos-Vara JA (2017). Principles and Methods of Immunohistochemistry. Methods Mol Biol, 1641, 115-128.

[233] Rao SP, Miller ST, Cohen BJ (1992). Transient aplastic crisis in patients with sickle cell disease. B19 parvovirus studies during a 7-year period. Am J Dis Child, 146(11), 1328-1330.

[234] Rathee K, Dhull V, Dhull R, Singh S (2016). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. Biochem Biophys Rep, 5, 35-54.

[235] Rees DC, Williams TN, Gladwin MT (2010). Sickle-cell disease. The Lancet, 376(9757), 2018-2031.

[236] Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, Schechter AN, Gladwin MT (2002). Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. Nat Med, 8(12), 1383-1389.

[237] Ribeil J-A, Hacein-Bey-Abina S, Payen E, Magnani A, Semeraro M, Magrin E, Caccavelli L, Neven B, Bourget P, El Nemer W, Bartolucci P, Weber L, Puy H, Meritet J-F, Grevent D, Beuzard Y, Chrétien S, Lefebvre T, Ross RW, Negre O, Veres G, Sandler L, Soni S, de Montalembert M, Blanche S, Leboulch P, Cavazzana M (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. N Engl J Med, 376(9), 848-855.

[238] Romain AJ, Brun JF, Varlet-Marie E, Raynaud de Mauverger E (2011). Effects of exercise training on blood rheology: a meta-analysis. Clin Hemorheol Microcirc, 49(1-4), 199-205.

[239] Romero MR, Ahumada F, Garay F, Baruzzi AM (2010). Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. Anal Chem, 82(13), 5568-5572.

[240] Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT (2005). The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma HemoglobinA Novel Mechanism of Human Disease. JAMA, 293(13), 1653-1662.

[241] Ryan TM, Ciavatta DJ, Townes TM (1997). Knockout-transgenic mouse model of sickle cell disease. Science, 278(5339), 873-876.

[242] Salazar Vazquez BY, Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M (2011). Nonlinear cardiovascular regulation consequent to changes in blood viscosity. Clin Hemorheol Microcirc, 49(1-4), 29-36.

[243] Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM (2013). Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. Blood, 121(8), 1276-1284.

[244] Schatz J, Brown RT, Pascual JM, Hsu L, DeBaun MR (2001). Poor school and cognitive functioning with silent cerebral infarcts and sickle cell disease. Neurology, 56(8), 1109.

[245] Schmidt S, Will N, Henn A, Reimers A, Woll A (2016). *Der Motorik-Modul Aktivitätsfragebogen MoMo-AFB : Leitfaden zur Anwendung und Auswertung*. Retrieved from

[246] Sehlo MG, Kamfar HZ (2015). Depression and quality of life in children with sickle cell disease: the effect of social support. BMC Psychiatry, 15, 78-78.

[247] Serjeant GR (2005). Mortality from sickle cell disease in Africa. BMJ, 330(7489), 432-433.

[248] Serjeant GR, Ceulaer CD, Lethbridge R, Morris J, Singhal A, Thomas PW (1994). The painful crisis of homozygous sickle cell disease: clinical features. Br J Haematol, 87(3), 586-591.

[249] Serjeant GR, Chin N, Asnani MR, Serjeant BE, Mason KP, Hambleton IR, Knight-Madden JM (2018). Causes of death and early life determinants of survival in

homozygous sickle cell disease: The Jamaican cohort study from birth. PLoS One, 13(3), e0192710-e0192710.

[250] Shah K, Maghsoudlou P (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. Br J Hosp Med (Lond), 77(7), C98-101.

[251] Shook LM, Ware RE (2018). Sickle cell screening in Europe: the time has come. Br J Haematol, 183(4), 534-535.

[252] Silva DGH, Belini Junior E, de Almeida EA, Bonini-Domingos CR (2013). Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. Free Radic Biol Med, 65, 1101-1109.

[253] Simmonds MJ, Connes P, Sabapathy S (2013). Exercise-induced blood lactate increase does not change red blood cell deformability in cyclists. PLoS One, 8(8), e71219-e71219.

