

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. C. P. Speer**

**Effekt maximaler Belastung auf zirkulierende endotheliale und mesenchymale Progenitorzellen bei Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Probanden**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Katharina Carmen Ruf  
aus Würzburg**

**Würzburg, Juli 2013**



Referent: Prof. Dr. H. Hebestreit

Koreferent: Prof. Dr. M. Schmidt

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2013

Die Promovendin ist Ärztin.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
1 Einleitung.....	2
<b>1.1 Mukoviszidose .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Mukoviszidose und körperliche Leistungsfähigkeit .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Positive Effekte von Sport bei Mukoviszidose .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.1 Kräftigung der Atemmuskulatur .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2 Verbesserte Sekretelimination aus den Atemwegen.....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Progenitorzellen und Sport .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.1 Endotheliale Progenitorzellen.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4.2 Mesenchymale Progenitorzellen.....</b>	<b>8</b>
2 Material und Methoden.....	12
<b>2.1 Stichprobe.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Durchführung.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Blutproben und Blutprobenanalysen.....</b>	<b>14</b>
<b>2.4 Statistische Auswertung.....</b>	<b>17</b>
3 Ergebnisse .....	19
4 Diskussion .....	28
<b>4.1 Beurteilung der Ergebnisse der Spiroergometrie.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Veränderungen der Zellzahlen im Blutbild in Folge körperlicher Belastung .....</b>	<b>29</b>
<b>4.3 Effekte körperlicher Belastung auf endotheliale Progenitorzellen.....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Effekte körperlicher Belastung auf mesenchymale Progenitorzellen.....</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Fazit .....</b>	<b>34</b>
5 Zusammenfassung.....	35
6 Literaturverzeichnis .....	37
Abbildungsverzeichnis .....	45
Tabellenverzeichnis .....	46
Abkürzungsverzeichnis.....	47
Danksagung.....	48
Lebenslauf .....	49

# 1 Einleitung

## 1.1 Mukoviszidose

Mukoviszidose (Cystische Fibrose = CF) ist die häufigste, fortschreitend verlaufende und unheilbare autosomal-rezessive Erbkrankheit in Europa mit einer Häufigkeit von ca. 1:2500 Lebendgeburten [1]. Die zugrunde liegenden Mutationen betreffen ein Gen auf Chromosom 7, welches für einen Chloridkanal, den sogenannten Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR)-Kanal kodiert. Der CFTR-Kanal wiederum beeinflusst auch die Funktion anderer Kanäle wie des Epithelialen Natriumkanals (ENaC). Durch die Funktionsstörung der CFTR-Kanäle, die vor allem in den Epithelien des Darms, der Atemwege und der Ausführungsgänge sekretorischer Drüsen lokalisiert sind, wird bei Mukoviszidose der epitheliale Salz- und Wassertransport gestört. Dadurch kommt es zu einem Transportproblem für Sekrete u.a. in den Atemwegen und den Ausführungsgängen von Bauchspeicheldrüse und Leber.

Die mangelnde mukoziliäre Clearance in den Atemwegen führt zu Sekretverhalt, rezidivierenden Atemwegsinfektionen und Inflammationsvorgängen, deren Folge eine bronchiale Obstruktion, pulmonale Fibrosierung sowie die Bildung von Bronchiektasen ist. Dies resultiert in einer progredienten pulmonalen Überblähung und – bei einigen Patienten – zudem in einer fibrotisch bedingten Einschränkung der totalen Lungkapazität.

Durch den gestörten Salz- und Wassertransport in den Ausführungsgängen des Pankreas mit Sekretverhalt und Inflammation entsteht ein fibrotischer Umbau des Organs mit exokriner und im Verlauf oft auch endokriner Pankreasinsuffizienz. Einige Patienten entwickeln zudem eine Hepathopathie und Leberzirrhose.

## 1.2 Mukoviszidose und körperliche Leistungsfähigkeit

Abhängig vom Krankheitszustand ist die körperliche Leistungsfähigkeit bei CF eingeschränkt [2, 3]. Dies hat unterschiedliche Gründe:

Aufgrund der bestehenden exokrinen Pankreasinsuffizienz und einer damit einhergehenden Malnutrition haben Patienten mit CF oft eine verminderte Muskelmasse, wodurch die Kraft der Skelettmuskulatur, aber auch die Kraft und Ausdauer der Atemmuskulatur vermindert ist [4]. Zudem kann die chronische Inflammation zu einer Minderung der Leistungsfähigkeit beitragen [5].

Weiterhin kann die pulmonale Erkrankung das Atemminutenvolumen limitieren, so dass die Ventilation leistungsbegrenzend wird. Auch entsteht im Rahmen der bronchialen Obstruktion oft ein regionales Missverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion mit Limitierung des Gasaustausches. Klinisch wird häufig über Belastungsdyspnoe und rasche Ermüdbarkeit berichtet.

Nicht selten sind jedoch auch häufige Infektionen, Belastungsdyspnoe, Husten und die verringerte Leistungsfähigkeit die Ursache für eine geringe körperliche Aktivität. Der damit verbundene Trainingsmangel reduziert wiederum die Leistungsfähigkeit.

### 1.3 Positive Effekte von Sport bei Mukoviszidose

Körperliche Aktivität und Sport können sich positiv auf den Krankheitsverlauf bei CF auswirken, so dass diese mittlerweile im Therapiekonzept verankert sind. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die körperliche Leistungsfähigkeit wie auch die Lebensqualität von Betroffenen mit CF mit der körperlichen Aktivität korrelieren bzw. durch ein sportliches Training gesteigert werden können [6-10]. Wie bei Gesunden sind hier die Effekte trainingspezifisch, d.h. dass ein Krafttraining eher die Kraft, ein Ausdauertraining die Ausdauerleistungsfähigkeit erhöht [11]. Da für die Bewältigung des Alltags und die Berufsausübung eine gewisse körperliche Leistungsfähigkeit erforderlich ist [12], kann Sport auch hier einen Beitrag leisten. Eine gute körperliche Fitness korreliert auch mit einer günstigeren Überlebensprognose bei CF [11, 13].

Ein besonders beachteter Effekt von sportlichem Training ist eine Stabilisierung bzw. sogar Verbesserung der Lungenfunktion bei CF [6, 8, 14]. Insgesamt scheint Krafttraining ebenso wie Ausdauertraining einen positiven Effekt auf die Lungenfunktion zu haben [8].

Nach wie vor ist jedoch unklar, woraus der positive Aspekt des Sports auf die Lunge bei CF resultiert. Es gibt einige Hypothesen, die diese positiven Aspekte aus unterschiedlichen Perspektiven zu erklären versuchen:

### 1.3.1 Kräftigung der Atemmuskulatur

Die Atemmuskulatur kann bei CF durch ein spezifisches Training gekräftigt werden, was zumindest im kurzfristigen Verlauf zu einer Verbesserung der Lungenfunktion führt [15, 16]. Es ist vorstellbar, dass eine kräftigere Atemmuskulatur intensivere Belastungen ermöglicht, die wiederum zu einer besseren Belüftung der Lunge führen. Eine gute Lungenbelüftung verbessert zweifelsohne die Sekretelimination aus den Atemwegen und vermindert die Anfälligkeit für Infektionen.

Neben der Atemmuskulatur ist sicherlich auch eine Kräftigung der Rumpfmuskulatur und damit eine verbesserte Haltung mit einer Reduktion der pulmonalen Überblähung sowie einer durch die Überblähung verursachten Brustkyphose mitverantwortlich für eine Stabilisierung der Lungenfunktion [8].

### 1.3.2 Verbesserte Sekretelimination aus den Atemwegen

Insgesamt scheint es durch körperliche Aktivität auch direkt, d.h. ohne Trainingseffekt auf die Atemmuskulatur, zu einer verbesserten Sekretelimination aus den Atemwegen zu kommen, einerseits durch mechanische Effekte (höhere Atemflüsse bei tieferer Inspiration) [17], andererseits durch eine Veränderung der Aktivität von Ionenkanälen [18].

- *Mechanische Effekte körperlicher Belastung*  
Körperliche Belastung führt zu einer Steigerung des Atemzugvolumens und der Atemfrequenz. Dies führt zur Belüftung größerer Lungenareale und zu höheren Atemflüssen durch die Bronchien mit Lockerung der Sekrete. Auch gehen manche Aktivitäten mit Erschütterungen und Lagewechsel einher, wodurch die Sekretmobilisation zusätzlich verbessert wird. Zudem kommt es unter Belastung zu einer Stimulation der beta-Rezeptoren, was wiederum zu einer Bronchodilatation führt und eine verbesserte Sekretelimination ermöglicht.
- *Auswirkungen von körperlicher Aktivität auf die Ionenkanäle*  
Unter körperlicher Anstrengung kommt es bei Patienten mit CF zu einer Hemmung der überaktiven ENaC-Kanäle des respiratorischen Epithels

[19-21]. Hierdurch könnte der periziliäre Flüssigkeitslevel erhöht, der Zilienschlag mit Transport von Mukus verbessert und die Sputumviskosität reduziert werden. Hierdurch würde eine bessere Sputum-Clearance erreicht [19].

### 1.3.3 Immunologische Reaktionen bei körperlicher Aktivität

Körperliche Anstrengung induziert akute, aber auch chronische Anpassungsvorgängen des Immunsystems. Akut führt körperliche Anstrengung zu einem Anstieg der Leukozyten sowie einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine (wie beispielsweise Interleukin-6) sowie auch Interleukin-10 [22]. Die genaue Herkunft der vermehrt gemessenen Leukozyten im peripheren Blut nach körperliche Anstrengung ist letztlich nicht endgültig geklärt, postuliert wird neben einer vermehrten Ablösung wandständiger Leukozyten von den Gefäßwänden auch eine Freisetzung aus Pools wie der Milz und dem Knochenmark [23].

Regelmäßige körperliche Aktivität mit moderater Intensität führt langfristig zu einem Abfall proinflammatorischer Zytokine und somit zu einer gewissen Immuntoleranz. Zudem scheint bei regelmäßiger moderater körperlicher Aktivität die Anzahl von Infektionen der oberen Atemwege reduziert zu sein [22], was möglicherweise auf eine Erhöhung von anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen und eine Verminderung von pro-inflammatorischen CD16<sup>+</sup> Monozyten zurückzuführen ist [24]. Weiterhin kommt es zu einem Anstieg des sekretorischen IgA im Speichel, was sich in einer reduzierten Anzahl von Infektionen der Atemwege niederschlagen scheint [23]. Sehr intensive körperliche Aktivität hingegen geht mit zu einer Zunahme von Infektionen der oberen Atemwege einher, die Mechanismen hierfür sind bislang nur unzureichend verstanden [22].

Bei Patienten mit CF induziert körperliche Anstrengung ebenfalls einen Anstieg der Leukozytenzahlen. Im Vergleich zu Gesunden wird der Anstieg der Leukozyten sowie auch der proinflammatorischen Zytokine sogar als überproportional beschrieben [22]. Weiterhin scheinen erhöhte Leukozytenzahlen und proinflammatorische Zytokine bei Patienten mit CF deutlich länger im peripheren Blut messbar zu sein als bei gesunden Probanden [22].

#### 1.3.4. Unterstützung von Reparaturvorgängen durch Sport

Eine relativ neue Hypothese besagt, dass körperliche Anstrengung zu einer Steigerung körpereigener Reparaturvorgänge führt [25, 26]. Als Mechanismus wird angenommen, dass es durch körperliche Belastung zur Freisetzung von Zytokinen kommt, die die vermehrte Bildung und Ausschüttung von Progenitorzellen ins Blut zur Folge haben und somit nach erfolgter Schädigung durch frühzeitige und adäquate Reparaturvorgänge möglicherweise fibrotische Umbauvorgänge bremsen können [27]. Im folgenden Absatz soll die Bedeutung von körperlicher Aktivität auf Progenitorzellen näher beleuchtet werden.

#### 1.4. Stammzellen und Sport

Stammzellen sind in den letzten Jahren zunehmend wissenschaftlich untersucht worden, hat man doch erkannt, welche große Rolle sie bei körpereigenen Reparaturvorgängen spielen. Generell werden Stammzellen in 2 Gruppen unterteilt: embryonale und adulte Stammzellen.

