

Aus der Kinderklinik und Poliklinik

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer

**Effekt körperlicher Belastung auf die
Zahl zirkulierender mesenchymaler Stammzellen bei allergischem
Asthma bronchiale**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marc Benjamin Krämer-Gabert

aus Heidelberg

Würzburg, November 2016



Referent: Prof. Dr. med. Helge Hebestreit

Koreferent: Prof. Dr. med. Berthold Jany

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2018

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Asthma..... | 1 |
| 1.2 | Sport und Asthma | 4 |
| 1.2.1 | Beziehungen zwischen Asthma und körperlicher Leistungsfähigkeit | 4 |
| 1.2.2 | Positive Effekte regelmäßiger sportlicher Aktivität bei Asthmatikern..... | 5 |
| 1.3 | Sport und Progenitorzellen..... | 8 |
| 1.3.1 | Endotheliale Progenitorzellen | 9 |
| 1.3.2 | Mesenchymale Progenitorzellen | 11 |
| 1.4 | In-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen | 13 |
| 1.5 | Fragestellungen | 15 |
| 2 | Material und Methoden | 17 |
| 2.1 | Geräte und Chemikalien | 17 |
| 2.1.1 | Geräte | 17 |
| 2.1.2 | Chemikalien und sonstige Substanzen | 18 |
| 2.1.2.1 | Chemikalien | 18 |
| 2.1.2.2 | Sonstige Substanzen | 19 |
| 2.1.3 | Software | 19 |
| 2.2 | Messung von Progenitorzellpopulationen vor und nach körperlicher Belastung .. | 19 |
| 2.2.1 | Stichprobe | 19 |
| 2.2.1.1 | Experimentalgruppe | 20 |
| 2.2.1.2 | Kontrollgruppe..... | 20 |
| 2.2.1.3 | Gesamtgruppe | 20 |
| 2.2.2 | Durchführung der klinischen Untersuchungen | 20 |
| 2.2.2.1 | Vorbereitungen..... | 20 |
| 2.2.2.2 | Untersuchungsablauf | 21 |
| 2.2.3 | Laboranalysen der Blutproben | 23 |
| 2.2.3.1 | Allgemeine Laboruntersuchungen..... | 23 |
| 2.2.3.2 | Laboranalysen zur Differenzierung der Progenitorzellpopulationen | 24 |
| 2.3 | MSC-Kulturen | 29 |
| 2.3.1 | Herstellung von MSC-Kulturmedium | 29 |

| | |
|---|----|
| 2.3.2 MSC-Kulturen aus Knochenmark..... | 30 |
| 2.3.3 MSC-Kulturen aus Vollblut | 33 |
| 2.4 Statistische Auswertung..... | 34 |
| 3 Ergebnisse..... | 36 |
| 3.1. Charakteristika des Probandenkollektivs und Differenzialblutbilder | 36 |
| 3.2 Progenitorzellen | 42 |
| 3.2.1 CD34 ⁺ Progenitorzellen..... | 42 |
| 3.2.2 Mesenchymale Progenitorzellen | 44 |
| 3.3 MSC-Kulturen | 47 |
| 3.3.1 MSC-Kulturen aus Knochenmark..... | 47 |
| 3.3.2 MSC-Kulturen aus Vollblut | 51 |
| 4 Diskussion | 56 |
| 4.1 Beurteilung der Charakteristika des Probandenkollektivs und der Blutwerte inklusive Differenzialblutbild | 56 |
| 4.2 Effekte körperlicher Belastung auf die Anzahl zirkulierender CD34 ⁺ Progenitorzellen im peripheren Blut..... | 58 |
| 4.3 Effekte körperlicher Belastung auf die Anzahl zirkulierender MSC im peripheren Blut..... | 60 |
| 4.4 in-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen aus Knochenmark..... | 63 |
| 4.5 in-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen aus peripherem Blut..... | 66 |
| 4.6 Fazit | 70 |
| 5 Zusammenfassung | 72 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 74 |
| Abbildungsverzeichnis..... | 82 |
| Tabellenverzeichnis..... | 83 |
| Liste der verwendeten Abkürzungen | 84 |

1 Einleitung

1.1 Asthma

"Asthma ist eine heterogene Erkrankung, die normalerweise durch eine chronische Entzündung der Atemwege gekennzeichnet ist. Definiert wird Asthma durch das anamnestische Auftreten von Symptomen wie pfeifende Atemgeräusche ("Giemen"), Kurzatmigkeit, Brustenge und Husten, die zeitlich und in ihrer Intensität variieren und mit einer variablen Einschränkung des expiratorischen Atemflusses einhergehen." (1)

Asthma gehört zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen. Die Prävalenzrate liegt in Deutschland bei Erwachsenen bei ca. 5% und bei Kindern bei ca. 10%. Damit ist Asthma im Kindesalter sogar die häufigste chronische Erkrankung überhaupt (2).

Es existieren verschiedene Formen des Asthmas: In der Pathogenese eines allergischen (= extrinsischen) Asthmas stellt das Vorliegen einer Allergie, d.h. einer Sensibilisierung mit Ausbildung von spezifischen Immunglobulin E-Antikörpern (IgE) gegen Umweltallergene, den hauptsächlich zugrunde liegenden krankheitsauslösenden Faktor dar. Die Symptomatik eines intrinsischen Asthmas wird dagegen meistens durch Atemwegsinfektionen getriggert. Eine Sensibilisierung gegen Umweltallergene wie beim extrinsischen Asthma besteht bei dieser Asthmaform jedoch nicht. Weiterhin gibt es Mischformen dieser beiden Typen. So kann sich ein anfänglich allergisches Asthma im Verlauf dahin entwickeln, dass klinisch die intrinsische Komponente überwiegt (2).

Als allgemeine Indikatoren für die Entstehung eines Asthma bronchiale gelten neben einer familiären Disposition unter anderem das atopische Säuglingsekzem, schwere und lang anhaltenden Atemwegsobstruktionen, ein Fortbestehen der Obstruktionen über das dritte Lebensjahr hinaus, Rhinovirus-Infektionen in den ersten Lebensjahren sowie eine Sensibilisierung gegen perenniale Allergene in den ersten drei Lebensjahren (3).

Allen Formen des Asthmas gemein ist die Hyperreagibilität der Atemwege auf verschiedene spezifische und unspezifische Stimuli, wie z.B. Allergenkontakt (beim allergischen Asthma), Atemwegsinfektionen, kalte, trockene Luft, (Tabak-)Rauch und Stäube, aber auch bestimmte Medikamente (z.B. Acetylsalicylsäure) oder körperliche Aktivität.

Dabei kommt es nach Kontakt mit dem auslösenden Reiz zu einer meist anfallsartig auftretenden, variablen Atemwegsobstruktion, die aus einer bronchialen Konstriktion (= Bronchospasmus) und einem, durch die chronische Inflammation bedingten, Schleimhautödem und verstärkter Bildung von Bronchialsekreten resultiert und sich hauptsächlich in den oben aufgeführten Symptomen äußert. Die Atemwegsobstruktion ist dabei spontan oder durch Therapie reversibel (3).

Das allergische Asthma beginnt oft schon im Kindesalter (1). Allergien sind dabei der Faktor, der am stärksten für die Pathogenese eines kindlichen Asthmas verantwortlich ist. Auch bei bis zu 80% der erwachsenen Asthmatiker können Allergien als primärer Krankheitsauslöser festgestellt werden (2).

Die allergische Reaktion nach Antigenkontakt, die beim allergischen Asthma bronchiale zur oben beschriebenen Atemwegsobstruktion und Inflammation führt, wird dabei in zwei Phasen unterteilt: eine Früh- und eine Spätphasereaktion.

Zunächst kommt es kurz nach dem Allergenkontakt zu einer Reaktion des Immunsystems, bei der es durch komplexe Interaktionen von Antigen-präsentierenden Zellen, Lymphozyten und proinflammatorischen Zytokinen (u.a. Interleukin(IL)-13, IL-4 und IL-5) zur Ausbildung von IgE-sezernierenden Plasmazellen kommt. Diese allergenspezifischen IgEs zirkulieren im Blut, binden dort an basophile Granulozyten und im Gewebe an Mastzellen. Kommt es in der Folge zu einem weiteren Kontakt mit dem spezifischen oder einem kreuzreagierenden Antigen, führt dies zu einer sofortigen Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen wie Histamin, Prostaglandinen, Leukotrienen, Interleukinen (z.B. IL-3, IL-4, IL-5, IL-6) und anderen Zytokinen wie TNF- α aus diesen Zellen. Im Rahmen der asthmatischen Frühphasereaktion ("early phase asthmatic reaction", EAR) bewirken diese Mediatoren wiederum in den Atemwegen innerhalb von wenigen Minuten eine Kontraktion von glatten Muskelzellen, eine erhöhte Gefäßpermeabilität, vermehrte Sekretbildung und bronchiale Hyperreagibilität. Schlussendlich führen diese Vorgänge dann zu einer bronchialen Obstruktion.

In der Spätphasereaktion, die erst sechs bis zwölf Stunden nach der Antigenexposition beginnt, kommt es durch Einwanderung von Zellen des Immunsystems (eosinophile und neutrophile Granulozyten, Lymphozyten) an den Ort des Antigenkontakts zu einer star-

ken Entzündung der Atemwege, die das Atemwegsepithel schädigt. Große Bedeutung wird bei dieser Entzündungsreaktion den eosinophilen Granulozyten durch Bildung und Freisetzung verschiedener Mediatoren zuteil. Diese schädigen auch die extrazelluläre Matrix und Neuronen, die im Zusammenspiel mit den Schäden am Epithel die bronchiale Hyperreagibilität noch weiter verstärken. Dies kann im Verlauf dazu führen, dass neben dem spezifischen Allergen auch unspezifische Stimuli eine asthmatische Reaktion auslösen. Bleibt die Entzündung in den Atemwegen weiterhin fortbestehen, kommt es im Verlauf durch Umbauprozesse zu irreversiblen strukturellen Veränderungen des Lungengewebes ("airway remodelling")(4).

Die Diagnose Asthma wird vor allem klinisch gestellt. Neben einer ausführlichen Anamnese, in der gezielt nach dem Auftreten asthmatypischer Symptome, bestehenden Auslöse- und Risikofaktoren, Allergien und Erkrankungen des atopischen Formenkreises in der eigenen und der Familienanamnese gefragt werden sollte, sind dabei vor allem eine ausführliche Lungenfunktionsdiagnostik inklusive Bronchospasmolyse- und Provokationstests und eine allergologische Stufendiagnostik notwendig.

Abhängig von der Symptomatik und der Lungenfunktion, dabei vor allem der Ausprägung der Atemwegsobstruktion, kann das Asthma in unterschiedliche Schweregrade eingeteilt werden. Die Einteilung reicht dabei von Grad I (= intermittierend) mit nur intermittierend auftretender Obstruktion und oft noch weitgehend normaler Lungenfunktion bis Grad IV (= schwergradig persistierend) mit anhaltender täglicher Symptomatik, oftmals auch nachts auftretenden Beschwerden und deutlich eingeschränkter Lungenfunktion. Diese Einteilung ist vor allem im Rahmen der initialen Diagnosestellung bei einem Patienten mit Asthma und noch nicht durchgeführter therapeutischer Intervention sinnvoll. Je nach vorliegendem Schweregrad kann dann eine adäquate Therapie eingeleitet werden. Zur Beurteilung des weiteren Verlaufes der Erkrankung, v.a. im Hinblick auf ein Ansprechen auf die therapeutischen Maßnahmen, scheint diese Einteilung jedoch weniger geeignet zu sein.

Sinnvoller ist es, die Kontrolle der Erkrankung anhand der Beschwerden und deren Intensität kontinuierlich zu überprüfen und die Therapie je nach Grad der Asthmakontrolle (kontrolliert, teilweise kontrolliert, unkontrolliert) entsprechend anzupassen(2).

Die leitliniengerechte Asthmatherapie zielt langfristig darauf ab, eine gute Kontrolle der Symptome im Alltag zu erreichen bzw. aufrechtzuerhalten um dem Patienten eine normale körperliche Aktivität zu ermöglichen (1, 2). Damit sollen zukünftige Exazerbationen, eine Progredienz der Erkrankung mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion bis hin zu irreversiblen Schäden an der Lunge vermieden, die bronchiale Hyperreagibilität reduziert und eine Verbesserung oder sogar Normalisierung der Lungenfunktion erreicht werden. Das Therapieprinzip umfasst dabei den kombinierten Einsatz einer ganzen Reihe sowohl nichtmedikamentöser als auch medikamentöser Maßnahmen. Das Spektrum der nichtmedikamentösen Therapiebestandteile reicht von Patientenschulungen, Rehabilitationsmaßnahmen, Allergen- und Noxenkarenz über regelmäßige körperliche Aktivität und Sport bis hin zu spezifischen Immuntherapien (SIT, "Hyposensibilisierung") bei Vorliegen von Allergien. Die Pharmakotherapie basiert auf dem Einsatz von Bedarfsmedikamenten wie rasch wirkenden Beta-2-Sympathomimetika (RABA, z.B. Salbutamol), Anticholinergika (z.B. Montelukast), Theophyllin und systemischen Corticosteroiden sowie dem Einsatz von Langzeittherapeutika, die je nach Schweregrad bzw. Grad der Kontrolle der Erkrankung miteinander kombiniert werden. Zu den langfristig eingesetzten Medikamenten zählen dabei vor allem inhalative Corticosteroide (ICS) und langwirksame Beta-2-Sympathomimetika (LABA). Seltener (nur in begründeten Einzelfällen) finden in der Langzeitbehandlung einer Asthmaerkrankung systemische Corticosteroide, monoklonale Antikörper (z.B. Omalizumab) oder sogar in sehr schwerwiegenden Fällen Methotrexat Anwendung.

1.2 Sport und Asthma

1.2.1 Beziehungen zwischen Asthma und körperlicher Leistungsfähigkeit

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Asthma abhängig vom Schweregrad einen negativen Einfluss auf die körperliche Leistungsfähigkeit hat (5-7). So konnten Vahlkvist und Pedersen 2009 (7) zeigen, dass Kinder, die an einem neu diagnostizierten, unbehandeltem Asthma litten im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Kinder weniger leistungsfähig waren, einen höheren Körperfettanteil besaßen und häufiger übergewichtig waren. Dass bei vielen Patienten mit Asthma bzw. einem hyperreagiblen Bronchialsystem körperliche Aktivität als unspezifischer Stimulus eine Bronchokonstriktion hervorrufen kann, könnte die geringere körperliche Leistungsfähigkeit von Asthmatikern mit ei-

nem unkontrollierten Asthma mit erklären. Dazu könnte auch die Tatsache beitragen, dass viele der Patienten solche Reaktionen schon einmal erlebt haben und sich deshalb aus Angst davor weniger sportlich betätigen (8-10). Auch die Angst mancher Eltern davor, dass ihr an Asthma erkranktes Kind durch Sport induzierte Asthmaattacken erleiden könnte, wirkt sich bei den betroffenen Kindern in einer geringeren körperlichen Aktivität im Vergleich zu gesunden Altersgenossen aus (6). Der damit verbundene Bewegungsmangel führt wiederum zu einer geringeren körperlichen Leistungsfähigkeit. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine geringere körperliche Fitness in der Kindheit schwach mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines Asthmas im jungen Erwachsenenalter korreliert ist (11).

1.2.2 Positive Effekte regelmäßiger sportlicher Aktivität bei Asthmatikern

Sport und körperliche Aktivität als nicht-medikamentöse Maßnahmen sind mittlerweile in verschiedenen Leitlinien als wesentlicher Bestandteil in das Therapiekonzept bei Asthma integriert (1, 2). Regelmäßige körperliche Aktivität, unter anderem in Form von Sport, kann den Krankheitsverlauf bei Asthma positiv beeinflussen (2). So konnte ein positiver Effekt von Sport bzw. körperlichem Training sowohl auf die körperliche Leistungsfähigkeit als auch die Lebensqualität von Asthmatikern belegt werden (9, 12, 13). Auf der anderen Seite scheint eine hohe körperliche Fitness mit einem reduzierten Risiko für die Entwicklung eines Asthmas einherzugehen (11). Für die positiven Effekte von Sport bei Patienten, die an Asthma leiden gibt es verschiedene Erklärungsansätze.

Mendes et. al. (12) konnten 2010 beispielsweise zeigen, dass bei Patienten mit einem kontrollierten Asthma, die an einem dreimonatigen Ausdauertrainings-Programm teilnahmen im Vergleich zu Patienten, die nicht an dieser Maßnahme teilnahmen, die Anzahl an symptomfreien Tagen zunahm. Diese Zunahme korrelierte signifikant mit der trainingsbedingten Verbesserung der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO_{2peak}) im Ausdauerleistungstest bei diesen Patienten. Weiterhin besserte sich in dieser Studie bei den trainierten Patienten deren psychischer Zustand im Hinblick auf Ängste und depressive Symptomatik.

Eine Verbesserung des VO_2 peak und somit der kardiopulmonalen Fitness bei Asthmatikern im Ausdauerleistungstest nach einer Teilnahme an einem Trainingsprogramm im Vergleich mit Patienten, die nicht trainiert hatten, konnte auch in weiteren Studien bestätigt werden (14-17). In diesen Studien zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Lungenfunktion gegenüber vor Beginn der Trainingsmaßnahmen.

Demgegenüber wirkte sich in einer Studie von Latorre-Roman et al. (13) aus dem Jahr 2014 die Teilnahme an einem Trainingsprogramm in einer Verbesserung der Lungenfunktion aus. So zeigte sich in der Trainingsgruppe eine signifikante Zunahme der maximalen Einsekundenkapazität (FEV1) gegenüber der Kontrollgruppe, die nicht am Trainingsprogramm teilnahm. Zu diesem Ergebnis kamen auch Sidiropoulou et al. (18) und Onur et al. (19).

Weiterhin zeigte die Studie von Latorre-Roman, dass in der Experimentalgruppe, die sich dem körperlichen Training unterzogen hatte, eine signifikante Abnahme des BMI und des Körperfettanteils beobachtet werden konnte (13). Die Tatsache, dass Übergewicht, welches mit einem erhöhten BMI einhergeht, wiederum die körperliche Leistungsfähigkeit negativ beeinflusst, wurde bereits mehrfach beschrieben (20-22).

Zudem ist vorstellbar, dass Sport bei Patienten mit einem Asthma bronchiale durch den Effekt einer trainingsassoziierten Kräftigung der Atemmuskulatur und Reduzierung der Atemfrequenz während der körperlichen Ertüchtigung zu einer Abnahme der Atemnotsymptomatik führen kann (23, 24).

Eine statistisch signifikante, trainingsbedingte Abnahme von belastungsinduzierten Bronchospasmen, welche ein wichtiges klinisches Erscheinungsbild der bronchialen Hyperreaktivität bei Asthma darstellen und als indirektes Maß für die Inflammation der Atemwege betrachtet werden können (25), konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (26-29).

Weitere Arbeiten, die die positiven Einflüsse von Sport auf den Verlauf eines Asthma bronchiale untersuchten, legten ihren Fokus auf die Hypothese, dass Sport zu einer Abnahme der entzündlichen Vorgänge in den Atemwegen führen könnte, welche eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Asthma spielen. So gibt es bereits Studien, die anhand von Tierversuchen mit Mäusen zeigen konnten, dass ein Ausdauertraining

bei Asthma die Anzahl eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen, die Expression bestimmter allergieassoziiertes Zytokine (u.a. IL-4 und IL-5) und das airway remodelling verringert (30, 31). Es existieren sogar Daten, die vermuten lassen, dass auch eine einzelne kurzfristige körperliche Belastung von moderater Intensität im aeroben Bereich die Inflammation in den Atemwegen reduzieren könnte (32). Mendes et. al. (17) konnten 2011 in ihrer Studie den im Mausmodell beschriebenen Effekt, dass es bei Vorliegen eines Asthmas durch Ausdauertraining zu einer Verringerung der Eosinophilenanzahl im Sputum kommt auch am Menschen nachweisen. Weiterhin zeigte sich in dieser Studie bei den Asthmatikern, die an dem 3-monatigen Trainingsprogramm teilgenommen hatten, eine Abnahme des Stickstoffmonoxid-Gehalts in der Ausatemluft - einem Marker, dessen Höhe bei einem Asthma bronchiale negativ mit dem Ausmaß der entzündlichen Aktivität in den Atemwegen korreliert (17).

Die Ergebnisse der Studie von Moreira et al.(33), die den Effekt eines regelmäßigen körperlichen Trainings auf die Atemwegsinflammation von Kindern mit einem allergischen Asthma und einer Sensibilisierung gegen Antigene der Hausstaubmilbenspezies *Dermatophagoides pteronyssinus* untersuchten, konnten zwar keine signifikanten Änderungen von Entzündungsparametern wie dem C-reaktiven Protein (CRP) und ausgeatmetem Stickstoffmonoxid (eNO) zeigen. Sie wiesen jedoch einen signifikanten Abfall von Gesamt- und Milben-spezifischem IgE gegenüber der Ausgangssituation vor Beginn des Trainings auf.

Neuere Untersuchungen unterstützen eine weitere Hypothese, die besagt, dass körperliche Belastung die Hochregulierung körpereigener Reparaturvorgänge stimuliert. Es könnte sein, dass eine durch körperliche Belastung induzierte Freisetzung von Zytokinen eine vermehrte Bildung und Mobilisation von Progenitorzellen ins Blut bewirkt, die dann in die Lungen einwandern und dort geschädigtes Gewebe reparieren (34, 35).

1.3 Sport und Progenitorzellen

Aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit sollen die Beziehungen zwischen körperlicher Aktivität und Progenitorzellen im Folgenden näher erläutert werden. Aufgrund der großen Bedeutung von Stammzellen für die körpereigenen Reparaturmechanismen, sind Stammzellen zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. Klassischerweise werden dabei zwei Gruppen von Stammzellen unterschieden, die sich in ihrem Differenzierungspotential deutlich unterscheiden:

- Embryonale Stammzellen: Diese Stammzellen entstammen aus der inneren Zellmasse der Blastocyste, einem sehr frühen Stadium der embryonalen Entwicklung. Sie sind omnipotent und damit dazu befähigt, sich in die Zelllinien aller drei Keimblätter zu entwickeln (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) (36).
- Adulte Stammzellen: Diese Stammzellen sind undifferenzierte Stammzellen, die sich im ausgereiften Organismus (d.h. nach Abschluss der Embryonalzeit) in verschiedenen Geweben finden lassen, so zum Beispiel im Knochen, im Knorpel, im Skelettmuskel, in der Leber, im Endothel, im peripheren Blut und im Knochenmark (KM) (37). Sie sind gewebsspezifisch und man nimmt an, dass sie dem Erhalt und der Reparatur des Gewebes, in dem sie sich befinden, dienen. Im Gegensatz zu den omnipotenten embryonalen Stammzellen besitzen sie jedoch nur ein geringeres Selbsterneuerungsvermögen und sind zudem stärker in ihrem Differenzierungspotenzial begrenzt, d.h. sie können sich nur zu einem bestimmten Zelltyp (= unipotente Stammzellen) bzw. einem begrenzten Spektrum von Zellen (= multipotente Stammzellen) weiterentwickeln (38). Es können bisher mindestens acht verschiedene Typen von adulten Stammzellen voneinander abgegrenzt werden: hämatopoetische, mesenchymale, endotheliale, neurale, olfaktorische und testikuläre Stammzellen sowie Stammzellen der Neuralleiste und der Brust (37).

Die Nomenklatur von adulten Stammzellen als Vorläuferzellen für bestimmte Gewebe bzw. Zelltypen in der Literatur ist nicht ganz einheitlich. So werden diese oftmals auch als Progenitorzellen bezeichnet. Dieser Ausdruck verdeutlicht, dass diese Zellen zwar bezüglich ihres Selbsterneuerungspotenzials Stammzeleigenschaften aufweisen und über ein gewisses Transdifferenzierungspotenzial verfügen, aber gewebsspezifisch sind

und somit also auch als bereits determinierte Stammzellen angesehen werden können. Die in dieser Arbeit untersuchten Typen von Stammzellen – endotheliale und mesenchymale Stammzellen – werden daher im Folgenden auch als Progenitorzellen bezeichnet.

Inwiefern sich Sport auf die Anzahl zirkulierender Progenitorzellen im Blut auswirkt, d. h. eine verstärkte Freisetzung bzw. Mobilisation von Progenitorzellen induziert, ist während des letzten Jahrzehnts vermehrt Gegenstand wissenschaftlicher Forschung geworden. Dabei konnte bisher in zahlreichen Studien insbesondere nachgewiesen werden, dass Sport eine Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen ins Blut bewirkt, von denen man weiß, dass sie an Reparaturvorgängen im Herz-Kreislaufsystem, z. B. bei kardiovaskulären Erkrankungen mit beteiligt sind (34, 35, 39, 40). Es gibt jedoch inzwischen auch Arbeiten zu möglichen Auswirkungen von Sport auf die Progenitorzellen im Blut und deren Bedeutung für den Verlauf pulmonaler Erkrankungen (38, 41-44).

1.3.1 Endotheliale Progenitorzellen

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs) wurden erstmals 1997 von Asahara et al. (45) nachgewiesen. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass sich eine aus menschlichem Blut isolierte CD34⁺ Zellpopulation in vitro zu Endothelzellen ausdifferenzierte. Weiterhin konnten sie in ihren Experimenten den Nachweis für deren regeneratives Potential bezüglich Angiogenese und Reparatur von Gefäßen erbringen. Eine weitere Studie von Asahara et al. aus dem Jahre 1999 (46) erbrachte dann den ersten Nachweis, dass diese Zellen aus dem Knochenmark stammen. In der Regel werden für den Nachweis von EPCs aus dem Blut die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von spezifischen Markern, wie CD34, CD133 und vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2, teilweise in der Literatur auch als KDR bezeichnet) hin untersucht. Die am häufigsten zur Quantifizierung von EPCs verwendete Oberflächenmarkerkombination ist dabei CD34⁺/VEGFR2⁺ (47).

Rehman et. al waren 2004 (48) eine der ersten Forschungsgruppen, die an Patienten mit chronischen Erkrankungen mithilfe eines symptomlimitierten Belastungstests untersuchten, ob eine einmalige körperliche Belastung die Anzahl zirkulierender

EPCs erhöht. Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, dass sich die Anzahl zirkulierender EPCs im Blut nahezu vervierfachte.

Zu einem Anstieg der CD34⁺VEGFR2⁺ Zellen von durchschnittlich mehr als 130 % nach einer maximalen körperlichen Ausdauerbelastung über 30 Minuten, verglichen mit dem Ausgangswert vor der Belastung, kam es in der Studie von Laufs et al. (49). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten ebenso einen deutlichen Anstieg von EPCs nach einer moderaten Ausdauerbelastung über 30 Minuten, während sich nach einer 10-minütigen moderaten Ausdauerbelastung kein Anstieg nachweisen ließ. Van Craenenbroeck et al. (50) konnten den steigernden Effekt von einer maximalen körperlichen Belastung auf die Anzahl zirkulierender EPCs ebenfalls bestätigen. So stieg in ihrer Studie die Anzahl von CD34⁺VEGFR2⁺ Zellen nach Belastung um mehr als 70 % an.