[254] Smith JA, Martin DT, Telford RD, Ballas SK (1999). Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. The American journal of physiology, 276(6), H2188-2193.

[255] Smith WR, Penberthy LT, Bovbjerg VE, McClish DK, Roberts JD, Dahman B, Aisiku IP, Levenson JL, Roseff SD (2008). Daily assessment of pain in adults with sickle cell disease. Ann Intern Med, 148(2), 94-101.

[256] Steinberg MH, Barton F, Castro O, Pegelow CH, Ballas SK, Kutlar A, Orringer E, Bellevue R, Olivieri N, Eckman J, Varma M, Ramirez G, Adler B, Smith W, Carlos T, Ataga K, DeCastro L, Bigelow C, Saunthararajah Y, Telfer M, Vichinsky E, Claster S, Shurin S, Bridges K, Waclawiw M, Bonds D, Terrin M (2003). Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. JAMA, 289(13), 1645-1651.

[257] Steinberg MH, McCarthy WF, Castro O, Ballas SK, Armstrong FD, Smith W, Ataga K, Swerdlow P, Kutlar A, DeCastro L, Waclawiw MA, Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell A, Follow-Up MSHP (2010). The risks and benefits of long-term use of hydroxyurea in sickle cell anemia: A 17.5 year follow-up. Am J Hematol, 85(6), 403-408.

[258] Stuart J, Nash GB (1990). Red cell deformability and haematological disorders. Blood Rev, 4(3), 141-147.

[259] Stuart MJ, Nagel RL (2004). Sickle-cell disease. The Lancet, 364(9442), 1343-1360.

[260] Styles L, Kuypers F, Kesler K, Reiss U, Lebeau P, Nagel R, Fabry M (2007). Arginine Therapy Does Not Benefit Children with Sickle Cell Anemia — Results of the CSCC Clinical Trial Consortium Multi-Institutional Study. Blood, 110(11), 2252-2252.

[261] Suhr F, Brenig J, Muller R, Behrens H, Bloch W, Grau M (2012). Moderate exercise promotes human RBC-NOS activity, NO production and deformability through Akt kinase pathway. PLoS One, 7(9), e45982.

[262] Suhr F, Porten S, Hertrich T, Brixius K, Schmidt A, Platen P, Bloch W (2009). Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes. Nitric Oxide, 20(2), 95-103.

[263] Taylor SM, Parobek CM, Fairhurst RM (2012). Haemoglobinopathies and the clinical epidemiology of malaria: a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis, 12(6), 457-468.

[264] Telen MJ (2001). Principles and problems of transfusion in sickle cell disease. Semin Hematol, 38(4), 315-323.

[265] Telen MJ (2016). Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. Blood, 127(7), 810-819.

[266] Telen MJ, Malik P, Vercellotti GM (2019). Therapeutic strategies for sickle cell disease: towards a multi-agent approach. Nature reviews. Drug discovery, 18(2), 139-158.

[267] Tewari S, Brousse V, Piel FB, Menzel S, Rees DC (2015). Environmental determinants of severity in sickle cell disease. Haematologica, 100(9), 1108-1116.

[268] Tinti G, Somera R, Valente FM, Domingos CRB (2010). Benefits of kinesiotherapy and aquatic rehabilitation on sickle cell anemia. A case report. Genetics and molecular research : GMR, 9(1), 360-364.

[269] Tomschi F, Bloch W, Grau M (2018). Impact of Type of Sport, Gender and Age on Red Blood Cell Deformability of Elite Athletes. Int J Sports Med, 40(01), 12-20.

[270] Tripette J, Alexy T, Hardy-Dessources M-D, Mougenel D, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Etienne-Julan M, Hue O, Meiselman HJ, Connes P (2009). Red blood cell aggregation, aggregate strength and oxygen transport potential of blood are abnormal in both homozygous sickle cell anemia and sickle-hemoglobin C disease. Haematologica, 94(8), 1060.

[271] Trudel M, De Paepe ME, Chretien N, Saadane N, Jacmain J, Sorette M, Hoang T, Beuzard Y (1994). Sickle cell disease of transgenic SAD mice. Blood, 84(9), 3189-3197.