- Embryonale Stammzellen entstammen der inneren Zelllinie der Blastozyste und sind in der Lage sich zu allen Keimblättern (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) zu entwickeln; sie sind somit pluripotente Zellen [28].
- Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die nach Abschluss der Embryonalentwicklung im Gewebe vorhanden sind und in ihrer Entwicklungsfähigkeit begrenzt sind. Sie sind gewebespezifisch, besitzen jedoch noch ein Transdifferenzierungspotential und dienen der Erhaltung und Regeneration. Sie kommen in verschiedensten Gewebearten vor, wie beispielsweise Knorpel, Muskel, Gefäße, Nerven und Endothel. Es werden verschiedene Stammzellgruppen unterschieden, unter ihnen endotheliale, mesenchymale sowie hämatopoetische Stammzellen [29]. Aus diesen Stammzellen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue spezialisierte Zellen gebildet. Adulte Stammzellen, die in Organen zu finden sind, haben im Allgemeinen in der Zellkultur ein deutlich geringeres Selbsterneuerungsvermögen und ein stärker eingeschränktes Differenzierungspotential als embryonale Stammzellen. Ihr Differenzierungspotential ist entweder multipotent wie beispielsweise bei



hämatopoetischen Stammzellen oder unipotent, d.h. sie sind in der Lage, lediglich einen bestimmten Zelltyp zu generieren [30].

In der hier vorliegenden Arbeit werden verschiedene Formen der adulten Stammzellen untersucht. Zur Vereinfachung der Terminologie werden diese als Progenitorzellen bezeichnet; sie sind Vorläuferzellen für ein bestimmtes Gewebe bzw. für einen bestimmten Zelltyp und sind gewebespezifisch mit einem gewissen Transdifferenzierungspotential.

Eine in letzter Zeit vermehrt diskutierte Frage ist, inwieweit durch Sport eine vermehrte Freisetzung von Progenitorzellen in die Blutbahn induziert wird. Insbesondere wurde bisher untersucht, inwieweit endotheliale Progenitorzellen durch körperliche Aktivität in die Blutbahn mobilisiert werden, um dann Reparaturvorgänge im Herzkreislaufsystem z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen wie der Arteriosklerose zu ermöglichen [31, 32]. Aber auch bei Patienten mit Lungenerkrankungen gibt es erste Daten zu möglichen Effekten körperlicher Belastung auf zirkulierende Progenitorzellen sowie deren Bedeutung für den Krankheitsverlauf [25, 26, 31, 33-36].

#### 1.4.1 Endotheliale Progenitorzellen

Laufs et al. fanden in ihrer Analyse der Auswirkungen von körperlicher Anstrengung auf endotheliale Progenitorzellen (CD34<sup>+</sup>/VEGFR2) eine Steigerung von 130% nach einer maximalen Ausdauerbelastung sowie ebenfalls eine deutliche Steigerung nach moderater Ausdauerbelastung über 30 Minuten, während sich nach einer moderaten Ausdauerbelastung von nur 10 Minuten Dauer keinerlei Steigerung nachweisen ließ [37]. Auch Van Craenenbroeck et al. konnten zeigen, dass nach einer maximalen Ausdauerbelastung die Anzahl endothelialer Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup>) um mehr als 70% angestiegen war [38].

Von manchen Autoren wird spekuliert, dass durch die belastungsinduzierte Freisetzung endothelialer Progenitorzellen möglicherweise Reparaturvorgänge im Gefäßsystem angestoßen oder zumindest erleichtert werden, die das Risiko für kardiovaskuläre Morbidität senken könnten [37-39]. Es gibt sogar Spekulationen, die die bekannten positiven Effekte regelmäßiger Bewegung auf das

Herzkreislaufsystem auf stammzellbasierte endotheliale Reparaturvorgänge zurückführen [25, 38].

Bezüglich der Bedeutung von endothelialen Progenitorzellen für Reparaturvorgänge in der Lunge gibt es weniger Daten. Es wurde jedoch gezeigt, dass Patienten mit Chronisch Obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) im Vergleich zu Gesunden eine niedrigere Zahl zirkulierender endothelialer Vorläufer aufweisen [34, 35]. Inwiefern dies mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert ist, ist noch unklar.

Bei Patienten mit bakterieller Pneumonie zeigte sich mit fortschreitender Genesung eine Mobilisierung von endothelialen Vorläuferzellen in die Blutbahn. Diese Zellen scheinen an Reparaturvorgängen nach entzündlichen Veränderungen beteiligt zu sein [33]. Es zeigte sich auch, dass die Patienten, die eine eher geringe Anzahl der Vorläuferzellen aufwiesen, vermehrt fibrotische Veränderungen zurückbehielten [33].

#### 1.4.2 Mesenchymale Progenitorzellen

„Mesenchymale Stammzellen“ (MSC) ist eine Bezeichnung für eine vermutlich heterogene Gruppe von Zellen, die ein reduziertes Selbsterneuerungspotential, aber zahlreiche unterschiedliche Differenzierungsmöglichkeiten aufweisen [40]. Nach den Richtlinien der International Society for Cellular Therapy sind sie über folgende Kriterien definiert: MSCs exprimieren CD105, CD73 und CD90 und weisen keine Oberflächenmarker des hämatopoetischen Systems auf (CD34, CD19, CD45, CD11a, MHC I und MHC II).

Die genannten Marker für MSCs sind auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert, so dass kein Konsens über die genaue Identität und Lokalisierung dieser Zellpopulation besteht [41]; sicher nachweisbar sind sie im Knochenmark, der Decidua sowie im Fettgewebe. MSCs sind wenig immunogen und können in Knochen, Knorpel und Fettgewebe differenzieren. In der heterogenen Gruppe der MSCs befinden sich auch Zellen, die zu Atemwegsepithelzellen ausdifferenzieren können [42].

Für die Gruppe der mesenchymalen Stammzellen gibt es bislang nur sehr wenige Daten in Bezug auf Mobilisierung durch körperliche Aktivität aber auch im Hinblick auf mögliche Reparaturvorgänge bei Erkrankungen. Schmidt et al. [43] konnten zeigen, dass durch maximale Fahrradbelastungen Faktoren, die für die Migration von MSCs notwendig sind, vermehrt ausgeschüttet werden und die Migrationsfähigkeit von MSCs über einen kurzen Zeitraum gesteigert wird.

Bislang gibt es keine Untersuchung zu den Effekten körperlicher Anstrengung auf die Anzahl zirkulierender MSCs. Im Tiermodell hat chronische Hypoxie einen Einfluss auf eine vermehrte Ausschüttung von MSCs in das periphere Blut [44]. Da körperliche Anstrengung bei Patienten mit CF eine Hypoxämie induzieren kann [45], ist denkbar, dass bei diesen Patienten durch körperliche Aktivität ebenfalls eine vermehrte Ausschüttung von MSCs in das periphere Blut provoziert werden könnte.

Auch ist möglich, dass körperliche Belastung gewebständige Progenitorzellen aktiviert; dies ist möglicherweise die Erklärung, warum eine Vermehrung von muskelspezifischen Progenitorzellen unter körperlicher Belastung im Muskelgewebe nachgewiesen werden konnte [29, 46].

Patienten mit pulmonalen Erkrankungen können von der Gabe mesenchymaler Progenitorzellen wohl profitieren [30, 40, 47]. Es wird spekuliert, dass diese Zellen nach Homing in das Lungengewebe durch Umwandlung zu Atemwegsepithel Reparaturvorgänge auslösen können [48].

Zudem scheinen MSCs immunmodulatorisch wirksam zu sein; so wiesen Patienten mit COPD nach intravenöser Gabe von MSCs im Vergleich zur Kontrollgruppe zwar keine Verbesserungen im Hinblick auf Lungenfunktion oder Lebensqualität auf, allerdings zeigte sich ein signifikanter Abfall des C-reaktiven Proteins in der Gruppe der behandelten Patienten [47]. Es ist vorstellbar, dass bei diesen Patienten zwar nicht die chronische Infektion durch die Gabe von MSCs gebremst werden kann (im Sinne einer antimikrobiellen Therapie), jedoch die inflammatorischen Umbauvorgänge (durch Zytokine im Rahmen der Immunantwort auf die mikrobiellen Erreger), die ja einen wesentlichen Anteil an der progredienten Zerstörung des Lungenepithels bei chronischen Lungenerkrankungen einnehmen. Bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation und

ausgeprägter Graft-versus-Host-Disease der Haut und des Darms hat sich die Gabe von mesenchymalen Stammzellen zur Beeinflussung von inflammatorischen Vorgängen mittlerweile etabliert; bei einigen dieser Patienten kann nach Gabe der MSCs die medikamentöse Immunsuppression deutlich reduziert werden [41].

### 1.5 Fragestellung

Ziel der Studie war zu untersuchen, ob sich die Anzahl der im peripheren Blut messbaren Progenitorzellen durch eine maximale körperliche Anstrengung steigern lässt. Dies wurde sowohl für die CD34+ Zellen (hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen) als auch für MSCs untersucht.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob sich Patienten mit CF in der Anzahl der Progenitorzellen von gesunden Probanden unterscheiden und zwar sowohl in Ruhe als auch nach der körperlichen Belastung. Auch die Dynamik der Veränderungen (Veränderung der Anzahl vor/nach Belastung) sollte zwischen den Gruppen verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stichprobe

7 Patienten mit CF (5 männlich, 2 weiblich) wurden durch die Christiane Herzog-Ambulanz für Mukoviszidosekranke der Universitäts-Kinderklinik Würzburg rekrutiert. Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 12 Jahren sowie eine gesicherte Mukoviszidose (klinisches Bild und entweder 2 pathologische Schweißteste oder nachgewiesene CF-verursachende Mutationen auf beiden Allelen). Patienten mit Diabetes mellitus, Leberzirrhose, akuter pulmonaler Exazerbation definiert nach Fuchs [49], einer bekannten durch Sport ausgelösten Herzrhythmusstörung, sowie Patienten, die systemisch Steroide einnahmen, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Weiterhin wurden 9 gesunde Kontrollpersonen (3 männlich, 6 weiblich) eingeschlossen. Auch für diese galt ein Mindestalter von 12 Jahren. Jede akute oder chronische Erkrankung sowie die Einnahme von Medikamenten führten zum Ausschluss von der Studie.

Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg erhob keine Einwände gegen die Durchführung der Studie (Nummer des Votums: 201/09). Alle Teilnehmer sowie – bei Teilnehmern < 18 Jahren – die Erziehungsberechtigten erklärten nach Aufklärung über die Studieninhalte schriftlich ihr Einverständnis an der Studie teilzunehmen.

### 2.2 Durchführung

Die Teilnehmer wurden mit den Untersuchungsinhalten und Testapparaturen vertraut gemacht und dabei aufkommende Fragen wurden beantwortet. Nachdem die Patienten über die einzelnen Studieninhalte und mögliche Risiken aufgeklärt waren, wurde von ihnen bzw. ihren gesetzlichen Vertretern eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Am Untersuchungstag wurden die Patienten für den Vormittag einbestellt. Die letzte Mahlzeit sollte mindestens 2 Stunden vorher eingenommen und auf koffeinhaltige Getränke am Morgen verzichtet worden sein. Außerdem sollte am Vortag keine intensive körperliche Anstrengung stattgefunden haben.

Nachdem Größe und Gewicht in Unterwäsche gemessen worden waren, erfolgte eine Spirometrie sowie Bodyplethysmographie (Master Screen Body, Jaeger, Höchberg, Germany) zur Erfassung der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>), der forcierten Vitalkapazität (FCV), des Residualvolumens (RV) sowie der totalen Lungkapazität (TLC). Nach Inhalation von 2 Hüben Salbutamol zur Bronchospasmodolyse über eine Vorsatzkammer (Volumatic) wurde die Lungenfunktionsuntersuchung wiederholt. Anschließend wurde für die geplanten Blutentnahmen eine Venenverweilkanüle in die Vena mediana cubiti platziert. Nach einer Ruhephase von 20 Minuten im Sitzen wurde die erste Blutentnahme durchgeführt (1,2 ml EDTA-Blut für die Blutbildbestimmung, 7,4 ml EDTA-Blut für die FACS-Analysen, 1 ml Fluorid-Blut für die Laktatbestimmung, 3 ml Blut für die Bestimmung von CRP und IgG im Serum sowie 1 ml Blut für die Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit).