Sieht man sich die Ergebnisse dieser Studien an, unterstützt das die postulierten Hypothesen der Autoren, dass die belastungsinduzierte Freisetzung von EPCs möglicherweise Reparaturmechanismen im Gefäßsystem in Gang setzt, die das Risiko für kardiovaskuläre Mortalität senken könnten (49, 50).

Ob EPCs auch in der Lunge an Reparaturvorgänge beteiligt sein könnten, ist im Gegensatz zu ihrer Bedeutung für das Herz-Kreislaufsystem bisher weniger intensiv untersucht worden. Es gibt jedoch zunehmend mehr Studien, die darauf hindeuten, dass EPCs auch bei pulmonalen Erkrankungen eine Rolle spielen (41-44, 51). So konnten Palange et al. (42) zeigen, dass bei Patienten mit Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) die Anzahl zirkulierender EPCs im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant reduziert war. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch Fadini et al. (44), die in ihrer Studie jedoch auch noch zusätzlich Patienten mit restriktiven Lungenerkrankungen untersuchten. Bei diesen Patienten zeigte sich im Vergleich mit Gesunden ebenfalls eine signifikant niedrigere Anzahl der zirkulierenden EPCs, wobei diese Erniedrigung auch noch positiv mit der Schwere der Krankheit korreliert war. Auch bei COPD gibt es zunehmend Evidenz dafür, dass die Anzahl zirkulierender EPCs mit der Schwere der Erkrankung korreliert ist (42). Anhand der Daten einer weiteren Arbeit, in der überprüft wurde, ob es bei Patienten mit bakterieller Pneumonie zu einer Mobilisation endothelialer Progenitorzellen kommt, konnten die Autoren einen signifikanten Anstieg

von EPCs infolge der Erkrankung feststellen. Hierbei stellte sich zudem heraus, dass bei Patienten, die insgesamt niedrigere Anzahlen zirkulierender EPCs aufwiesen, vermehrt persistierende fibrotische Veränderungen in den Lungen nachweisbar waren, auch nachdem die Pneumonie ausgeheilt war (41).

Insgesamt legen all diese Daten den Schluss nahe, dass EPCs auch an Reparaturvorgängen in der Lunge beteiligt sind.

1.3.2. Mesenchymale Progenitorzellen

Mesenchymale Stromazellen (MSCs) sind Zellen, die sich in-vitro durch Plastikadhärenz, durch die Expression spezifischer Oberflächenantigene und ein multipotentes Transdifferenzierungspotenzial auszeichnen. Die International Society for Cellular Therapy schlägt zur Identifizierung von MSCs mittels Durchflusszytometrie (FACS) folgendes vor: Die Zellen sollten CD105, CD73 und CD90 exprimieren, während auf ihrer Oberfläche hämatopoetische Antigene wie CD45, CD34, CD14/ CD11b, CD79α/CD19 und MHC I bzw. MHCII nicht nachweisbar sein sollten (52). MSCs finden sich unter anderem im Knochenmark, im Fettgewebe, in der Nabelschnur und im Muskelgewebe und zeigen je nachdem aus welchem Gewebe sie stammen eine unterschiedliche Expression von Oberflächenantigenen auf. Sie sind somit eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, unter denen sich auch eine Subfraktion von Zellen befindet, die Eigenschaften von Progenitorzellen aufweisen, weshalb sie in der Literatur oft auch als mesenchymale Stammzellen bezeichnet werden (53, 54). Charakteristischerweise können sich MSCs zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten ausdifferenzieren (52). Weiterhin gibt es Hinweise, dass sich unter den MSCs mit ihren zahlreichen Subgruppen auch Zellen befinden, die die Fähigkeit besitzen sich zu Atemwegsepithelzellen zu differenzieren (55). Seit ihrer Erstbeschreibung im Jahre 1974 durch Friedenstein et al. (56) sind MSCs Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung.

Im Gegensatz zur Bedeutung von EPCs für körpereigene Reparaturvorgänge und die Mobilisierung ebenjener Zellen durch körperliche Aktivität, sind diese Themen im Hinblick auf MSCs bisher weniger gut erforscht. So gibt es bisher keine Studien dazu, inwiefern sich Sport auf die Anzahl zirkulierender MSCs auswirkt. Dass es jedoch Effekte von körperlicher Aktivität auf MSCs gibt, zeigt z.B. die Arbeit von Schmidt et al. (57).

Darin konnte gezeigt werden, dass durch eine kurzfristige intensive körperliche Belastung die migratorische Aktivität von MSCs gesteigert wird. Als möglicherweise dafür zugrunde liegenden Mechanismus fanden die Autoren heraus, dass nach der Belastung bestimmte Faktoren im Blut erhöht messbar waren, die die Migration von MSCs stimulieren. Weiterhin gibt es Daten, die zeigen, dass nach einer körperlichen Belastung vermehrt muskelspezifische MSCs im Muskelgewebe nachweisbar sind (58).

Dafür, dass MSCs bei verschiedenen Erkrankungen eine Rolle spielen und dabei evtl. auch an Reparaturvorgängen beteiligt sein könnten, gibt es deutlich mehr Hinweise. Die Daten von Koning et al. (59) lassen z.B. stark vermuten, dass MSCs infolge von Entzündungsvorgängen aus dem Knochenmark mobilisiert werden um sich dann in anderer Körpergeweben an Reparaturmechanismen zu beteiligen. Diese Hypothese gilt auch für das Lungengewebe. Der zugrunde liegende Mechanismus dabei könnte sein, dass MSCs nach einer Schädigung des Gewebes durch bestimmte Faktoren "angelockt" in die Lunge einwandern (= Homing) und dort nach Umwandlung in Atemwegsepithel an der Reparatur des Gewebes teilhaben (60). Auch einige weitere Studien stellen einen positiven Effekt von MSCs bei Lungenerkrankungen deutlich heraus. So konnte im Jahr 2014 von Asmussen et. al. (61) gezeigt werden, dass im Tierversuch mit an bakterieller Pneumonie erkrankten Schafen, die Verabreichung humaner MSCs zu einer signifikanten Reduktion der akuten Lungenschädigung führte. Im Tiermodell konnte ein positiver Effekt nach Applikation humaner MSCs auch bei Asthma nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich u. a. sowohl eine signifikante Abnahme der Atemwegsinfammation, der bronchialen Hyperreaktivität, des airway remodelling, bestimmter auch an der Pathogenese des Asthmas beteiligter Zytokine (u.a. IL-4), des Immunglobulin E und der Anzahl Eosinophiler Granulozyten als auch ein Anstieg protektiver regulatorischer T-Zellen (62-64). Somit scheinen MSCs insgesamt immunregulatorische Eigenschaften zu besitzen. Dies zeigte sich auch bei Patienten mit COPD, bei denen es nach intravenöser Gabe von MSCs im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar zu keinen signifikanten Veränderungen bzgl. der Lungenfunktionsparameter oder der Exazerbationshäufigkeit kam, sich jedoch ein signifikanter Abfall der Konzentration des CRPs zeigte (65).

Betrachtet man die Ergebnisse all dieser Studien legt dies die Vermutung nahe, dass Patienten mit diversen Lungenerkrankungen, wie auch Asthma bronchiale, eventuell zukünftig von der Gabe von MSCs profitieren könnten.

1.4 In-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen

Zahlreiche Forschungsgruppen haben bereits Versuche zur in-vitro Kultivierung von MSCs unternommen. Die Methoden zur Isolierung und Expansion der Zellen unterscheiden sich dabei aber teils erheblich. Was jedoch allgemein für alle MSCs – gleich welcher Subgruppe sie angehören – zu gelten scheint, ist, dass sich die Zellen durch Plastikadhärenz auszeichnen, wenn sie unter Standardbedingungen kultiviert werden (52). Typischerweise bilden sie dabei, nachdem sie adhärent geworden sind Kolonien von spindelförmigen Zellen aus, die in ihrem Erscheinungsbild Fibroblasten ähneln (66). MSCs kommen in vielen verschiedenen Geweben vor, dennoch werden für Kulturversuche meistens MSCs aus Knochenmark oder Fettgewebe verwendet (67).

Zur Kultivierung von MSCs aus Fettgewebe werden die dafür benötigten Zellen in der Regel aus dem Material isoliert, das bei Liposuktionen, Lipoplastiken oder Lipektomien anfällt. Dafür muss das gewonnene Gewebe zunächst enzymatisch behandelt, zentrifugiert und dann gewaschen werden. Die gängigste Praxis um MSCs aus Knochenmark zu erhalten ist die Dichtegradientenzentrifugation (54). Mit diesem Verfahren lassen sich leicht die Mononukleären Zellen aus dem Knochenmark isolieren. Diese werden anschließend gewaschen, daraufhin mit Zellkulturmedium versetzt und in Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen aus Plastik ausgesät. Weitere Methoden zur Isolation von MSCs nutzen die Plastikadhärenz der Zellen oder selektieren die MSCs über deren Oberflächenantigene mithilfe von Antikörpern aus. Durch das letztgenannte Verfahren ist es sogar möglich, Subpopulationen von MSCs anzureichern, die sich in ihren Eigenschaften z.B. hinsichtlich ihres Differenzierungs- oder Proliferationspotentials unterscheiden. So konnte bereits gezeigt werden, dass CD133⁺ angereicherte MSCs eine erhöhte Proliferationskapazität gegenüber MSCs besitzen, die nur durch Plastikadhärenz selektiert wurden (68).

Um verwertbare Mengen an MSCs zu erhalten, müssen die Zellen unter optimalen Bedingungen kultiviert werden. Dies liegt mitunter an der geringen Frequenz, mit der MSCs

vorkommen. So stellen sie z.B. einen Anteil von lediglich ca. 0,001-0,01 % der mononukleären Zellen des Knochenmarks dar (67). MSCs benötigen für die Expansion bestimmte Wachstumsfaktoren, welche unter anderem im Serum enthalten sind. Da es sehr viele dieser Faktoren enthält, ist fötales Kälberserum (fetal calf serum; FCS) ein häufig für die in-vitro Kultivierung verwendeter Mediumszusatz (69). Im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz kultivierter MSCs am Menschen ist der Einsatz von FCS jedoch insofern als problematisch anzusehen, da dabei sowohl ein Risiko für die Transmission zoonotischer Infektionen bzw. Pathogene (z.B. Prionen) auf den Menschen besteht als auch die Möglichkeit einer Sensibilisierung gegen bovine Antigene (67, 69, 70). Eine gute Alternative zu FCS stellen daher Mediumszusätze dar, die aus menschlichen Blutbestandteilen gewonnen werden. So haben aus humanen Thrombozyten (human platelets; PLTs) hergestellte Produkte, allen voran PLT-Lysat (PL) wachstumsfördernde Effekte auf MSCs. Diese Produkte enthalten mitogene Wachstumsfaktoren wie z.B. PLT-derived growth factors (PDGFs), transforming growth factor- β (TGF- β), epidermal growth factor (EGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) (67, 69). PDGF-BB und bFGF scheinen dabei entscheidende Inhaltsstoffe zu sein, die den proliferationsfördernden Effekt von PL vermitteln. Es ist dabei aber interessant, dass der alleinige Zusatz dieser Wachstumsfaktoren bzw. verschiedener Kombinationen dieser Faktoren jedoch nicht ausreichend ist, um die Proliferation von MSCs zu fördern (67). Da PL Gerinnungsfaktoren, Thrombin und Fibrinogen enthält, die ohne Zusatz von Antikoagulantien durch Polymerisation des Fibrinogens im Medium zur Ausbildung einer gelartigen Masse führen würden, wird dem Medium vor Zugabe des PL standardmäßig zusätzlich noch Heparin hinzugegeben (69, 71). Dass MSCs, die mit PL als Mediumszusatz kultiviert werden für den sicheren klinischen Einsatz tauglich zu sein scheinen, zeigt die bereits erfolgreiche Anwendung in klinischen Studien (72, 73) gegen chronische bzw. akute refraktäre Graft-versus-Host-Disease nach allogener Stammzelltransplantation. In den o. g. Studien kam es zu keinen relevanten Nebenwirkungen.

Obwohl die Isolation und Expansion von MSCs aus Knochenmark problemlos möglich ist, ist es doch von großem wissenschaftlichem Interesse, alternative Quellen und Isolationstechniken für die Gewinnung von MSCs zu finden, da die Entnahme von Knochenmark ein traumatischer und auch in der Entnahmemenge limitierter Eingriff ist (74). Da

ein Vorkommen von MSCs auch im peripheren Blut vermutet wird, scheinen Versuche zur Isolation und Expansion von MSCs aus peripherem Blut (PBMSC) durchaus sinnvoll zu sein. Jedoch haben die wenigen Studien, die es bisher zu diesem Thema gibt, gezeigt, dass dies nicht so ohne Weiteres möglich zu sein scheint (74-78). Die in diesen Studien verwendeten Methoden zur Isolation und Expansion von PBMSC, wie auch die Resultate der Studien, unterschieden sich teils erheblich. In vielen Fällen gelang es nicht, PBMSC aus "normalem" peripheren Blut längerfristig erfolgreich zu kultivieren (74-76). So schlussfolgerten manche Autoren, dass zwar MSCs im "normalen" peripheren Blut vorhanden sind, die Anzahl dieser Zellen jedoch so niedrig ist, dass sie keine längerfristige Kultivierung zulässt (74, 75). Demgegenüber gibt es aber auch Studien, die einen gewissen Erfolg bzgl. der Kultivierung von PBMSC zu verzeichnen hatten (74, 77, 78). Tabelle 1 auf der nachfolgenden Seite gibt einen Überblick über diese Studien und welche Isolations- und Kulturtechniken von den Autoren für die Kultivierung von PBMSC verwendet wurden.

1.5 Fragestellungen

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob eine maximale körperliche Belastung zu einem Anstieg der Anzahl an CD34⁺-Progenitorzellen, d.h. endothelialen und hämatopoetischen Progenitorzellen, als auch an MSCs im peripheren Blut führt.

Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob Patienten mit allergischem Asthma bronchiale im Vergleich zu Gesunden sowohl in Ruhe als auch nach körperlicher Belastung unterschiedliche Anzahlen von Progenitorzellen im Blut aufweisen, sowie ob es zwischen den beiden Gruppen Unterschiede bezüglich der Dynamik der Zellzahländerungen gibt (d.h. ob sich die Zellzahlen vor und nach der Belastung im Gruppenvergleich unterschiedlich stark verändern).

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich mithilfe einer gängigen Methode zur Kultivierung von MSCs aus Knochenmark diese auch aus peripherem Blut isolieren und kultivieren lassen.

Tabelle 1 - Übersicht über Studien zur Isolierung und Expansion von PBMSC

| Studie | Methodik zur Isolierung bzw. Selektion von PBMSC | Verwendetes Medium | Ergebnis |
|-----------------------|--|--|---|
| Chong et al., 2012 | Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation und Selektion von MSCs über Plastikadhärenz. | Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit niedrigem Glucosegehalt (1,0 g/ml) + 20% FCS und 1% Gibco Antibiotic-Antimycotic-Solution (10.000 IE Penicillin, 10 mg Streptomycin + 25µg Amphotericin B pro ml) | Erfolgreiche Kultivierung von PBMSCs über 2 Passagen, im Vergleich zu MSC-Kulturen aus KM jedoch größerer Anteil rundlicher Zellen. Fazit: Im Vergleich zu KM nur limitierte Anzahl von MSCs aus PB zu erhalten, diese besitzen jedoch ähnliche Eigenschaften bzgl. der Expression MSC-typischer CD-Oberflächenantigene und ihres Differenzierungspotenzials. |
| Kassis et al., 2006 | Isolierung von PBMCs aus mittels G-CSF mobilisiertem Blut unter Verwendung eines automatischen Zellseparators (COBE Spectra Apherese System). Selektion von MSCs über Fibrin-Microbeads vs. Selektion von MSCs über Plastikadhärenz. | "Poor Medium" (PM): DMEM mit niedrigem Glucosegehalt (1,0 g/ml) + 10% FCS + 1% Vitamine + 1% Nichtessenzielle Aminosäuren + 1% Glutamin + 1% Pen/Strep "Rich Medium" (RM): DMEM mit hohem Glucosegehalt (4,5 g/ml) + 20% FCS + 1% Vitamine + 1% Nichtessenzielle Aminosäuren + 1% Glutamin + 1% Pen/Strep | <u>Selektion über Plastikadhärenz:</u> Kein Unterschied bzgl. der verwendeten Medien. In beiden Fällen mehrheitlich große, runde Zellen, in ihrer Morphologie Leukozyten ähnlich. Nach 18 Tagen Zellen größtenteils apoptotisch. Vernachlässigbare Anzahl an MSCs, die nicht weiter expandiert werden konnten. <u>Selektion über FMB:</u> In 8 von 11 Versuchen erfolgreiche Isolation und Expansion von MSCs mit entsprechendem Differenzierungspotenzial. Bessere Ergebnisse bei Verwendung von RM. |
| Lazarus et al., 1997 | Isolierung von Hämatopoetischen Progenitorzellen aus peripherem Blut (PBPC) aus mittels G-CSF mobilisiertem Blut. Selektion von MSCs über Plastikadhärenz. | Keine Informationen vorhanden | MSCs konnten nicht aus PB gewonnen werden. Aus KM gelang dies problemlos. |
| Wexler et al., 2003 | Isolierung von PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation, Selektion von MSCs über Plastikadhärenz. | DMEM mit niedrigem Glucosegehalt (1,0 g/ml) + 10% FCS | Karge Schicht adhärenter, nicht konfluierender und in ihrer Morphologie sehr heterogener Zellen. Teilweise spindelförmig, jedoch nicht über die erste Passage hinaus expandierbar. Im Gegensatz dazu Kultivierung von MSCs aus KM problemlos möglich. |
| Zvaifler et al., 2000 | Isolierung von PBMCs über Dichtegradientenzentrifugation. Nachfolgend Elutriation um höhere Konzentration an MSCs zu erhalten. Anschließend Selektion dieser über Plastikadhärenz. | DMEM + 20% FCS | Ausgesäte Zellen werden in Kultur plastikadhärent. Zunächst längliche Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie neben großen, runden Zellen mit einem zentralen Nukleus. Mit fortschreitender Kulturdauer werden runde Zellen der dominierende Zelltyp. Auf allen Zelltypen können verschiedene zytoskeletale, zytoplasmatische und Oberflächenmarker mesenchymaler Progenitorzellen nachgewiesen werden, insbesondere eine hohe Expressionsrate von CD44 und CD105. Kultivierte Zellen besitzen fibrogene, osteogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit. |

2 Material und Methoden

Die Durchführung der Studie erforderte die Zustimmung seitens der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, die für diese Studie auch erteilt wurde (Zeichen 20/12, Schreiben vom 28.02.2012). Die Erfassung, Speicherung und Auswertung der erhobenen Daten erfolgte gemäß den geltenden Datenschutzbestimmungen.

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

| | |
|---|---|
| 12-Kanal-EKG | custocard m, custo med, Ottobrunn, Deutschland |
| Bodyplethysmograph | Master Screen Body, Jaeger, Höchberg, Deutschland |
| Brutschrank | Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland |
| Fahrradergometer | ergoselect 200, ergoline, Bitz, Deutschland |
| Falcon-Röhrchen | Cellstar Tubes, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Filter- und Beutelsystem zur Herstellung von Plättchenlysat | Platelet lysate preparation kit, Macopharma, Tourcoing, Frankreich |
| Hämatologie-System | ADVIA 120, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland |
| MACS-Säulen | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland |
| Mikroskop | Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland |
| Neubauer-Zählkammer | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipetten | Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Pulsoxymeter | Nellcor Reflectance oxygen sensor RS10, Nellcor Puritan Bennet, Pleasanton, CA, USA |
| Spiroergometriegerät | CPX/D, MedGraphics, St. Paul, MN, USA |
| Stabpipetten | Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkulturflaschen | Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland |

| | |
|----------------------------|---|
| Zellkulturplatten, 96-well | Nunc A/S, Roskilde, Dänemark |
| Zentrifuge | Rotixa 50 RS, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge | Rotanta 46 RC, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland |

2.1.2 Chemikalien und sonstige Substanzen

2.1.2.1 Chemikalien

Antikörper

7-AAD PerCP, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
APC-Mouse IgG1 κ Isotype Control, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
APC Streptavidin, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD29 PE, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD31 FITC, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD34 PerCP, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD38 APC, invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD44 APC, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD45 APC, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD45 FITC, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD45 PerCP, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD105 PE, IOTest, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD133 PE, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD235a FITC, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD271 APC, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD271 MicroBead Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
FITC-Mouse IgG1 κ Isotype Control, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
MSCA-1 PE, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
PE-Mouse IgG1 κ Isotype Control, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PerCP- Mouse IgG1 κ Isotype Control, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Purified Mouse Anti-Human CD73, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Purified Mouse Anti-Human CD90, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
VEGFR2 PE, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Reagenzien

Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

CellGro Preclinical MSC Medium, CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline ohne Calcium- und Magnesiumchlorid (PBS),
Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

FACS-Lysing-Solution, BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland

Trypanblau-Lösung, 0,5-%, bereitgestellt durch Gemeinsames Stammzelllabor der
Universitäts-Kinderklinik und Medizinischen Klinik II, Würzburg, Deutschland

Pharm Lyse Pufferlösung, BectonDickinson, Heidelberg, Deutschland

2.1.2.2 Sonstige Substanzen

Penicillin/Streptavidin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Plättchenlysat aus humanem Thrombozyten-Apheresekonzentrat, zur Verfügung gestellt
vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie am Universi-
tätsklinikum Würzburg, Deutschland

Salbutamol Dosieraerosol, GlaxoSmithKline, Bad Oldesloe, Deutschland

Heparin-Natrium-5000 (5000 I.E./0,2 ml), Fa. Ratiopharm, Deutschland

2.1.3 Software

Microsoft Office Excel 2007 Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

PASW Statistics SPSS 18 SPSS Inc., Chicago, Ill, USA

CellQuestPro, Version 5.2.1 BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.2 Messung von Progenitorzellpopulationen vor und nach körperlicher Belastung

2.2.1 Stichprobe

Für die Studie wurden insgesamt 19 junge Erwachsene rekrutiert, die wie folgt einer Ex-
perimental- und einer Kontrollgruppe zugeordnet wurden. Die Probanden wurden alle-
samt im Zeitraum von Mai 2012 bis Juni 2014 in Würzburg über ein standardisiertes
Informationsschreiben angesprochen und rekrutiert. Alle Teilnehmer gaben nach schrift-
licher und mündlicher Aufklärung über die Studieninhalte schriftlich ihr Einverständnis,
an der Studie teilzunehmen.

2.2.1.1 Experimentalgruppe

Für die Experimentalgruppe (EG) wurden sieben Patienten (fünf männlich, zwei weiblich) rekrutiert, die an einem anamnestisch gesicherten allergischen Asthma bronchiale mit Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben der Art *Dermatophagoides pteronyssinus* litten. Das geforderte Mindestalter der Patienten, um an der Studie teilzunehmen, betrug 12 Jahre. Für die Diagnose Asthma wurden dabei die Kriterien der Global Initiative for Asthma herangezogen (1). Als Ausschlusskriterien galten dabei das Vorliegen von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus, Leberzirrhose, Behandlung mit systemischen Steroiden wie z.B. bei allergischer bronchopulmonaler Aspergillose, akute pulmonale Exazerbation definiert nach der Nationalen Versorgungsleitlinie Asthma von 2009 (2), regelmäßiges Rauchen und bekannte belastungsinduzierte kardiale Arrhythmien.

2.2.1.2 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe (KG) wurden 12 Probanden (sieben männlich, fünf weiblich) rekrutiert, die nach ihrer Anamnese Nicht-Raucher waren, zum Zeitpunkt der Untersuchung völlig gesund waren und dabei insbesondere weder unter chronischen Krankheiten, noch unter rezidivierenden Erkältungen oder Allergien litten.

2.2.1.3 Gesamtgruppe

Aus allen Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG), allen Probanden aus der Kontrollgruppe (KG) und denjenigen Studienteilnehmern, die aufgrund einer laborchemisch nachweisbaren Sensibilisierung gegen *Dermatophagoides pteronyssinus* bei fehlenden Allergiesymptomen weder in die EG noch die KG eingeschlossen werden konnten, wurde eine Gesamtgruppe (GG) gebildet.

2.2.2 Durchführung der klinischen Untersuchungen

2.2.2.1 Vorbereitungen

Nachdem die Probanden zu Anfang des Untersuchungstermins über den Ablauf der Untersuchungen und mögliche Risiken umfangreich aufgeklärt wurden und alle dabei aufkommenden Fragen beantwortet waren, wurde das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie seitens des Studienteilnehmers durch Unterzeichnung einer Einverständniserklärung schriftlich festgehalten. Die Untersuchungstermine lagen immer in mindestens zweistündigem Abstand zur Einnahme der letzten Mahlzeit. Außerdem wurden die Teil-

nehmer angewiesen, im Zeitraum von 24 Stunden vor dem Untersuchungstermin keinen körperlich anstrengenden Tätigkeiten mehr nachzugehen und am Morgen des Untersuchungstages keine koffeinhaltigen Getränke zu sich zu nehmen.

2.2.2.2 Untersuchungsablauf

Zu Beginn wurden Größe und Gewicht der Teilnehmer in Unterwäsche bestimmt. Des Weiteren wurden die Teilnehmer mittels eines standardisierten Fragebogens zu ihrer allgemeinen körperlichen Aktivität im Alltag befragt, um hinsichtlich derer eventuelle Unterschiede in den beiden Gruppen feststellen zu können. Dieser Fragebogen enthielt die Fragen der deutschen Version des Seven Day Physical Activity Recall Questionnaires (7D-PAR). In diesem Fragebogen werden körperliche Aktivitäten in drei Kategorien ("mäßig anstrengende", "anstrengende" und "sehr anstrengende" Tätigkeiten) eingeteilt und die Befragten sollen auf eine halbe Stunde genau einschätzen, wieviel Zeit sie in den vorangegangenen sieben Tagen in welcher Kategorie zugebracht haben. Ausgewertet wurde dabei jeweils die Summe der Zeit in Minuten, die von den Studienteilnehmern pro Woche in den Kategorien „anstrengende“ und „sehr anstrengende“ Tätigkeiten des 7D-PAR verbracht wurde. Der Fragebogen wurde mit in die Studie aufgenommen, da Ruf et al. (79) in ihrer Studie aus dem Jahre 2012 bereits für Patienten mit Mukoviszidose aufzeigen konnten, dass die Zeit (angegeben in Minuten pro Woche), die in den Kategorien "anstrengende" und "sehr anstrengende" Tätigkeiten des 7D-PAR verbracht wird, signifikant mit der objektiv mittels Akzelerometrie gemessenen körperlichen Aktivität korreliert.

