

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des
Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: PD Dr. med. habil. Michel Noutsias

**Auswirkung einer kurzfristigen Maximalbelastung auf proinflammatorische
Monozyten im Vergleich von Hochleistungssportlern versus einer
altersadaptierten gesunden Kontrollgruppe**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
< Doktor der Medizin (Dr.med.) >

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tobias Wehnert
geboren am 10.03.1982 in Dresden

Betreuer: apl. Prof. Dr. med. habil. Axel Schlitt

Gutachter:

1. apl. Prof. A. Schlitt (Quedlinburg/Halle)
2. Prof. H. Treede
3. Prof. Ch. Weiß (Lüneburg)

20.11.2018

30.09.2019

Referat

Regelmäßige körperliche Aktivität zählt zu den Hauptpräventionsfaktoren chronischer Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Dyslipidämie und Hypertonie sowie deren Folgeerkrankung Atherosklerose. Im Pathomechanismus der Atherosklerose spielen Monozyten eine entscheidende Rolle. Monozyten können anhand der Expression des Lipopolysaccharidrezeptors CD14 und des Fc-Oberflächenrezeptors CD16 in drei funktionell unterschiedliche Subgruppen aufgeteilt werden. Entsprechend der Expressionsintensität ergeben sich die Gruppen Mo1 (CD14⁺⁺, CD16⁻), Mo2 (CD14⁺⁺, CD16⁺) und Mo3 (CD14⁺, CD16⁺⁺). Studien konnten einen Zusammenhang zwischen erhöhter CD16 positiver Monozytenzahl und vaskulären Pathologien wie erhöhter Intima-Media-Dicke, erhöhter Plaque-Vulnerabilität und Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung nachweisen. Verschiedene Arbeiten zeigten eine Reduktion CD16 positiver Monozyten nach regelmäßiger körperlicher Aktivität. Bei diesen Arbeiten erfolgte lediglich die Aufteilung der Monozyten in zwei Subgruppen (CD14⁺⁺, CD16⁻ und CD14⁺, CD16⁺). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Monozytensubpopulationen in der heute gebräuchlichen Einteilung in drei Monozytensubpopulationen zweier Kollektive im Alter zwischen 18 und 30 Jahren, welche sich in ihrer körperlichen Aktivität stark unterschieden, zu untersuchen. Wir verglichen hierzu 42 Leistungssportler der 1. bis 4. Liga mit 29 Kontrollprobanden, die weniger als zwei Stunden Sport pro Woche trieben. Untersucht wurden die Unterschiede der Subpopulationen zwischen den Gruppen in Ruhe und nach körperlicher Belastung. Um eine valide körperliche Ausbelastung sicherzustellen, wurden die Probanden einer Laufbandspiroergometrie unterzogen, wobei die anaerobe Schwelle erreicht werden musste. Die Monozytensubpopulationen wurden vor und nach der Belastung mittels fluoreszenzgestützter Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen wurde zudem ein Differentialblutbild angefertigt. Es ließ sich nachweisen, dass regelmäßiges Training zu einer signifikanten Senkung der Monozytensubpopulation 3 (CD14⁺CD16⁺⁺) führt. Nach körperlicher Ausbelastung zeigten sich in beiden Probandengruppen eine Abnahme der Zellzahlen in der Mo1- und eine Zunahme in der Mo3-Fraktion. In der Subgruppe Mo2 konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Wir schlussfolgerten, dass regelmäßiger Sport zur Senkung proinflammatorischer Monozyten beitragen kann.