[272] Tsaras G, Owusu-Ansah A, Boateng FO, Amoateng-Adjepong Y (2009). Complications Associated with Sickle Cell Trait: A Brief Narrative Review. The American Journal of Medicine, 122(6), 507-512.

[273] Tsikas D (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. Free Radic Res, 39(8), 797-815.

[274] Tsikas D (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. Anal Biochem, 524, 13-30.

[275] Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, Baskurt OK (2011). Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells. Nitric Oxide, 24(4), 184-191.

[276] Umbreit J (2007). Methemoglobin--it's not just blue: a concise review. Am J Hematol, 82(2), 134-144.

[277] Vaya A, Collado S, Dasi MA, Perez ML, Hernandez JL, Barragan E (2014). Erythrocyte deformability and aggregation in homozygous sickle cell disease. Clin Hemorheol Microcirc, 58(4), 497-505.

[278] Verduzco LA, Nathan DG (2009). Sickle cell disease and stroke. Blood, 114(25), 5117-5125.

[279] Viallat A, Abkarian M (2014). Red blood cell: from its mechanics to its motion in shear flow. Int J Lab Hematol, 36(3), 237-243.

[280] Vichinsky EP, Earles A, Johnson RA, Hoag MS, Williams A, Lubin B (1990). Alloimmunization in Sickle Cell Anemia and Transfusion of Racially Unmatched Blood. N Engl J Med, 322(23), 1617-1621.

[281] Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, Nickerson B, Orringer E, McKie V, Bellevue R, Daeschner C, Manci EA (2000). Causes and outcomes of the acute chest syndrome in sickle cell disease. National Acute Chest Syndrome Study Group. N Engl J Med, 342(25), 1855-1865.

[282] Voskaridou E, Christoulas D, Bilalis A, Plata E, Varvagiannis K, Stamatopoulos G, Sinopoulou K, Balassopoulou A, Loukopoulos D, Terpos E (2010). The effect of prolonged administration of hydroxyurea on morbidity and mortality in adult patients with sickle cell syndromes: results of a 17-year, single-center trial (LaSHS). Blood, 115(12), 2354.

[283] Voskou S, Aslan M, Fanis P, Phylactides M, Kleanthous M (2015). Oxidative stress in β-thalassaemia and sickle cell disease. Redox biology, 6, 226-239.

[284] Wagener FA, Feldman E, de Witte T, Abraham NG (1997). Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. Proc Soc Exp Biol Med, 216(3), 456-463.

[285] Walters MC, De Castro LM, Sullivan KM, Krishnamurti L, Kamani N, Bredeson C, Neuberg D, Hassell KL, Farnia S, Campbell A, Petersdorf E (2016). Indications and Results of HLA-Identical Sibling Hematopoietic Cell Transplantation for Sickle Cell Disease. Biol Blood Marrow Transplant, 22(2), 207-211.

[286] Waltz X, Hedreville M, Sinnapah S, Lamarre Y, Soter V, Lemonne N, Etienne-Julan M, Beltan E, Chalabi T, Chout R, Hue O, Mougenel D, Hardy-Dessources MD, Connes P (2012). Delayed beneficial effect of acute exercise on red blood cell aggregate strength in patients with sickle cell anemia. Clin Hemorheol Microcirc, 52(1), 15-26.

[287] Waltz X, Romana M, Hardy-Dessources M-D, Lamarre Y, Divialle-Doumdo L, Petras M, Tarer V, Hierso R, Baltyde K-C, Tressières B, Lalanne-Mistrih M-L, Maillard F, Hue O, Etienne-Julan M, Connes P (2013). Hematological and hemorheological determinants of the six-minute walk test performance in children with sickle cell anemia. PLoS One, 8(10), e77830-e77830.

[288] Warburton DER, Bredin SSD (2017). Health benefits of physical activity: a systematic review of current systematic reviews. Curr Opin Cardiol, 32(5), 541-556.

[289] Ware RE (2013). Hydroxycarbamide: clinical aspects. Comptes rendus biologies, 336(3), 177-182.

[290] Ware RE, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud MR (2017). Sickle cell disease. The Lancet, 390(10091), 311-323.