Nachdem die Teilnehmer den Fragebogen ausgefüllt hatten, wurde an vier Körperstellen (über dem Bizeps, über dem Trizeps, subscapular, supriliacal) die Dicke der Hautfalten in mm bestimmt und mit der Formel nach Durnin und Womersley (80) der Körperfettanteil in Prozent errechnet. Durch Abzug dieses Anteils vom Körpergesamtwicht ergab sich die fettfreie Körpermasse (Lean Body Mass; LBM). Danach wurde eine Lungenfunktionsuntersuchung mittels Spirometrie und Bodyplethysmographie durchgeführt. Diese diente der Erfassung folgender Parameter: der forcierten Vitalkapazität (FVC), der Einsekundenkapazität (FEV1), des Residualvolumens (RV), der totalen Lungenkapazität (TLC) sowie des effektiven Atemwegswiderstands (Reff). Im Anschluss daran wurde die Lungenfunktionsuntersuchung nach Inhalation von zwei Hüben Salbutamol über eine

Vorsatzkammer (Volumatic) zur Bronchospasmyse wiederholt. Als nächstes wurde eine Venenverweilkanüle in der Vena mediana cubiti platziert um darüber die geplanten Blutentnahmen vor und nach körperlicher Belastung durchführen zu können. Die erste Blutentnahme fand nach einer Ruhephase von 20 Minuten im Sitzen statt. Dabei wurden 1,2 ml EDTA-Blut für die Blutbildbestimmung, 7,4 ml EDTA-Blut für die FACS-Analysen und Zellkulturversuche, 1,2 ml Fluorid-Blut für die Laktatbestimmung, 2 ml Blut für die Bestimmung von CRP, Immunglobulin G (IgG), Natrium, Kalium, Chlorid und Gesamteiweiß im Serum, 2 ml Blut für die Bestimmung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE gegen Antigene der Hausstaubmilben-Art *Dermatophagoides pteronyssinus* im Serum sowie 1 ml Blut für die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) entnommen.

Auf die Blutentnahme folgte ein spiroergometrischer Ausdauerleistungstest auf einem Fahrradergometer bis zur maximalen körperlichen Ausbelastung nach dem Godfrey-Protokoll (81). Die Anfangslast betrug dabei 20 Watt und wurde jede Minute um weitere 20 Watt gesteigert. Die Probanden wurden dabei dazu angehalten, den Test bis zur vollständigen subjektiven körperlichen Erschöpfung durchzuführen. In die späteren Auswertungen wurden dabei nur die Studienteilnehmer mit einbezogen, die in der Spiroergometrie einen respiratorischen Quotienten von $\geq 1,05$ als Maß für die körperliche Ausbelastung erreichten. Während der gesamten Dauer der Spiroergometrie wurde parallel ein Belastungs-EKG mittels 12-Kanal-EKG (custocard m, custo med, Ottobrunn, Deutschland) abgeleitet, um den Herzfrequenzanstieg durch die zunehmende körperliche Belastung zu objektivieren, die maximale Herzfrequenz zu ermitteln und eventuell auftretende belastungsinduzierte pathologische EKG-Veränderungen, wie z.B. Erregungsrückbildungsstörungen frühzeitig erkennen zu können. Zusätzlich wurde auch die Sauerstoffsättigung im Blut durch Pulsoxymetrie (Nellcor Reflectance forehead oxygen sensor RS10, Nellcor Puritan Bennet, Pleasanton, CA, USA) gemessen. Die gleichzeitige Messung von Ventilation und O₂- sowie CO₂- Konzentration in der Atemluft zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO₂peak) und des respiratorischen Quotienten (RQ) erfolgte mittels Spiroergometriegerät (CPX/D, MedGraphics, St. Paul, MN, USA).

Die Parameter Herzfrequenz und respiratorischer Quotient wurden dann in der Auswertung herangezogen, um die maximale Ausbelastung der Studienteilnehmer zu objektivieren.

Anschließend an den Ausdauerleistungstest erfolgte nach 10 Minuten eine zweite Blutentnahme. Außer der Bestimmung von BSG, CRP, IgG, spezifischem IgE und Gesamt-IgE wurden dieselben Blutmengen entnommen und dieselben Blutuntersuchungen durchgeführt wie bei der ersten Blutentnahme. Der Zeitpunkt für die zweite Blutentnahme wurde in dieser Studie 10 Minuten nach Ende der körperlichen Belastung gewählt, da bereits mehrere Autoren in ihren Studien zeigen konnten, dass es 10 Minuten nach einer maximalen körperlichen Belastung zu einem signifikanten Anstieg von CD34⁺ endothelialen Progenitorzellen kommt, so z.B. Van Craenenbroeck et al. (50) und Laufs et al. (49).

2.2.3 Laboranalysen der Blutproben

2.2.3.1 Allgemeine Laboruntersuchungen

Aus dem vor und nach der Spiroergometrie entnommenen Blut wurde jeweils maschinell ein Blutbild inklusive Differenzialblutbild angefertigt. Außerdem wurde vor und nach der Belastung der Laktat Spiegel im Blut gemessen, um die erfolgte maximale körperliche Arbeit auch laborchemisch zu bestätigen. Zudem wurden das Gesamteiweiß, das Natrium, das Kalium und das Chlorid im Blutserum vor und nach Belastung bestimmt. Zusätzlich wurden aus dem vor der Belastung entnommenen Blut auch noch folgende weitere Parameter analysiert: die BSG, das CRP und der IgG-Spiegel als Marker für akute und chronische Entzündungen sowie, um das Vorliegen einer Hausstaubmilbenallergie bei den gesunden Kontroll-Probanden auszuschließen bzw. bei den Patienten mit allergischem Asthma zu bestätigen, der Gesamt-IgE-Wert und der Wert für das spezifische IgE gegen *Dermatophagoides pteronyssinus*. Da es bedingt durch die Flüssigkeitsverluste während der körperlichen Anstrengung zu einer Veränderung des Plasmavolumens und damit zu einer Veränderung des Hämatokrits im Sinne einer Hämokonzentration kommt, die einen Einfluss auf die nach der Belastung gemessenen Zellzahlen im Blut haben könnte, wurde diese Plasmavolumenänderung nach dem Verfahren von Greenleaf et al. (82) berechnet.

2.2.3.2 Laboranalysen zur Differenzierung der Progenitorzellpopulationen

Das für die durchflusszytometrischen Analysen und die Zellkulturversuche entnommene EDTA-Blut wurde bei 4°C gekühlt gelagert und innerhalb von 12 Stunden nach Entnahmezeitpunkt analysiert und weiter aufbereitet. Sämtliche im Folgenden beschriebene Schritte wurden dabei für das vor und das nach der Belastung entnommene Blut separat durchgeführt. Zunächst wurden aus Vollblut mittels FACS zwei Zellpopulationen quantitativ erfasst. Dafür wurden von den beiden Blutproben (vor und nach Belastung) jeweils 400 µl verwendet und die Zellen nach folgendem Schema mit Färbeantikörpern angefärbt:

Tabelle 2 - Färbekombination zur Bestimmung der hämatopoetischen Stammzellsubfraktionen im peripheren Blut

| FITC | PE | PerCP | APC |
|------|----|-------|-----|
| CD45 | - | CD34 | - |

Die Antikörperfärbungen wurden dabei entsprechend den Anleitungen der jeweiligen Hersteller durchgeführt. Folgende Zellpopulationen wurden nach der in Abbildung 1 dargestellten Gating-Strategie definiert: Eine CD34⁺SSC^{low}-Zellpopulation, in der sich die hämatopoetischen (HSC) und endothelialen Progenitorzellen (EPC) befinden und eine Zellpopulation, die negativ für CD45 ist (CD45⁻SSC^{low}) und damit diejenigen Zellen des peripheren Blutes enthält, die nicht Leukozyten oder deren Progenitoren entsprechen. Es ist anzunehmen, dass sich in dieser CD45⁻SSC^{low}-Zellpopulation auch mesenchymale Progenitorzellen (MSC) finden lassen, jedoch ist dabei nicht auszuschließen, dass sich in dieser Population auch z.B. Erythrozyten, Normoblasten, Thrombozyten, apoptotische Zellen und Debris befinden.

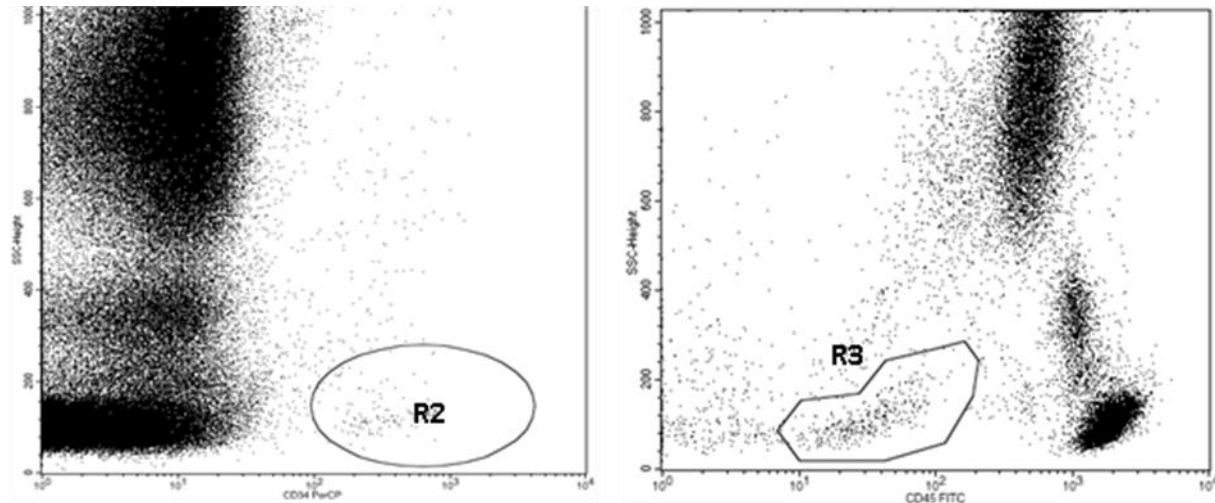


Abbildung 1: Gating Strategie zur Charakterisierung einer $CD34^+SSC^{low}$ und einer $CD45^-SSC^{low}$ – Zellpopulation.

Der $CD34^+SSC^{low}$ – Zellpopulation entsprechen alle Ereignisse in der Region R2. Der $CD45^-SSC^{low}$ – Zellpopulation entsprechen alle Ereignisse, die sich im Gate R3 befinden.

Es wurden jeweils 250.000 Events aufgezeichnet. Zusätzlich wurde für jede Blutprobe eine Isotypen-Kontrolle angefertigt. Dafür wurden IgG1-Isotypen-Kontroll-Antikörper, die mit den entsprechenden Farbstoffen (FITC, PE, PerCP, APC) gekoppelt waren, verwendet. Anhand der Isotypen-Kontrollen konnte dann die Expression der jeweiligen CD-Oberflächen-Antigene in den gefärbten Blutproben quantitativ bestimmt werden.

Der mittels FACS-Analyse festgestellte Wert für $CD34^+SSC^{low}$ Events wurde dabei als prozentualer Anteil der Leukozytenzahl definiert. Anhand dieses Wertes und des vorher mit dem ADVIA-Hämatologie-Vollautomaten bestimmten Wertes Leukozytenanzahl/ μ l konnte dann die absolute Zahl an hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen pro μ l errechnet werden.

Weiterhin ausgewertet wurden Ereignisse, welche sich im $CD45^-SSC^{low}$ -Gate darstellten. Aus diesem Wert konnte jedoch nicht auf einen Absolutwert an MSCs pro μ l zurückgerechnet werden, da dieser Wert lediglich einen Prozentwert aller Ereignisse in diesem Gate darstellt. Zwar ist, wie oben schon beschrieben, anzunehmen, dass sich unter den $CD45^-SSC^{low}$ -gategateten Zellen auch mesenchymale Stammzellen befinden, diese Population ist jedoch nicht mit ihnen gleichzusetzen, da eine genaue Charakterisierung der Gruppe der MSCs aufgrund ihrer Heterogenität sehr schwierig ist. Daher wurden weitere Marker zu einer genaueren Charakterisierung der im $CD45^-SSC^{low}$ -Gate

befindlichen Zellen herangezogen. Dabei wurden diese Zellen auf die Expression von CD105, CD73, CD90, CD44, CD29, CD271 und MSCA-1 hin untersucht. Eine Expression dieser Marker ist auf MSCs beschrieben, die zu einer Ausdifferenzierung in Atemwegsepithel fähig sind (52, 55, 83, 84). In dieser Studie sollte mittels durchflusszytometrischer Verfahren untersucht werden, ob es in dem vor und nach körperlicher Belastung entnommenen Blut Unterschiede hinsichtlich der Menge jener Zellen gibt, die die oben genannten Marker exprimieren, um somit Hinweise darauf zu erhalten, ob es durch körperliche Belastung zu einer vermehrten Ausschüttung dieser Zellpopulation ins periphere Blut kommt.

Anschließend an die Analyse der $CD34^+SSC^{low}$ und $CD45^-SSC^{low}$ Subfraktionen wurden aus dem übrigen EDTA-Blut (jeweils 7 ml) die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), die den Lymphozyten und Monozyten entsprechen, mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und von den übrigen zellulären Blutbestandteilen (Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) getrennt. Das Verfahren wurde für die Blutproben vor und nach Belastung jeweils separat wie folgt durchgeführt: Zuerst wurde das Blut im Verhältnis 1:2 mit PBS-Lösung gemischt und diese Mischung dann in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Biocoll Separating Solution geschichtet. Anschließend erfolgte entsprechend den Herstellerangaben eine Zentrifugation bei 22°C mit 300 g, Bremse 1 für 30 Minuten. Durch die Zentrifugation bildete sich eine Interphase aus, die die PBMCs enthielt. Diese Interphase wurde nach der Zentrifugation vorsichtig mit einer 10 ml Stabpipette entnommen und in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um die PBMCs möglichst vollständig von Verunreinigungen durch Biocoll-Lösung zu befreien, wurden diese gewaschen. Dazu wurde das Falcon-Röhrchen, das die Zellen aus der Interphase enthielt, mit PBS aufgefüllt und anschließend bei Raumtemperatur mit 400 g, Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das am Boden des Falcon-Röhrchens haftende Zellpellet erneut in PBS resuspendiert und das Ganze wiederum bei Raumtemperatur mit 400 g, Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde danach noch ein weiteres Mal wiederholt.

Im Anschluss an die Biocoll-Separation und die Waschvorgänge wurde die Anzahl an vitalen PBMCs im Zellpellet mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde das Zellpellet zunächst in 10 ml PBS aufsuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden im

Verhältnis 1:9 mit 0,5-prozentiger Trypanblau-Lösung versetzt, um tote Zellen, deren Zellmembran permeabel für Trypanblau ist, anzufärben. Davon wurden anschließend 10 µl in die Neubauer-Kammer gegeben und dann unter dem Mikroskop die Anzahl vitaler Zellen in vier großen Eckquadraten ausgezählt. Danach erfolgte die Berechnung der Zellzahl in der Zellsuspension nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der ausgezählten Zellen}/4 \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Um die Zellzahl im Zellpellet zu erhalten, wurde das Ergebnis dieser Rechnung dann noch mit dem Faktor 10 multipliziert.

Für die FACS-Analysen zur genaueren Charakterisierung der Progenitorzell-Populationen wurden der Zellsuspension dann 2×10^6 Zellen entnommen. Die übrige Zellsuspension wurde für die nachfolgenden Zellkulturversuche verwendet. Die zur weiteren Charakterisierung entnommenen PBMCs wurden entsprechend der in den Tabellen 3 und 4 dargestellten Färbekombinationen angefärbt und anschließend nach der weiter unten beschriebenen Vorgehensweise durchflusszytometrisch untersucht:

Tabelle 3 - Färbekombination zur genaueren Charakterisierung CD34⁺/SSC^{low} gateder Events

| FITC | PE | PerCP | APC |
|------|--------|-------|------|
| CD45 | CD133 | CD34 | CD38 |
| CD31 | VEGFR2 | CD34 | CD45 |

Tabelle 4 - Färbekombination zur genaueren Charakterisierung CD45⁻CD235⁻SSC^{low} gateder Events

| FITC | PE | PerCP | APC |
|-------|--------|-------|-------|
| CD235 | CD105 | CD45 | CD73 |
| CD235 | CD29 | CD45 | CD44 |
| CD235 | MSCA-1 | CD45 | CD271 |
| CD235 | CD105 | CD45 | CD90 |

Ähnlich zum weiter oben beschriebenen Vorgehen bei den Analysen aus Vollblut wurde zunächst die Fraktion der $CD34^+SSC^{low}$ -Events bestimmt. Dabei wurde jedoch zusätzlich eine Standardregion auf die Lymphozytenpopulation gelegt und diese mit der $CD34^+SSC^{low}$ -Region kombiniert. Weiterhin wurde ähnlich zu den Analysen aus Vollblut die $CD45^-SSC^{low}$ -Fraktion bestimmt. Hier wurde jedoch neben einer Standardregion auf die Lymphozytenpopulation noch eine Negativregion auf CD235a gelegt, um eventuell verbliebene Zellen oder Fragmente von Zellen der erythrozytären Reihe auszuschließen und diese beiden Regionen mit der $CD45^-SSC^{low}$ Region kombiniert. Somit war die Zielpopulation, die auf die Expression typischerweise auf MSCs befindlicher Oberflächenmarker hin untersucht wurde, $CD45^-CD235a^-SSC^{low}$. Analog dem Vorgehen bei den Vollblutproben wurden dabei jeweils 250.000 Events aufgezeichnet und für jede Probe eine Isotypenkontrolle angefertigt. Um die Expression der in Tabelle 3 und 4 aufgeführten Antigene in den definierten Zielpopulationen zu quantifizieren, wurden für die in diesen Zielpopulationen befindlichen Events dann zweidimensionalen Punktwolkendiagramme, sogenannten Dot-Plots angefertigt, in der sich die aufgezeichneten Events entsprechend ihrer Antigenexpression verteilt darstellten. Anhand der angefertigten Isotypenkontrollen konnten die Dot-Plots dann in Quadranten unterteilt werden und die Events anhand ihrer jeweiligen Lage in den verschiedenen Quadranten als positiv oder negativ für die Expression der untersuchten Antigene klassifiziert werden. Eine Vorgabe, die jedoch zum Teil aufgrund der extrem niedrigen Frequenzen der gesuchten Zielzellen im Blut nicht immer erfüllt werden konnte, war dabei, dass sich in den einzelnen Dot-Plots jeweils mindestens 100 Events finden lassen sollten.

Beispielhaft ist in der folgenden Abbildung 2 die Strategie für die Untersuchung $CD45^-CD235a^-SSC^{low}$ gatedeter Events auf die Expression von MSC-typischen Oberflächenmarkern detailliert dargestellt.

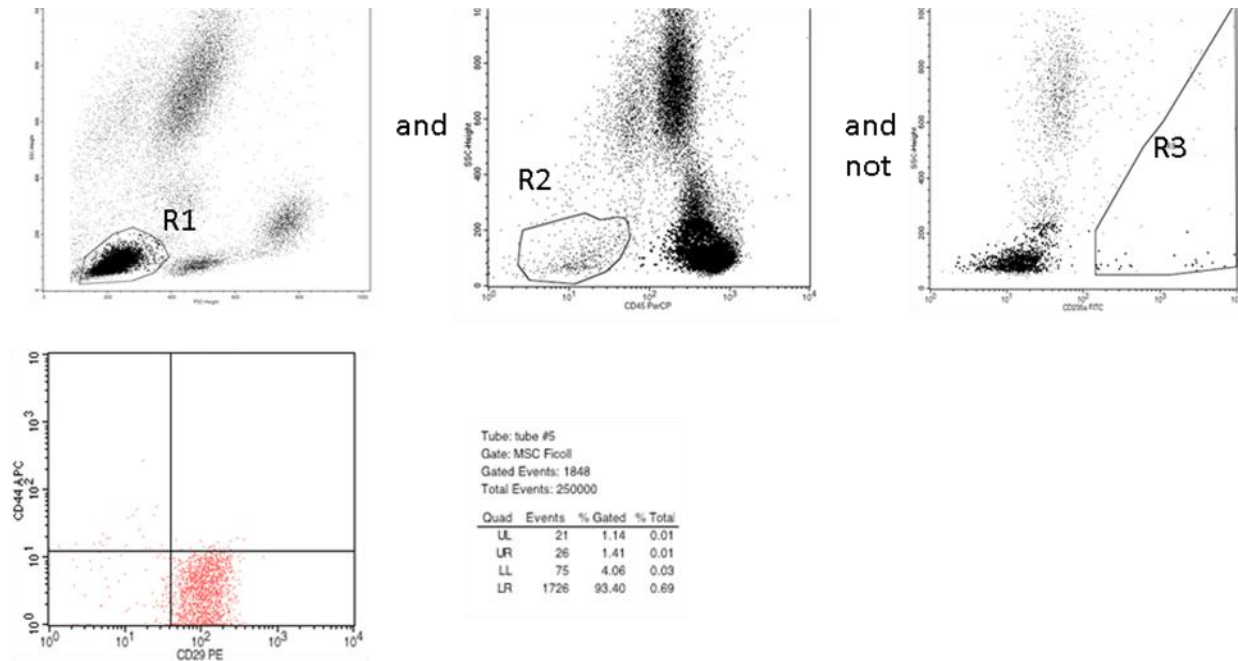


Abbildung 2: Gating Strategie zur Quantifizierung von Zellen, die MSC-typische CD-Oberflächenantigene exprimieren

Die Region R1 (linke Grafik) erfasst die Lymphozytenpopulation, in der sich auch die Stammzellen finden lassen. Mit der Region R2 (mittlere Grafik) werden CD45⁺SSC^{low} Events erfasst, sowie mit der Region R3 (rechte Grafik) CD235a positive Events. Durch Kombination dieser 3 Regionen (R1 und R2, aber nicht R3) wird die CD45⁺CD235⁻SSC^{low} Zielpopulation definiert und diese Zellen in entsprechenden Dot-Plots auf die Expression von CD-Oberflächenmarkern hin untersucht. Exemplarisch ist hier die Untersuchung auf die Expression von CD29 und CD44 bei einem Patienten mit Asthma bronchiale vor körperlicher Belastung dargestellt.

2.3 MSC-Kulturen

Die Zellkulturversuche zur in vitro-Kultivierung von MSCs aus peripherem Blut bestanden aus insgesamt neun Ansätzen. Für drei dieser Ansätze wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmark verwendet. Diese Versuche sollten als Positiv-Kontrolle dienen. Sechs der Ansätze wurden schließlich aus PBMCs hergestellt. Alle MSC-Kulturversuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.1 Herstellung von MSC-Kulturmedium

Um ein Medium zu erhalten, das optimale Bedingungen für das in-vitro-Wachstum von MSCs bietet, wurde CellGro Preclinical MSC Medium (MSC-Gro) im Verhältnis 9:1 mit Plättchenlysat (PL) versetzt, das zuvor aus Thrombozyten-Apheresekonzentrat hergestellt wurde.

Zur Herstellung des PL wurde ein steriles, leukozytendepletiertes Thrombozyten-Apheresekonzentrat, welches aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg stammte, in einem

Kryokonservierungs-Beutel bei -80°C eingefroren. Als nächstes wurde dieses Thrombozytenkonzentrat zweimal hintereinander zunächst bei $+37^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und dann wiederum bei -80°C eingefroren. Hierauf folgte ein weiterer Auftauvorgang bei $+4^{\circ}\text{C}$ über mindestens 12 Stunden und eine anschließende Zentrifugation über 30 Minuten bei 4000 g, um die Überreste der Thrombozytenmembranen zu entfernen. Dann wurde der Beutel aufgehängt, der Überstand der Schwerkraft folgend über einen Filter mit der Porengröße von $0,65\ \mu\text{m}$ geleitet, das gefilterte PL in 30 ml Portionen aliquotiert und bis zur Verwendung wieder eingefroren.

Um eine Koagulation des mit PL versetzten MSC-Gro (PL-MSG-Gro) durch die im PL vorhandenen Gerinnungsfaktoren, Thrombin und Fibrinogen zu verhindern, wurde dem MSC-Gro noch vor Zugabe des PL unfractioniertes Heparin in einer Dosierung von 2 IU/ml hinzugefügt. Weiterhin wurden dem PL-MSG-Gro pro ml 100 U Penicillin und $100\ \mu\text{g}$ Streptomycin zugesetzt.

2.3.2 MSC-Kulturen aus Knochenmark

Es wurden insgesamt drei MSC-Kulturen aus Knochenmark angefertigt. Dazu wurden ausschließlich Knochenmarkzellen verwendet, die aus dem übrig gebliebenen Material einer Knochenmarkspende gewonnen wurden. Sie stammten von gesunden Individuen, denen zuvor Knochenmark zum Zwecke der allogenen Stammzelltransplantation entnommen worden war.

Aus diesem Knochenmark wurden zunächst, analog zu dem unter 2.2.3.2 beschriebenen Vorgehen, mittels Dichtegradientenzentrifugation die mononukleären Zellen isoliert und deren Anzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden diese mononukleären Zellen – abhängig von der vorher bestimmten Anzahl – in der entsprechenden Menge PL-MSG-Gro aufsuspendiert, sodass die mittlere Zellkonzentration in diesem $6,8 \times 10^5$ Zellen/ml betrug. Die Zellzahl wurde so gewählt, da Vorversuche ergeben hatten, dass geringere Konzentrationen zu keiner nennenswerten Expansion von Zellen führten. Jeweils 10 ml dieser Suspension wurden dann in $75\ \text{cm}^2$ Zellkulturflaschen (T75) ausgesät und die Flaschen anschließend bei Standardbedingungen (37°C , 5 % CO_2 und wassergesättigter Atmosphäre) im Brutschrank bebrütet. In der folgenden Zeit wurde alle 72 Stunden ein Mediumswechsel durchgeführt. Dazu wurden jeweils

8 ml altes PL-MS-Gro mit der Stabpipette aus den T75-Flaschen abgezogen und diese 8 ml jeweils in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Falcon-Röhrchen wurden dann bei 200 g, Raumtemperatur, Bremse 1 für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand mit der Stabpipette abgenommen und das Zellpellet in 8 ml neuem PL-MS-Gro resuspendiert. Diese Suspension wurde dann wieder in die entsprechenden T75-Flaschen gegeben und die Flaschen wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die Mediumswechsel wurden solange nach oben beschriebenen Verfahren durchgeführt, bis sich in den T75-Flaschen erste adhärenente Zellen zeigten. Danach wurde für jeden weiteren Mediumswechsel lediglich 8 ml altes Medium mit der Stabpipette aus den T75-Flaschen abgezogen, verworfen und durch 8 ml neues Medium ersetzt. Bei jedem Mediumswechsel wurde auch die Dichte der Zellnester auf den Flaschenböden unter dem Mikroskop untersucht. Waren insgesamt mehr als 50 % der Fläche der Flaschenböden mit konfluierenden Zellnestern bedeckt, wurde die Zellkultur nach folgender Vorgehensweise passagiert. Das Verfahren wurde dabei für jede Flasche einzeln durchgeführt.