Wehnert, Tobias: Auswirkung einer kurzfristigen Maximalbelastung auf proinflammatorische Monozyten im Vergleich von Hochleistungssportlern versus einer altersadaptierten gesunden Kontrollgruppe, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 67 Seiten, 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Monozyten.....	1
1.2 Funktion mononukleärer Phagozyten.....	2
1.3 Rezeptorbesatz und Subgruppen der Monozyten	2
1.3.1 Der CD14-Rezeptor.....	2
1.3.2 Der CD16-Rezeptor.....	3
1.3.3 Subgruppen der Monozyten	3
1.4 Pathomechanismus der Atherosklerose.....	4
1.5 Die Bedeutung der Monozytensubpopulationen in der Pathogenese der Atherosklerose.....	6
1.5.1 Funktionelle Besonderheiten der CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Monozyten (Mo1)	6
1.5.2 Funktionelle Besonderheiten der CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Monozyten (Mo2).....	7
1.5.3 Funktionelle Besonderheiten der CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺ Monozyten (Mo3).....	7
1.6 Sport als präventiver Faktor	8
2. Zielstellung	9
3. Material und Methodik	10
3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	10
3.2 Auswahl der Probanden, Routineuntersuchungen und Blutentnahme.....	11
3.3 Laufbandspiroergometrie und Laktatbestimmung	13
3.5 Durchflusszytometrie	15
3.5.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie.....	15
3.5.2 Das Durchflusszytometer MACS-Quant.....	17
3.5.3 Präparation der Monozyten	17
3.5.4 Auswertung der Messergebnisse – Gating	20
3.6 Hämatologische Untersuchungen	24
3.7 Berechnung der Daten	24
3.7.1 Monozytensubpopulationen.....	24
3.8 Statistische Auswertung.....	25

4. Ergebnisse	25
4.1 Probandenbeschreibung	25
4.2 Leistungsergebnisse des Tests	26
4.3 Hämatologische Daten	27
4.4 Veränderungen der Monozytensubpopulationen	29
4.4.1 Vergleich Kontrollgruppe vor und nach Belastung	29
4.4.2 Vergleich Sportler vor und nach Belastung	31
4.4.3 Vergleich Sportler und Kontrollgruppe vor und nach Belastung	33
4.4.4 Altersadaptierter Vergleich Sportler und Kontrollgruppe vor und nach Belastung	37
4.4.5 Vergleich Sportlerinnen und Sportler vor und nach Belastung	39
4.4.6 Vergleich Kontrollprobandinnen und Kontrollprobanden	40
5. Diskussion	41
5.1 Effekte körperlicher Aktivität auf inflammatorische Prozesse	41
5.2 Monozytensubpopulationen	43
5.2.1 Bedeutung regelmäßiger sportlicher Aktivität auf die Monozytensubpopulationen	44
5.2.2 Veränderungen der Monozytensubpopulationen nach erschöpfender Belastung bei trainierten und untrainierten Probanden	46
5.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Monozytensubpopulationen	48
5.2.4 Einfluss des Alters auf die Monozytensubpopulationen	48
6. Zusammenfassung	50
7. Literaturverzeichnis	51
7.1 Tabellenverzeichnis	56
7.2 Abbildungsverzeichnis	56
8. Thesen	58
9. Anhang	59
9.1 Probandeninformation	59
9.2 Protokoll Sportgruppe Mann	62
9.3 Protokoll Sportgruppe/Kontrollen	63

10. Selbstständigkeitserklärung.....	64
11. Erklärung über frühere Promotionsversuche	65
12. Danksagung	66

Abkürzungsverzeichnis

BD:	Becton Dickinson
BSA:	Bovine Serum Albumin Fraktion V – Serumalbumin des Rindes
CCL-2:	Chemokine Ligand 2
CCR-2:	Chemokine Receptor 2 oder CD192
CD:	Cluster of Differentiation
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
EKG:	Elektrokardiogram
FACS:	Fluorescens Activated Cell Sorting oder Scanning
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FSC:	Forward Scatter
Ig	Immunglobulin
IL:	Interleukin
IUIS:	International Union of Immunological Societies
KHK:	Koronare Herzkrankheit
LDL:	Low Density Lipoprotein
LPS:	Lipopolysaccharide
MACS:	Magnetic Activated Cell Sorting; Produktbezeichnung für FACS-Produkte und Zubehör von Miltenyi Biotec
MCH:	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC:	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCP-1:	Monoocyte chemoattractant protein 1 oder CCL-2
M-CSF:	Macrophage colony-stimulating factor
M-CSFR:	Macrophage colony-stimulating factor receptor oder CD115
MCV:	Mean Corpuscular Volume
MET:	Metabolic Equivalent of Task
MFI:	Mean Fluorescence Intensity
MHC-II:	Major Histocompatibility Complex II
Mo1:	Monozytensubpopulation 1
Mo2:	Monozytensubpopulation 2
Mo3:	Monozytensubpopulation 3
MPS:	Mononukleäres Phagozytensystem
NaN ₃ :	Natriumacid
NO:	Stickstoffmonoxid
NFκB:	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