[291] Ware RE, Helms RW, Investigators SW (2012). Stroke With Transfusions Changing to Hydroxyurea (SWiTCH). Blood, 119(17), 3925-3932.

[292] Wasserman K (1986). The anaerobic threshold: definition, physiological significance and identification. Adv Cardiol, 35, 1-23.

[293] Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, Stringer WW, Sietsema KE, Sun XG, Whipp BJ (2012). Principles of exercise testing and interpretation : including pathophysiology and clinical applications (5th ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

[294] Weatherall DJ (2010). The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. Blood, 115(22), 4331-4336.

[295] Westhoff M, Ruhle KH, Greiwing A, Schomaker R, Eschenbacher H, Siepmann M, Lehnigk B (2013). [Positional paper of the German working group "cardiopulmonary exercise testing" to ventilatory and metabolic (lactate) thresholds]. Dtsch Med Wochenschr, 138(6), 275-280.

[296] Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M, Grisham MB (2001). Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. Antioxid Redox Signal, 3(2), 203-213.

[297] Wood KC, Granger DN (2007). Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. Clin Exp Pharmacol Physiol, 34(9), 926-932.

[298] World Health Organization (2010). Global recommendations on physical activity for health. https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/9789241599979/en/ (Zuletzt abgerufen am 31.07.2020)

[299] World Health Organization (2018). International statistical classification of diseases and related health problems (11th Revision). https://icd.who.int/browse11/l-m/en (Zuletzt abgerufen am 31.07.2020)

[300] Yagi K (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. Methods Mol Biol, 108, 101-106.

[301] Yalcin O, Bor-Kucukatay M, Senturk UK, Baskurt OK (2000). Effects of swimming exercise on red blood cell rheology in trained and untrained rats. J Appl Physiol (1985), 88(6), 2074-2080.

[302] Yawn BP, Buchanan GR, Afenyi-Annan AN, Ballas SK, Hassell KL, James AH, Jordan L, Lanzkron SM, Lottenberg R, Savage WJ, Tanabe PJ, Ware RE, Murad MH, Goldsmith JC, Ortiz E, Fulwood R, Horton A, John-Sowah J (2014). Management of sickle cell disease: summary of the 2014 evidence-based report by expert panel members. JAMA, 312(10), 1033-1048.

[303] Zemel BS, Kawchak DA, Ohene-Frempong K, Schall JI, Stallings VA (2007). Effects of Delayed Pubertal Development, Nutritional Status, and Disease Severity on Longitudinal Patterns of Growth Failure in Children With Sickle Cell Disease. Pediatr Res, 61, 607.

7. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden im Einvernehmen mit Frau Dr. rer. nat. Marijke Grau und Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch unter den nachfolgenden Literaturstellen veröffentlicht:

Grau M, Jerke M, Nader E, Schenk A, Renoux C, Collins B, Dietz T, Bizjak DA, Joly P, Bloch W, Connes P, Prokop A (2019). Effect of acute exercise on RBC deformability and RBC nitric oxide synthase signalling pathway in young sickle cell anaemia patients. Scientific Reports, 9(1), 11813.

Grau M, Nader E, Jerke M, Schenk A, Renoux C, Dietz T, Collins B, Bizjak DA, Joly P, Bloch W, Prokop A, Connes P (2019). Impact of A Six Week Training Program on Ventilatory Efficiency, Red Blood Cell Rheological Parameters and Red Blood Cell Nitric Oxide Signaling in Young Sickle Cell Anemia Patients: A Pilot Study. Journal of Clinical Medicine, 8(12).