Im Anschluss erfolgte ein maximaler Ausdauerleistungstest mittels Spiroergometrie auf einem Fahrradergometer (ergoselect 200, ergoline, Bitz, Deutschland) nach dem Godfreyprotokoll [50]. Bei einer Anfangslast von 20 W wurde die Last jede Minute um 20 W bis zur subjektiven Erschöpfung gesteigert. Während der Fahrradergometrie wurde kontinuierlich ein 12 Kanal-EKG abgeleitet (custocard m, Ottobrunn, Germany) und die Sauerstoffsättigung gemessen (Nellcor Reflectance oxygen sensor RS10, Nellcor Puritan Bennet Inc., Pleasanton, CA, USA). Außerdem wurden die Ventilation sowie die Konzentration von O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in der Atemluft mittels Spiroergometriegerät (CPX/D, MedGraphics, St. Paul, MN, USA) zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme (VO<sub>2peak</sub>) sowie des respiratorischen Quotienten (RQ) gemessen.

Zehn Minuten nach Ende der Belastung wurde eine zweite Blutentnahme durchgeführt (keine Bestimmung der Blutsenkungsgeschwindigkeit, des CRP- und IgG-Wertes, sonst identische Blutmengen zur ersten Blutentnahme). Van Craenenbroeck et al. konnten in einer Ausdauerbelastung zeigen, dass zehn Minuten nach einer maximalen körperlichen Belastung die Anzahl endothelialer CD34<sup>+</sup> Stammzellen signifikant anstieg, so dass in dieser Studie ebenfalls der Zeitpunkt zehn Minuten nach maximaler Belastung zur zweiten Blutentnahme gewählt wurde [38]. Auch in der Studie von Laufs et al. [37], die den Einfluss einer intensiven

Laufbelastung auf endotheliale Progenitorzellen untersucht haben, erfolgte die Blutentnahme 10 Minuten nach der maximalen Belastung.

### 2.3 Blutproben und Blutprobenanalysen

Die Blutproben, die vor der Ergometrie sowie zehn Minuten nach Ende der Ergometrie gewonnen wurden, wurden folgendermaßen analysiert: es erfolgte die Bestimmung eines Blutbildes inklusive maschineller Differenzierung (Advia 120, Siemens, Deutschland) sowie die Bestimmung von C-reaktivem Protein und des Immunglobulin G Spiegels als Marker für akute und chronische entzündliche Aktivität (nur vor Ergometrie). Um die maximalen Anstrengung neben den Parametern Herzfrequenz und respiratorischer Quotient auch laborchemisch zu quantifizieren, wurde sowohl vor als auch 10 Minuten nach Belastung der Laktatspiegel bestimmt.

Da es nach körperlicher Belastung zu einer Hämokonzentration kommt und diese einen Einfluss auf die gemessenen Zellzahlen haben könnte, wurden Veränderungen des Plasmavolumens durch die maximale Belastung nach dem Verfahren von Greenleaf et al. [51] berechnet.

#### *Analyse der Progenitorzellpopulationen*

Nach Anfertigung des Differentialblutbildes wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS-Calibur, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) zunächst zwei Populationen definiert wie in Abbildung 1 und 2 dargestellt (initial wurden hierfür 10.000 Events aufgezeichnet): die hämatopoetische Progenitorzellpopulation ( $CD34^+CD45^{low}SSC^{low}$ ) sowie die  $CD45^{neg}CD235^{neg}$  Zellen. Letztere Population erfasst Zellen im peripheren Blut, die nicht Leukozyten entsprechen ( $CD45^-$ ), jedoch auch keine Erythrozyten oder Normoblasten sind (negativ für Glykophorin A; CD235); allerdings ist eine Kontamination dieser Population durch apoptotische Zellen, Thrombozyten und Debris nicht ausgeschlossen.

Tabelle 1 – Färbekombination zur Bestimmung der Stammzellsubfraktionen im peripheren Blut

FITC	PE	PerCp	APC
CD45	CD34	CD235	-



Die Gatingstrategie zur weiteren Charakterisierung der hämatopoetischen und endothelialen Progenitorzellen ist in Abbildung 1 genauer dargestellt.

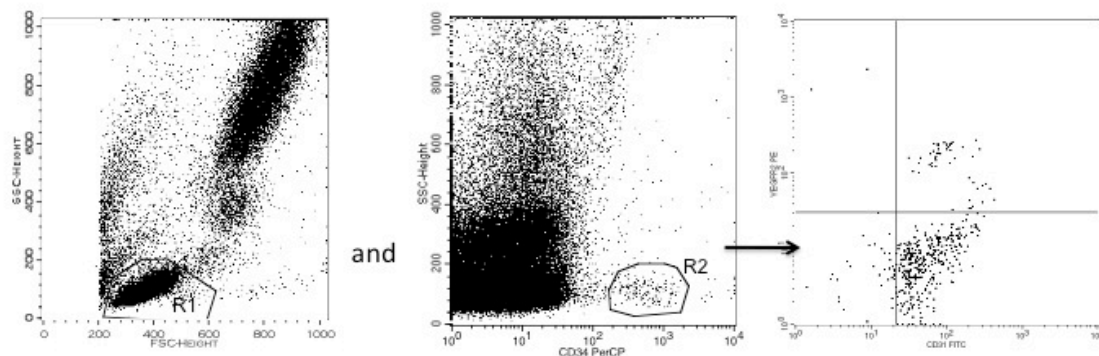


Abbildung 1: Gating-Strategie zur Identifizierung hämatopoetischer und endothelialer Stammzellen.

Neben einer Standardregion, die auf die Lymphozyten/Stammzellpopulation gelegt wurde (linke Grafik R1), wurden  $CD34^{pos}SSC^{low}$  Ereignisse erfasst (mittlere Grafik R2). Die Zielpopulation wurde durch Kombination dieser beiden Regionen definiert (R1 und R2) und in entsprechenden Punktwolkenendiagrammen auf die jeweiligen Markerexpressionen hin untersucht. Exemplarisch ist hier die VEGF-R2 und CD31 Expression nach körperlicher Belastung bei einem Kontrollprobanden dargestellt.

Die hämatopoetischen Progenitorzellen wurden in absoluten Zahlen pro  $\mu l$  angegeben. Der Absolutwert wurde anhand der Gesamtleukozytenzahl aus dem Häma-vollautomaten, dem prozentualen Anteil an Lymphozyten (beide Messungen: Advia 120, Siemens, Deutschland) sowie dem prozentualen Anteil der Progenitorzellen an der Lymphozytenpopulation (Wert aus der Durchflusszytometrie) errechnet.

In der Population der  $CD45^-CD235^-$  Zellen würden sich eventuell mesenchymale Stammzellen finden lassen, die Population ist jedoch nicht mit ihnen gleichzusetzen. Die Charakterisierung der sehr heterogenen Gruppe der MSCs ist schwierig wie bereits in der Einleitung beschrieben. In dieser Studie sollten insbesondere die MSCs untersucht werden, die zu einer Ausdifferenzierung in Atemwegsepithel fähig sind: Daher wurden folgende Marker zur Charakterisierung herangezogen: CD105, CD73, CD90, CD44, CD29, CD271, MSCA-1 [42, 52-54]. Mittels FACS-Analyse wurden diese Zellpopulationen vor und nach körperlicher Anstrengung untersucht um zu beurteilen, ob es zu einer vermehrten Ausschüttung ins periphere Blut kommt.

Nach Analyse der Fraktionen von  $CD34^+CD45^{low}$  und  $CD45^-CD235a^-$  wurde das restliche EDTA-Blut (6ml) mittels FICOLL-Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Mit Hilfe dieser Technik können die mononukleären Zellen (d.h. Lymphozyten und Monozyten) von den restlichen Blutbestandteilen (Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) getrennt werden. Vorversuche hatten ergeben, dass einige der in dieser Arbeit verwendeten Färbeantikörper wesentlich besser an ficollisierte Zellen binden als an Zellen aus Vollblut. Die mononukleären Zellen nach der FICOLL-Isolierung wurden folgendermaßen analysiert:

Tabelle 2 – Färbekombination der  $CD34^+$  Progenitorzellen (gated auf  $CD34^+/CD45^{low}$  – Events; siehe Abb. 1)

FITC	PE	PerCp	APC
CD45	CD133	CD34	CD38
CD31	VEGFR2	CD34	CD45

Tabelle 3 – Färbekombination mesenchymaler Progenitorzellen (gated auf  $CD45^-/CD235^-$  -Events; siehe Abb. 2)

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

Um ein statistisch verwertbares Ergebnis zu erhalten wurde ein sogenanntes "livegate" für die  $CD34^+/CD45^{low}$  und  $CD45^-/CD235^-$  - Population verwendet, und es wurden jeweils mindestens 100.000 Events aufgezeichnet, die diese Kriterien erfüllten (z.B. sowohl in R1 als auch in R2 gelegen). Für die Bestimmung der Antigenexpression wurde dann ein zweidimensionales Punktwolkendiagramm (Dot-Plots) verwendet, welches die Verteilung der jeweiligen Antigenexpressionen darstellte; dabei sollten mindestens 100 Ereignisse in dem jeweiligen Quadranten des Punktwolken-Diagramms zu finden sein. Trotz dieses Vorgehens konnten aufgrund der z.T. extrem niedrigen Frequenzen der gesuchten Zellen im Blut diese erwünschten Vorgaben nicht immer erreicht werden. Die Gating-Strategie für die

MSCs ist in Abbildung 2 nochmals detailliert dargestellt (identische Gates vor bzw. nach körperlicher Belastung).

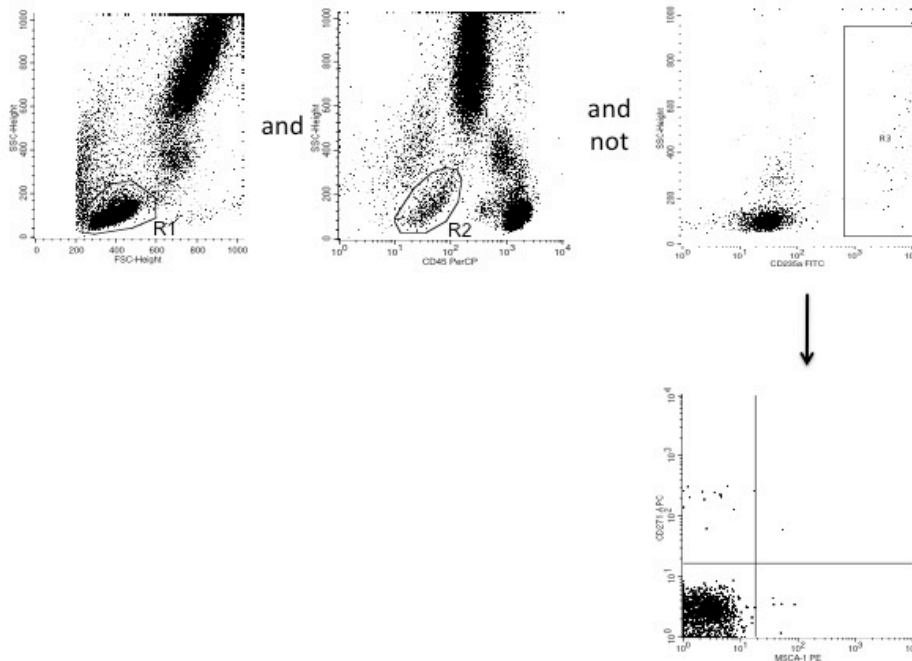


Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung mesenchymaler Stammzellen: Neben einer Standardregion, die auf die Lymphozyten/Stammzellpopulation gelegt wurde (linke Grafik R1) wurden  $CD45^{neg}/SSC^{low}$  Ereignisse unter Aussparung von Thrombozyten erfasst (mittlere Grafik R2). Zellen der erythrozytären Reihe wurden durch eine Negativregion auf CD235a ausgeschlossen (rechte Grafik R3). Die Zielpopulation wurde durch Kombination dieser drei Regionen definiert (R1 und R2 aber nicht R3) und in entsprechenden Punktwolkendiagrammen auf die jeweiligen Markerexpressionen hin untersucht. Exemplarisch ist hier die CD271 und MSCA-1 Expression nach körperlicher Belastung bei einem Patienten mit CF dargestellt

## 2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel, Version 2003 (Microsoft) sowie SPSS 20.0 (IBM). Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte mittels CellQuestPro (Fa. BectonDickinson, Heidelberg).