pAVK:	perivere arterielle Verschlusskrankheit
PBS:	Phosphate Buffered Saline – phosphatgepufferte Salzlösung
RZB:	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RES:	Retikuloendotheliales System
ROS:	Reactive oxygen species
SSC:	Sideward Scatter
TNF- α :	Tumornekrosefaktor- α
USB:	Universal Serial Bus
VCAM-1:	Vascular Cell Adhesion Molecule 1 oder CD106
VLA-4:	Very Late Antigen-4

1. Einleitung

1.1 Monozyten

Ilija Metchnikow definierte 1880 den Begriff Makrophage, nachdem er phagozytierende Zellen in Seeanemonen betrachtete und die Bedeutung dieser Zellgattung für die Funktion des Immunsystems erkannte (Newill 2016). Im Rahmen weiterer Forschungen der darauffolgenden Jahre fasste Ludwig Aschoff 1913 alle Zellen, die dem retikulären Bindegewebe entstammten und zur Phagozytose fähig waren, zum retikuloendothelialen System (RES) zusammen (Schittenhelm 1925). Diese Systematik, welche die Zellgattungen nach steigender Phagozytoseaktivität eingliederte, war allerdings sehr weit gefasst und unspezifisch, da alle Mitglieder der zellulären Immunabwehr wie z.B. Endothelzellen, Fibrozyten, retikuläre Zellen von Milz und Lymphknoten usw. vertreten waren und keine immunologischen oder morphologischen Unterschiede zwischen den Zellarten getroffen wurden. Im Laufe der weiteren Forschung wurden die einzelnen Zellpopulationen weiter untersucht. Funktionen wie Immunglobulin- oder komplementgestützte Phagozytose oder die Entwicklungsabläufe konnten genauer dargestellt werden. So wurde 1972 von van Furth et al. eine neue und noch heute gültige Einteilung des mononukleären Phagozytensystem (MPS) getroffen. Diese Systematik beinhaltet in aufsteigender Reihenfolge die Entwicklungsstadien der mononukleären Phagozyten (R. Van Furth 1972):

Vorläufer Zelle (Knochenmark) → Promonozyt (Knochenmark) → Monozyt (Knochenmark und Blut) → Makrophage und deren spezifische Differenzierung

Wie in der Einteilung dargestellt, sind Monozyten eine Vorstufe in der Entwicklung zum Makrophagen. Sie entwickeln sich im Knochenmark aus einer myeloiden Vorläuferzelle und gelangen als Monozyten in die Blutbahn. Sie sind 15-20 µm groß und besitzen einen großen meist nierenförmigen Zellkern. Daraus leitet sich auch die Bezeichnung Monozyt ab (siehe Abbildung 1). Nur 2-8% der Gesamtleukozyten im zirkulierenden Blut sind Monozyten. Nach ihrer Bildung befinden sie sich ca. 12-24 h im Blut und

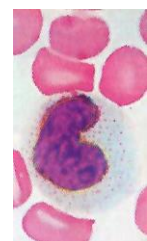


Abbildung 1
Monozyt
(Kühnel
2002)

wandern per Diapedese in das Bindegewebe, wo die weitere Differenzierung zum Makrophagen stattfindet. Die Art des entstehenden Makrophagen ist hierbei gewebsabhängig, z.B. Kupffer'sche Sternzellen in der Leber, Mikrogliazellen im Gehirn oder Alveolarmakrophagen in der Lunge. In den entsprechenden Geweben kann die Überlebenszeit dann mehrere Monate betragen (Sobotta und Welsch 2009; Riede 2004).