Zunächst wurde das verbrauchte Medium mit der Stabpipette vollständig aus der T75-Flasche abgezogen und verworfen. Um die Zellkultur zu waschen wurden 5 ml PBS in die Flasche gegeben und die Flasche vorsichtig geschwenkt. Das PBS wurde dann mit der Stabpipette abgezogen und verworfen. Danach wurden 2 ml Trypsin-Lösung in die Flasche gegeben und die Flasche bei 37°C im Brutschrank für 4-5 Minuten inkubiert. Dadurch lösten sich die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden ab. Anschließend wurde die Kulturflasche aus dem Brutschrank entnommen und geschwenkt um die abgelösten Zellen zu suspendieren. Die Zellsuspension wurde sodann aus der Flasche entnommen und in ein 50 ml Falcon gegeben. Als Nächstes wurde die Flasche mit 10 ml PBS gewaschen, das PBS danach jedoch nicht verworfen, sondern abgezogen und in das 50 ml Falcon mit der Zellsuspension überführt. Um die Zellen zu waschen und von Resten von altem Medium und Trypsin zu befreien, wurde das Falcon anschließend bei Raumtemperatur mit 400 g, Bremse 9 für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgezogen und verworfen und das am Boden haftende Zellpellet erneut in 10 ml PBS suspendiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 400 g, Bremse 9 für 10 Minuten. Nach diesen Waschvorgängen wurde das Zellpellet (nachdem die überste-

hende Flüssigkeit entfernt worden war) in 20 ml PL-MS-C-Gro gelöst und jeweils 10 ml davon in einer neuen T75-Zellkulturflasche ausgesät.

Die Zellkulturen wurden bis zu einer maximalen Dauer von 30 Tagen kultiviert. Dabei erfolgten jeweils am Ende des Kulturzeitraumes (bei Kultur 1 auch zwischenzeitlich, siehe Ergebnisteil) durchflusszytometrische Untersuchungen auf die Expression MSC-typischer Oberflächenantigene. Dazu wurden die adhärennten Zellen einer Zellkulturflasche, wie oben beschrieben, mit Trypsin abgelöst, jedoch nicht wieder in Zellkulturmedium gelöst und ausgesät. Stattdessen wurden die abgelösten Zellen zweimal hintereinander mit PBS gewaschen und anschließend entsprechend nachfolgendem Schema mit Färbekombinationen gefärbt.

Tabelle 5 - Färbekombination zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen auf Zellen der MSC-Kulturen aus Knochenmark

| FITC | PE | PerCP | APC |
|------|--------|-------|-------|
| CD45 | CD105 | 7-AAD | CD73 |
| CD45 | CD29 | 7-AAD | CD44 |
| CD45 | MSCA-1 | 7-AAD | CD271 |

Danach erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung. Dazu wurde zunächst eine Population definiert, die am wahrscheinlichsten die lebenden MSCs aus der Kultur enthielt. Dazu wurde eine Region auf die Events gelegt, die $FSC^{high}SSC^{high}$ waren. Diese Region wurde mit zwei weiteren Regionen kombiniert: Um Zellen auszuschließen, die der leukozytären Reihe entstammen, wurde eine Region auf $CD45^{-}$ Events gelegt; um tote Zellen auszuschließen, wurde eine Region auf 7-AAD negative Events gelegt, da sich tote Zellen durch 7-AAD anfärben lassen. Die Events, die auf die Expression der in Tabelle 5 aufgelisteten Oberflächenantigene hin untersucht wurden, waren somit $CD45^{-}7-AAD^{-}$. Das genaue Vorgehen ist in Abbildung 5 (siehe Ergebnisteil Punkt 3.3.1) nochmals detailliert dargestellt. Die Quantifizierung der Expression der oben genannten Oberflächenantigene fand dabei analog dem Vorgehen unter 2.2.3.2 mit Hilfe von Dot-Plots statt. Auch hier wurde dazu jeweils eine Isotypenkontrolle mit IgG1-Isotypen-Kontroll-Antikörpern angefertigt.

2.3.3 MSC-Kulturen aus Vollblut

Insgesamt sechs MSC-Kulturen wurden aus PBMCs aus dem Blut angefertigt, das aus den Blutentnahmen vor bzw. nach Belastung sowohl von gesunden Kontroll-Probanden als auch von Patienten mit allergischem Asthma stammte.

Nachdem der Zellsuspension, die die PBMCs aus dem Blut vor bzw. nach Belastung enthielt, für die FACS-Analysen zur genaueren Charakterisierung der Progenitorzellpopulationen 2×10^6 Zellen entnommen worden waren (siehe 2.2.3.2), wurde die restliche Zellsuspension, die sich noch im 50 ml Falcon-Röhrchen befand bei Raumtemperatur und 400 g, Bremse 9 für 10 min abzentrifugiert. Bei drei Versuchen wurde dann analog dem Vorgehen bei den Kulturversuchen mit Knochenmarkszellen (siehe 2.3.2) vorgegangen: Der Überstand wurde entnommen, verworfen und das Zellpellet mit den PBMCs – abhängig von der vorher bestimmten Anzahl – in der entsprechenden Menge PL-MS-Gro aufsuspendiert, sodass die mittlere Zellkonzentration in diesem $6,8 \times 10^5$ Zellen/ml betrug. Alle folgenden Schritte zur Kultivierung und die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Zellen wurden ebenfalls dem Vorgehen unter 2.3.2 entsprechend durchgeführt.

Bei drei der MSC-Kulturen aus PBMCs wurde etwas von der oben beschriebenen Methodik abgewichen. Es erfolgte bei diesen Versuchen noch vor dem Ansetzen der jeweiligen Zellkultur eine Selektion $CD271^+$ Zellen aus der Zellsuspension mittels magnetischer Zellseparation (Magnetic Activated Cell Sorting; MACS), um die kritische Zelldichte zu erhöhen. Nach der MACS-Separation wurde die mit $CD271^+$ Zellen angereicherte Zellsuspension abzentrifugiert, das Zellpellet in 200 μ l PL-MS-Gro suspendiert und in ein well einer 96-well-Zellkulturplatte mit U-Boden gegeben. Alle weiteren folgenden Schritte (Mediumswechsel alle drei Tage, durchflusszytometrische Untersuchungen) entsprachen auch hier dem Vorgehen unter 2.2.3.2.

Alle sechs Ansätze wurden über einen Zeitraum zwischen 21 und 62 Tagen kultiviert.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Programme Microsoft Office Excel 2007 sowie PASW Statistics SPSS 18. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen wurde mittels CellQuestPro, Version 5.2.1 durchgeführt.

Um das Probandenkollektiv zu beschreiben, wurden für die anthropometrischen Daten, die körperliche Aktivität, die Werte aus den Lungenfunktionsuntersuchungen und der Spiroergometrie sowie die Laborwerte jeweils der Median und der Range (Bereich zwischen Minimal und Maximalwert) angegeben. Die spiroergometrisch gewonnenen Daten für die maximale Wattleistung und die maximale Sauerstoffaufnahme wurden nach Godfrey (81) und Orenstein (85) in Prozent des Vorhersagewertes (%pred) ausgedrückt. Um Unterschiede zwischen der EG und der KG hinsichtlich dieser Daten festzustellen, wurde aufgrund der geringen Größe der Stichprobe ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test gerechnet.

Die jeweils aus dem Blut vor und nach Belastung mittels FACS-Analyse ermittelten Werte bezüglich der relativen Häufigkeiten von CD34⁺ Progenitorzellen, wurden durch Multiplikation mit der im entsprechenden Blutbild festgestellten Leukozytenzahl/ μ l in absolute Werte (Zellen/ μ l) umgerechnet.

Die ebenfalls mittels FACS-Analyse ermittelten Prozentwerte MSC entsprechen jeweils dem prozentualen Anteil von CD45⁻SSC^{low}-gegateten Events an den Gesamtereignissen. Diese Werte wurden aus Vollblut ermittelt. Die MSC-Subpopulationen entsprechen jeweils dem Anteil in Prozent von für den entsprechenden Marker positiven Events an den Gesamtereignissen im CD45⁻CD235a⁻SSC^{low} Gate. Diese Werte wurden aus dem durch die Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Material bestimmt.

Änderungen der Zellzahlen von Leukozyten, Neutrophilen, Lymphozyten und Eosinophilen in den Blutbildern vor und nach dem Ausdauerleistungstest wurden für die EG, KG und GG durch Subtraktion der jeweiligen Zellzahl vor der Belastung von der entsprechenden Zellzahl nach der Belastung errechnet. Auf die gleiche Art und Weise wurden Änderungen der Zahlen für CD34⁺ und mesenchymale Progenitorzellen inklusive derer Subklassen berechnet.

Die so bestimmten Änderungen dieser oben genannten Zellzahlen (Blutbilder und Progenitorzellen) in den jeweiligen Gruppen wurden mittels nicht-parametrischer Wilcoxon-Tests auf deren Signifikanz hin analysiert. Um möglicherweise bestehende Unterschiede zwischen den Gruppen bzgl. dieser Zellzahländerungen feststellen zu können, wurde mit den berechneten Zellzahländerungen außerdem ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

An der Studie nahmen insgesamt 19 junge Erwachsene teil. Die EG umfasste sieben Patienten (fünf männlich, zwei weiblich; n=7) mit allergischem Asthma bronchiale gegen *Dermatophagoides pteronyssinus*. Für die KG wurden ursprünglich insgesamt 12 Probanden rekrutiert. Jedoch mussten im Nachhinein vier dieser Probanden aus der KG ausgeschlossen werden, da bei zwei weiblichen und einem männlichen Probanden, trotz fehlender Allergiesymptome im Alltag, im Blut anhand des spezifischen IgEs eine Sensibilisierung gegen *Dermatophagoides pteronyssinus* festgestellt wurde. Weiterhin ergaben sich bei einer Probandin fehlerhafte Blutbilder. Somit umfasste die KG schließlich acht gesunde Probanden (sechs männlich, zwei weiblich; n=8). Alle Probanden erreichten im Ausdauerleistungstest einen respiratorischen Quotienten $\geq 1,05$, waren somit maximal körperlich ausbelastet und konnten damit in die Auswertungen einbezogen werden.

3.1. Charakteristika des Probandenkollektivs und Differenzialblutbilder

Die Charakteristika des Probandenkollektivs sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die Patienten der EG wiesen dabei gegenüber der KG in ihrem Blut signifikant höhere Werte bzgl. des Gesamt-IgE, als auch des spezifischen IgE gegen Antigene von *Dermatophagoides pteronyssinus* auf. Die Unterschiede für das spezifische IgE waren dabei sogar hoch signifikant.

Tabelle 6 - Charakteristika des Probandenkollektivs (die einzelnen Werte sind jeweils als Median (Range) bzw. die Signifikanzen als p-Wert angegeben)

| | EG | KG | Signifikanzniveau bzgl. Unterschieden zwischen EG und KG (p-Wert) |
|--|--------------------|---------------------|---|
| Alter (Jahre) | 24 (23-27) | 25,5 (22-31) | ,232 ^{n.s.} |
| Größe (cm) | 185 (165-187) | 184 (166-199) | ,536 ^{n.s.} |
| Gewicht (kg) | 73 (58-88) | 83,5 (56-102) | ,397 ^{n.s.} |
| Körperfettanteil (%) | 19,0 (13,7-26,5) | 18,9 (8,7-26,6) | ,955 ^{n.s.} |
| LBM (kg) | 59,3 (42,6-75,9) | 70,8 (41,1-77,6) | ,463 ^{n.s.} |
| körperliche Aktivität (Summe anstrengende + sehr anstrengende Tätigkeiten in min./Woche) | 480 (30-1740) | 270 (180-1020) | ,867 ^{n.s.} |
| FEV1 vor Bronchospasmolyse (%pred) | 103,7 (90,9-119,8) | 114,9 (87,2-125,5) | ,536 ^{n.s.} |
| FEV1 nach Bronchospasmolyse (%pred) | 105,8 (96,2-125,7) | 116,7 (90,7-132,4) | ,397 ^{n.s.} |
| Änderung des FEV1 nach Bronchospasmolyse (%pred) | 4,3 (0,0-8,1) | 2,8 (0,4-12,8) | ,867 ^{n.s.} |
| Änderung des FEV1 nach Bronchospasmolyse (ml) | 180 (0-400) | 130 (20-460) | ,867 ^{n.s.} |
| FEV1/VC (%pred) | 76,6 (74,0-90,4) | 80,8 (62,9-91,8) | ,867 ^{n.s.} |
| FVC (%pred) | 107,7 (95,2-119,1) | 116,5 (103,2-125,1) | ,094 ^{n.s.} |
| RV/TLC (%) | 25,2 (18,4-26,2) | 21,0 (7,1-28,1) | ,181 ^{n.s.} |
| Reff (% pred) | 53,6 (26,8-65,8) | 49,2 (14,5-76,3) | ,950 ^{n.s.} |
| Wmax (%pred) | 129 (108-171) | 129 (102-147) | ,613 ^{n.s.} |
| VO ₂ peak (%pred) | 104 (91-114) | 94 (77-117) | ,189 ^{n.s.} |
| max. Herzfrequenz (1/min) | 189 (178-199) | 183 (169-200) | ,189 ^{n.s.} |
| RQ bei max. Belastung | 1,29 (1,20-1,41) | 1,27 (1,15-1,31) | ,336 ^{n.s.} |
| IgE gesamt (kU/l) | 228,0 (48,5-1081) | 52,5 (19,7-100) | ,021 * |
| IgE spezifisch (kUA/l) | 12,4 (4,99-100) | 0,04 (0,02-0,18) | ,000 *** |

| | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| IgG (U/l) | 1001 (804-1173) | 847 (735-1286) | ,181 ^{n.s.} |
| CRP (mg/dl) | 0,03 (0,01-0,21) | 0,11 (0,01-0,25) | ,397 ^{n.s.} |
| BSG (Einstundenwert in mm) | 5 (0-10) | 5 (0-10) | ,779 ^{n.s.} |
| Laktat nach Belastung (mmol/l) | 9,6 (8,3-12,8) | 8,9 (2,7-14,2) | ,397 ^{n.s.} |
| Änderung des Gesamteiweiß nach Belastung (g/dl) | 0,8 (0,4-1,0) | 0,7 (-0,1 bis 1,1) | ,491 ^{n.s.} |
| Veränderung des Plasmavolumen nach Belastung (%) | -8,6 (-11,7 bis -2,3) | -8,9 (-19,1 bis -4,2) | ,613 ^{n.s.} |

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

Im Hinblick auf die anthropometrischen Daten, die körperliche Alltagsaktivität, die Werte aus Lungenfunktion, Spiroergometrie und die übrigen in Tabelle 6 dargestellten Blutwerte zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen der EG und der KG.

Die Differenzialblutbilder vor der Spiroergometrie sind in Tabelle 7 dargestellt. Bei den Patienten der EG fand sich dabei eine signifikant höhere Anzahl an Eosinophilen, sowohl im Bezug auf die absolute Anzahl pro μl als auch die relative Anzahl in % der Gesamtleukozyten. Für die übrigen Zellzahlen im Differenzialblutbild zeigten sich vor der Spiroergometrie keine signifikanten Unterschiede zwischen EG und KG.

Tabelle 7 - Differenzialblutbilder vor der Spiroergometrie (Darstellung der Werte als Median (Range) und Signifikanzen als p-Wert)

| | EG | KG | Signifikanzniveau bzgl. Unterschieden zwischen EG und KG (p-Wert) |
|----------------------|------------------|------------------|---|
| Leukozyten/ μ l | 5900 (3320-7800) | 6130 (4450-8130) | ,536 ^{n.s.} |
| Neutrophile (%) | 51,4 (40,1-62,2) | 57,3 (41,6-71,1) | ,094 ^{n.s.} |
| Neutrophile/ μ l | 3128 (1706-3937) | 3467 (2026-5660) | ,281 ^{n.s.} |
| Eosinophile (%) | 4,4 (1,7-6,0) | 1,8 (1,1-3,3) | ,006 ** |
| Eosinophile/ μ l | 276 (100-351) | 127 (53-161) | ,029 * |
| Lymphozyten (%) | 35,9 (26,8-49,0) | 31,3 (24,1-45,6) | ,094 ^{n.s.} |
| Lymphozyten/ μ l | 1870 (1192-3822) | 1934 (1362-2221) | 1,000 ^{n.s.} |

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

Betrachtet man die in der nachfolgenden Tabelle 8 aufgeführten Blutbildwerte nach der Spiroergometrie, so zeigten sich bzgl. der nach der Belastung gemessenen Zellzahlen (sowohl Absolutzellzahlen als auch relative Zellverteilung) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es konnte jedoch in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme der Leukozytenanzahl/ μ l beobachtet werden. Diese betrug in der EG ca. 40% und in der KG ca. 50% (mediane Zellzahländerung jeweils bezogen auf den medianen Ausgangswert).

Auch bei den Lymphozyten und den Neutrophilen zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Änderung nach der Belastung. So stiegen in der EG und in der KG die Absolutzellzahlen der Lymphozyten und der Neutrophilen an. Prozentuell nahm in beiden Gruppen der Anteil der Neutrophilen am Differenzialblutbild jedoch ab, wohingegen der prozentuale Anteil der Lymphozyten zunahm. Bei den Eosinophilen Granulozyten war in der EG eine signifikante Abnahme des relativen Anteils an der Gesamtleukozytenzahl zu beobachten, jedoch keine signifikante Änderung der Zellzahl/ μ l. In der KG verhielt es sich so, dass sich der prozentuale Anteil der Eosinophilen an der Leukozytenzahl zwar auch leicht verringerte (betrachtet man den Median nach der Belastung verglichen mit

dem Median vorher), diese Änderung jedoch nicht signifikant war. Dafür zeigte sich in dieser Gruppe aber ein signifikanter Anstieg bezogen auf die Eosinophilenanzahl/ μl . Im Gruppenvergleich zwischen EG und KG zeigten sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Veränderungen aller Zellzahlen nach der Belastung (Leukozyten, Neutrophile, Eosinophile, Lymphozyten).

Tabelle 8 - Differenzialblutbilder 10 Minuten nach Ende der Spiroergometrie (Werte für die Zellzahlen als Median (Range) und Signifikanzniveaus als p-Wert angegeben, s.o.)

| | EG | KG | Signifikanzniveau bzgl. Zellzahlän- derung innerhalb EG | Signifikanzniveau bzgl. Zellzahlän- derung innerhalb KG | Signifikanzniveau bzgl. Unterschie- den zwischen EG und KG |
|--|--------------------|-------------------|--|--|--|
| Leukozyten/ μ l | 7880 (5400-9200) | 9720 (5220-12060) | ,018 * | ,012 * | ,336 ^{n.s.} |
| Änderung der Leu- kozyten/ μ l zur Ru- hemessung | + 2300 (1400-3040) | + 3155 (350-4510) | | | ,281 ^{n.s.} |
| Neutrophile (%) | 44,2 (31,0-62,5) | 54,9 (43,9-66,6) | ,028 * | ,036 * | ,121 ^{n.s.} |
| Neutrophile/ μ l | 3388 (2387-5125) | 4988 (2292-7260) | ,028 * | ,012 * | ,121 ^{n.s.} |
| Änderung der Neu- trophilen/ μ l zur Ruhemessung | + 720 (-276-1514) | + 1378 (200-2028) | | | ,152 ^{n.s.} |
| Eosinophile (%) | 3,5 (1,5-5,2) | 1,6 (1,1-5,0) | ,018 * | ,734 ^{n.s.} | ,054 ^{n.s.} |
| Eosinophile/ μ l | 274 (123-410) | 163 (74-261) | ,128 ^{n.s.} | ,012 * | ,072 ^{n.s.} |
| Änderung der Eo- sinophilen/ μ l zur Ruhemessung | + 23 (-38-134) | + 46 (19-100) | | | ,336 ^{n.s.} |
| Lymphozyten (%) | 43,2 (30,5-58,7) | 34,9 (28,4-40,8) | ,027 * | ,05 * | ,094 ^{n.s.} |
| Lymphozyten/ μ l | 3326 (2365-5400) | 3261 (2130-3877) | ,018 * | ,017 * | ,955 ^{n.s.} |
| Änderung der Lymphozyten/ μ l zur Ruhemessung | + 1173 (631-1633) | + 1331 (-91-2010) | | | ,779 ^{n.s.} |

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

3.2 Progenitorzellen

3.2.1 CD34⁺ Progenitorzellen

Die Werte für die CD34⁺ Progenitorzellen inkl. ihrer Subgruppen sind in Tabelle 9 dargestellt. Bezüglich der absoluten Zellzahl an CD34⁺ Progenitorzellen zeigten sich in Ruhe und nach der Belastung keine signifikanten Unterschiede zwischen der EG und der KG. Jedoch zeigte sich in der Subgruppe der CD34⁺CD31⁺ Zellen bei den gesunden Probanden ein signifikant höherer Ruhewert im Vergleich zu den Teilnehmern mit allergischem Asthma bronchiale ($p=0,035$). Die übrigen Ruhewerte der einzelnen Subgruppen unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen aber nicht. Dies galt ebenfalls für die Zellzahlen der Subgruppen nach der Belastung.

Tabelle 9 - CD34⁺ Progenitorzellen vor und nach der Belastung bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontroll-Probanden (KG) (Darstellung der Werte als Median (Range))

| | EG | | KG | |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Ruhe | Belastung | Ruhe | Belastung |
| CD34 ⁺ /µl | 1,99 (0,24-4,88) | 2,76 (1,17-4,63) | 2,17 (0,80-3,25) | 3,10 (0,68-12,06) |
| CD34 ⁺ / CD133 ⁺ (% ¹) | 68,38 (48,05-80,82) | 67,44 (53-80,60) | 59,82 (44,44-76,61) | 58,92 (32,70-73,01) |
| CD34 ⁺ /CD38 ⁺ (% ¹) | 94,52 (37,84-96,64) | 89,33 (43,02-100) | 88,68 (48,38-97,68) | 67,68 (35,85-96,32) |
| CD34 ⁺ / VEGFR2 ⁺ (% ¹) | 5,32 (1,85-69,64) | 8,47 (2,08-30,38) | 7,89 (0,00-27,54) | 4,39 (0,00-23,35) |
| CD34 ⁺ /CD31 ⁺ (% ¹) | 94,69 (86,36-96,43) | 95,48 (81,25-98,73) | 97,61 (94,44-99,74) | 96,01 (54,55-100,00) |

¹ % der CD34⁺ Progenitorzellen

Nach der körperlichen Belastung zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg der Anzahl CD34⁺ Progenitorzellen pro µl um ca. 40 %. Dieser war jedoch in beiden Gruppen nicht signifikant (EG: $p=0,237$; KG: $p=0,128$). Dafür zeigte sich in der KG nach Belastung ein signifikanter Abfall der relativen Konzentrationen der CD34⁺/CD38⁺ und der CD34⁺/VEGFR2⁺ Subpopulation (jeweils $p=0,028$). In der EG waren die Veränderungen

in den Subpopulationen nicht signifikant. Trotz der signifikanten Änderungen der beiden beschriebenen Subpopulationen in der KG stellte sich nach Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test heraus, dass die Stärke der Veränderungen – verglich man die EG und die KG miteinander – sowohl bezüglich der Absolutzahl an CD34⁺ Progenitorzellen als auch der relativen Konzentrationen ihrer Subgruppen, nicht signifikant unterschiedlich war.

Um zu überprüfen, ob diese doch recht unterschiedlichen Ergebnisse zwischen EG und KG möglicherweise durch den jeweils sehr kleinen Stichprobenumfang bedingt waren, wurde nochmal ein Wilcoxon-Test mit der Gesamtgruppe gerechnet (alle Teilnehmer der EG, der KG und drei ausgeschlossene Kontrollen mit IgEs, vgl. Methodikteil; n=18). In der GG zeigte sich dann auch ein signifikanter Anstieg der CD34⁺ Progenitorzellen nach der Belastung. Die Veränderungen in den CD34⁺ Subpopulationen stellten sich in der GG als nicht signifikant heraus. Die Werte der GG inkl. der Signifikanzniveaus aus dem Wilcoxon-Test kann man der Tabelle 10 entnehmen.

Tabelle 10 - Anzahl CD34⁺ Progenitorzellen vor und nach der Belastung in der Gesamtgruppe (GG) (Darstellung der Werte als Median (Range))

| | GG | | Signifikanzniveau bzgl. Zellzahländerung |
|--|---------------------|----------------------|--|
| | Ruhe | Belastung | |
| CD34 ⁺ /µl | 2,04 (0,24-4,88) | 2,80 (0,68-12,06) | ,031 * |
| CD34 ⁺ /CD133 ⁺ (% ¹) | 66,86 (44,44-80,95) | 63,36 (32,70-85,25) | ,523 ^{n.s.} |
| CD34 ⁺ /CD38 ⁺ (% ¹) | 93,93 (37,84-98,92) | 89,47 (35,85-100,00) | ,112 ^{n.s.} |
| CD34 ⁺ /VEGFR2 ⁺ (% ¹) | 7,10 (0,00-69,64) | 8,02 (0,00-30,38) | ,463 ^{n.s.} |
| CD34 ⁺ /CD31 ⁺ (% ¹) | 95,50 (72,73-99,74) | 94,62 (54,55-100,00) | ,943 ^{n.s.} |

¹ % der CD34⁺ Progenitorzellen

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

3.2.2 Mesenchymale Progenitorzellen

In Tabelle 11 sind die relativen Häufigkeiten der MSCs abgebildet. Im Hinblick auf die Ruhewerte vor der Spiroergometrie und die Werte danach zeigten sich zwischen der EG und der KG keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 11 - Mesenchymale Progenitorzellen vor und nach der Belastung bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontroll-Probanden (KG) (Darstellung der Werte als Median (Range))

| | EG | | KG | |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Ruhe | Belastung | Ruhe | Belastung |
| MSC (% ¹) | 1,57 (0,43-2,01) | 2,25 (0,65-2,88) | 1,08 (0,33-6,18) | 1,04 (0,34-3,27) |
| CD73 (% ²) | 4,79 (0,25-9,08) | 2,27 (0,10-13,25) | 1,33 (0,00-8,06) | 2,20 (0,00-19,28) |
| CD105 (% ²) | 0,55 (0,08-1,66) | 0,20 (0,01-1,35) | 0,17 (0,00-0,57) | 0,34 (0,01-0,58) |
| CD44 (% ²) | 2,10 (0,12-11,56) | 1,03 (0,02-14,56) | 2,20 (0,51-4,56) | 5,34 (0,14-17,74) |
| CD29 (% ²) | 1,58 (0,09-93,40) | 1,00 (0,01-88,70) | 65,07 (1,40-96,26) | 64,84 (9,31-94,95) |
| CD271 (% ²) | 0,18 (0,00-3,43) | 0,54 (0,08-3,76) | 0,32 (0,00-2,33) | 0,44 (0,00-2,77) |
| MSCA-1 (% ²) | 0,27 (0,00-0,67) | 0,24 (0,00-0,75) | 0,19 (0,00-0,29) | 0,26 (0,12-3,46) |
| CD90 (% ²) | 0,64 (0,08-5,97) | 0,69 (0,11-1,84) | 0,30 (0,00-1,10) | 0,07 (0,00-8,77) |

¹ % der Lymphozyten; ² % der MSC

In der KG hatte die körperliche Maximalbelastung keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl an Events im MSC-Gate und auf die einzelnen Subpopulationen. In der EG zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Einfluss der Belastung auf die Anzahl von Ereignissen im MSC-Gate. In dieser Gruppe kam es nach der Spiroergometrie jedoch zu einer signifikanten Abnahme bezüglich des prozentualen Anteils an CD29⁺ MSCs (p=0,018). Die übrigen Subpopulationen änderten sich aber wie in der KG nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob sich die Belastung auf die beiden Gruppen unterschiedlich stark auswirkte, d.h. ob sich die Veränderungen bezüglich der MSC-Zahlen zwischen den

beiden Gruppen unterschieden, wurden die Differenzen zwischen den Werten nach und den Werten vor der Belastung berechnet und diese mit einem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Hier konnte jedoch gezeigt werden, dass die Belastung auf die MSCs inklusive Subgruppen bei den Asthmatikern und den gesunden Kontrollen keine signifikant unterschiedlichen Auswirkungen hatte. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 12 nochmals detailliert dargestellt.