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Hb-Moleküle	12
Abbildung 2:	Jährliche Inzidenz der Sichelzellanämie weltweit	13
Abbildung 3:	Zytoskelett der erythrozytären Zellmembran	17
Abbildung 4:	Übersicht Pathophysiologie der Sichelzellanämie	28
Abbildung 5:	Akute und chronische Komplikationen der Sichelzellanämie	32
Abbildung 6:	Ablauf der Sportintervention	52
Abbildung 7:	V-Slope-Methode (a) und V'E/V'O2-Kurve (b) zur Bestimmung der VT1	57
Abbildung 8:	Erkennen der ersten ventilatorischen Schwelle in der Spirometriesoftware	58
Abbildung 9:	Enzymatisch-amperometrisches Messprinzip	60
Abbildung 10:	Beispielhafte Standardkurve des Hemoglobin Human ELISA	63
Abbildung 11:	Beispielhafte Standardkurve des IDK Arginin ELISA Kits	65
Abbildung 12:	Prinzip der Ektazytometrie mit LORCA	66
Abbildung 13:	Logarithmische Verformbarkeitskurve und Elongationsindex	67
Abbildung 14:	Prinzip der Syllektometrie mit LORCA	68
Abbildung 15:	Die vier Phasen des Syllektogramms	68
Abbildung 16:	Aufbau der Gasphasen-Chemilumineszenz-Detektion	71
Abbildung 17:	Beispielhafte NO_2^--Konzentrationen der Eichreihe (a) und Standardgerade (b)	72
Abbildung 18:	Schematische Darstellung eines Objektträgers der Immunhistochemie	74
Abbildung 19:	Immunhistochemische Färbung von Erythrozyten eines Sichelzellanämiepatienten	76
Abbildung 20:	Verbindung von MDA und TBA bei 90-100°C	77
Abbildung 21:	Beispielhafte TBARS Standardkurve mit MDA Konzentrationsberechnung	78
Abbildung 22:	Messprinzip des ROS/RNS Assays	80
Abbildung 23:	Beispielhafte Standardkurve des ROS/RNS Assays	81
Abbildung 24:	Beispielhafte Trolox Standard Kurve	83
Abbildung 25:	Leistungsparameter im Eingangstest von SCA- und AA-Gruppe	86
Abbildung 26:	Akute Veränderungen des freien Hämoglobins im Plasma von SCA- und AA-Gruppe	87
Abbildung 27:	Akute Veränderungen der erythrozytären Verformbarkeit von SCA- und AA-Gruppe	88
Abbildung 28:	Akute Veränderungen des erythrozytären NO von SCA- und AA-Gruppe	89

Abbildung 29:	Akute Veränderungen der erythrozytären NO-Produktion und der Aktivität der erythrozytären NO-Synthase von SCA- und AA-Gruppe	90
Abbildung 30:	Akute Veränderungen des oxidativen Stresses von SCA- und AA-	91
Abbildung 31:	Chronische Veränderungen der Leistungsparameter der SCA-Gruppe	92
Abbildung 32:	Chronische Veränderung der ventilatorischen Effizienz der SCA-Gruppe	93
Abbildung 33:	Chronische Veränderung des freien Hämoglobins der SCA-Gruppe	94
Abbildung 34:	Chronische Veränderung der erythrozytären Verformbarkeit der SCA-Gruppe	95
Abbildung 35:	Chronische Veränderungen der erythrozytären Aggregation der SCA-Gruppe	96
Abbildung 36:	Chronische Veränderung von NO in Plasma und Erythrozyten der SCA-Gruppe	96
Abbildung 37:	Chronische Veränderungen der erythrozytären NO-Produktion, der erythrozytären NOS-Aktivität und von erythrozytärem L-Arginin der SCA-Gruppe	98
Abbildung 38:	Chronische Veränderungen der Marker für oxidativen Stress der SCA-Gruppe	99