1.2 Funktion mononukleärer Phagozyten

Monozyten oder auch mononukleäre Phagozyten sind ein bedeutender Bestandteil des Immunsystems. Sie begleiten eine Reihe relevanter Aufgaben wie z.B. den Abbau von gealterter Matrix, Zellen, Bakterien, Tumorzellen und Fremdkörpern sowie die Kontrolle von Zellwachstum und Zelldifferenzierung. Hierzu sind sie in der Lage, rezeptorvermittelt die entsprechenden Fremdkörper oder Zellen zu erkennen und zu phagozytieren. Bei diesem Vorgang wird der Fremdkörper in einer Ausstülpung der Zellmembran in die Zelle internalisiert. Durch intrazelluläres Zusammenführen des so entstandenen Phagosoms mit Lysosomen wird das „intrazelluläre Killing“ eingeleitet. In den Lysosomen befinden sich proteolytische Enzyme (Elastase, Lysozym, saure Hydrolase), welche zum Abbau bzw. zur Tötung des Phagosomeninhalts führen. Sie sind des Weiteren in der Lage, nach entsprechendem Prozessieren Antigene an MHC-II-Klasse-Rezeptoren zu präsentieren und mit T-Zellen zu interagieren. Neben der Phagozytose können Monozyten und Makrophagen bei entsprechender Stimulation eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen sezernieren und übernehmen so immunmodulatorische Fähigkeiten, z.B. die Regulation des Entzündungsgeschehens über pro- und antiinflammatorische Zytokine (TNF- α ; IL-10), chemotaktische Komplementkomponenten (C5b), Beeinflussung der Gerinnung und Freisetzung toxischer Radikale (Hahn et al. 2001; Sobotta und Welsch 2009; Riede 2004; Lüllmann-Rauch 2006).

1.3 Rezeptorbesatz und Subgruppen der Monozyten

1.3.1 Der CD14-Rezeptor

Monozyten und Makrophagen besitzen die Möglichkeit, spezifische Antigenstrukturen über Mustererkennungsrezeptoren zu erfassen und über die Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade entsprechende Reaktionen auszulösen. Mithilfe des Rezeptors CD14 ist es Makrophagen und Monozyten möglich, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien zu erkennen. CD14 ist ein 55 kDa großes Protein, welches in der Plasmamembran mittels eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers verbunden ist. CD14 übernimmt bei der Lipopolysaccharid-Erkennung modulierende Aufgaben. Lipopolysaccharide werden im Körper zunächst durch das Akute-Phase-Protein Lipopolysaccharid Binding Protein (LBP) gebunden und an CD14 übergeben. Der CD14-LPS-Komplex interagiert und aktiviert nun den Toll-Like-Rezeptor-4-MD-2-Komplex, welcher eine intrazelluläre Kaskade auslöst, die über den Transkriptionsfaktor NF κ B die Transkription von Peptiden einleitet (Murphy et al. 2014).

1.3.2 Der CD16-Rezeptor

Mithilfe von hoch affinen und spezifischen Antikörpern ist es dem Immunsystem möglich, Pathogene wie Bakterien, Viren, Fremdkörper und Toxine zu opsonieren und zu inaktivieren. Hierzu steht neben dem Komplementsystem auch eine Reihe von Effektorzellen zur Verfügung, die mit spezifischen Rezeptoren für den Fc-Teil von Antikörpern ausgestattet sind. Diese Fc-Rezeptoren sind strukturell so aufgebaut, dass sie nur einen bestimmten Antikörperisotyp binden können. CD16 oder auch FcγRIII ist ein ca. 50-70 kDa großes Protein, das Antikörper vom Typ IgG bindet und so die Wirksamkeit der Phagozytose von antikörpermarkierten Pathogenen verbessert (Murphy et al. 2014).