Tabelle 12 - Vergleich der relativen Zellzahländerungen nach Belastung von MSCs inklusive Subgruppen zwischen Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontrollen (KG); Darstellung der Werte als Median (Range) und Signifikanzen als p-Wert

| | EG | KG | p-Wert |
|----------------------------|------------------------|------------------------|---------------|
| Δ MSC (% ¹) | 0,30 (-0,64 - 2,09) | 0,03 (-2,92 - 0,53) | ,108 n.s. |
| Δ CD73 (% ²) | -2,14 (-6,81 - 6,78) | 2,20 (-1,37 - 13,84) | ,097 n.s. |
| Δ CD105 (% ²) | -0,31 (-0,86 - 0,74) | -0,01 (-0,14 - 0,37) | ,053 n.s. |
| Δ CD44 (% ²) | -0,26 (-11,54 - 12,46) | 3,35 (-1,47 - 13,18) | ,383 n.s. |
| Δ CD29 (% ²) | -1,25 (-16,87 - 0,08) | -1,31 (-31,33 - 36,55) | ,805 n.s. |
| Δ CD271 (% ²) | 0,12 (-2,89 - 3,58) | 0,02 (-1,58 - 1,56) | ,805 n.s. |
| Δ MSCA-1 (% ²) | 0,08 (-0,60 - 0,18) | 0,22 (-0,14 - 3,17) | ,259 n.s. |
| Δ CD90 (% ²) | -0,12 (-5,84 - 0,47) | -0,02 (-0,54 - 8,21) | ,535 n.s. |

¹ % der Lymphozyten; ² % der MSC

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

Analog zum Vorgehen bei den CD34⁺ Progenitorzellen wurden abschließend die Änderungen der MSCs und ihrer Subpopulationen ebenfalls für die Gesamtgruppe analysiert. Hierbei stellten sich die Änderungen als nicht signifikant heraus. (Werte siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 - MSCs: relative Häufigkeiten vor und nach der Belastung in der Gesamtgruppe (GG) (Darstellung der Werte als Median (Range); Signifikanzen als p-Wert)

| | GG | | Signifikanzniveau bzgl. Zellzahländerung |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--|
| | Ruhe | Belastung | |
| MSC (% ¹) | 1,40 (0,33-6,18) | 1,37 (0,32-3,27) | ,948 ^{n.s.} |
| CD73 (% ²) | 3,25 (0,00-12,64) | 2,24 (0,00-42,94) | ,811 ^{n.s.} |
| CD105 (% ²) | 0,51 (0,00-1,90) | 0,35 (0,01-9,15) | ,740 ^{n.s.} |
| CD44 (% ²) | 2,15 (0,12-35,92) | 1,88 (0,02-35,51) | ,372 ^{n.s.} |
| CD29 (% ²) | 69,49 (0,09-96,26) | 59,82 (0,01-95,77) | ,102 ^{n.s.} |
| CD271 (% ²) | 0,32 (0,00-3,43) | 0,63 (0,00-3,76) | ,586 ^{n.s.} |
| MSCA-1 (% ²) | 0,19 (0,00-0,71) | 0,27 (0,00-3,46) | ,156 ^{n.s.} |
| CD90 (% ²) | 0,47 (0,00-5,97) | 0,15 (0,00-8,77) | ,163 ^{n.s.} |

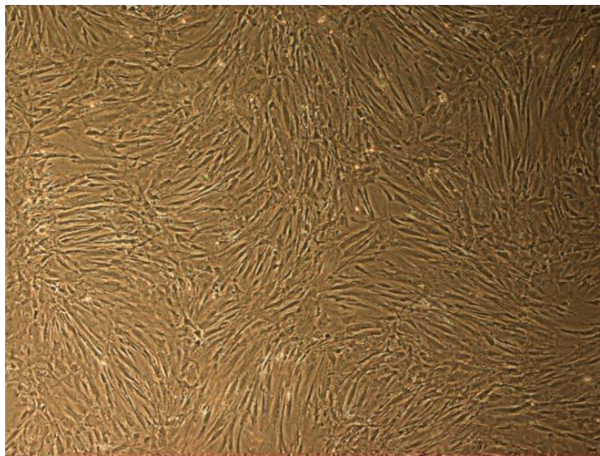
¹ % der Lymphozyten; ² % der MSC

Signifikanzniveau: *** $p \leq 0,001$; ** $0,001 < p \leq 0,01$; * $0,01 < p \leq 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

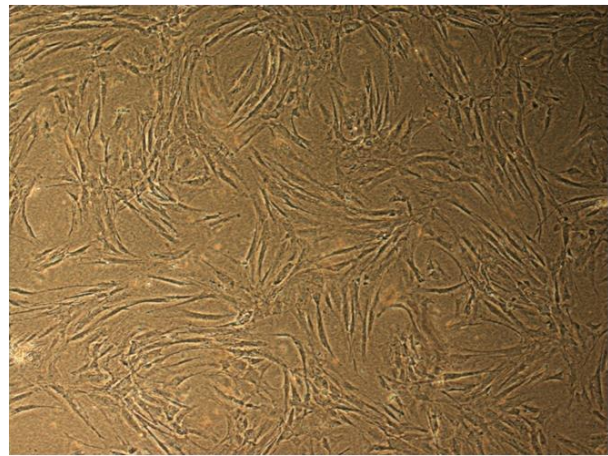
3.3 MSC-Kulturen

3.3.1 MSC-Kulturen aus Knochenmark

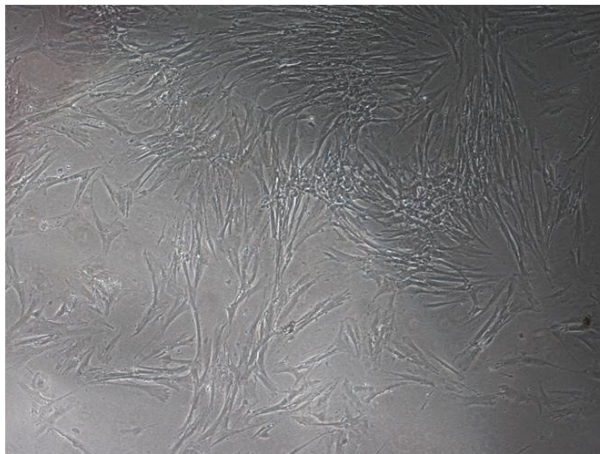
In drei Versuchen wurden mononukleäre Zellen aus Knochenmark isoliert, direkt in PL-MSG-Gro ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Nach durchschnittlich acht Tagen zeigten sich hier unter Standard-Zellkulturbedingungen erste Zellnester adhärenter Zellen. Diese wiesen die für MSC typische längliche, spindelförmige Morphologie auf. Diese spindelförmigen Zellen sind beispielhaft in Abbildung 3 dargestellt.



a



b



c

Abbildung 3: Exemplarische Aufnahmen in-vitro kultivierter MSC aus Knochenmark

- a) Aufnahme in 10x Vergrößerung
- b) Aufnahme in 40x Vergrößerung
- c) Aufnahme in 40x Vergrößerung

Aufgrund der raschen, stetigen Expansion und zunehmender Konfluenz der Zellnester musste bei allen drei Ansätzen nach 11-15 Tagen Kulturzeit die erste Passage erfolgen. Weitere Passagen wurden in der Folgezeit alle drei bis fünf Tage nötig, bis die Kulturen nach einer maximalen Kulturdauer von 30 Tagen abgeerntet und die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenmarkerexpression hin untersucht wurden.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind nachfolgend in Tabelle 14 dargestellt. Im Mittel exprimierten 99,16 % der kultivierten Zellen den für MSCs typischen Oberflächenmarker CD105. Der ebenfalls für MSCs typische Oberflächenmarker CD73 konnte jedoch im Gegensatz dazu nur auf durchschnittlich 4,76 % der kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Weitere Antigene, deren Expression auf den Zellen untersucht wurden, waren CD29, CD44, MSCA-1 und CD271. Diese wurden im Mittel von 83,98 % (CD29), 99,23 % (CD44), 49,35 % (MSCA-1) und 6,16 % (CD271) der Zellen exprimiert.

Tabelle 14 - Expression von Oberflächenmarkern auf Zellen aus MSC-Kulturen aus Knochenmark

| Bezeichnung | Passage Nr. | Kulturdauer zum Messzeitpunkt in Tagen | CD105 (%) | CD73 (%) | CD29 (%) | CD44 (%) | MSCA-1 (%) | CD271 (%) |
|-------------|-------------|--|-----------|----------|----------|----------|------------|-----------|
| Kultur 1 | 2 | 19 | 98,75 | 9,73 | 84,18 | 99,71 | 92,8 | 7,65 |
| | 5 | 30 | 99,92 | 0,63 | 54,25 | 99,95 | 32,76 | 0,24 |
| Kultur 2 | 3 | 23 | 99,67 | 3,5 | 99,04 | 99,19 | 20,2 | 1,99 |
| Kultur 3 | 3 | 30 | 98,29 | 5,16 | 98,43 | 98,08 | 51,64 | 14,76 |

* Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf Ereignissen im MSC-Gate (CD457-AAD) in %

Zur besseren Veranschaulichung sind die Daten aus Tabelle 14 auf der folgenden Seite in Abbildung 4 nochmals grafisch in einem Balkendiagramm dargestellt.

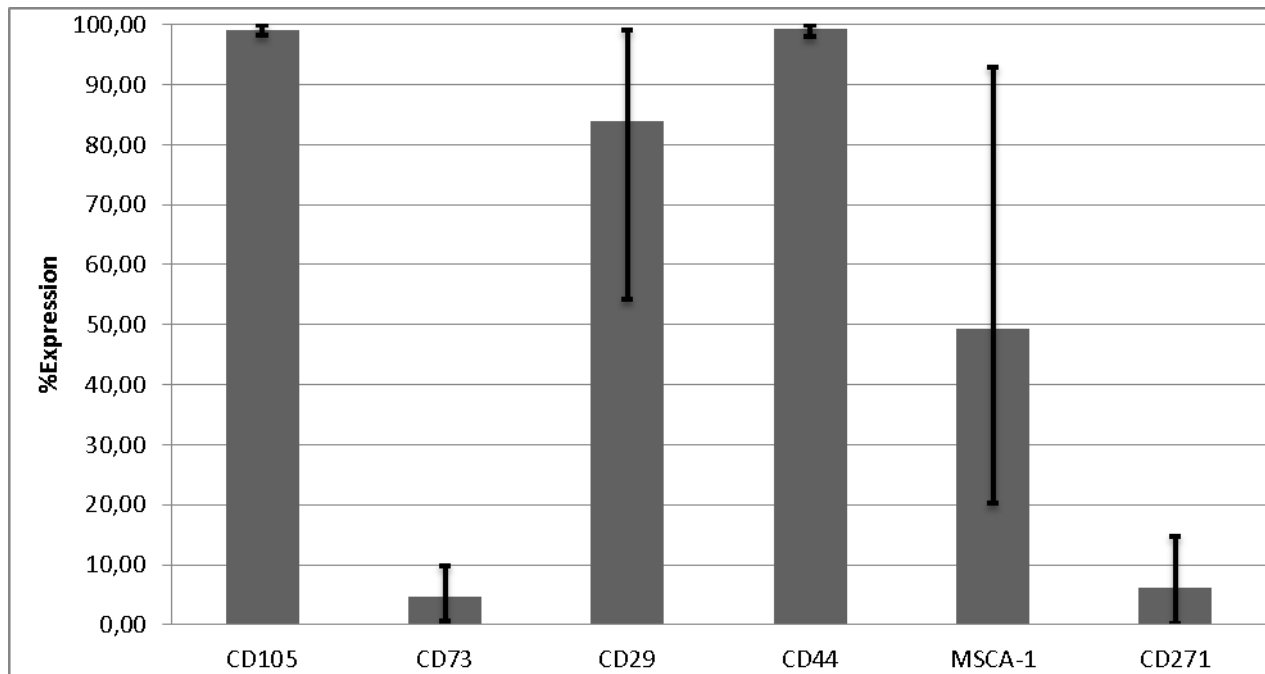


Abbildung 4: Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten MSCs aus Knochenmark. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert (grauer Balken) und die Streuung der gemessenen Werte um den Mittelwert (schwarze Linie).

Abbildung 5 (siehe folgende Seite) stellt anhand einer exemplarischen Zellkultur die Gatingstrategie der durchflusszytometrischen Untersuchungen und die Expression von MSC-Oberflächenantigenen auf den Zellen dieser Kultur dar (das Vorgehen bei den FACS-Analysen gilt dabei für alle Zellkulturversuche aus Knochenmark).

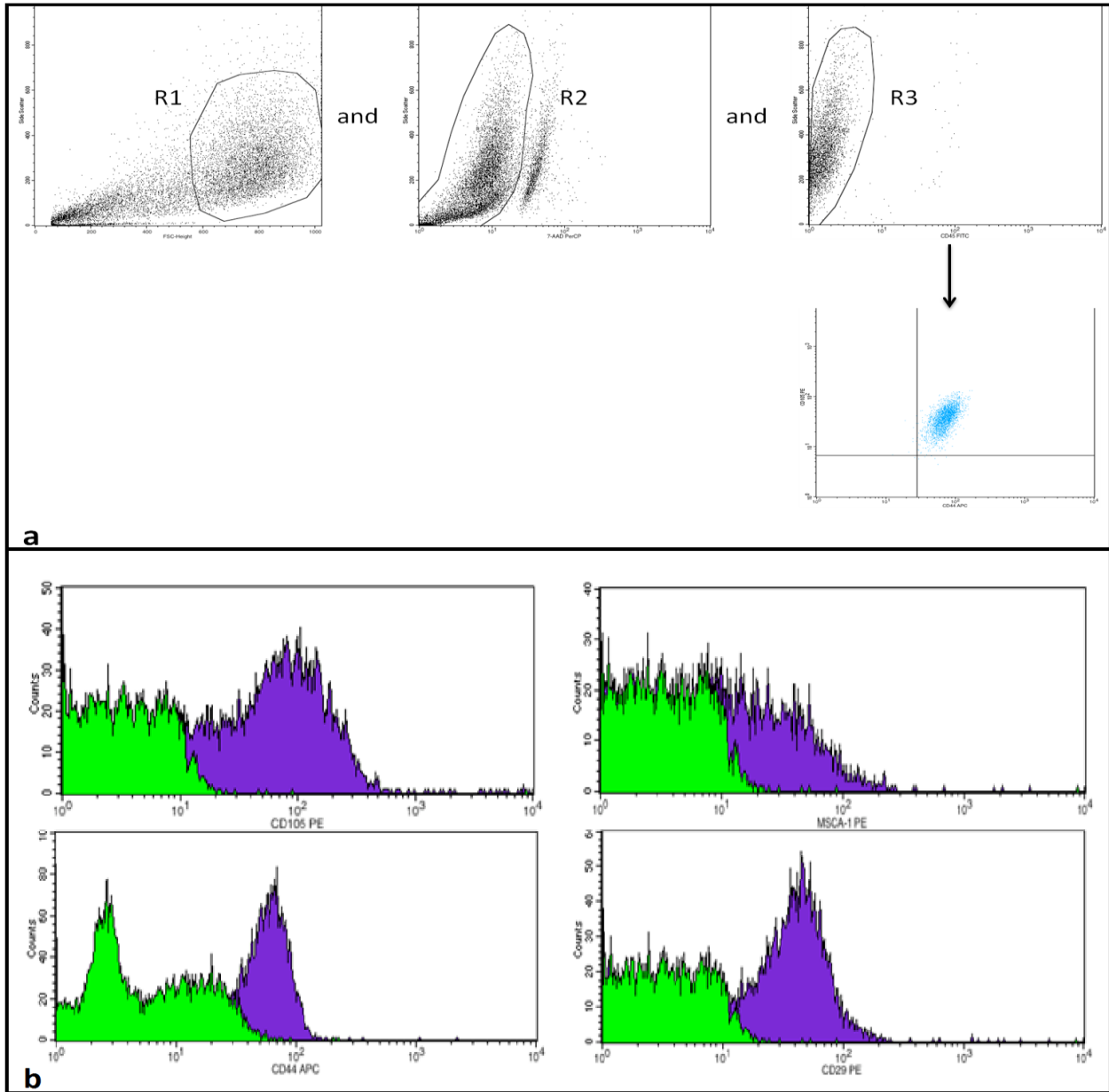


Abbildung 5:

a) Gating Strategie zur Quantifizierung der Antigenexpression in-vitro kultivierter MSCs aus Knochenmark

Die Region R1 (linke Grafik) erfasst die Zellen, die am wahrscheinlichsten vitale MSC sind. Mit der Region R2 (mittlere Grafik) werden 7-AAD negative Events erfasst, sowie mit der Region R3 (rechte Grafik) CD45 negative Events. Durch Kombination dieser 3 Regionen (R1 und R2 und R3) wird die CD45-7-AAD-Zielpopulation definiert und diese Zellen in entsprechenden Dot-Plots auf die Expression von CD-Oberflächenmarkern hin untersucht. Exemplarisch ist hier die Untersuchung auf die Expression von CD105 und CD44 dargestellt.

b) Expression von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten MSCs nach 30 Tagen Kulturzeit

Im Histogramm entspricht die Farbe Lila den Events, die Färbeantikörper gebunden haben und somit das gesuchte Antigen exprimieren, die Farbe Grün entspricht den ungefärbten Events aus der Isotypenkontrolle

3.3.2 MSC-Kulturen aus Vollblut

In sechs Versuchen wurden PBMCs aus Vollblut von Studienteilnehmern isoliert und bei Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert. Bei drei Versuchen erfolgte vor dem Ansetzen der Kultur noch eine Präselektion CD271⁺ Zellen. In allen Versuchsreihen zeigten sich teilweise bereits nach vier Tagen erste adhärenente Zellen. Einige von diesen Zellen wiesen anfangs die für MSC typische längliche und spindelförmige Morphologie auf, der überwiegende Teil der Zellen jedoch wies eine eher abgeflachte, runde, "spiegeleiförmige" Morphologie mit einem zentralen Zellkern auf. Nach durchschnittlich acht Tagen wurden keine weiteren Zellen mehr adhärenent, sodass bis dahin nicht adhärenent gewordene Zellen von den Kulturen herunter gewaschen wurden. Die Zellnester, die sich bis dahin aus adhärenenten Zellen gebildet hatten und die teilweise über die ersten Tage noch eine gewisse Größenzunahme zu verzeichnen hatten, zeigten im weiteren Verlauf jedoch keine nennenswerte Expansion mehr auf. Auch die wenigen Zellen, die zu Beginn des Kulturzeitraumes noch eine MSC-typische Form aufgewiesen hatten, veränderten mit zunehmender Kulturdauer ihr Aussehen dahingehend, dass sie sich bei fehlender Expansion zunehmend abflachten und ebenfalls "Spiegeleiform" annahmen. In Abbildung 6 ist eines dieser Zellnester von möglichen aus peripherem Blut stammenden MSC exemplarisch abgebildet.

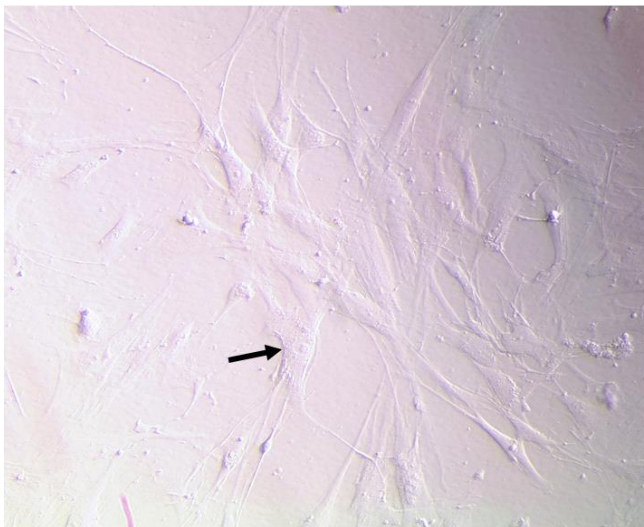


Abbildung 6: Exemplarische Aufnahme (40x Vergrößerung) eines Zellnestes in-vitro kultivierter PBMSC.

Die Zellen weisen überwiegend noch eine spindelförmige Morphologie auf, beginnen sich aber zunehmend „spiegeleiförmig“ abzuflachen (siehe Pfeil).

Aufgrund der fehlenden Expansion wurden in der folgenden Zeit zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils eine oder mehrere der T75 Zellkulturflaschen der einzelnen Ansätze abgeerntet und die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von MSC-typischen Oberflächenantigenen untersucht. Die verbliebenen T75 der einzelnen Ansätze wurden dabei weiter kultiviert, um zu überprüfen welche Auswirkungen eine weitere Zunahme der Kulturdauer auf die in Kultur verbliebenen Zellen hatte. Dabei war unter dem Mikroskop zu beobachten, dass die Zellen – je länger sie in Kultur verblieben – zunehmend apoptotisch wurden und sich schließlich teilweise ganz auflösten. Daher wurden die einzelnen Versuche nach 21 bis 62 Tagen Kulturdauer beendet und die wenigen verbliebenen Zellen abschließend durchflusszytometrisch auf die Expression von MSC-Oberflächenmarkern hin analysiert. Da bei allen Ansätzen am Ende nur noch wenige, teils sogar nur noch vereinzelt flache, spiegeleiförmige Zellen übrig geblieben waren, konnten bei diesen Messungen aufgrund der geringen Zellzahl jedoch nicht mehr alle Antikörper-Färbungen durchgeführt werden und die Zellen somit nur noch auf die Expression einzelner weniger Oberflächenantigene hin untersucht werden. Bei der Analyse der drei Kulturansätze, bei denen mit Hilfe von MACS-Separation nur 271^+ Zellen ausgesät worden waren, zeigte aufgrund der niedrigen Zellzahl jeweils sogar nur eine Messung verwertbare Ergebnisse. Auch bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen, die im Zeitverlauf der drei Ansätze ohne vorherige MACS-Separation zwischenzeitlich durchgeführt worden waren, konnten aufgrund der niedrigen Zellzahl in der überwiegenden Anzahl der Fälle nicht alle Färbungen bzw. Messungen erfolgreich durchgeführt werden. Eine der Kulturen lieferte sogar überhaupt keine auswertbaren Ergebnisse. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der oben genannten durchflusszytometrischen Messungen nochmals detailliert aufgeführt und in Abbildung 7 als Balkendiagramm grafisch dargestellt (siehe folgende Seite). Wie man an der Tabelle indirekt erkennen kann, erzielten die Versuche ohne vorherige MACS-Separation insgesamt höhere Zellzahlen, sodass hier pro Ansatz mehr Färbungen und Messungen erfolgreich gelangen, als bei den Zellen aus $CD271^+$ Kulturen. Für diese gelang pro Ansatz jeweils nur eine Messung. Dafür zeigten hier die wenigen gemessenen Events im MSC-Gate aber eine höhere Expressionsrate bezüglich der untersuchten Oberflächenantigenkombination.