Für die Beschreibung des Probandenkollektivs wurden die Mediane sowie der Bereich (Range) der anthropometrischen Daten, Lungenfunktionswerte, Ergebnisse der Spiroergometrie und Laborwerte bestimmt. Tests auf Unterschiede zwischen Patienten mit Mukoviszidose sowie gesunden Probanden wurden aufgrund

der kleinen Stichprobe mittels nicht parametrischer Tests (Mann-Whitney-U-Test) durchgeführt. Die maximale Wattleistung sowie die maximale Sauerstoffaufnahme wurde nach Godfrey [50] bzw. Orenstein [55] in Prozent des Vorhersagewertes (%pred) ausgedrückt.

Die ermittelten relativen Häufigkeiten für die CD34<sup>+</sup> Zellen wurden durch Multiplikation mit der entsprechenden Leukozytenzahl (jeweils vor und nach körperlicher Belastung) in absolute Werte (Zellen/ $\mu$ l) umgerechnet.

Die Prozentwerte MSC repräsentieren den Anteil der CD45<sup>-</sup>/CD235<sup>-</sup>/SSC<sup>low</sup> Ereignisse (Gate wie in Abb. 2 dargestellt) an den Gesamtereignissen. Die MSC-Subpopulationen entsprechen dem jeweiligen Anteil (in %) der Marker-positiven Ereignisse (z.B. CD 105<sup>+</sup>) im ficollisierten Material an allen Ereignissen im MSC-Gate.

Die Analyse der Zellzahlveränderung nach maximaler Ausdauerleistung erfolgte mittels nicht-parametrischer Tests (Wilcoxon-Test). Zudem erfolgte die Berechnung von Änderungen (Zellzahl nach Spiroergometrie minus Zellzahl vor Spiroergometrie) aus den Laboranalysen vor bzw. nach der Belastung für die weiße Reihe des peripheren Blutbildes (Leukozyten, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten) sowie die endothelialen und mesenchymalen Progenitorzellen einschließlich der Subklassen. Zur Analyse einer möglicherweise unterschiedlichen Veränderung der Zellzahlen bei Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Probanden erfolgte ein Mann-Whitney-U-Test mit den berechneten Änderungen.

### 3 Ergebnisse

Die Charakteristika des Probandenkollektivs sind in Tabelle 4 dargestellt. Insgesamt nahmen 8 (5 mit CF) männliche und 8 (2 mit CF) weibliche Probanden teil.

Patienten mit CF waren signifikant jünger und leichter, hatten eine schlechtere Lungenfunktion sowie eine geringere Leistung und maximale Sauerstoffaufnahme in der Spiroergometrie als die gesunden Probanden.

Tabelle 4 – Charakteristika des Probandenkollektivs (Median (Range))

Variable	Patienten mit CF	Gesunde Probanden
Alter (Jahre)	22,2 (13-28)	25,5 (24-37) *
Größe (cm)	169 (161-179)	175 (164-190) <sup>n.s.</sup>
Gewicht (kg)	55 (43,5-68)	70 (55-85) **
FEV1 (%pred)	67,7 (39,9-102,2)	109,5 (102,2-125,6) ***
FVC (%pred)	78,5 (69,1-108,6)	108,5 (94,5-131,4) **
RV/TLC (%)	40,6 (20,9-52,4)	21,3 (16,6-31,6) *
Wmax (%pred)	92 (76-100)	108 (96-140) ***
VO <sub>2</sub> peak (%pred)	73 (58-98)	95 (76-109) **
max. Herzfrequenz (1/min)	168 (154-182)	175 (159-190) <sup>n.s.</sup>
Respiratorischer Quotient bei max. Belastung	1,22 (1,17-1,31)	1,29 (1,21-1,45) <sup>n.s.</sup>
CRP (mg/dl) (Ruhemessung)	0,52 (0,10-2,33)	0,07 (0,04-0,44) *
IgG (U/l) (Ruhemessung)	1173 (941-1550)	925 (750-1290) *
Laktat (mg/dl) nach Belastung	6,6 (5,4-9,8)	10,6 (6,6-13,1) **
Veränderung des Plasmavolumens nach Belastung (%)	-10,1 (-2,3 bis -21,8)	-9,2 (-1,3 bis -13,4) <sup>n.s.</sup>

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

Das gesunde Kollektiv war leistungsfähiger als die Patienten mit CF, gemessen an der maximalen Leistungsfähigkeit sowie der maximalen Sauerstoffaufnahme. Be-

zöglich der maximalen Herzfrequenz und dem respiratorischen Quotient fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Nach der Belastung zeigten die gesunden Probanden jedoch signifikant höhere Laktatwerte.

Die Blutbildwerte vor der Spiroergoemtrie sind in Tabelle 5 dargestellt. Es fand sich eine signifikant höhere Gesamtleukozytenzahl sowie eine größere Absolutzahl der Monozyten bei den Patienten mit Mukoviszidose. Bzgl. der relativen Zellverteilung ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 5 – Blutbild inklusive Differenzierung der Leukozyten (Ruhemessung; Median (Range))

Parameter	Patienten mit CF	Gesunde Probanden
Leukozyten/ $\mu$ l	6250 (4970-10590)	4790 (3480-5930) **
Neutrophile (%)	62,0 (42,8-80,3)	59,5 (49,9-72,1) <sup>n.s.</sup>
Neutrophile/ $\mu$ l	3875 (2388-8387)	2670 (1879-4275) <sup>n.s.</sup>
Lymphozyten (%)	27,4 (8,9-41)	29,3 (18,9-40,5) <sup>n.s.</sup>
Lymphozyten/ $\mu$ l	1712 (943-2287)	1322 (1062-1940) <sup>n.s.</sup>
Monozyten (%)	6,8 (4,2-9,0)	5,8 (4,3-6,5) <sup>n.s.</sup>
Monozyten/ $\mu$ l	425 (338-804)	273 (164-316) ***

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

Bei der Analyse des Blutbildes nach Belastung (Werte siehe Tabelle 6) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl um ca. 3000 Leukozyten/ $\mu$ l (= 42% des Ausgangswertes) in beiden Gruppen ( $p=0,000$ ), mit Anstieg von Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten im Differentialblutbild.

Tabelle 6 – Blutbild inklusive Differenzierung der Leukozyten (10 Minuten nach Ende der Belastung; Median (Range))

Parameter	Patienten mit CF	Änderung zur Ruhemessung (CF)	Gesunde Probanden	Änderung zur Ruhemessung (gesunde Probanden)
Leukozyten/ $\mu$ l	8550 (6860-19580)	+2300 (580-8990)	7440 (5460-8890) ***	+2320 (1320-4100)
Neutrophile (%)	58,4 (44,04-80,1)		56,25 (40,9-65,8) **	
Neutrophile/ $\mu$ l	4993 (3046-14998)	+1133 (446-6611)	3682 (3069-5606) ***	+1211 (308-1331)
Lymphozyten (%)	31,5 (12,2-39,7)		32,4 (23-49,5) ***	
Lymphozyten/ $\mu$ l	2616 (1350-2737)	+872 (190-1446)	2313 (1800-4400) ***	+839 (621-2460)
Monozyten (%)	6,1 (2,9-9,5)		6,3 (4,6-7,3) <sup>n.s.</sup>	
Monozyten/ $\mu$ l	592 (276-1272)	+99 (-99-467)	430 (289-558) ***	+175 (122-281)

Signifikanzniveau bzgl. Unterschieden zwischen den Gruppen: \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; n.s.: nicht signifikant.

In der Gruppe der Patienten mit CF stieg die Leukozytenzahl insgesamt um 37% an. Im Differentialblutbild kam es zu einem Anstieg der Neutrophilenzahl um 29%, der Lymphozytenzahl um 53% und der Monozytenzahl um 39%. Bei den gesunden Probanden stieg die Gesamtleukozytenzahl um 55%, die Neutrophilenzahl um 38%, die Lymphozytenzahl um 75% und die Monozytenzahl um 57% an. Zwischen den Patienten mit CF und den gesunden Probanden fand sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anstiegs der Zellzahlen nach Belastung (Leukozyten, Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten), wie in Abbildung 3 dargestellt.

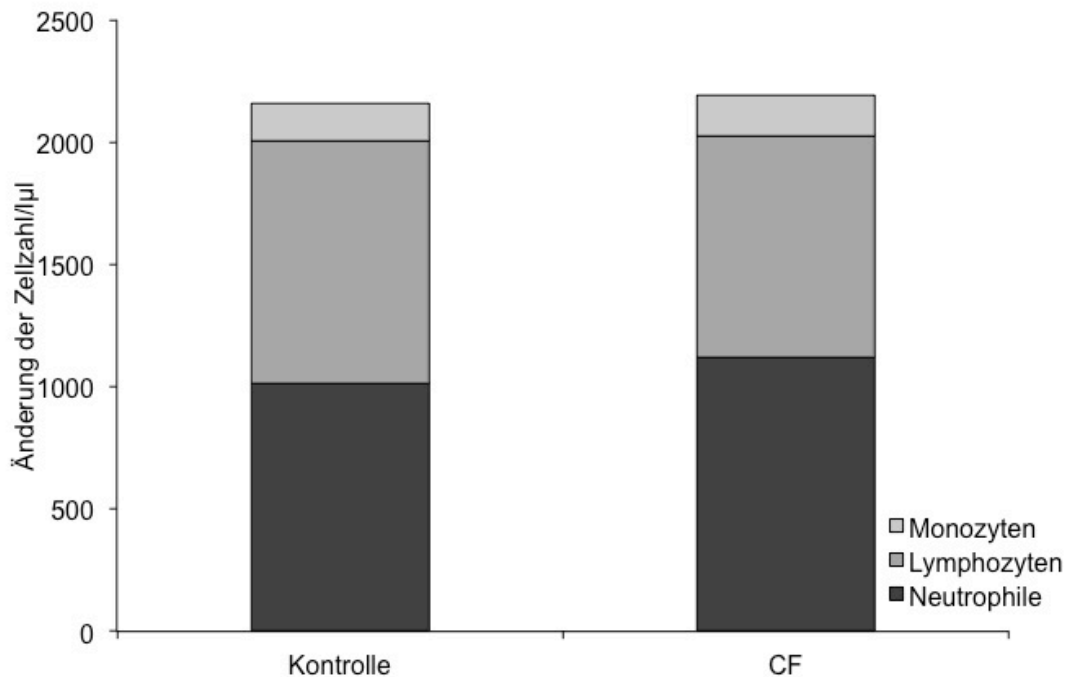


Abbildung 3: Änderungswerte der Zellzahlen pro  $\mu\text{l}$  der Leukozytensubgruppen durch körperliche Belastung bei den gesunden Probanden (links) sowie den Patienten mit CF (rechts)

Die Werte der  $\text{CD}34^+$  Stammzellen vor und nach Spiroergometrie sind in Tabelle 7 dargestellt. In der Ruhemessung fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit CF und gesunden Probanden. Die  $\text{CD}34^+$  Progenitorzellen stiegen bei den gesunden Probanden um 15% an, bei den Patienten mit CF um 118%.



Tabelle 7 – CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen vor und nach körperlicher Belastung bei Patienten mit CF und gesunden Probanden. Die angegebenen Werte sind Median (Range).