1.3.3 Subgruppen der Monozyten

In den vergangenen Jahrzehnten erfolgten intensive Forschungen, um die Bedeutung und Funktion von Monozyten bei inflammatorischen Erkrankungen zu ergründen. Insbesondere die Perfektionierung der Durchflusszytometrie in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern brachte bedeutende Fortschritte. Passlick und Ziegler et al. differenzierten mit dieser Technik 1989 erstmalig zwei Monozytensubpopulationen unter Verwendung von CD14- und CD16-Antikörpern. Sie trennten damals zwischen Monozyten, welche im hohen Maße CD14 aber kein CD16 exprimierten von einer kleineren Monozytengruppe, die wenig für CD14 aber für CD16 hoch positiv waren (Passlick et al. 1989). Im Laufe weiterer Arbeiten wurde die Aufteilung auf drei Monozytensubpopulationen erweitert und eine einheitliche Nomenklatur geschaffen, die durch die International Union of Immunological Societies (IUIS) validiert wurde (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Tabelle 1 stellt die Subgruppen und deren Rezeptorbesatz dar.

Tabelle 1 Monozytennomenklatur (Ziegler-Heitbrock et al. 2010)

Subgruppe	Bezeichnung	Rezeptorbesatz
Mo1	Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻
Mo2	Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺
Mo3	Nonclassical	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺

+ Expression 10-fach höher als Isotypenkontrolle; ++ Expression 100-fach höher als Isotypenkontrolle

1.4 Pathomechanismus der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine der bedeutendsten, chronisch fortschreitenden Erkrankungen des Gefäßsystems. Ihre lokalen Manifestationen verursachen Erkrankungen wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), Schlaganfall und die koronare Herzerkrankung (KHK). So führten im Jahr 2015 die KHK und der Myokardinfarkt die Todesursachenstatistik an (Statistisches Bundesamt (Destatis)). Die zugrunde liegende Pathologie dieser Erkrankungen, die Atherosklerose, wird schon seit Jahrhunderten erforscht. Der häufig verwendete Begriff Arteriosklerose wurde von Lobstein im Jahre 1833 definiert (Acierno 1994). Da diese Bezeichnung nur die Verkalkung bzw. Verhärtung der Arterien beschreibt und sich im Laufe der Forschung auch proliferative sowie entzündliche Ursachen herausbildeten, schlug Marchand im Jahre 1904 die Bezeichnung Atherosklerose vor; eine Verbindung aus dem Wort „Athero“ (altgriechisch für „grützeartig“) zur Beschreibung der fettigen Degeneration und Sklerose für die Gefäßverhärtung (Sclerosis). Die Atherosklerose ist ein Prozess welcher das gesamte Gefäßsystem betrifft. Sie beginnt zunächst mit einer lokalen Entzündungsreaktion. Im weiteren Verlauf folgt eine systemische Immunreaktion. Ursächlich für die lokale Entzündungsreaktion ist eine Erhöhung der Permeabilität des Gefäßendothels. Diese endotheliale Dysfunktion wird durch diverse Risikofaktoren begünstigt, wie z.B. arterielle Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Rauchen und Diabetes mellitus. Im Verlauf kommt es durch die Erhöhung der Permeabilität zur Ablagerung insbesondere von LDL-Cholesterin im Bereich der Tunica intima. LDL selbst ist hierbei zunächst wenig proinflammatorisch. Erst durch die oxidative Veränderung durch Enzyme sowie Bindung an Proteoglykane der extrazellulären Matrix werden Makrophagen zur Internalisierung stimuliert (Fogelstrand und Borén 2012). Hierdurch kommt es zur lokalen Entzündungsreaktion. Diese Makrophagen entwickeln sich aus peripheren Monozyten (siehe Abschnitt 1.1). Sie werden infolge der endothelialen Entzündungsreaktion bedingt durch oben genannten Noxen angezogen. Die Endothelzellen exprimieren hierzu das Adhäsionsmolekül VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und erleichtern damit den Monozyten die Anbindung.