Tabelle 15 - Expression von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblut-MSK-Kulturen

| Bezeichnung | Kulturdauer zum Messzeitpunkt in Tagen | CD105 (%) [*] | CD73 (%) [*] | CD29 (%) [*] | CD44 (%) [*] | MSCA-1 (%) [*] | CD271 (%) [*] |
|---------------------------------------|--|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Kultur 1 aus PB | 17 | 8,92 | 0,29 | 9,56 | 0 | 6,86 | 0 |
| | 23 | 67,02 | 1,86 | - | - | 0 | 0,09 |
| | 41 | 3,49 | - | - | 98,46 | 0 | 0,33 |
| Kultur 2 aus PB | 23 | - | - | - | - | 0 | 0,23 |
| | 33 | 19,47 | - | - | 92,92 | 0 | 0 |
| | 62 | 0,2 | - | - | 96,39 | 0 | 14,29 |
| Kultur 4 aus PB (CD271 ⁺) | 34 | 100 | - | - | - | - | 96 |
| Kultur 5 aus PB (CD271 ⁺) | 27 | - | - | - | - | 99,51 | 99,51 |
| Kultur 6 aus PB (CD271 ⁺) | 22 | - | - | - | - | 95,09 | 75,9 |

* Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf Ereignissen im MSC-Gate (CD45⁺7-AAD⁻) in %

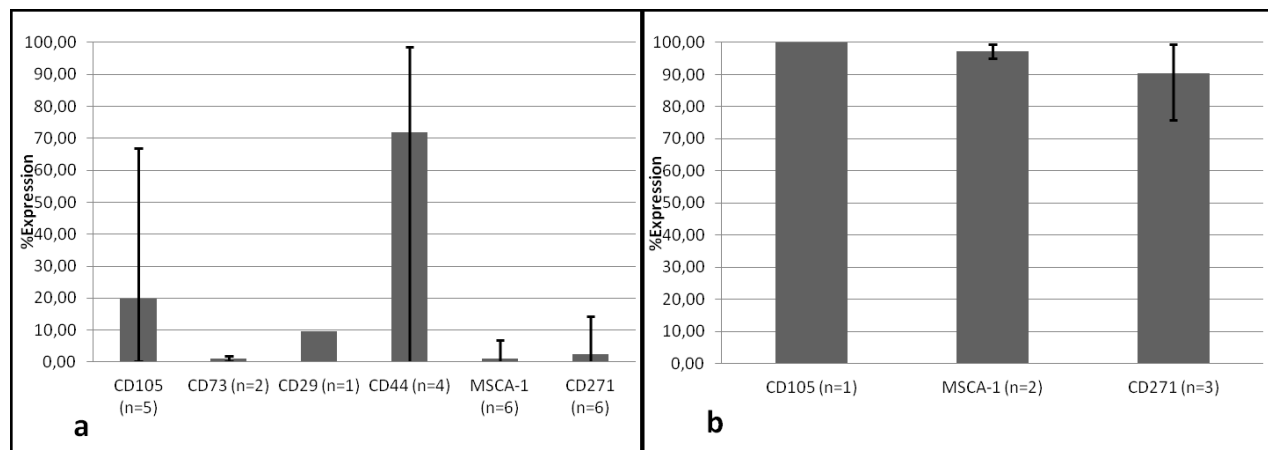


Abbildung 7: Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten PBMSC. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert (grauer Balken) und die Streuung der gemessenen Werte um den Mittelwert (schwarze Linie). n = Anzahl der Kulturversuche, bei denen eine Messung bzgl. der jeweiligen Markerexpression erfolgreich durchgeführt werden konnte. **a)** nicht vorselektierte PBMSC **b)** CD271⁺ Zellen

Sieht man sich die Tabelle 15 und die Abbildung 7 an, so ist zu erkennen, dass die Messungen für Zellen aus Vollblut-Kulturen (ohne vorherige Selektion) im Vergleich zu den MSC aus Knochenmark eine wesentlich geringer ausgeprägte Expressionsrate des typischerweise auf MSC exprimierten Oberflächenantigens CD105 (KM Ø 99,16% vs. PB Ø 19,82%) anzeigten. Auch bezüglich der MSC-Marker CD29 (KM Ø 83,98% vs. PB Ø 9,56%) und MSCA-1 (KM Ø 49,35% vs. PB Ø 1,14%) zeigten die Zellen aus Vollblutkulturen (unselektiert) eine viel geringere Expression. Hinsichtlich der Marker CD73 und CD271 ergaben sich bei beiden oben genannten Versuchsreihen ähnlich niedrige Expressionsraten (CD 73: KM Ø 4,76% vs. PB Ø 1,08%; CD271: KM Ø 6,16% vs. PB Ø 2,49%). Bezogen auf CD44 wiesen beide hohe Expressionsraten auf (KM Ø 99,23% vs. PB Ø 71,94%).

Abbildung 8 auf der folgenden Seite stellt nochmals exemplarisch, anhand einer Zellkultur aus unselektierten PBMCs, das Vorgehen bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen und die Expression von CD-Oberflächenantigenen auf den Zellen dieser Kultur dar (das Vorgehen bei den FACS-Analysen gilt dabei für alle Zellkulturversuche aus PB). Anhand der niedrigen Count-Zahlen in den Histogrammen für markerpositive Events (lila, siehe Abbildungsbeschreibung) kann man die niedrigen Zahlen von PBMSC, repräsentiert durch die Anzahl von Events im MSC-Gate, in den Zellkulturen aus Vollblut gut nachvollziehen.

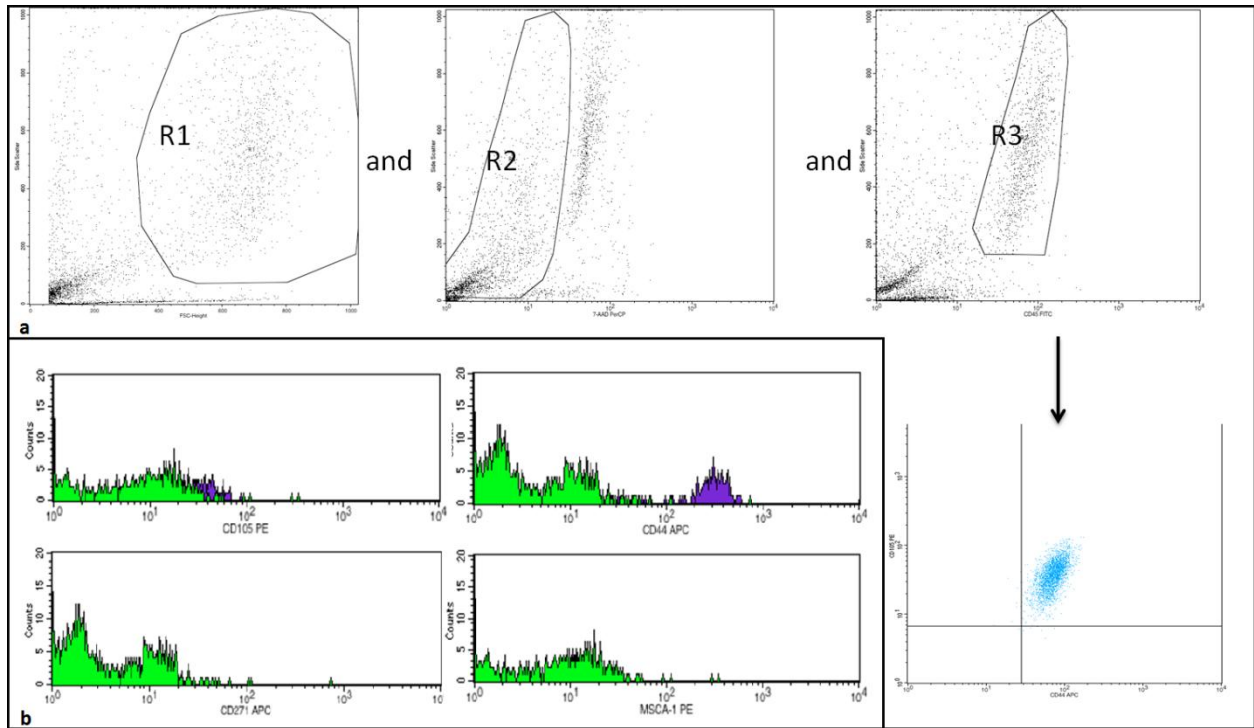


Abbildung 8:

a) Gating Strategie zur Quantifizierung der Antigenexpression in-vitro kultivierter PBMSC

Die Region R1 (linke Grafik) erfasst die Zellen, die am wahrscheinlichsten vitale MSC sind. Mit der Region R2 (mittlere Grafik) werden 7-AAD negative Events erfasst, sowie mit der Region R3 (rechte Grafik) CD45 negative Events. Durch Kombination dieser 3 Regionen (R1 und R2 und R3) wird die CD45⁻7-AAD⁻-Zielpopulation definiert und diese Zellen in entsprechenden Dot-Plots auf die Expression von CD-Oberflächenmarkern hin untersucht. Exemplarisch ist hier die Untersuchung auf die Expression von CD105 und CD44 dargestellt.

b) Expression von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten PBMSC nach 33 Tagen Kulturzeit

Im Histogramm entspricht die Farbe Lila den Events, die Färbeantikörper gebunden haben und somit das gesuchte Antigen exprimieren, die Farbe Grün entspricht den ungefärbten Events aus der Isotypenkontrolle

4 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob eine körperliche Maximalbelastung bei Patienten mit einem allergischen Asthma bronchiale und bei gesunden Probanden einen Einfluss auf die Anzahl zirkulierender CD34-positiver und mesenchymaler Progenitorzellen hat. Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich MSCs auch aus Vollblut isolieren und in-vitro kultivieren lassen.

4.1 Beurteilung der Charakteristika des Probandenkollektivs und der Blutwerte inklusive Differenzialblutbild

Die Werte bezüglich körperlicher Aktivität im Alltag, die Ergebnisse der Lungenfunktionsuntersuchungen und die körperliche Leistungsfähigkeit (siehe Ergebnisse der Spiroergometrien) unterschieden sich zwischen der Gruppe der Patienten mit allergischem Asthma bronchiale und den gesunden Kontrollen nicht signifikant. Betrachtet man die Ergebnisse der Spiroergometrie, in der neben der maximalen Leistung auch die maximale Sauerstoffaufnahme und der respiratorische Quotient zur Messung des Grads der körperlichen Belastung herangezogen wurden und die Laktatwerte im Blut nach der Spiroergometrie, so kann davon ausgegangen werden, dass alle Studienteilnehmer dabei am Ende maximal ausbelastet waren. Auch wenn Studien gezeigt haben, dass Asthmatiker weniger leistungsfähig und im Alltag weniger körperlich aktiv sind sowie schlechtere Lungenfunktionswerte aufwiesen, so gilt dies doch nur für Patienten mit einem unkontrollierten Asthma (5-7). Dass die Studienteilnehmer alle an einem kontrollierten, saisonalen allergischen Asthma litten, könnte demnach die Tatsache erklären, dass sich bezüglich der oben genannten Werte keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen ließen.

Ein deutlicher Unterschied zwischen der EG und der KG ließ sich jedoch für die aus dem Blut vor der Belastung bestimmten Werte für das Gesamt-IgE und das spezifische IgE feststellen. Diese beiden Werte waren in der EG signifikant erhöht. Für das spezifische IgE gegen *Dermaphagoides pteronyssinus* wiesen die Patienten mit allergischem Asthma bronchiale dabei erwartungsgemäß hohe Werte auf, die einer CAP-Klasse von ≥ 3 entsprachen und die in Zusammenschau mit der Anamnese eindeutig mit dem Vorliegen einer Sensibilisierung gegen *Dermaphagoides pteronyssinus* in Einklang zu

bringen sind. Dagegen wiesen die gesunden Probanden der KG allesamt Werte auf, die einer CAP-Klasse von 0 entsprachen (die Probanden somit also nicht gegen Hausstaubmilben sensibilisiert waren) (86). Dass drei eigentlich für die KG rekrutierte Probanden aufgrund positiver Testergebnisse für das spezifische IgE im Nachhinein aus der Studie ausgeschlossen werden mussten, ist der Tatsache geschuldet, dass manchmal auch trotz fehlender klinischer Symptome in der Anamnese im Blut erhöhte Werte für spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden können, deren klinische Relevanz vor diesem Hintergrund jedoch sehr fraglich ist (87). Im Nachhinein betrachtet wäre es hinsichtlich dessen daher sicherlich sinnvoll gewesen, mögliche Kontrollprobanden vor Aufnahme in die Studie auf das Vorliegen von spezifischen IgEs gegen *Dermatophagoides pteronyssinus* hin zu screenen.

Die höhere Anzahl bzw. der höhere relative Anteil an Eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild, die vor der Belastung im Blut der Patienten der EG gemessen werden konnten, ist ebenfalls mit der Diagnose allergisches Asthma bronchiale in Einklang zu bringen. Eosinophile Granulozyten sind wesentlich an den Vorgängen, die der Pathogenese eines allergischen Asthmas zugrunde liegen, beteiligt und sind bei Asthmatikern – im Vergleich mit gesunden Probanden – daher charakteristischerweise in erhöhter Anzahl im Blut nachweisbar (88, 89).

Dass in der vorliegenden Studie sowohl für die EG als auch die KG eine signifikante Zunahme der Leukozytenanzahl im Blut nach der Belastung gezeigt werden konnte, ist mit den Ergebnissen vieler anderer Studien in Einklang zu bringen. Als Beispiel sei hier das Review von Walsh et al. (90) genannt. Der Anstieg der Leukozyten unterschied sich im Gruppenvergleich jedoch nicht signifikant. Dies deckt sich z. B. mit den Ergebnissen der Arbeit von Schwindt et al. (91). Auch hier kam es sowohl in der Gruppe der Asthmatiker als auch in der Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl, wobei der Anstieg in der Gruppe der Asthmatiker nicht signifikant stärker war als in der Kontrollgruppe.

Da es nach einer maximalen körperlichen Belastung zu einer Hämokonzentration durch Verminderung des Plasmavolumens um ca. 10 % kommt (92), wurde diese Plasmavolumenänderung auch in der vorliegenden Studie berechnet, um die Änderung der Zell-

zahlen vor und nach dem Ausdauerleistungstest besser interpretieren zu können. Es kam in vorliegender Studie in beiden untersuchten Gruppen zu einer medianen Verminderung der Plasmavolumens von ca. 9 %, was sich mit den Ergebnissen der oben genannten Studie nahezu deckt. Im Gegensatz dazu lag der hier registrierte Anstieg der Leukozytenzahl jedoch bei ca. 40 % für die EG und ca. 50 % für die KG sowie der Anstieg der CD34⁺ Progenitorzellen für beide Gruppen bei ca. 40%, was durch die oben genannte Abnahme des Plasmavolumens sicher nicht hinreichend erklärt werden kann.

4.2 Effekte körperlicher Belastung auf die Anzahl zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen im peripheren Blut

Aufgrund intensiver Forschungsarbeit ist in der Literatur heute mittlerweile vielfach beschrieben, dass es nach einer körperlichen Belastung zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen kommt (vgl. auch 1.3.1). In der vorliegenden Studie konnte bei getrennter Berechnung für die EG und die KG zwar in den einzelnen Gruppen eine Zunahme der Anzahl an CD34⁺ Progenitorzellen pro μl nach der Belastung um ca. 40 % verzeichnet werden, statistisch war diese Zunahme jedoch nicht signifikant. Dies könnte möglicherweise durch den geringen Umfang der jeweiligen Stichproben bedingt sein. Für die GG mit insgesamt $n=18$ berechnet, ergab sich ebenfalls eine Zunahme der CD34⁺ Progenitorzellen von ca. 40 %, die sich im Gegensatz zu der getrennten Berechnung für die EG und die KG jedoch letztendlich als signifikant herausstellte. Möglicherweise ein Effekt der größeren Probandenanzahl in dieser Gruppe.

In den meisten der Studien, die einen Anstieg von CD34⁺ Progenitorzellen nach einer Maximalbelastung nachweisen konnten (48-50), waren allerdings jeweils gesunde Probanden untersucht worden. Studien zu der Frage, ob auch bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale eine sportliche Maximalbelastung eine Veränderung der Anzahl an CD34⁺ Progenitorzellen hervorruft und ob sich diese von der Veränderung in einer gesunden Stichprobe unterscheidet, sind in der Literatur bisher noch nicht publiziert worden.

Gleichwohl gibt es weitere Studien, deren Ergebnisse eine durch Belastung induzierte Freisetzung von CD34⁺ Progenitorzellen auch bei Erkrankten zeigen und deren Autoren

anhand dieser Ergebnisse die Hypothese eines positiven Effekts von Sport bei Patienten mit insbesondere kardiovaskulären Erkrankungen postulieren (93-95). Beispielsweise konnten Adams et al. (94) zeigen, dass eine einzelne Episode körperlicher Maximalbelastung mittels eines symptomlimitierten Belastungstests bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit einen zeitabhängigen signifikanten Anstieg zirkulierender EPCs in deren peripherem Blut zur Folge hatte. Auch die Ergebnisse der erst kürzlich veröffentlichten Studie von Sandri et al. (95) stellten heraus, dass sportliche Betätigung bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu einer Zunahme der Anzahl an EPCs in deren Blut führt. Hier wurden allerdings nicht die Effekte einer kurzfristigen Maximalbelastung untersucht, sondern die Auswirkungen eines regelmäßigen Trainings. Ein vierwöchiges Trainingsprogramm führte bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl an EPCs von fast 70 % im Vergleich zu deren Anzahl vor Beginn des Trainingsprogramms. Auch eine Verbesserung der Funktion der EPCs konnte in dieser Studie gezeigt werden. Möglicherweise führt körperliche Aktivität zu einer verstärkten Mobilisierung von EPCs in das periphere Blut, welche dann wiederum möglicherweise Reparaturmechanismen im kardiovaskulären System induzieren (37, 96).

Inzwischen gibt es auch zunehmend Daten, die dafür sprechen, dass EPCs auch bei anderen chronischen Erkrankungen sowie auch Lungenerkrankungen eine Rolle spielen (42-44). Die angeführten Studien kamen allesamt zu dem übereinstimmenden Ergebnis, dass bei Patienten mit COPD die Anzahl zirkulierender EPCs im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt war. Dass erniedrigte Zahlen von EPCs auch in der Pathogenese der Idiopathischen Lungenfibrose eine Rolle zu spielen scheinen, wird durch die Ergebnisse einer Arbeit von Malli et al. aus dem Jahre 2013 verdeutlicht (51). Die Ergebnisse dieser Studie legen die Vermutung nahe, dass erniedrigte Zahlen von EPCs bei Patienten mit Idiopathischer Lungenfibrose möglicherweise einen profibrogenen Effekt haben könnten, was möglicherweise durch eine Suppression der durch EPCs gesteuerten Reparatur- und Wiederherstellungsmechanismen im geschädigten pulmonalen Endothel erklärt werden könnte. In einer weiteren Studie konnte auch für Patienten mit COPD nachgewiesen werden, dass eine erniedrigte EPC-Zahl positiv mit der Schwere der Erkrankung korreliert ist, was möglicherweise Ausdruck einer mit reduzierten EPC-Zahlen einhergehender Abnahme der Regenerationskapazität des Gewebes ist (97).

In der vorliegenden Studie zeigten sich zwischen der EG und der KG keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Absolutzellzahl/ μl an CD34^+ Progenitorzellen in Ruhe und nach Belastung. Möglicherweise lässt sich die Tatsache, dass bei den Asthmatikern im Vergleich zu den Gesunden keine verringerte Absolutzellzahl an EPCs nachgewiesen werden konnte, damit erklären, dass alle Teilnehmer der EG ein sehr gut kontrolliertes Asthma hatten und damit kaum Krankheitsaktivität aufwiesen. Vor diesem Hintergrund wäre eine weiterführende Untersuchung zu dem Thema, inwiefern sich die Anzahl von CD34^+ Progenitorzellen bei Patienten mit einem nur teilweise kontrollierten oder gar unkontrollierten Asthma im Vergleich zu Gesunden verhält, sicher interessant.

Welche Relevanz die Tatsache hat, dass sich in Ruhe bei der Kontrollgruppe ein signifikant höherer Prozentanteil der $\text{CD34}^+/\text{CD31}^+$ Subpopulation an der Gesamtanzahl der CD34^+ Progenitorzellen gezeigt hatte, lässt sich hier jedoch nicht hinreichend erklären. Dies gilt auch für die unter 3.2.1 beschriebene Auswirkung körperlicher Belastung auf die CD38^+ und der VEGFR2^+ EPC-Subpopulationen in der KG.

4.3 Effekte körperlicher Belastung auf die Anzahl zirkulierender MSC im peripheren Blut

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit sich körperliche Belastung auf die relative Konzentration von MSCs bei Patienten mit Asthma und gesunden Kontroll- Probanden auswirkt. Diese wurden jeweils vor und nach der Belastung mittels Durchflusszytometrie ermittelt und statistisch ausgewertet. Wie unter 3.2.2 beschrieben, fanden sich zwischen den Gruppen hinsichtlich der Ruhewerte und der Werte nach der Belastung keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an MSC. Eine Auswirkung von körperlicher Belastung auf die relative Anzahl zirkulierender MSC konnte in keiner der beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Der positive Einfluss körperlicher Aktivität auf Entzündungsvorgänge im Körper ist gut belegt (s. Kap. 1.2.2). So konnte unter anderem von Vieira et al. (30) und Silva et al. (31) bereits in zwei Studien am Mausmodell gezeigt werden, dass Ausdauertraining bei an Asthma erkrankten Mäusen zu einer verringerten Expression allergieassoziiertes proinflammatorischer Zytokine führt. Dass bestimmte Interleukine einen Einfluss auf die migratorische Aktivität von MSCs haben ist ebenfalls gut bekannt. Insbe-

sondere IL-6 scheint bei vermehrter Ausschüttung die Migrationsaktivität und Mobilität von MSCs zu erhöhen. So zeigen beispielsweise die Ergebnisse der Arbeit von Schmidt et al. (57), dass eine maximale körperliche Belastung zu einer gesteigerten migratorischen Aktivität von MSCs führt und dass diese mit einem Anstieg von IL-6 und IL-8 einhergeht. Möglicherweise kann die gesteigerte Migrationsaktivität der MSCs auf die Erhöhung dieser Interleukine zurückgeführt werden, was zu einer Verbesserung von Reparaturvorgängen im Lungengewebe führt. Auch bei Asthmatikern konnten erhöhte IL-6 Level gemessen werden (98). Denkbar wäre, dass diese ein verstärktes Homing von MSCs in das geschädigte Lungengewebe bewirken, welche dort nach Umwandlung in Atemwegsepithel an den benötigten Reparaturvorgängen beteiligt sind.

Möglicherweise kann die oben beschriebene Tatsache, dass sich in dieser Studie die Ruhewerte und die MSC-Werte nach der Belastung zwischen der EG und der KG nicht wesentlich unterschieden, dadurch erklärt werden, dass aufgrund der offensichtlich sehr geringen Krankheitsaktivität bei den Patienten der EG zum Zeitpunkt der Untersuchung keine MSCs für Reparaturvorgänge in der Lunge benötigt wurden und diese damit in deren Blut auch nicht in erhöhter Anzahl nachweisbar waren. Vor diesem Hintergrund wäre es im Nachhinein betrachtet sicherlich interessant und sinnvoll gewesen, zusätzlich noch Interleukin 6 als promigratorischen Faktor sowie weitere an der Pathogenese des Asthma bronchiale beteiligte Zytokine, wie IL-4, laborchemisch im Blut der Probanden zu quantifizieren. Auch eine Wiederholung der Untersuchungen mit Patienten, die nachgewiesenermaßen durch airway remodelling hervorgerufene Veränderungen im Bereich der Zellstruktur der Atemwege aufweisen, z. B. bei einem Asthma mit chronisch aktiver Inflammation, wäre hinsichtlich dieser Fragestellung von großem Interesse.

Insgesamt fanden sich in dieser Studie jedoch nur sehr niedrige Konzentrationen zirkulierender MSCs im peripheren Blut, was eine mögliche Erklärung für die statistisch nicht signifikante Erhöhung der relativen Anzahl an MSC infolge der Belastung von 0,3 % bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl in der EG ($p=0,108$) wäre. Möglicherweise hätte ein größerer Stichprobenumfang statistisch aussagekräftigere Ergebnisse geliefert. Sicherlich trägt auch der Verdünnungseffekt bei der laborchemischen Aufbereitung der Blutproben einen Anteil zu den niedrigen Zellzahlen bei, da gerätebedingt jeweils nur vier Antikörper gleichzeitig gemessen werden konnten und somit pro Blutprobe sehr vie-

le verschiedene Färbungen notwendig waren. Hier wären erneute Untersuchungen mit neueren Durchflusszytometriegeräten, die heutzutage die gleichzeitige Messung von bis zu 20 Parametern pro Färbungsansatz zulassen, sicher interessant. Im Falle dieser Studie wäre auch eine Untersuchung größerer Mengen an Blut eine denkbare Möglichkeit gewesen, dem Verdünnungseffekt mit höheren Zellzahlen entgegenzuwirken und damit möglicherweise eine größere Aussagekraft der Ergebnisse zu erzielen. Zwar ist die Existenz von MSCs im peripheren Blut evident (75, 99), doch deren Messung ist durch deren geringe Anzahl im peripheren Blut erschwert, sodass die Ergebnisse von Studien daher wiederholt diskutiert werden und sich oft als nicht reproduzierbar erweisen (74, 75). Insgesamt wurden bisher jedoch nur sehr wenig Daten bezüglich der Quantifizierung von MSC im peripheren Blut und zu der Frage, inwiefern sich körperliche Belastung auf die Anzahl zirkulierender MSCs auswirkt, publiziert.

Im Gegensatz zu den nicht nachweisbaren Veränderungen der relativen Gesamtanzahl an MSC konnte bei der Untersuchung deren Subgruppen für die EG jedoch ein signifikanter Abfall des prozentualen Anteils der CD29⁺ Zellen an der Gesamtanzahl der MSCs nach der Belastung verzeichnet werden. Dieser war jedoch mit einem medianen Abfall von 1,25 % sehr gering, sodass die klinische Relevanz dieses Ergebnisses fragwürdig bleibt. Auch wenn es sowohl innerhalb der EG als auch innerhalb der KG durch körperliche Aktivität zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl CD105⁺ MSCs kam, zeigte sich bei einem p von 0,053 dennoch ein mit Tendenz zur Signifikanz unterschiedlicher Einfluss körperlicher Aktivität auf die Verteilung dieser MSC-Subgruppe bei Patienten mit Asthma bronchiale und gesunden Probanden. In der EG kam es bezüglich dieser Zellen zu einem etwas stärkeren Abfall verglichen mit dem Abfall in der KG. Die Ursachen hierfür bleiben weitgehend unklar.

CD105 scheint eine wichtige Rolle bei der adipogenen und osteogenen Ausdifferenzierung von MSCs zu spielen (100). CD29 oder auch Integrin β 1 ist ein auf der Zelloberfläche von MSCs exprimiertes Molekül, das in vivo an deren Migration beteiligt ist (101). Es gibt Daten, die am Tiermodell zeigen konnten, dass sich die Expression dieses Oberflächenmarkers auf MSCs durch mechanische Belastung längerfristig verändert. Mechanischer Stress führte in dieser Studie an MSCs, die aus dem Knochenmark von Ratten stammten, nach mehreren Tagen zu einem Abfall der Expressionsrate an CD29 (102).

Ob es durch mechanische Belastung auch kurzfristig zu Veränderungen in der Expressionsrate von CD29 kommt und ob körperliche Belastung im Sinne von Sport Auswirkungen auf diese hat, ist bisher noch nicht untersucht worden. Möglicherweise könnten die mechanischen Belastungen, die während des Ausdauerleistungstests auf den Körper eingewirkt hatten, die beobachtete Veränderung hervorgerufen haben. Ein zufälliger Unterschied scheint jedoch aufgrund der geringen Größe der Stichprobe auch möglich. Ebenfalls könnte auch eine Kontamination mit anderen Zelltypen, z.B. Thrombozyten, die ebenfalls CD29 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, den beobachteten Effekt mit hervorgerufen haben. Denn betrachtet man die Daten in Tabelle 11 (siehe S.46), fällt auf, dass sich bei den Messungen der einzelnen Subpopulationen vor allem für die CD29⁺ Zellen sowohl in der EG als auch in der KG extrem schwankende Werte ergaben. In geringerem Maße konnten solche Schwankungen auch bei den Messungen bezüglich der Expressionsrate von CD44⁺ und CD73⁺ verzeichnet werden, möglicherweise ebenfalls durch Kontamination mit anderen Zelltypen hervorgerufen.