Parameter	Patienten mit CF		Gesunde Probanden	
	Ruhe	Belastung	Ruhe	Belastung
CD34 <sup>+</sup> /μl	2,2 (1,0-9,8)	4,8 (1,3-5,9)	2,6 (1,5-3,9)	3,0 (1,4-6,7)
CD34 <sup>+</sup> /CD133 <sup>+</sup> (%)	40,0 (27,5-92,5)	66,7 (48,7-90,3)	64,2 (18,1-100)	66,0 (40,7-91,2)
CD34 <sup>+</sup> /CD31 <sup>+</sup> (%)	82,3 (34,8-100)	85,7 (72,4-97,9)	87,9 (36,3-100)	90,9 (50-100)
CD34 <sup>+</sup> / VEGFR2 <sup>+</sup> (%)	5,5 (0-17,4)	2,75 (0-26)	5,0 (0-18,3)	2,7 (0-33)

# % der CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen

Nach körperlicher Belastung zeigte sich im gesamten Probandenkollektiv ein signifikanter Anstieg der CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen ( $p=0,020$ ). In den relativen Konzentrationen der CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen, wozu auch die endothelialen Progenitorzellen zählen, wurden aber keine Effekte der Belastung beobachtet. Zur Beurteilung von Unterschieden zwischen Patienten mit CF und gesunden Probanden wurde, wie bereits im Methodenteil dargestellt, die Zellzahländerungen der einzelnen Zellpopulationen berechnet und mittels Mann-Whitney-U-Test der Gruppenvergleich berechnet. Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit Mukoviszidose und gesunden Probanden bezüglich des Anstiegs der CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen und der Veränderungen in der Verteilung ihrer Subgruppen.

Die relativen Häufigkeiten der mesenchymalen Progenitorzellen sind in Tabelle 8 abgebildet. Es fand sich kein Unterschied zwischen Patienten mit CF und gesunden Probanden vor der körperlichen Belastung außer bei den CD 271<sup>+</sup> Progenitorzellen; dort hatten die Patienten mit Mukoviszidose eine höhere Anzahl CD 271<sup>+</sup>-Zellen ( $p= 0,009$ ).

Tabelle 8 – mesenchymale Progenitorzellen vor und nach körperlicher Belastung bei Patienten mit CF und gesunden Probanden. Die angegebenen Werte sind Median (Range).

Parameter	Patienten mit CF		Gesunde Probanden	
	Ruhe	Belastung	Ruhe	Belastung
MSC (%) <sup>#</sup>	1,0 (0,5-2,0)	1,2 (0,5-2,2)	1,3 (0,9-6,6)	1,2 (0,8-4,3)
CD29 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	80,2 (51,0-95,0)	71,8 (19,7-88,6)	81,2 (25,0-98,0)	64,0 (12,6-95,4)
CD44 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	2,1 (0-7)	1,1 (0-14,7)	1,6 (0-20,0)	1,0 (0,1-24,3)
CD73 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	1,1 (0-10,7)	4,4 (0,3-25,0)	4,1 (0,6-10,8)	1,5 (1-5)
CD90 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	1,5 (0-3,2)	2,5 (0-12,2)	0,5 (0,1-1,7)	1,0 (1,0-2,4)
CD105 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	0,6 (0-3,1)	0,4 (0,2-7,9)	0,6 (0,1-4,2)	0,5 (0,2-2,6)
CD271 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	0,6 (0-2)	0,3 (0-0,8)	0	0,3 (0-1,5)
MSCA-1 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>	0,4 (0-3,4)	0,3 (0-3,0)	0,5 (0-3,7)	1,4 (0-3,0)

<sup>#</sup> % der CD45<sup>-</sup>CD235<sup>-</sup>SSC<sup>low</sup> gateden Zellen

<sup>\*</sup> % der MSC

Bei den MSCs zeigte sich bzgl. der relativen Anzahl der Events in der FACS-Analyse weder in der Analyse der Gesamt Ereignisse im Zielgate (siehe Abb. 2) noch in den Analysen der einzelnen Subpopulationen (z.B. CD105<sup>+</sup>) signifikante Veränderungen nach maximaler Ausdauerleistung.

Bei den MSCs, die positiv waren für CD73, fand sich ein Abfall der Events für die gesunde Population, während es bei den Patienten mit CF in Folge der Belastung zu einem Anstieg der Events kam. Dies ist in der Abbildung 4 dargestellt.

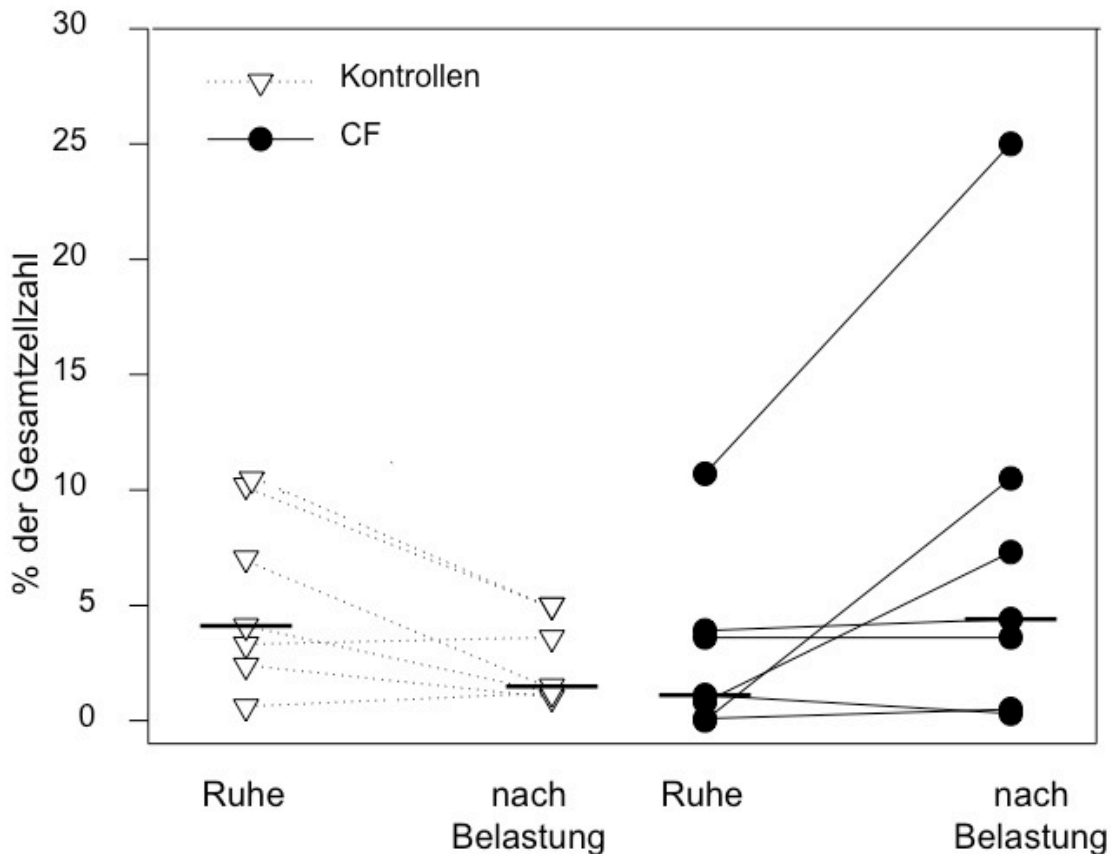


Abbildung 4: MSC CD73<sup>+</sup>, in Ruhe und nach Belastung (links gesunde Probanden, rechts Patienten mit CF). Der Median ist jeweils durch einen waagerechten Balken gekennzeichnet.

Bei den CD 271<sup>+</sup> Zellen zeigte sich ein umgekehrter Effekt (siehe Abbildung 5): Hier stiegen die Werte in der Kontrollgruppe mehrheitlich an, während sie bei den Patienten mit CF abfielen.

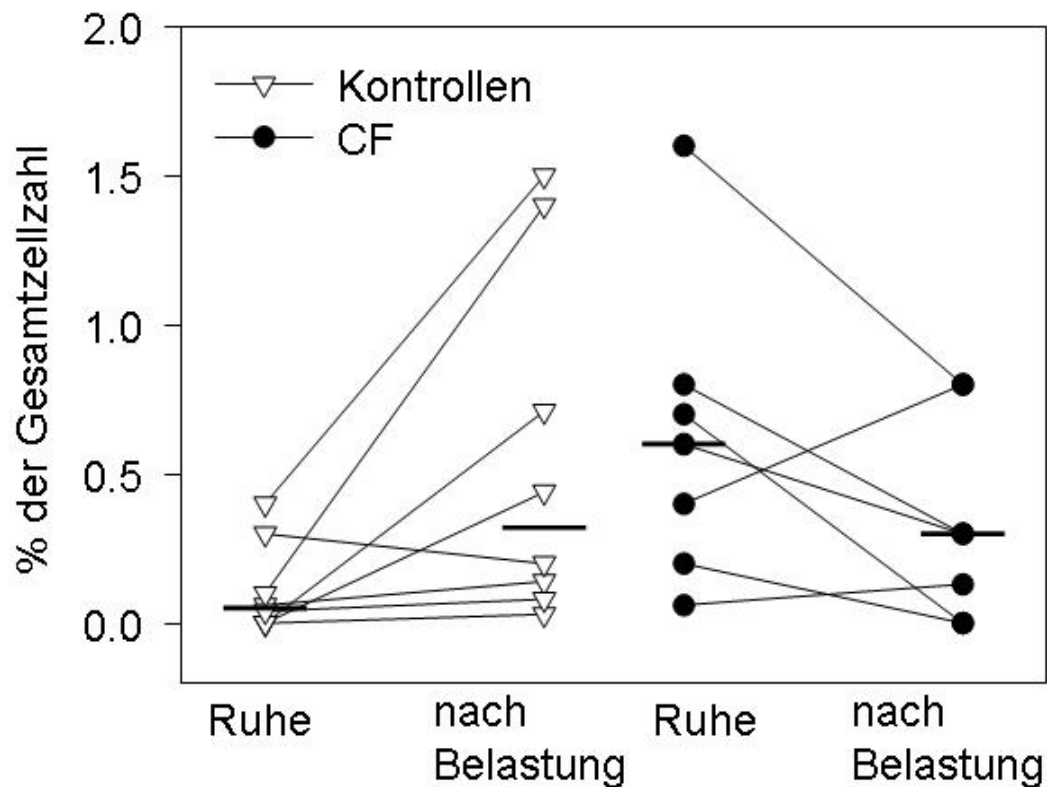


Abbildung 5: Relativer Anteil der MSC CD271<sup>+</sup> Zellen in Ruhe und nach Belastung (links gesunde Probanden, rechts Patienten mit CF). Der Median ist jeweils durch einen waagerechten Balken gekennzeichnet.

Zum Vergleich der gesunden Probanden mit den Patienten mit CF in den einzelnen Subpopulationen der MSCs erfolgte die Berechnung der Differenz zwischen den Werten vor und denen nach körperlicher Belastung und der Vergleich dieser mittels Mann-Whitney-U-Test. Hier fanden sich signifikante Unterschiede in der Veränderung der Zellzahl durch körperliche Anstrengung bei Patienten mit CF und gesunden Probanden für die CD73<sup>+</sup> ( $p=0,017$ ) und CD271<sup>+</sup> MSCs ( $p=0,014$ ).