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ergebnisse von Sportinterventionen mit Sichelzellanämiepatienten	44
Tabelle 2:	Verwendete Verbrauchsmaterialen	46
Tabelle 3:	Verwendete Chemikalien	47
Tabelle 4:	Verwendete Lösungen	48
Tabelle 5:	Verwendete Antikörper	49
Tabelle 6:	Verwendete Kits	49
Tabelle 7:	Verwendete Geräte	50
Tabelle 8:	Verwendete Software	51
Tabelle 9:	Größenabhängige Belastung des Stufentests	53
Tabelle 10:	Anthropometrische Daten für die Auswertung akuter Effekte	55
Tabelle 11:	Anthropometrische Daten für die Auswertung chronischer Effekte	55
Tabelle 12:	Parameter des kleinen Blutbildes	60
Tabelle 13:	Mitgelieferte Reagenzien des Hemoglobin Human ELISA Kits	62
Tabelle 14:	Standardreihe des Hemoglobin Human ELISA	62
Tabelle 15:	Mitgelieferte Reagenzien des IDK Arginin ELISA Kits	64
Tabelle 16:	Nitritkonzentrationen der CLD-Standardreihe	72
Tabelle 17:	Verwendete Antikörper der Immunhistochemie	75
Tabelle 18:	Vorbereitung der Reagenzien des TBARS Assay Kits	77
Tabelle 19:	Erstellung der Standardreihe zur TBARS Messung	77
Tabelle 20:	Vorbereitung der Reagenzien des ROS/RNS Assays	80
Tabelle 21:	H_2O_2-Standardreihe des ROS/RNS Assays	81
Tabelle 22:	Mitgelieferte Reagenzien des TAK Assay Kits	82
Tabelle 23:	Erstellung der Standardreihe zur TAK Messung	83
Tabelle 24:	Laktatmessung im Eingangstest von SCA- und AA-Gruppe	85
Tabelle 25:	Akute Veränderungen der Parameter des Blutbildes von SCA- und AA-Gruppe	87
Tabelle 26:	Chronische Veränderungen des Blutbildes der SCA-Gruppe	94
Tabelle 27:	Übersicht der Unterschiede zwischen SCA- und AA-Gruppe in der akuten Intervention	101
Tabelle 28:	Übersicht der akuten und chronischen Effekte der Sportintervention	102

8.3 Aktivitätsfragebogen

Aktivitätsfragebogen

Name und Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Geschlecht ☐ männlich ☐ weiblich

Wer füllt den Fragebogen aus?
- ☐ Jugendliche/r
- ☐ Eltern mit Jugendlichem
- ☐ Anderer mit Jugendlichem

Welche Schule besuchst du?
- ☐ Grundschule
- ☐ Weiterführende Schule
- ☐ Berufsbegleitende Schule
- ☐ Andere_____

Nimmst du am Schulsport teil? ☐ Ja ☐ Nein

Bist du in einem Verein aktiv? ☐ Ja ☐ Nein

Wenn ja. Welcher Verein und welche Sportart? _____

Kreise die entsprechende Zahl ein.

An wie vielen Tagen einer normalen Woche bist du mindestens 1 Stunde am Tag körperlich aktiv?
(Schwimmen, Radfahren, Schulsport, Tanszen, Fußball spielen,.....)
Es zählen Schulsport, Vereinssport und Spielen in der Freizeit zusammen.

0 1 2 3 4 5 6 7 Tage

Wie groß ist dein Interesse an Sport?

sehr gering gering mittelmäßig groß sehr groß

Wie oft in der Woche hast du Schulsport?

0 1 2 3 4 5 6 7 Tage

Wie viele Unterrichtsstunden (à 45min) hast du Sportunterricht in der Schule?

Nie 1 2 3 4 5 pro Woche

Wie sehr strengst du dich dabei an?

Ohne zu schwitzen und ohne Kurzatmigkeit/schnaufen | Etwas schwitzen und etwas Kurzatmigkeit | Viel schwitzen und Kurzatmigkeit

Wenn du in einem Verein Sport machst. Wie oft in der Woche gehst du zum Vereinssport?

0 1 2 3 4 5 6 7 Tage

Wenn du in einem Verein Sport machst. Wie viele Stunden Sport sind pro Trainingstag angesetzt?

Weniger als 1 1 2 3 mehr als 3 Stunden

Ging es dir nach dem Sport schonmal schlecht? (Schwindel, Schmerzen, Übelkeit, Müdigkeit)

☐ Ja ☐ Nein

Musstes du nach dem Sport schon mal ins Krankenhaus (z.B. wegen einer Schmerzkrise)?

☐ Ja ☐ Nein

Wie kommst du meistens zur Schule?

Zu Fuß? ☐ Wie lange brauchst du pro Strecke? _____ Minuten

Mit dem Fahrrad? ☐ Wie lange brauchst du pro Strecke? _____ Minuten

Mit Bus, Bahn, Straßenbahn ☐

Mit dem Auto ☐

Sonstiges ☐ _____

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.