4.4 in-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen aus Knochenmark

Das Meiste, was wir heutzutage über mesenchymale Progenitorzellen wissen, resultiert aus den Daten von Studien, die mit Zellkulturen und Tiermodellen gearbeitet haben. Die zur Isolierung und Expansion der Zellen verwendeten Methoden sind dabei sehr uneinheitlich. Wie unter 1.4 bereits beschrieben, werden MSCs dabei meist aus Knochenmark gewonnen. Die gängigste Methode zur Isolierung von MSCs stellt dabei die Dichtegradientenzentrifugation dar (54). Eines der wichtigsten Selektionskriterien für MSC ist deren Eigenschaft, dass sie sich in Kultur unter Standardbedingungen durch Plastikadhärenz auszeichnen (52). Nachdem sie adhären geworden sind, bilden MSCs dann typischerweise Kolonien spindelförmiger Zellen aus, die morphologisch Fibroblasten ähneln (66).

In der vorliegenden Studie erfolgte die Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark ebenfalls mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach weiterer Aufbereitung erfolgte dann deren Kultivierung unter Standardbedingungen. Nach durchschnittlich acht Tagen zeigten sich dabei erste Nester plastikadhärenter Zellen, die auch die typische spindelförmige Morphologie von MSC ausbildeten. In der Folgezeit war eine stetige Expansion dieser Zellnester zu beobachten. Nach einer maximalen Kulturdauer von

30 Tagen erfolgten wie unter 3.3.1 beschrieben durchflusszytometrische Messungen bezüglich der Expression MSC-typischer Oberflächenantigene auf diesen Zellen. Hier wiesen durchschnittlich 99,16 % der kultivierten Zellen die Expression von CD105 auf. Auch die Expressionsrate von CD44 auf diesen Zellen lag bei mehr als 99 %. Eine ebenfalls sehr hohe Expressionsrate konnte für CD29 gezeigt werden. Diese lag bei 84,18 %. Die Anwesenheit der übrigen Marker konnte auf weit weniger Zellen nachgewiesen werden. Konnte MSCA-1 noch auf durchschnittlich 49,35 % der Zellen gefunden werden, lag der Anteil der CD 271⁺Zellen lediglich bei 6,16 %. CD73 fand sich sogar nur auf 4,76 % der Zellen.

Wie oben beschrieben scheint CD105 von Bedeutung für die Ausdifferenzierung von MSCs zu sein. In Kultur waren CD105⁺ MSC nach Stimulation dazu fähig, sich sowohl in Richtung osteogener als auch adipogener Zelllinien weiterzuentwickeln (100). CD73, ein immunregulatorisches und an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligtes Molekül (103), scheint ebenso wie CD29 eine regulatorische Funktion bei der Migration von MSCs zu haben (102). Auch eine regulatorische Funktion bei der chondro- und osteogenen Differenzierung wird für CD73 vermutet (104). CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, das über eine Interaktion mit Hyaluronsäure bei der Extravasation aktivierter T-Zellen in Areale entzündlicher Aktivität benötigt wird (105). Auf MSCs exprimiert, scheint es dort ebenfalls über eine Interaktion mit Hyaluronsäure deren Migration zu ermöglichen (106).

Nach wie vor werden zur Identifikation und Definition von MSC die Kriterien der International Society for Cellular Therapy (ISCT) von 2006 angewendet (107). Nach diesen Kriterien werden MSCs neben ihrer Plastikadhärenz über ihre Fähigkeit zur Differenzierung in mindestens drei verschiedene Zelllinien (d.h. Fett-, Knorpel- und Knochengewebe), über die Expression von CD105, CD73 und CD90 und die Abwesenheit hämatopoetischer Oberflächenmarker (u.a. CD34 und CD45) definiert (52).

Die in der vorliegenden Studie kultivierten Zellen aus Knochenmark wiesen sowohl Plastikadhärenz als auch die typische Morphologie von MSC auf. Auch das Profil der exprimierten Oberflächenmoleküle wies, wie oben beschrieben, teilweise große Übereinstimmungen mit den von der ISCT geforderten Kriterien auf, sodass die Vermutung naheliegt, dass die erhaltenen Zellen der Gruppe der mesenchymalen Progenitorzellen

zuzuordnen sind. Dieser Annahme widerspricht jedoch die nur sehr geringe Expressionsrate von CD73. Möglicherweise ist diese auf die Untersuchungsmethodik zurückzuführen, da für den Nachweis von CD73 wie auch für CD90 ungekoppelte Antikörper verwendet wurden, die in einem zweiten Schritt nach Bindung an die Zelloberfläche noch mit PE-konjugierten Zweitantikörpern markiert werden mussten. Beispielsweise könnte die hiermit verbundene Notwendigkeit u.a. zusätzlicher Waschvorgänge zur Aufreinigung einen Zellverlust zufolge gehabt haben, der sich in der niedrigen Anzahl gemessener CD73⁺ Events niederschlägt. Die genauen Gründe hierfür bleiben jedoch ungeklärt. Ebenso kann auch die ebenfalls sehr geringe Expression von CD271 nicht abschließend geklärt werden.

Obwohl durch die Kriterien der ISCT eine gewisse Standardisierung von MSC-Studien erreicht wurde, gibt es in der Literatur doch teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Charakteristika von MSCs (107-114). Es wird vermutet, dass die in-vitro-Kultivierung, die der Charakterisierung vorangeht, möglicherweise einen Einfluss auf den Immunphänotyp sowie funktionelle und genetische Eigenschaften von MSC haben könnte (107). Neuere Studien haben daher den Fokus auf die Erforschung weiterer Oberflächenantigene auf MSCs gelegt, um deren Identifikation und Isolation bereits in vivo zu erleichtern. Eine der Kultivierung vorangehende Präselektion von MSCs über spezifische Marker würde eine höhere Reinheit im Vergleich zur Selektion über Plastikadhärenz garantieren (115). So gilt bislang CD271 als der spezifischste Marker für die Charakterisierung und Aufreinigung von MSCs aus dem Knochenmark (115). Auch MSCA-1 konnte 2009 von Battula et al. (83) als ein neuer und selektiver MSC-Marker vorgestellt werden.

Möglicherweise könnte die hier gezeigte, sehr uneinheitliche Expression MSC-typischer Oberflächenantigene darüber erklärt werden, dass auch in dieser Studie der abschließenden Charakterisierung eine Kultivierung über einen längeren Zeitraum voranging. Denkbar wäre, dass diese einen Einfluss auf die Expression der gemessenen Marker gehabt haben könnte. In Folgestudien sollte daher eine Charakterisierung der MSCs zu früheren Passagen erfolgen, um einen Bias durch die lange Kulturzeit zu vermeiden. Auch die Verwendung eines direkt markierten Antikörpers für den Nachweis von CD73 und CD90 wäre vermutlich vorteilhafter gewesen.

Trotzdem kann hier mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Kultivierung von MSCs aus dem Knochenmark gelungen ist und daher als Positivkontrolle für die nachfolgenden Versuche mit Zellen aus peripherem Blut dienen kann. Dafür sprechen die Morphologie und die Plastikadhärenz der Zellen. Auch die starke Expression von CD105, CD44 und CD29 sowie die doch immerhin bei fast 50 % liegende Expressionsrate von MSCA-1 liefern gute Argumente dafür, dass die kultivierten Zellen der Gruppe der MSCs zuzurechnen sind. Eine weiterführende Untersuchung der kultivierten Zellen bezüglich deren Differenzierungsfähigkeit hätte zur Sicherung der vermuteten Zugehörigkeit zu den MSCs beitragen können.

4.5 in-vitro Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen aus peripherem Blut

Die Hauptquelle zur Gewinnung und anschließenden Expansion von MSCs ist nach wie vor das Knochenmark. Wie unter 1.4 beschrieben, ist die erfolgreiche Isolation und Kultivierung von MSCs aus Knochenmark als Standardverfahren anzusehen. Da die Entnahme von Knochenmark jedoch einen traumatischen und auch in der Entnahmemenge limitierten Eingriff darstellt, sind Untersuchungen zu dem Thema, ob sich MSCs auch aus anderen Quellen isolieren und kultivieren lassen, von großem wissenschaftlichen Interesse (74). Ein Vorkommen von MSC im peripheren Blut scheint gesichert, jedoch weisen die Ergebnisse der wenigen Studien, die es bisher zu dem Thema gibt, darauf hin, dass eine Kultivierung dieser Zellen im Gegensatz zur Kultivierung von MSCs aus Knochenmark nicht so problemlos möglich zu sein scheint (74-78). Daher wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob sich MSCs auch aus peripherem Blut isolieren und – was nach unserem Wissen bisher noch nicht untersucht wurde – in mit Plättchenlysat versetztem MSC-Kulturmedium kultivieren lassen. Eine Hypothese dabei war auch, dass die körperliche Belastung die Frequenz der MSCs im Blut eventuell erhöhen und damit die Kultur begünstigen könnte.

Im Falle der vorliegenden Studie wurden in drei Ansätzen PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut von Studienteilnehmern isoliert und diese, wie unter 2.3.3 beschrieben, ohne weitere Aufreinigung in PL-MS-C-Gro unter Standardbedingungen kultiviert. Dabei zeigten sich nach wenigen Tagen erste adhärenente Zellen, von denen wenige anfänglich auch die typische spindelförmige Morphologie, die für MSCs beschrieben ist, aufwiesen. Der überwiegende Anteil der adhärenenten Zellen wa-

ren jedoch abgeflachte, große, rundliche Zellen mit einer "spiegeleiförmigen" Morphologie und einem zentralen Zellkern. Auch die wenigen Zellen, die zu Beginn noch die typische MSC-Form aufgewiesen hatten, veränderten im Verlauf ihre Form dahingehend, dass sie sich spiegeleiförmig abflachten. Eine nennenswerte Expansion der Zellnester war nicht zu beobachten. Stattdessen wurden mit zunehmender Kulturdauer immer mehr Zellen apoptotisch. Eine Passagierung der Zellen gelang nicht.

Auch Wexler et al. (75) gelang es nicht, aus der Stammzellfraktion des peripheren Blutes eine nennenswerte Menge an MSCs zu erhalten, geschweige denn diese Zellen über mehrere Passagen zu kultivieren, während dies aus Knochenmark problemlos gelang. Unter MSC-Kulturbedingungen entwickelte sich aus Knochenmark ein Monolayer monomorpher, konfluierender, elongierter, fibroblastenähnlicher Zellen, die auch über bis zu 5 Passagen hin kultiviert werden konnten. Im Gegensatz dazu brachten die Ansätze aus peripherem Blut unter denselben Kulturbedingungen nur eine sehr karge Schicht adhärenter, nicht konfluierender und in ihrer Morphologie sehr heterogener Zellen hervor. Davon wies zwar auch ein Teil eine spindelförmige Form auf, eine Kultivierung über die erste Passage hinaus war jedoch nicht möglich. Auch Lazarus et al. (76) gelang es nicht, MSCs aus peripherem Blut zu kultivieren.

Die in der vorliegenden Studie gemachte Beobachtung, dass sich die Morphologie der Zellen mit zunehmender Kulturdauer immer mehr in Richtung flacher, runder Zellen entwickelte, deckt sich mit den Ergebnissen von Zvaifler et al. (77). Diese hatten ebenfalls Versuche zur Kultivierung von MSCs aus peripherem Blut unternommen, wobei sich auch hier zunächst längliche Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie neben großen, runden Zellen mit einem zentralen Nukleus gezeigt hatten. Auch in dieser Studie wurden diese runden Zellen mit fortschreitender Kulturdauer der dominierende Zelltyp. Für all diese Zellen, sowohl die runden großen als auch die spindelförmigen, konnte eine Expression von verschiedenen zytoskelettalen, zytoplasmatischen und Oberflächenmarkern mesenchymaler Progenitorzellen nachgewiesen werden: so unter anderem eine hohe Expression von CD105 und CD44. Weiterhin konnte von den Autoren gezeigt werden, dass diese Zellen die Fähigkeit besaßen sich zu Fibroblasten, Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren. Auch wenn die Autoren sich nicht klar festlegen, ob tatsächlich die Kultivierung von MSCs gelang, verweisen sie dennoch darauf, dass all

die oben genannten Eigenschaften Merkmale sind, die man auch bei mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark findet.

Auch in der vorliegenden Studie konnten die durchflusszytometrischen Analysen der Zellen aus den Kulturen, für die unselektierte PBMCs verwendet worden waren, auf dem überwiegenden Teil der Events (und damit Zellen) im MSC-Gate das Vorhandensein von CD44 belegen. Der Nachweis von CD105 gelang jedoch nur auf durchschnittlich 20 % dieser Zellen, wobei die Verteilung je nach Ansatz und Kulturdauer zwischen 0,2 % und 67,02 % lag. Der Nachweis der übrigen MSC-Marker (s. Tabelle 15) gelang überwiegend nicht.

Diese Tatsache ist sicherlich auch dadurch erklärbar, dass, wie unter 3.2.2 beschrieben, insgesamt nur sehr geringe Zellzahlen erzielt werden konnten und dementsprechend nur wenige Färbungen gelangen. Aufgrund dieser niedrigen Zellzahlen war auch eine weiterführende Untersuchung der Zellen bezüglich ihrer Differenzierungsfähigkeit nicht möglich. Dies wäre jedoch sicherlich von großem Interesse gewesen, um eine eventuelle mesenchymale Abstammung der kultivierten Zellen belegen zu können. Es wäre im Hinblick darauf ebenso von Vorteil gewesen, wenn man weitere Marker zur genaueren Charakterisierung der Zellen hätte einsetzen können. Von Interesse wäre daher sicherlich eine weiterführende Studie mit erneuter Kultivierung von PBMCs und einer anschließenden Untersuchung der Zellen auf weitere MSC-Marker sowie eine Untersuchung auf deren Differenzierungsfähigkeit.

Sieht man sich die Ergebnisse der Studie von Kassis et al. (74) an, scheint der Einsatz von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) und Microbeads die Erfolgsrate bei der Kultivierung von PBMSCs zu erhöhen. Die Autoren setzten in ihren Versuchen G-CSF zur Stammzellmobilisierung und Fibrin-Microbeads zur Präselektion von MSCs aus dem Blut gesunder menschlicher Spender ein und verglichen die Kultivierung dieser so selektierten Zellen mit der Kultivierung über Plastikadhärenz selektierter Zellen. Stammzellmobilisierung mithilfe von G-CSF bewirkt eine Ausschüttung unreifer Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut (116). Diesen Mechanismus machten sich Kassis et al. (74) zunutze, um auch die Anzahl zirkulierender MSC im Blut zu erhöhen. Da die G-CSF Mobilisierung offenbar eine Freisetzung verschiedener unreifer

fer Stammzellen, darunter MSCs, aber auch hämatopoetischer und anderer Progenitorzellen bewirkt (117), wurden weiterhin Fibrin-Microbeads (FMB) verwendet, um selektiv MSCs aus dem mobilisierten Blut zu isolieren. Dies führte zu dem Ergebnis, dass in acht von elf Versuchen, in denen mithilfe von FMBs selektierte Zellen eingesetzt wurden, erfolgreich MSCs kultiviert werden konnten, während die Versuchsansätze, in denen MSCs lediglich über deren Eigenschaft der Plastikadhärenz isoliert wurden, in einer vernachlässigbaren Anzahl von MSC resultierten (74).

Das Vorgehen in der Studie von Kassis et al. (74) zum Vorbild, erfolgte in der vorliegenden Studie bei drei Versuchen zur Kultivierung von PBMSC eine Präselektion CD271⁺ Zellen aus der Fraktion der PBMCs mittels MACS-Separation, um den Reinheitsgrad und die kritische Dichte von MSCs im Kulturansatz zu erhöhen. Auch hier zeigten sich, wie in den Versuchen mit unselektierten PBMCs, nach wenigen Tagen adhärenzte Zellen. Im Gegensatz zu diesen ersten Versuchen wies hier jedoch ein größerer Teil der morphologisch ebenfalls sehr heterogenen Zellen die MSC-typische Spindel-form auf. Leider hatte die Selektion CD271⁺ Zellen offensichtlich keinen positiven Einfluss auf die Expansionsrate der Zellen. Insgesamt erzielten diese Versuche solch niedrige Zellzahlen, dass bei den FACS-Analysen dieser Zellen jeweils nur die Expression von zwei MSC-Oberflächenmarkern auf den Events im MSC-Gate untersucht werden konnte. In Abbildung 7b auf Seite 55 kann man dabei jedoch deutlich erkennen, dass die über CD271 vorselektionierten Zellen zu einem sehr hohen Prozentsatz positiv für CD271, MSCA-1 und CD105 waren. Damit zeichnet sich auch in vorliegender Studie ein Vorteil durch die angewendete Vorselektion ab, auch wenn weitere Passagen leider nicht gelangen. Die Annahme, dass über die CD271⁺ Selektion wie gewünscht ein größerer Reinheitsgrad an MSCs in diesen Kulturen erzielt werden konnte, liegt also nahe. Gänzlich beweisen lässt sich diese Annahme jedoch nicht, da hierfür ein Nachweis weiterer MSC-Oberflächenmarker und eine Untersuchung bezüglich der Differenzierungsfähigkeit der Zellen notwendig gewesen wäre. Warum es auch hier trotz höherem Reinheitsgrad zu keiner nennenswerten Expansion der Zellen kam, lässt sich nicht abschließend klären.

Möglicherweise liegt dies daran, dass die Zahl der eingesetzten Zellen, bedingt durch die ausschließliche Selektion der CD271⁺ Subpopulation der im peripheren Blut ohnehin

nur in sehr geringer Anzahl vorkommenden MSCs, noch geringer ausfiel. Die in der aktuellen Studie erzielten Ergebnisse stützen somit die schon wiederholt postulierte These, dass zwar vermutlich MSCs im peripheren Blut vorhanden sind, deren Anzahl aber zu niedrig ist um sie längerfristig zu kultivieren. Auch körperliche Belastung konnte die Anzahl zirkulierender MSCs nicht signifikant erhöhen, sodass dadurch keine Verbesserung der MSC-Isolierung und Kultur erreicht wurde. Ebenfalls scheint die bisher noch nicht publizierte Verwendung des in dieser Studie für die Kultivierung von PBMSC genutzten PL-MSC-Gro die Erfolgsrate nicht wesentlich zu beeinflussen. Möglicherweise haben PBMSC bezüglich der für ihre Expansion benötigten Wachstumsfaktoren gänzlich andere Ansprüche als MSC aus Knochenmark, womit möglicherweise die Wahl des in dieser Studie verwendeten Kulturmediums eine Rolle bei der fehlenden Expansion gespielt haben könnte. Warum die aus unmobilisiertem peripherem Blut isolierten MSC zumindest in vitro, abhängig von der Methode ihrer Isolierung und Kultivierung, anscheinend kaum Expansionsfähigkeit besitzen, gilt es in weiteren Studien zu klären.

4.6 Fazit

Insgesamt konnte die vorliegende Studie bei getrennter Berechnung für die EG und die KG keinen signifikanten Anstieg von CD34⁺ Progenitorzellen nach körperlicher Belastung zeigen – möglicherweise bedingt durch die kleinen Stichproben. Zu einem signifikanten Anstieg kam es nur bei der Berechnung der Veränderungen für die Gesamtgruppe. Trotzdem scheint durchaus denkbar zu sein, dass es auch bei Lungenerkrankungen durch körperliche Ertüchtigung zu einer Zunahme der Anzahl zirkulierender CD34⁺ Progenitorzellen im peripheren Blut kommt, die vermutlich maßgeblich an körpereigenen Reparaturvorgängen beteiligt sind und damit krankheitsbedingte Umbauvorgänge zumindest etwas abzuschwächen vermögen. Nicht nur deshalb sollte Sport weiterhin in den nichtmedikamentösen Therapieprinzipien bei Lungenerkrankungen Anwendung finden.

Ein wesentlicher Effekt kurzfristiger körperlicher Aktivität auf die Anzahl zirkulierender mesenchymaler Progenitorzellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zwar geht aus der Literatur hervor, dass Sport einen Einfluss auf diese Zellen zu haben scheint, welcher sich z. B. in einer gesteigerten migratorischen Aktivität dieser Zellen nach Belastung widerspiegelt. Welche genaue Rolle diese Zellen im zirkulieren-

den peripheren Blut spielen und ob eine körperliche Belastung einen Einfluss auf deren Anzahl hat, bleibt jedoch weiterhin offen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass körperliche Aktivität die Zahl und Funktion von MSCs im Lungenparenchym durch Transdifferenzierung aus anderen Zelltypen fördert, und die MSC-Progenitoren gar nicht den Weg über den Blutstrom nehmen müssen. Da inzwischen die Ergebnisse mehrerer Studien eine Beteiligung mesenchymaler Progenitorzellen an Reparaturvorgängen bei verschiedenen Erkrankungen nahelegen, sollten hier weitere Untersuchungen zu den durch Sport vermittelten Effekten auf diese Zellen folgen. Der Fokus sollte dabei, neben erneuter Quantifizierung dieser Zellen, insbesondere auch auf die Untersuchung durch körperliche Aktivität vermittelter Einflüsse auf die für das Homing dieser Zellen verantwortliche Mechanismen gelegt werden.

Die Definition neuer MSC-Marker zur Charakterisierung derselben wäre im Hinblick auf eine Standardisierung für zukünftige Studien wünschenswert, da bisherige Studien diesbezüglich noch sehr uneinheitliche Ergebnisse gezeigt haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Kultivierung mesenchymaler Progenitorzellen aus Knochenmark auch in vorliegender Studie erfolgreich möglich war. Eine längerfristige Kultivierung solcher Zellen in nennenswerter Anzahl aus peripherem Blut gelang jedoch nicht. Im Hinblick auf die uneinheitlichen Ergebnisse der wenigen Studien, die es bisher zur Kultivierung von MSCs aus peripherem Blut gibt, scheinen weitere Untersuchungen zu deren Isolation und Expansion notwendig zu sein, um diesbezüglich langfristig eine sichere, erfolgsversprechende Kulturmethodik für PBMSCs entwickeln zu können. Besonders vielversprechend scheint hier der Einsatz vorselektierter Zellen aus mobilisiertem Blut zu sein.

5 Zusammenfassung

Asthma bronchiale gehört weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen des Menschen. In verschiedenen Leitlinien zur Asthmatherapie sind Sport bzw. regelmäßige körperliche Aktivität als nicht-medikamentöse Maßnahmen mittlerweile ein integrativer Bestandteil. Etliche Studien haben gezeigt, dass regelmäßige körperliche Aktivität sowohl die Lebensqualität als auch den Krankheitsverlauf bei Asthmatikern positiv beeinflussen kann. Welche Mechanismen genau die positiven Effekte von Sport bei dieser Erkrankung vermitteln, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Die Erklärungsansätze reichen dabei von einer Zunahme der kardiopulmonalen Fitness sowie Verbesserung der Lungenfunktion über eine immunologisch vermittelte Reduzierung der Atemwegsinfektion bis hin zu einer Verbesserung körpereigener Reparaturmechanismen. Letztere ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten gerückt, wobei man vermutet, dass dabei insbesondere $CD34^+$ Progenitorzellen und MSCs eine bedeutende Rolle spielen könnten.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich körperliche Belastung auf die Anzahl zirkulierender $CD34^+$ Progenitorzellen und MSCs bei Patienten mit einem allergischen Asthma bronchiale gegen Hausstaubmilben der Art *Dermatophagoides pteronyssinus* verglichen mit gesunden Kontroll-Probanden auswirkt. Hierfür unterzogen sich sieben Patienten und zwölf Gesunde einem spiroergometrischen Ausdauerleistungstest bis zur subjektiven körperlichen Ausbelastung. Vor und nach der Spiroergometrie erfolgten Blutentnahmen. Neben einer Bestimmung von Entzündungsparametern wurde jeweils ein Blutbild inklusive Differenzierung angefertigt und die Anzahl zirkulierender $CD34^+$ Progenitorzellen und MSCs mittels FACS-Analyse bestimmt. Weiterhin wurde überprüft, ob sich mithilfe einer gängigen Methode zur Kultivierung von MSCs aus Knochenmark diese auch aus peripherem Blut isolieren und kultivieren lassen.

Bezüglich der $CD34^+$ Progenitorzellen und der MSCs kam es dabei nach Belastung bei getrennter Berechnung für die beiden Studiengruppen zu keiner signifikanten Veränderung. Die Gesamtheit der Studienteilnehmer wurde daher nochmals in einer Gesamtgruppe zusammengefasst, für die ebenfalls durch Belastung hervorgerufene Veränderungen berechnet wurden. Hier ließ sich ein signifikanter Anstieg von $CD34^+$ Progenitor-

zellen feststellen, wohingegen bei den MSCs weiterhin keine Veränderung zu beobachten war. In den Versuchen zur Kultivierung von MSCs aus peripherem Blut ließen sich keine nennenswerten Mengen dieser Zellen kultivieren, wenngleich die Kulturen doch möglicherweise zu Beginn einige dieser Zellen enthielten. Im Gegensatz dazu war die Kultivierung von MSCs aus Knochenmark erfolgreich.