Exemplarisch zeigt die folgende Abbildung 6 die Werte für CD271<sup>+</sup>/MSCA-1<sup>+</sup> MSCs für einen Patienten mit CF sowie einen gesunden Probanden in dotplots.

gated auf:  
Lymphozyten-Region  
CD45low  
CD235neg

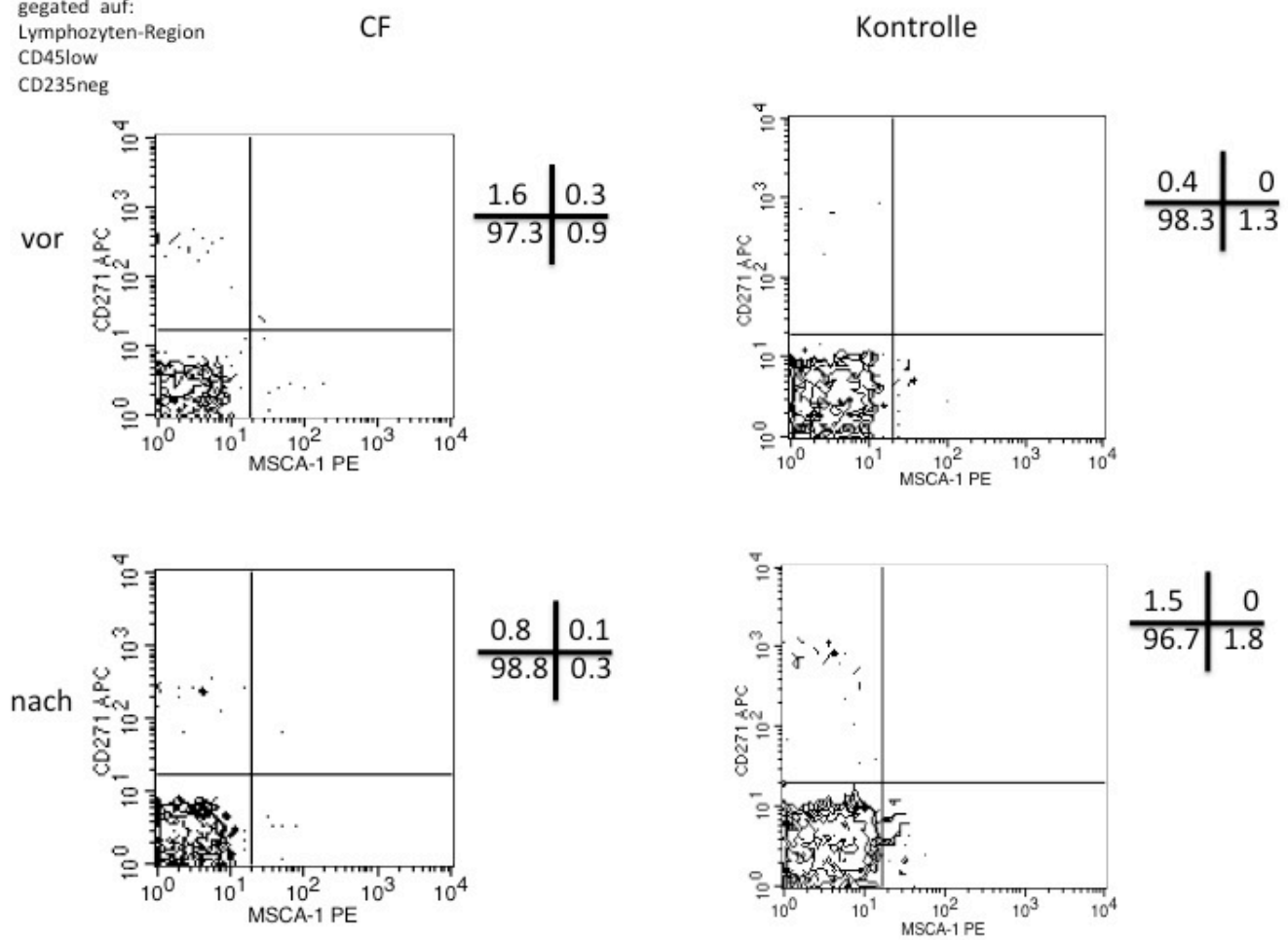


Abbildung 6: CD271 und MSCA-1 positive MSCs, exemplarisch an einem gesunden Probanden sowie einem Patienten mit CF vor sowie nach körperlicher Belastung.

## 4 Diskussion

Die hier beschriebene Studie untersuchte den Einfluss einer maximalen körperlichen Belastung auf die Anzahl zirkulierender hämatopoetischer und mesenchymaler Progenitorzellen bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit Mukoviszidose.

### 4.1 Beurteilung der Ergebnisse der Spiroergometrie

Zur Beurteilung einer möglichst maximalen Anstrengung in der Spiroergometrie erfolgte neben der Messung der maximalen Leistung und der maximalen Sauerstoffaufnahme die Bestimmung der maximalen Herzfrequenz, des respiratorischen Quotienten sowie des Laktatspiegels nach Belastung. Im Vergleich der Patienten mit Mukoviszidose mit den gesunden Probanden fiel auf, dass die Patienten mit Mukoviszidose einen signifikant niedrigeren Laktatspiegel erreichten; in Bezug auf die Herzfrequenz und den respiratorischen Quotienten zum Zeitpunkt der maximalen Anstrengung fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, so dass von einer Ausbelastung auch bei den Patienten mit Mukoviszidose ausgegangen werden kann. Die krankheitsbedingten Einschränkungen bei körperlicher Belastung spiegeln sich in einer signifikant niedrigeren maximalen Leistung und Sauerstoffaufnahme wieder. Eine eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit bei Patienten mit CF ist gut bekannt, die Antwort auf eine maximale Anstrengung bei geringerer Leistung jedoch mit einem gesunden Kollektiv vergleichbar [56]. Die Ursache für den niedrigeren Laktatspiegel der Patienten mit CF im Kollektiv dieser Studie im Anschluss an die maximale Belastung ist unklar. Moorcroft et al. konnten in einem Kollektiv von 104 Patienten mit CF und 27 gesunden Kontrollen zeigen, dass nach maximaler Anstrengung kein Unterschied im Laktatspiegel bestand [56], so dass der in dieser Studie vorliegende Unterschied möglicherweise auch in der geringen Fallzahl begründet liegt.

In den Charakteristika des Studienkollektivs zeigte sich, dass die Patienten mit CF signifikant leichter waren als die Probanden der Kontrollgruppe, möglicherweise erklärbar durch das jüngere Alter der Patienten mit CF, allerdings auch gut vereinbar mit einem reduzierten Ernährungszustand, wie er oft Teil der Grunderkrankung ist.

## 4.2 Veränderungen der Zellzahlen im Blutbild in Folge körperlicher Belastung

Ein Anstieg der Leukozytenzahl durch eine einzelne intensive körperliche Belastung ist in der Literatur vielfach beschrieben, siehe beispielsweise das Review von Walsh et al. [23]. Bei Patienten mit CF wurde sogar eine überschießende Reaktion mit überproportionalem Leukozytenanstieg im Vergleich zu gesunden Probanden berichtet [22]. Dies konnte in der hier vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Zwar stiegen auch die Leukozytenzahlen der Patienten mit CF deutlich nach Belastung an, jedoch nicht signifikant mehr als die der gesunden Probanden.

Um den Anstieg der Zellzahlen besser beurteilen zu können, erfolgte die Berechnung der Plasmavolumenänderung in Folge der Belastung. Der Median für die Veränderung des Plasmavolumens lag bei Gesunden und Patienten mit CF bei knapp 10%. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die auch eine Veränderung des Plasmavolumens von ca. 10% nach maximaler Belastung beschrieben [57]. Durch die Hämokonzentration kann der in der aktuellen Studie beobachtete Anstieg der Zellzahl für Leukozyten inklusive der Subpopulationen und der CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen sicherlich nicht ausschließlich erklärt werden.

## 4.3 Effekte körperlicher Belastung auf endotheliale und hämatopoetische Progenitorzellen

In den letzten Jahren sind, wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, eine Vielzahl an Untersuchungen zum Effekt von körperlicher Aktivität auf Progenitorzellen durchgeführt worden. In der aktuellen Studie konnte ein Anstieg der CD34<sup>+</sup>-Zellen nach maximaler Belastung nachgewiesen werden, wobei sowohl die Patienten mit CF als auch die gesunden Probanden eine signifikante Zunahme der Absolutzahl der CD34<sup>+</sup> Zellen pro  $\mu\text{l}$  aufwiesen. Dieser Anstieg lag in der Gesamtstichprobe bei ca. 70%. Andere Studien [37, 38] konnte zudem einen Anstieg der endothelialen Stammzellen nach körperlicher Anstrengung nachweisen. Dort waren jeweils gesunde, gut trainierte Probanden untersucht worden. Möglicherweise führt regelmäßige körperliche Aktivität zu einer besseren Mobilisation endothelialer Progenitorzellen durch körperliche Belastung (siehe beispielsweise [29, 31]). Daten zum

Anstieg CD34<sup>+</sup> Zellen nach Belastung bei Patienten mit CF sind bislang nicht publiziert.

Es wird diskutiert, dass der positive Effekt von Sport in der Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen zumindest teilweise mit einer vermehrten Freisetzung von CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen durch körperliche Aktivität zusammenhängt. Neben anderen Autoren konnten Shalaby et al. [58] zeigen, dass sowohl aerobes als auch anaerobes Training die Anzahl zirkulierender CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen um ein Vielfaches steigern kann. Auch gibt es erste Studien, die zeigen, dass auch bei Kindern und Jugendlichen nicht nur durch kurze maximale Anstrengung, sondern auch durch regelmäßige körperliche Aktivität die Anzahl der endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut ansteigt. Dies gilt insbesondere für übergewichtige Kinder und Jugendliche [31, 32]. Park et al. [31] konnten zeigen, dass bei übergewichtigen Kindern nach einem 12-wöchigen kombinierten Kraft-/Ausdauertraining dreimal pro Woche nicht nur die Anzahl der CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant angestiegen war; eine Messung der Intima-Media Dicke der A. carotis externa (als Marker für eine beginnende endotheliale Schädigung) zeigte in der Studiengruppe einen signifikanten Rückgang, der möglicherweise durch stammzellinduzierte Reparaturvorgänge zu erklären ist.

Im Tierversuch fanden Fernandes et al. [26] bei hypertensiven Ratten nicht nur einen Anstieg der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen nach 10 Wochen Ausdauertraining, sondern zudem einen Rückgang der arteriellen Hypertension sowie eine vermehrte Kapillaraussprossung als Ausdruck eines endothelialen Reparaturmechanismus.

Neben dem Effekt der endothelialen Progenitorzellen auf das kardiovaskuläre System wird zunehmend auch ihre Rolle bei anderen chronischen Erkrankungen diskutiert. Huertas et al. [36] beschreiben in einem Review, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, Diabetes mellitus, chronischem Nierenversagen und zerebralem Insult eine verminderte Anzahl von endothelialen Progenitorzellen aufweisen und diese auch in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Bei Patienten mit COPD scheint eine chronische Inflammationsreaktion mitverantwortlich für eine erniedrigte Anzahl endothelialer Progenitorzellen zu sein. Im Lungengewebe von



Patienten mit COPD fand sich eine deutlich erhöhte Anzahl von apoptotischen Zellen, so dass offensichtlich in hohem Maße endotheliale Progenitorzellen für Reparaturmechanismen benötigt werden [36]; diese sind daher möglicherweise konsekutiv im peripheren Blut erniedrigt. Insgesamt scheint eine erniedrigte Anzahl zirkulierender endothelialer Stammzellen Ausdruck von Krankheitsaktivität zu sein und auf eine systemische Inflammation mit Apoptose im Lungen-, aber auch Muskelgewebe mit einer zunehmenden Erschöpfung der regenerierenden Ressourcen hinzuweisen [36, 59, 60].

In unserer Stichprobe fand sich bei den Mukoviszidosepatienten vor und nach Belastung keine signifikant erniedrigte Anzahl an CD34<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu den gesunden Probanden, allerdings waren die Patienten mit einer medianen FEV1 von 64% des Vorhersagewertes pulmonal nur mittelschwer beeinträchtigt. Eine Analyse der endothelialen Progenitorzellen bei pulmonal schwer kranken Patienten mit Mukoviszidose wäre sicherlich interessant um dieser Fragestellung weiter nachzugehen.

Ein schlechter Ernährungsstatus repräsentiert durch einen niedrigen body mass index (BMI) scheint auch mit einer niedrigeren Anzahl endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit COPD assoziiert [34]. Die Ursache hierfür ist nicht hinreichend geklärt, möglich scheint eine mäßige Knochenmarkinsuffizienz auf dem Boden von erhöhten Zytokinkonzentrationen von beispielsweise Tumornekrosefaktor alpha. Bei den Patienten der aktuellen Studie lag, zumindest ausgehend von den Werten des peripheren Blutbildes, keine offensichtliche Knochenmarkinsuffizienz vor, allerdings war das Patientenkollektiv für Patienten mit CF relativ gesund.