Dass es nach körperlicher Aktivität bzw. Sport zu einem Anstieg CD34⁺ Progenitorzellen im peripheren Blut kommt, ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben. Es wird vermutet, dass diese Zellen an körpereigenen Reparaturvorgängen beteiligt sind. Dieser Mechanismus könnte eine mögliche Erklärung für die positiven Effekte von Sport bei Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen darstellen. Auch bei Lungenerkrankungen wird CD34⁺ Progenitorzellen eine Rolle bei Reparaturvorgängen zugeschrieben. Obwohl es zunehmend Hinweise dafür gibt, dass auch MSCs für diese Vorgänge von Bedeutung sind, ist die Frage, welche spezifische Rolle diesen Zellen im zirkulierenden peripheren Blut zukommt, weiterhin nicht hinreichend geklärt. Bei Untersuchungen zu diesem Thema kommt erschwerend hinzu, dass MSCs im peripheren Blut nur in sehr geringer Frequenz nachweisbar sind und die Gruppe dieser Zellen eine sehr große Heterogenität aufweist. Auch eine Kultivierung von MSCs aus peripherem Blut scheint nicht so ohne weiteres möglich zu sein. All dies bereitet Schwierigkeiten bei der genauen Quantifizierung und Charakterisierung dieser Zellen. Auch wenn es in dieser Studie nicht gelang einen Effekt körperlicher Belastung auf die Anzahl zirkulierender MSCs nachzuweisen, sollten dennoch weitere Untersuchungen zu den durch Sport vermittelten Effekten auf diese Zellen folgen. Der Fokus sollte dabei insbesondere auf die Untersuchung von Einflüssen körperlicher Aktivität auf die für das Homing dieser Zellen verantwortlichen Mechanismen gelegt werden. Auch weitere Untersuchungen zur Isolation und Expansion von MSCs aus peripherem Blut scheinen notwendig zu sein, um diesbezüglich langfristig eine sichere, erfolgsversprechende Kulturmethode entwickeln zu können. Besonders vielversprechend scheint hier der Einsatz vorselektierter Zellen aus mobilisiertem Blut zu sein. Zusammenfassend könnte all dies einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die Mechanismen körpereigener Reparaturvorgänge besser zu verstehen. Diese Erkenntnisse wiederum könnten dann zur Entwicklung neuer Strategien zur Therapie diverser Lungenerkrankungen wie auch Asthma beitragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2014. 2014. Available from: www.ginasthma.org
2. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin. Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Langfassung, 2. Auflage. Version 5. 2009, zuletzt geändert: August 2013.:271.
3. Berdel D, Reinhardt D, Kabesch M, Hansen G. Asthma bronchiale. In: Reinhardt D, Nicolai T, Zimmer K-P, editors. Therapie der Krankheiten im Kindes- und Jugendalter. 9., überarbeitete und erweiterte Auflage: Springer Verlag, Berlin - Heidelberg; 2014. p. 731-52.
4. Frey U, Gappa M, Eber E, von Mutius E, Barben J, Hammer J, et al. Obstruktive Atemwegserkrankungen. In: von Mutius E, Gappa M, Eber E, Frey U, editors. Pädiatrische Pneumologie. 3., vollständig überarbeitete Auflage: Springer Verlag, Berlin - Heidelberg; 2013. p. 539-68.
5. Chiang LC, Huang JL, Fu LS. Physical activity and physical self-concept: comparison between children with and without asthma. *J Adv Nurs*. 2006;54(6):653-62.
6. Lang DM, Butz AM, Duggan AK, Serwint JR. Physical activity in urban school-aged children with asthma. *Pediatrics*. 2004;113(4):e341-6.
7. Vahlkvist S, Pedersen S. Fitness, daily activity and body composition in children with newly diagnosed, untreated asthma. *Allergy*. 2009;64(11):1649-55.
8. O'Byrne PM, Pedersen S, Schatz M, Thoren A, Ekholm E, Carlsson LG, et al. The poorly explored impact of uncontrolled asthma. *Chest*. 2013;143(2):511-23.
9. Disabella V, Sherman C. Exercise for asthma patients: little risk, big rewards. *Phys Sportsmed*. 1998;26(6):75-84.
10. Clark CJ, Cochrane LM. Assessment of work performance in asthma for determination of cardiorespiratory fitness and training capacity. *Thorax*. 1988;43(10):745-9.
11. Rasmussen F, Lambrechtsen J, Siersted HC, Hansen HS, Hansen NC. Low physical fitness in childhood is associated with the development of asthma in young adulthood: the Odense schoolchild study. *Eur Respir J*. 2000;16(5):866-70.
12. Mendes FA, Goncalves RC, Nunes MP, Saraiva-Romanholo BM, Cukier A, Stelmach R, et al. Effects of aerobic training on psychosocial morbidity and symptoms in patients with asthma: a randomized clinical trial. *Chest*. 2010;138(2):331-7.
13. Latorre-Roman PA, Navarro-Martinez AV, Garcia-Pinillos F. The effectiveness of an indoor intermittent training program for improving lung function, physical capacity, body composition and quality of life in children with asthma. *J Asthma*. 2014;51(5):544-51.
14. Crosbie A. The effect of physical training in children with asthma on pulmonary function, aerobic capacity and health-related quality of life: a systematic review of randomized control trials. *Pediatr Exerc Sci*. 2012;24(3):472-89.
15. Ram FS, Robinson SM, Black PN. Effects of physical training in asthma: a systematic review. *Br J Sports Med*. 2000;34(3):162-7.
16. Pereira MC. Physical training for asthma. *Sao Paulo Med J*. 2014;132(3):193-4.

17. Mendes FA, Almeida FM, Cukier A, Stelmach R, Jacob-Filho W, Martins MA, et al. Effects of aerobic training on airway inflammation in asthmatic patients. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(2):197-203.
18. Sidiropoulou MP, Fotiadou EG, Tsimaras VK, Zakas AP, Angelopoulou NA. The effect of interval training in children with exercise-induced asthma competing in soccer. *J Strength Cond Res.* 2007;21(2):446-50.
19. Onur E, Kabaroglu C, Gunay O, Var A, Yilmaz O, Dundar P, et al. The beneficial effects of physical exercise on antioxidant status in asthmatic children. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2011;39(2):90-5.
20. Niederer I, Kriemler S, Zahner L, Burgi F, Ebenegger V, Marques P, et al. BMI group-related differences in physical fitness and physical activity in preschool-age children: a cross-sectional analysis. *Res Q Exerc Sport.* 2012;83(1):12-9.
21. So WY, Choi DH. Differences in Physical Fitness and Cardiovascular Function Depend on BMI in Korean Men. *J Sports Sci Med.* 2010;9(2):239-44.
22. Huang YC, Malina RM. BMI and health-related physical fitness in Taiwanese youth 9-18 years. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(4):701-8.
23. Girodo M, Ekstrand KA, Metivier GJ. Deep diaphragmatic breathing: rehabilitation exercises for the asthmatic patient. *Arch Phys Med Rehabil.* 1992;73(8):717-20.
24. Cochrane LM, Clark CJ. Benefits and problems of a physical training programme for asthmatic patients. *Thorax.* 1990;45(5):345-51.
25. Wanrooij VH, Willeboordse M, Dompeling E, van de Kant KD. Exercise training in children with asthma: a systematic review. *Br J Sports Med.* 2014;48(13):1024-31.
26. Fanelli A, Cabral AL, Neder JA, Martins MA, Carvalho CR. Exercise training on disease control and quality of life in asthmatic children. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(9):1474-80.
27. Wicher IB, Ribeiro MA, Marmo DB, Santos CI, Toro AA, Mendes RT, et al. Effects of swimming on spirometric parameters and bronchial hyperresponsiveness in children and adolescents with moderate persistent atopic asthma. *J Pediatr (Rio J).* 2010;86(5):384-90.
28. Henriksen JM, Nielsen TT. Effect of physical training on exercise-induced bronchoconstriction. *Acta Paediatr Scand.* 1983;72(1):31-6.
29. Araki H, Kano S, Nishima S, Ogasawara M, Matsuzaki M, Tanaka MM, et al. Effects of physical training on children with bronchial asthma. *Alerugi.* 1991;40(3 Pt 1):205-14.
30. Vieira RP, Claudino RC, Duarte AC, Santos AB, Perini A, Faria Neto HC, et al. Aerobic exercise decreases chronic allergic lung inflammation and airway remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176(9):871-7.
31. Silva RA, Vieira RP, Duarte AC, Lopes FD, Perini A, Mauad T, et al. Aerobic training reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. *Eur Respir J.* 2010;35(5):994-1002.
32. Hewitt M, Creel A, Estell K, Davis IC, Schwiebert LM. Acute exercise decreases airway inflammation, but not responsiveness, in an allergic asthma model. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;40(1):83-9.
33. Moreira A, Delgado L, Haahtela T, Fonseca J, Moreira P, Lopes C, et al. Physical training does not increase allergic inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J.* 2008;32(6):1570-5.

34. Shantsila E, Lip GY. Endothelial function and endothelial progenitors: possible mediators of the benefits from physical exercise? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009;16(4):401-3.
35. Fernandes T, Nakamuta JS, Magalhaes FC, Roque FR, Lavini-Ramos C, Schettert IT, et al. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. *J Hypertens.* 2012;30(11):2133-43.
36. Loebinger MR, Sage EK, Janes SM. Mesenchymal stem cells as vectors for lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2008;5(6):711-6.
37. Macaluso F, Myburgh KH. Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2012;33(3-4):187-98.
38. Loebinger MR, Aguilar S, Janes SM. Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls. *Clin Sci.* 2008;114(2):99-108.
39. Wahl P, Bloch W, Schmidt A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. *Int J Sports Med.* 2007;28(5):374-80.
40. De Biase C, De Rosa R, Luciano R, De Luca S, Capuano E, Trimarco B, et al. Effects of physical activity on endothelial progenitor cells (EPCs). *Front Physiol.* 2013;4:414.
41. Yamada M, Kubo H, Ishizawa K, Kobayashi S, Shinkawa M, Sasaki H. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax.* 2005;60(5):410-3.
42. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J.* 2006;27(3):529-41.
43. Huertas A, Palange P. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *Eur Respir J.* 2011;37(2):426-31.
44. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, et al. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem cells.* 2006;24(7):1806-13.
45. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
46. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-8.
47. Volaklis KA, Tokmakidis SP, Halle M. Acute and chronic effects of exercise on circulating endothelial progenitor cells in healthy and diseased patients. *Clin Res Cardiol.* 2013;102(4):249-57.
48. Rehman J, Li J, Parvathaneni L, Karlsson G, Panchal VR, Temm CJ, et al. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12):2314-8.
49. Laufs U, Urhausen A, Werner N, Scharhag J, Heitz A, Kissner G, et al. Running exercise of different duration and intensity: effect on endothelial progenitor cells in healthy subjects. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2005;12(4):407-14.
50. Van Craenenbroeck EMF, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VFI, et al. A maximal exercise bout increases the number of circulating

CD34+/KDR+ endothelial progenitor cells in healthy subjects. Relation with lipid profile. *J Appl Physiol*. 2008;104(4):1006–13.

51. Malli F, Koutsokera A, Paraskeva E, Zakyntinos E, Papagianni M, Makris D, et al. Endothelial progenitor cells in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: an evolving concept. *PLoS ONE [Electronic Resource]*. 2013;8(1):e53658.

52. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

53. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.

54. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.

55. Wong AP, Keating A, Lu WY, Duchesneau P, Wang X, Sacher A, et al. Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium. *J Clin Invest*. 2009;119(2):336-48.

56. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17(4):331-40.

57. Schmidt A, Bierwirth S, Weber S, Platen P, Schinkothe T, Bloch W. Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells. *Br J Sports Med*. 2009;43(3):195-8.

58. Valero MC, Huntsman HD, Liu J, Zou K, Boppart MD. Eccentric exercise facilitates mesenchymal stem cell appearance in skeletal muscle. *PloS one*. 2012;7(1):e29760.

59. Koning JJ, Kooij G, de Vries HE, Nolte MA, Mebius RE. Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front Immunol*. 2013;4:49.

60. Ohnishi S, Nagaya N. Tissue regeneration as next-generation therapy for COPD--potential applications. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(4):509-14.

61. Asmussen S, Ito H, Traber DL, Lee JW, Cox RA, Hawkins HK, et al. Human mesenchymal stem cells reduce the severity of acute lung injury in a sheep model of bacterial pneumonia. *Thorax*. 2014;69(9):819-25.

62. Ge X, Bai C, Yang J, Lou G, Li Q, Chen R. Effect of mesenchymal stem cells on inhibiting airway remodeling and airway inflammation in chronic asthma. *J Cell Biochem*. 2013;114(7):1595-605.

63. Martinez-Gonzalez I, Cruz MJ, Moreno R, Morell F, Munoz X, Aran JM. Human mesenchymal stem cells resolve airway inflammation, hyperreactivity, and histopathology in a mouse model of occupational asthma. *Stem Cells Dev*. 2014;23(19):2352-63.

64. Song X, Xie S, Lu K, Wang C. Mesenchymal Stem Cells Alleviate Experimental Asthma by Inducing Polarization of Alveolar Macrophages. *Inflammation*. 2014.

65. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, LeRoux-Williams M, Tashkin DP. A placebo-controlled, randomized trial of mesenchymal stem cells in COPD. *Chest*. 2013;143(6):1590-8.

66. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol*. 2006;13(6):419-25.

67. Fekete N, Gadelorge M, Furst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy*. 2012;14(5):540-54.
68. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem cells*. 2005;23(8):1105-12.
69. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007;47(8):1436-46.
70. Sensebe L, Krampera M, Schrezenmeier H, Bourin P, Giordano R. Mesenchymal stem cells for clinical application. *Vox Sang*. 2010;98(2):93-107.
71. Hemeda H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2013;15(9):1174-81.
72. von Bonin M, Stolzel F, Goedecke A, Richter K, Wuschek N, Holig K, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(3):245-51.
73. Lucchini G, Introna M, Dander E, Rovelli A, Balduzzi A, Bonanomi S, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1293-301.
74. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(10):967-76.
75. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol*. 2003;121(2):368-74.
76. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Caplan AI. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. *J Hematother*. 1997;6(5):447-55.
77. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res Ther*. 2000;2(6):477-88.
78. Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 2012;30(4):634-42.
79. Ruf KC, Fehn S, Bachmann M, Moeller A, Roth K, Kriemler S, et al. Validation of activity questionnaires in patients with cystic fibrosis by accelerometry and cycle ergometry. *BMC Med Res Methodol*. 2012;12:43.
80. Durnin JV, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr*. 1974;32(1):77-97.
81. Godfrey S, Davies CT, Wozniak E, Barnes CA. Cardio-respiratory response to exercise in normal children. *Clin Sci*. 1971;40(5):419-31.

82. Greenleaf JE, Convertino VA, Mangseth GR. Plasma volume during stress in man: osmolality and red cell volume. *J Appl Physiol Respir Environ Exercise Physiol.* 1979;47(5):1031–8.
83. Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica.* 2009;94(2):173-84.
84. Buhning HJ, Battula VL, Trembl S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:262-71.
85. Orenstein DM. Assessment of Exercise & Pulmonary Function. In: Rowland TW, editor. *Pediatric Laboratory Exercise Testing. Clinical Guidelines.* Champaign, IL: Human Kinetics; 1993. p. 141-63.
86. Wohrl S, Vigl K, Zehetmayer S, Hiller R, Jarisch R, Prinz M, et al. The performance of a component-based allergen-microarray in clinical practice. *Allergy.* 2006;61(5):633-9.
87. Dolen WK. IgE antibody in the serum--detection and diagnostic significance. *Allergy.* 2003;58(8):717-23.
88. Ulrik CS. Peripheral eosinophil counts as a marker of disease activity in intrinsic and extrinsic asthma. *Clin Exp Allergy.* 1995;25(9):820-7.
89. Horn BR, Robin ED, Theodore J, Van Kessel A. Total eosinophil counts in the management of bronchial asthma. *N Engl J Med.* 1975;292(22):1152-5.
90. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6-63.
91. Schwindt CD, Zaldivar F, Wilson L, Leu SY, Wang-Rodriguez J, Mills PJ, et al. Do circulating leucocytes and lymphocyte subtypes increase in response to brief exercise in children with and without asthma? *Br J Sports Med.* 2007;41(1):34-40.
92. Bloomer RJ, Farney TM. Acute plasma volume change with high-intensity sprint exercise. *J Strength Cond Res.* 2013;27(10):2874-8.
93. Shalaby MN, Saad M, Akar S, Reda MA, Shalgham A. The Role of Aerobic and Anaerobic Training Programs on CD(34+) Stem Cells and Chosen Physiological Variables. *J Hum Kinet.* 2012;35:69-79.
94. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):684-90.
95. Sandri M, Viehmann M, Adams V, Rabald K, Mangner N, Hollriegel R, et al. Chronic heart failure and aging - effects of exercise training on endothelial function and mechanisms of endothelial regeneration: Results from the Leipzig Exercise Intervention in Chronic heart failure and Aging (LEICA) study. *Eur J Prev Cardiol.* 2015.
96. Park JH, Miyashita M, Kwon YC, Park HT, Kim EH, Park JK, et al. A 12-week after-school physical activity programme improves endothelial cell function in overweight and obese children: a randomised controlled study. *BMC Pediatr.* 2012;12:111.
97. Huertas A, Testa U, Riccioni R, Petrucci E, Riti V, Savi D, et al. Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;170(1):23-31.
98. Yokoyama A, Kohno N, Fujino S, Hamada H, Inoue Y, Fujioka S, et al. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(5):1354-8.

99. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):585-97.
100. Roura S, Farre J, Soler-Botija C, Llach A, Hove-Madsen L, Cairo JJ, et al. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(6):555-63.
101. Ip JE, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell.* 2007;18(8):2873-82.
102. Ode A, Kopf J, Kurtz A, Schmidt-Bleek K, Schrade P, Kolar P, et al. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2011;22:26-42.
103. Hunsucker SA, Mitchell BS, Spychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 2005;107(1):1-30.
104. Ode A, Schoon J, Kurtz A, Gaetjen M, Ode JE, Geissler S, et al. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2013;25:37-47.
105. Mohamadzadeh M, DeGrendele H, Arizpe H, Estess P, Siegelman M. Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion. *J Clin Invest.* 1998;101(1):97-108.
106. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells.* 2006;24(4):928-35.
107. Muniz C, Teodosio C, Mayado A, Amaral AT, Matarraz S, Barcena P, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13(high) CD105(+) CD45(-) mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):169.
108. Lopez-Villar O, Garcia JL, Sanchez-Guijo FM, Robledo C, Villaron EM, Hernandez-Campo P, et al. Both expanded and uncultured mesenchymal stem cells from MDS patients are genomically abnormal, showing a specific genetic profile for the 5q- syndrome. *Leukemia.* 2009;23(4):664-72.
109. Zhao ZG, Xu W, Yu HP, Fang BL, Wu SH, Li F, et al. Functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer Lett.* 2012;317(2):136-43.
110. Blau O, Baldus CD, Hofmann WK, Thiel G, Nolte F, Burmeister T, et al. Mesenchymal stromal cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients have distinct genetic abnormalities compared with leukemic blasts. *Blood.* 2011;118(20):5583-92.
111. Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res.* 2005;29(2):215-24.
112. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Flores-Guzman P, Gutierrez-Espindola G, Arana-Trejo RM, Castillo-Medina S, et al. Functional analysis of myelodysplastic syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res.* 2008;32(9):1407-16.
113. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop J.* 2011;5 Suppl 2:242-8.
114. Soenen-Cornu V, Tourino C, Bonnet ML, Guillier M, Flamant S, Kotb R, et al. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid

of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro. *Oncogene*. 2005;24(15):2441-8.

115. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Otero-Hernandez J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*. 2015;7(2):470-6.

116. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol*. 2002;30(9):973-81.

117. Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, Bergamin N, D'Aurizio F, Verardo R, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ Res*. 2009;104(10):1225-34.

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1 – Gating Strategie zur Charakterisierung einer CD34+SSClow und einer CD45-SSClow - Zellpopulation..... | 25 |
| Abbildung 2 – Gating Strategie zur Quantifizierung von Zellen, die MSC-typische CD-Oberflächenantigene exprimieren..... | 29 |
| Abbildung 3 – Exemplarische Aufnahmen in-vitro kultivierter MSC aus Knochenmark..... | 47 |
| Abbildung 4 – Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten MSCs aus Knochenmark..... | 49 |
| Abbildung 5..... | 50 |
| a) Gating Strategie zur Quantifizierung der Antigenexpression in-vitro kultivierter MSCs aus Knochenmark | |
| b) Expression von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten MSCs nach 30 Tagen Kulturzeit | |
| Abbildung 6 – Exemplarische Aufnahme (40x Vergrößerung) eines Zellnestes in-vitro kultivierter PBMSC..... | 51 |
| Abbildung 7 – Expressionsfaktor von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten PBMSC..... | 53 |
| Abbildung 8..... | 55 |
| a) Gating Strategie zur Quantifizierung der Antigenexpression in-vitro kultivierter PBMSC | |
| b) Expression von Oberflächenantigenen auf in-vitro kultivierten PBMSC nach 33 Tagen Kulturzeit | |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 - Übersicht über Studien zur Isolierung und Expansion von PBMSC..... | 16 |
| Tabelle 2 - Färbekombination zur Bestimmung der hämatopoetischen Stammzellsubfraktionen im peripheren Blut | 24 |
| Tabelle 3 - Färbekombination zur genaueren Charakterisierung CD34 ⁺ /SSC ^{low} gegateter Events..... | 27 |
| Tabelle 4 - Färbekombination zur genaueren Charakterisierung CD45 ⁻ CD235 ⁻ SSC ^{low} gegateter Events | 27 |
| Tabelle 5 - Färbekombination zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen auf Zellen der MSC-Kulturen aus Knochenmark | 32 |
| Tabelle 6 - Charakteristika des Probandenkollektivs (die einzelnen Werte sind jeweils als Median (Range) bzw. die Signifikanzen als p-Wert angegeben) | 37 |
| Tabelle 7 - Differenzialblutbilder vor der Spiroergometrie (Darstellung der Werte als Median (Range) und Signifikanzen als p-Wert) | 39 |
| Tabelle 8 - Differenzialblutbilder 10 Minuten nach Ende der Spiroergometrie (Werte für die Zellzahlen als Median (Range) und Signifikanzniveaus als p-Wert angegeben, s.o.) | 41 |
| Tabelle 9 - CD34 ⁺ Progenitorzellen vor und nach der Belastung bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontroll-Probanden (KG) (Darstellung der Werte als Median (Range)) | 42 |
| Tabelle 10 - Anzahl CD34 ⁺ Progenitorzellen vor und nach der Belastung in der Gesamtgruppe (GG) (Darstellung der Werte als Median (Range))..... | 43 |
| Tabelle 11 - Mesenchymale Progenitorzellen vor und nach der Belastung bei Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontroll-Probanden (KG) (Darstellung der Werte als Median (Range)) | 44 |
| Tabelle 12 - Vergleich der relativen Zellzahländerungen nach Belastung von MSCs inklusive Subgruppen zwischen Patienten mit allergischem Asthma bronchiale (EG) und gesunden Kontrollen (KG); Darstellung der Werte als Median (Range) und Signifikanzen als p-Wert | 45 |
| Tabelle 13 - MSCs: relative Häufigkeiten vor und nach der Belastung in der Gesamtgruppe (GG) (Darstellung der Werte als Median (Range); Signifikanzen als p-Wert)..... | 46 |
| Tabelle 14 - Expression von Oberflächenmarkern auf Zellen aus MSC-Kulturen aus Knochenmark | 48 |
| Tabelle 15 - Expression von Oberflächenmarkern auf Zellen aus Vollblut-MSK-Kulturen | 53 |

Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|---------|--|
| 7-AAD | 7-Aminoactinomycin |
| 7D-PAR | Seven Day Physical Activity Recall Questionnaire |
| APC | Allophycocyanin |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| CD | cluster of differentiation |
| COPD | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| CRP | C-reaktives Protein |
| EAR | allergische Frühphasereaktion |
| EG | Experimentalgruppe |
| EGF | epidermal growth factor |
| eNO | ausgeatmetes Stickstoffmonoxid |
| EPC | endotheliale Progenitorzelle |
| FACS | Durchflusszytometrie |
| FCS | fötales Kälberserum |
| FEV1 | Einsekundenkapazität |
| FEV1/VC | Tiffenau-Index |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FMB | Fibrin-Microbeads |
| FSC | Vorwärtsstreulicht |
| FVC | forcierte Vitalkapazität |
| G-CSF | Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor |
| HSC | hämatopoetische Progenitorzellen |
| ICS | inhalative Corticosteroide |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgE | Immunglobulin E |
| IL | Interleukin |
| ISCT | International Society for Cellular Therapy |
| KDR | kinase insert domain receptor (= VEGFR-2) |
| KG | Kontrollgruppe |
| KM | Knochenmark |

| | |
|----------------------|---|
| LABA | langwirksame Beta-2-Sympathomimetika |
| LBM | fettfreie Körpermasse |
| MACS | magnetische Zellseparation |
| MSC | Mesenchymale Progenitorzellen |
| MSCA-1 | mesenchymal stromal cell antigen-1 |
| MSC-Gro | CellGro Preclinical MSC Medium |
| PB | Peripheres Blut |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PE | Phycoerythrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll |
| PL | Plättchenlysate |
| PL-MSC-Gro | mit PL versetztes MSC-Gro |
| PLTs | humane Thrombozyten |
| PDGFs | PLT-derived growth factors |
| RABA | rasch wirkende Beta-2-Sympathomimetika |
| Reff | effektiver Atemwegswiderstand |
| RQ | respiratorischer Quotient |
| RV | Residualvolumen |
| SIT | spezifische Immuntherapie |
| SSC | Seitwärtsstreulicht |
| T75 | 75 cm ² Zellkulturflaschen |
| TGF-β | transforming growth factor-β |
| TLC | totale Lungkapazität |
| VEGFR-2 | vascular endothelial growth factor receptor 2 |
| VO ₂ peak | maximale Sauerstoffaufnahme |
| Wmax | maximale Leistung in Watt |
| %pred | Prozent des Vorhersagewertes |

Danksagung

Ohne die liebenswerte Mitarbeit einiger Personen wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

In erster Linie danke ich dabei meinen Probanden.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinem Doktorvater Prof. Dr.med. Helge Hebestreit: Dafür, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir von Anfang an jederzeit mit seinem wertvollen fachkundigen Rat und mit vollem körperlichem Einsatz zur Seite gestanden hat.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr.med. Matthias Eyrich meinen Dank aussprechen, ohne dessen großartige Hilfe diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre. Mit seiner Expertise im Bereich der Stammzellforschung hat er maßgeblich an der Planung und Durchführung dieses Projektes mitgewirkt, mich in die Geheimnisse der Durchflusssy-tometrie eingeweiht und mich jederzeit bei meinen Arbeiten im Labor und im Prozess des Schreibens unterstützt.

Weiterhin bin ich dem Team des Gemeinsamen Stammzelllabor der Universitäts-Kinderklinik und Medizinischen Klinik II, die mir bei meinen Arbeiten im Labor immer - sogar am Wochenende - mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben zu Dank verpflichtet. Außerdem danke ich Frau Dr. Schmid für ihre große Hilfe bei der Durchführung der Spiroergometrien sowie Frau Astrid Langhirt und Schwester Elisabeth Voit, die mir den einen oder anderen Vor- und Nachmittag in der Lungenfunktion ermöglicht und mich dort mit viel Geduld unterstützt haben.

Nicht zuletzt geht mein großer Dank an meinen Bruder Moritz für das geduldige Korrekturlesen sowie den Rest meiner Familie, die mich immer unterstützt und an mich glaubt. Schließlich danke ich auch meinem kleinen Sohn Emil, der mein Leben so bereichert, und meiner Frau Zora - dafür, dass sie mich stets liebevoll unterstützt und ermutigt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marc Benjamin Krämer-Gabert
Geburtsdatum: 21.03.1986
Geburtsort: Heidelberg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Verheiratet, 1 Kind

Beruflicher Werdegang

02/2015 - 04/2017 Assistenzarzt, Abteilung für Innere Medizin, Helios-Klinikum Schleswig
Seit 05/2017 Assistenzarzt, Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Helios-Klinikum Schleswig

Ausbildung

06/2014 Erhalt der Approbation als Arzt
05/2014 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2008 – 05/2014 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians Universität Würzburg
09/2007 – 02/2008 Medizinstudium an der Semmelweis-Universität Budapest, Ungarn
09/1996 – 06/2006 St. Raphael Gymnasium Heidelberg

Schleswig, 05.03.2018