**4.4 Effekte körperlicher Belastung auf mesenchymale Progenitorzellen**  
Schmidt et al. [43] konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass durch einen maximalen Belastungstest die Migrationsaktivität von MSCs anstieg, unter anderem konnte ein signifikanter Anstieg von Interleukin 6 und Interleukin 8 nachgewiesen werden. Insbesondere für Interleukin 6 ist bekannt, dass durch vermehrte Ausschüttung die Migrationsaktivität und Mobilität von MSCs erhöht wird. Daneben scheint Interleukin 6 maßgeblich für den anti-inflammatorischen Effekt regelmäßiger körperlicher Aktivität verantwortlich zu sein, welcher möglicherweise durch eine vermehrte

Ausschüttung von MSCs und damit verbesserten Reparaturvorgängen im Gewebe hervorgerufen wird. Trotz der erhöhten Zytokine durch körperliche Anstrengung konnte jedoch in den Zellkulturen keine erhöhte Anzahl an MSCs nach Belastung nachgewiesen werden [43].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die relative Konzentration von MSCs vor sowie nach körperlicher Belastung gemessen. Es fand sich keine relative Konzentrationsänderung der zirkulierenden MSCs bei insgesamt sehr niedriger Konzentration von MSCs im peripheren Blut, allerdings zeigen sich die oben beschriebenen Unterschiede zwischen Patienten mit CF und gesunden Probanden in den CD73<sup>+</sup> und CD271<sup>+</sup> Subgruppen. Die unterschiedliche Wirkung körperlicher Aktivität auf die Verteilung von CD271<sup>+</sup> und CD73<sup>+</sup> MSCs bei Patienten mit CF und gesunden Probanden kann nicht hinreichend erklärt werden.

CD271 ist ein Oberflächenmarker, der auf Zellen exprimiert mit, die Tumornekrosefaktor alpha Rezeptoren aufweisen. *In vitro* sezernieren CD271<sup>+</sup> Zellen immun-suppressive (Interleukin-10) wie auch pro-inflammatorische (Interferon-gamma, Tumornekrosefaktor-alpha) Zytokine und scheinen *in vivo* für eine vermehrte Ausdifferenzierung von T-Zellen und NK-Zellen verantwortlich zu sein [61].

Extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) hat auf vielen Zellen des Immunsystems pro-inflammatorische Wirkung [62]. Durch Dephosphorylierung von ATP zu Adenosin erfolgt die Kontrolle dieses Signalwegs, da Adenosin wiederum anti-inflammatorische Wirkung hat. Diese Dephosphorylierung wird neben CD39 auch von CD73 maßgeblich kontrolliert. CD73 ist in regulatorischen T-Zellen vor allem intrazellulär zu finden, kann jedoch bei Bedarf als Ektoenzym auf der Oberfläche präsentiert werden und dann zu einer erhöhten Umwandlung von Adenosinmonophosphat (AMP) zu Adenosin führen. Das wiederum geht mit einer anti-inflammatorischen Wirkung einher [63].

Möglicherweise spielt die chronische Inflammation und damit ein anderes Zytokinprofil sowie eine vermehrte Zytokinausschüttung bei den Patienten mit CF eine Rolle. Ein zufälliger Unterschied scheint jedoch aufgrund der geringen Stichprobe

auch möglich. Hier sind weitere Untersuchungen mit größerer Stichprobenzahl sowie qualitativer Analyse der Zellen in Zellkulturen notwendig.

Auffallend in der Analyse der MSC-Subpopulationen ist ein sehr hoher Anteil an CD29<sup>+</sup>-Zellen. Dieser hohe Anteil rekrutiert sich wahrscheinlich aus Thrombozyten und Debris, so dass dies keine echte MSC-Subpopulation darstellt. In einer Folge-studie sollte bei der Charakterisierung dieser Zellen deshalb zusätzlich ein Thrombozytenmarker bei der Färbung der Zellen mitberücksichtigt werden.

In den meisten Studien werden MSCs aus dem Knochenmark gewonnen, wo sie in höherer Anzahl repräsentiert sind. Im peripheren Blut ist die Messung durch die niedrige Zellzahl erschwert, so dass immer wieder kontrovers über die Methoden der Messung und Stammzellgewinnung diskutiert wird [64]. Bislang gibt es kaum Daten zur Quantifizierung von MSCs im peripheren Blut sowie zu eventuellen Veränderungen der Anzahl unter körperlicher Belastung.

Mehrheitlich stammt das Wissen über MSCs aus Studien an Zellkulturen sowie Daten aus Tierversuchen. Wang et al. konnten nachweisen, dass MSCs zu Epithelzellen der Atemwege differenzieren können. Weiterhin konnten MSCs von Patienten mit CF *ex vivo* genkorrigiert werden und unter experimentellen Bedingungen zu einer Verbesserung der Chloridsekretion in der Zellkultur beitragen [65]. Insgesamt herrscht jedoch kein Konsens, wie genau MSCs, die zu Atemwegsepithelzellen ausdifferenzieren können, charakterisiert sind und ob eine beispielsweise intravenöse Gabe wirklich eine therapeutische Option darstellt. Loebinger et al. fassen in einem Review zusammen, dass es nach Gabe exogener MSCs zwar zu einem Engraftment der Zellen in der Lunge kommt, jedoch nur bei einem sehr geringen Anteil der Zellen. Dennoch scheinen MSCs eine gewisse Rolle bei Reparaturvorgängen nach Lungenverletzung zu spielen; so kam es im Mausmodell nach Bleomycin-induzierter Lungenfibrose zu einem Rückgang der Fibrose nach exogen zugeführten MSCs [30].

Die chronische Inflammation in der Lunge von Mukoviszidosepatienten schlägt sich zwar in einer signifikant höheren Leukozytenzahl nieder, eine Veränderung in der Konzentration von zirkulierenden MSCs konnte jedoch nicht gefunden werden.

Auch nach körperlicher Belastung konnte diesbezüglich kein wegweisender Befund erhoben werden.

#### 4.5 Fazit

Insgesamt konnte diese Studie zeigen, dass auch Patienten mit Mukoviszidose unter körperlicher Anstrengung einen deutlichen Anstieg CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen aufweisen, welche höchstwahrscheinlich an körpereigenen Reparaturvorgängen beteiligt sind. Diese Befunde können ein weiteres Argument für regelmäßige körperliche Aktivität sein. Möglicherweise trägt die Aktivität dazu bei, bei einer Krankheit, die mit zunehmenden Umbauvorgängen in verschiedenen Geweben einhergeht, diese möglichst lange durch körpereigene Reparaturmechanismen heraus zu zögern. Sport, einhergehend mit einer vermehrten Zirkulation von CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen, scheint dazu einen Beitrag leisten zu können.

Die Rolle zirkulierender mesenchymaler Stammzellen ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt, wohl auch aufgrund der Vielfalt von Subpopulationen und ihrer geringen Konzentration im peripheren Blut. Erste Studien zeigen, dass auch mesenchymale Stammzellen offensichtlich eine Rolle bei Reparaturvorgängen spielen, die genauen Mechanismen sind jedoch noch ungeklärt. Auch die Reaktion von MSCs auf körperliche Aktivität bedarf weiterer Studien, nicht nur im Hinblick auf quantitative Veränderungen, sondern insbesondere in Bezug auf Charakterisierung der Zellen und mögliche Homing Mechanismen.

## 5 Zusammenfassung

Mukoviszidose als häufigste der seltenen Erkrankungen ist trotz intensiver Forschung und Behandlungsmöglichkeiten nach wie vor mit einer deutlich verkürzten Lebenserwartung assoziiert. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass körperliche Aktivität einen wichtigen Beitrag nicht nur zur Lebensqualität von Mukoviszidosepatienten leisten kann, sondern auch einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf als solches hat. Die genauen Mechanismen des positiven Effekts von Sport auf den Krankheitsverlauf sind jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Neben vielen anderen Mechanismen wie verbesserter Sekretelimination aus den Atemwegen, Training des Herz-Kreislaufsystems und Regulierung der überaktiven epithelialen Natriumkanäle wird zunehmend auch ein Anstoßen von Reparaturmechanismen durch Sport diskutiert. Dabei scheinen  $CD34^+$ -Progenitorzellen und MSCs eine Rolle spielen zu können.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine maximale Ausdauerbelastung die Anzahl zirkulierender  $CD34^+$ -Progenitorzellen und mesenchymaler Progenitorzellen im peripheren Blut verändert, was sekundär mit Reparaturvorgängen im Lungengewebe assoziiert sein könnte. Hierfür wurde bei 7 Patienten mit Mukoviszidose sowie 9 gesunden Probanden eine Spiroergometrie bis zur subjektiven Erschöpfung und vor sowie zehn Minuten nach Beendigung der Aktivität eine Blutentnahme durchgeführt. Neben einer Analyse des Blutbildes inklusive Differenzierung und Bestimmung von Entzündungsparametern erfolgte mittels Durchflusszytometrie die Quantifizierung von  $CD34^+$  und mesenchymalen Progenitorzellen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der  $CD34^+$  Progenitorzellen in beiden Studiengruppen nach Belastung, während die mesenchymalen Stammzellen keine signifikante Änderung der Anzahl zeigten.

Der Anstieg der  $CD34^+$ -Progenitorzellen nach körperlicher Belastung ist in der Literatur mehrfach beschrieben und wird als eine Erklärung für die Prävention von Herz-Kreislaufkrankungen durch Sport genannt. Auch bei akuten wie chronischen Lungenerkrankungen scheinen hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen eine Rolle bei Reparaturvorgängen zu spielen. Die Rolle der mesenchymalen Stammzellen ist dagegen noch nicht hinreichend geklärt. Insgesamt er-

schwert die Heterogenität der Gruppe der mesenchymalen Stammzellen eine genaue Quantifizierung, ihr geringes Vorkommen im peripheren Blut stellt eine weitere Schwierigkeit bei der Charakterisierung und Quantifizierung dar. Nachdem zumindest der Nachweis von ansteigenden endothelialen Progenitorzellen auch bei Patienten mit Mukoviszidose gelingt, sollte in weiteren Studien die Rolle der mesenchymalen Stammzellen weiter untersucht werden. Insbesondere die Charakterisierung der Zellen in der Zellkultur sowie eine Untersuchung von Zytokinen, die für ein Homing von mesenchymalen Stammzellen verantwortlich sein könnten, scheint wesentlich, um den Mechanismus der Reparaturvorgänge besser zu verstehen und so möglicherweise die Therapie der Mukoviszidose zu erweitern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Klinger K. Genetics of cystic fibrosis. *Semin Respir Med* 1985(9):243-51.
2. Selvadurai HC, Blimkie CJ, Cooper PJ, Mellis CM, Van Asperen PP. Gender differences in habitual activity in children with cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2004 Oct;89(10):928-33.
3. Lands LC, Heigenhauser GJ, Jones NL. Analysis of factors limiting maximal exercise performance in cystic fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Oct;83(4):391-7.
4. de Meer K, Gulmans V, van der Laag J. Peripheral muscle weakness and exercise capacity in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999(159):748-54.
5. van de Weert-van Leeuwen PB, Slieker MG, Hulzebos HJ, Kruitwagen CL, van der Ent CK, Arets HG. Chronic infection and inflammation affect exercise capacity in cystic fibrosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2012 Apr;39(4):893-8.
6. Hebestreit H, Kieser S, Junge S, Ballmann M, Hebestreit A, Schindler C, et al. Long-term effects of a partially supervised conditioning programme in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2010 Mar;35(3):578-83.
7. Hebestreit H, Kieser S, Rudiger S, Schenk T, Junge S, Hebestreit A, et al. Physical activity is independently related to aerobic capacity in cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2006 Oct;28(4):734-9.
8. Selvadurai HC, Blimkie CJ, Meyers N, Mellis CM, Cooper PJ, Van Asperen PP. Randomized controlled study of in-hospital exercise training programs in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2002 Mar;33(3):194-200.

9. Schneiderman-Walker J, Pollock SL, Corey M, Wilkes DD, Canny GJ, Pedder L, et al. A randomized controlled trial of a 3-year home exercise program in cystic fibrosis. *J Pediatr*. 2000 Mar;136(3):304-10.
10. Urquhart D, Sell Z, Dhouieb E, Bell G, Oliver S, Black R, et al. Effects of a supervised, outpatient exercise and physiotherapy programme in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2012 Dec;47(12):1235-41.
11. Nixon PA, Orenstein DM, Kelsey SF, Doershuk CF. The prognostic value of exercise testing in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 1992 Dec 17;327(25):1785-8.
12. Frangolias DD, Holloway CL, Vedal S, Wilcox PG. Role of exercise and lung function in predicting work status in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jan 15;167(2):150-7.
13. Moorcroft AJ, Dodd ME, Webb AK. Exercise testing and prognosis in adult cystic fibrosis. *Thorax*. 1997 Mar;52(3):291-3.
14. Moorcroft A, Dodd M, Morris J, Webb A. Individualised unsupervised exercise training in adults with cystic fibrosis: a 1 year randomised controlled trial. *Thorax*. 2004(59):1074-80.
15. Pause M, Kamin W. Improved pulmonary function and increased sputum expectoration in CF patients after additional training with SpiroTiger compared to conventional physiotherapie alone. *Eur Respir J*. 2006;28 Supplement 50:7169.
16. Sartori R, Barbi E, Poli F, Ronfani L, Marchetti F, Amaddeo A, et al. Respiratory training with a specific device in cystic fibrosis: a prospective study. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2008 Jul;7(4):313-9.
17. Rand S, Prasad SA. Exercise as part of a cystic fibrosis therapeutic routine. *Expert Rev Respir Med*. 2012 Jun;6(3):341-51; quiz 52.



- 
18. Hebestreit A, Kersting U, Hebestreit H. Hypertonic saline inhibits luminal sodium channels in respiratory epithelium. *Eur J Appl Physiol*. 2007 May;100(2):177-83.
19. Hebestreit A, Kersting U, Basler B, Jeschke R, Hebestreit H. Exercise inhibits epithelial sodium channels in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Aug 1;164(3):443-6.
20. Schmitt L, Wiebel M, Frese F, Dehnert C, Zugck C, Bartsch P, et al. Exercise reduces airway sodium ion reabsorption in cystic fibrosis but not in exercise asthma. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2011 Feb;37(2):342-8.
21. Wheatley CM, Wilkins BW, Snyder EM. Exercise is medicine in cystic fibrosis. *Exerc Sport Sci Rev*. 2011 Jul;39(3):155-60.
22. van de Weert-van Leeuwen PB, Arets HG, van der Ent CK, Beekman JM. Infection, inflammation and exercise in cystic fibrosis. *Respir Res*. 2013;14:32.
23. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2011;17:6-63.
24. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Sep;11(9):607-15.
25. Shantsila E, Lip GY. Endothelial function and endothelial progenitors: possible mediators of the benefits from physical exercise? *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2009 Aug;16(4):401-3.
26. 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 Nov;30(11):2133-43.

- 
27. Sorg RV, Ozcan Z, Brefort T, Fischer J, Ackermann R, Muller M, et al. Clinical-scale generation of dendritic cells in a closed system. *J Immunother.* 2003 Jul-Aug;26(4):374-83.
28. Loebinger MR, Sage EK, Janes SM. Mesenchymal stem cells as vectors for lung disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Aug 15;5(6):711-6.
29. Macaluso F, Myburgh KH. Current evidence that exercise can increase the number of adult stem cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2012 Aug;33(3-4):187-98.
30. Loebinger MR, Aguilar S, Janes SM. Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls. *Clin Sci (Lond).* 2008 Jan;114(2):99-108.
31. 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.
32. Arnold C, Wenta D, Müller-Ehmsen J, Sreeram N, Graf C. Progenitor cell number is correlated to physical performance in obese children and young adolescents. *Cardiology in the Young.* 2010;20(04):381-6.
33. 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 May;60(5):410-3.
34. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology.* 2006 Mar;27(3):529-41.
35. 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 Jul;24(7):1806-13.

36. Huertas A, Palange P. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2011 Feb;37(2):426-31.
37. 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 Aug;12(4):407-14.
38. Van Craenenbroeck EM, Vrints CJ, Haine SE, Vermeulen K, Goovaerts I, Van Tendeloo VF, 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 Apr;104(4):1006-13.
39. Walther C, Adams V, Bothur I, Drechsler K, Fikenzer S, Sonnabend M, et al. Increasing physical education in high school students: effects on concentration of circulating endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2008 Aug;15(4):416-22.
40. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev*. 2004 Aug;13(4):436-48.
41. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008 May 10;371(9624):1579-86.
42. 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 Feb;119(2):336-48.
43. Schmidt A, Bierwirth S, Weber S, Platen P, Schinköthe T, Bloch W. Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells. *Br J Sports Med*. 2009(43):195-8.

- 
44. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Herault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells*. 2006 Oct;24(10):2202-8.
45. Ruf K, Hebestreit H. Exercise-induced hypoxemia and cardiac arrhythmia in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009 Mar;8(2):83-90.
46. 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.
47. Weiss DJ, Casaburi R, Flannery R, Leroux-Williams M, Tashkin DP. A Placebo-Controlled Randomized Trial of Mesenchymal Stem Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chest*. 2012 Nov 22.
48. 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.
49. Fuchs HJ, Borowitz DS, Christiansen DH, Morris EM, Nash ML, Ramsey BW, et al. Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med*. 1994 Sep 8;331(10):637-42.
50. Godfrey S, Davies CT, Wozniak E, Barnes CA. Cardio-respiratory response to exercise in normal children. *Clin Sci*. 1971 May;40(5):419-31.
51. Greenleaf JE, Convertino VA, Mangseth GR. Plasma volume during stress in man: osmolality and red cell volume. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1979 Nov;47(5):1031-8.
52. 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 Feb;94(2):173-84.

53. 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.
54. Buhring HJ, Battula VL, Tremel 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.
55. Orenstein DM. Assessment of Exercise & Pulmonary Function. . In: T.W. R, editor. *Pediatric Laboratory Exercise Testing*. Champaign, IL: Human Kinetics; 1993. p. 141-63.
56. Moorcroft AJ, Dodd ME, Morris J, Webb AK. Symptoms, lactate and exercise limitation at peak cycle ergometry in adults with cystic fibrosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2005 Jun;25(6):1050-6.
57. Bloomer RJ, Farney TM. Acute plasma volume change with high intensity sprint exercise. *J Strength Cond Res*. 2013 Jan 8.
58. 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 Dec;35:69-79.
59. 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 Jan 31;170(1):23-31.
60. Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, Gomez C, Togores B, Sala E, et al. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 Aug 15;166(4):485-9.
61. Kuci S, Kuci Z, Kreyenberg H, Deak E, Putsch K, Huenecke S, et al. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and

lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):651-9.

62. Salazar-Gonzalez JF, Moody DJ, Giorgi JV, Martinez-Maza O, Mitsuyasu RT, Fahey JL. Reduced ecto-5'-nucleotidase activity and enhanced OKT10 and HLA-DR expression on CD8 (T suppressor/cytotoxic) lymphocytes in the acquired immune deficiency syndrome: evidence of CD8 cell immaturity. *J Immunol*. 1985 Sep;135(3):1778-85.

63. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol*. [Review]. 2013 Jan;171(1):1-7.

64. Roufousse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):585-97.

65. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, Quiniones BC, Tom S, Lanson NA, Jr., et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 4;102(1):186-91.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gating-Strategie zur Identifizierung hämatopoetischer und endothelialer Stammzellen. ....	15
Abbildung 2: Gating-Strategie zur Identifizierung mesenchymaler Stammzellen: .	17
Abbildung 3: Änderungswerte der Zellzahlen pro $\mu$ l der Leukozytensubgruppen durch körperliche Belastung bei den gesunden Probanden (links) sowie den Patienten mit CF (rechts).....	22
Abbildung 4: MSC CD73 <sup>+</sup> , in Ruhe und nach Belastung (links gesunde Probanden, rechts Patienten mit CF). Der Median ist jeweils durch einen waagerechten Balken gekennzeichnet.....	25
Abbildung 5: Relativer Anteil der MSC CD271 <sup>+</sup> Zellen in Ruhe und nach Belastung (links gesunde Probanden, rechts Patienten mit CF). Der Median ist jeweils durch einen waagerechten Balken gekennzeichnet. ....	26
Abbildung 6: CD271 und MSCA-1 positive Zellen, exemplarisch an einem gesunden Probanden sowie einem Patienten mit CF vor sowie nach körperlicher Belastung. ....	27

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Färbekombination zur Bestimmung der Stammzellsubfraktionen im peripheren Blut.....	14
Tabelle 2 – Färbekombination der CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen (gegated auf CD34 <sup>+</sup> /CD45 <sup>low</sup> – Events; siehe Abb. 1).....	16
Tabelle 3 – Färbekombination mesenchymaler Progenitorzellen (gegated auf CD45 <sup>-</sup> /CD235 <sup>-</sup> -Events; siehe Abb. 2).....	16
Tabelle 4 – Charakteristika des Probandenkollektivs (Median (Range)).....	19
Tabelle 5 – Blutbild inklusive Differenzierung der Leukozyten (Ruhemessung; Median (Range)).....	20
Tabelle 6 – Blutbild inklusive Differenzierung der Leukozyten (10 Minuten nach Ende der Belastung; Median (Range)).....	21
Tabelle 7 – CD34 <sup>+</sup> Progenitorzellen vor und nach körperlicher Belastung bei Patienten mit CF und gesunden Probanden. Die angegebenen Werte sind Median (Range).....	23
Tabelle 8 – mesenchymale Progenitorzellen vor und nach körperlicher Belastung bei Patienten mit CF und gesunden Probanden. Die angegebenen Werte sind Median (Range). .....	24



## Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Proteinkomplex
APC	Allophycocyanin
MSC	mesenchymale Stammzellen
MSCA-1	mesenchymales Stammzellantigen-1
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
CD	cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
IgG	Immunglobulin G
CF	zystische Fibrose (Mukoviszidose)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Wmax	maximale Leistung in Watt
VO <sub>2</sub> peak	maximale Sauerstoffaufnahme
RQ	respiratorischer Quotient
%pred	Prozent des Vorhersagewertes
FEV1	Einsekundenkapazität (Forced expiratory volume in 1 second)
FVC	forcierte Vitalkapazität
RV	Residualvolumen
TLC	totale Lungenkapazität

## Danksagung

Die Durchführung eines solchen Projektes ist natürlich alleine nicht möglich und so gibt es einige Menschen, denen ich für die Unterstützung danke möchte.

An erster Stelle stehen alle Probanden, die mit Geduld und Motivation die für diese Fragestellung notwendigen Untersuchungen engagiert absolviert haben. Bei der Durchführung der einzelnen Untersuchungen habe ich viel Unterstützung vom Team der Christiane-Herzog Ambulanz für Mukoviszidose der Universitäts-Kinderklinik erhalten, insbesondere von Fr. Dr. Schmid, Schwester Elisabeth Voit und Frau Astrid Langhirt.

Zutiefst zu Dank verpflichtet bin ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Helge Hebestreit, der mich herzlich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir seine Begeisterung für Wissenschaft und Forschung weitergegeben hat. In vielen Projekten durfte ich seine wissenschaftliche Expertise und seine Begeisterung für die Bedeutung von Sport erleben. Er hat mich in die Geheimnisse der Spiroergometrie eingeweiht und stand trotz forderndem Klinikalltag stets mit Rat und Tat zur Seite. Die Überlassung dieses spannenden Themas führte erneut zu einer sehr angenehmen Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Matthias Eyrich für das Engagement bei der Planung dieses Projektes sowie die großartige Unterstützung bei den FACS-Analysen und das stets offene Ohr für meine zahlreichen Fragen.

Keinesfalls vergessen werden darf Dr. Kristina Roth, für die kein Statistikproblem unlösbar scheint und mit der ich zahlreiche fruchtbare methodische Diskussionen führen durfte. Unsere Zeit „im Keller“ hat zu vielen produktiven Stunden geführt.

Nicht unerwähnt bleiben sollen die Kolleginnen der onkologischen Tagesklinik (Dr. B. Winkler, Dr. E. Miller, Dr. V. Wiegering), die mit der Ermöglichung der ein oder anderen Woche Urlaub dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit letztendlich fertiggestellt werden konnte.