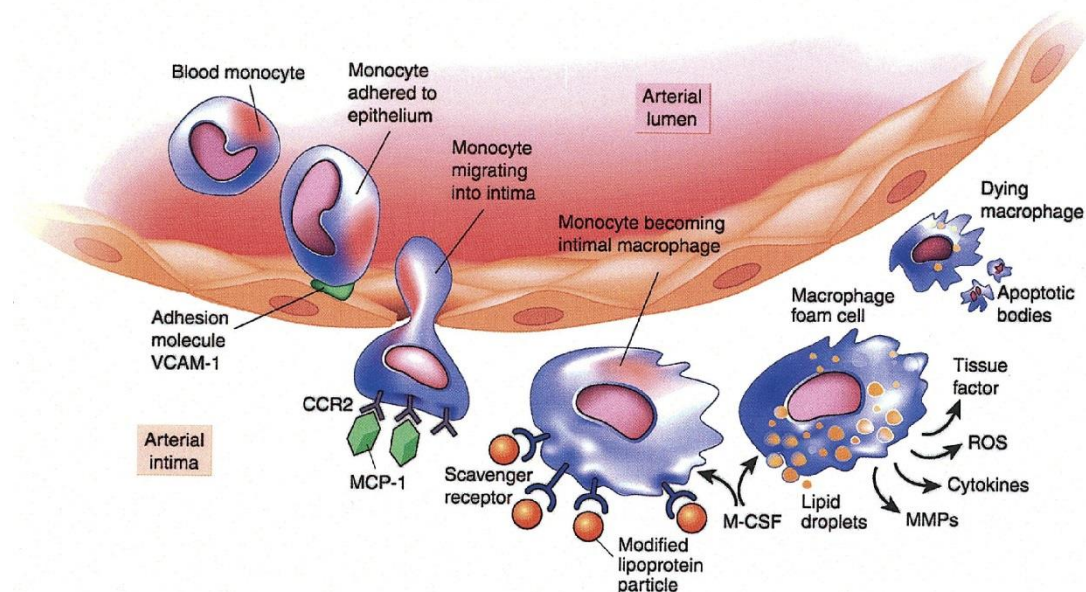


Abbildung 2 Monozytenmigration (Jaffer et al. 2006)

Vor Ort sezernieren Monozyten das Monocyte-chemoattractant-protein 1 (MCP-1), welches die Einwanderung weiterer Monozyten hervorruft (Gu et al. 1998). Im subendothelialen Raum akkumulieren dadurch vermehrt Monozyten, die sich unter dem Einfluss des macrophage colony stimulating factor (M-CSF), welcher von den Intimazellen sezerniert wird, zu Makrophagen differenzieren. Ebenfalls wird durch M-CSF die Expression von Scavenger Rezeptoren gesteigert und hierdurch die rezeptorvermittelte Aufnahme von modifizierten LDL gesteigert (Willem J. S. de Villiers 1994). Das dadurch übermäßig in Makrophagen aufgenommene modifizierte LDL wird in lysosomalen Verdauungsvakuolen enzymatisch umgewandelt und lagert sich vakuolär ab. Diese lipidgefüllten Makrophagen werden histologisch als Lipophagen oder Schaumzellen bezeichnet (Riede 2004). Die durch die Makrophagen sezernierten Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukin- 1β unterhalten die weitere Aktivierung von Makrophagen und Schaumzellen. Einwandernde CD4^+ T-Lymphozyten schütten Zytokine aus, die zur Apoptose der Lipophagen führen. Durch den Zellzerfall kommt es zur Freisetzung der lysosomalen Cholesterinkristalle und es bildet sich eine instabile Lipidplaque. Makrophagen, Endothelzellen und Thrombozyten sezernieren den platelet derived growth factor, woraufhin eine Proliferation der glatten Muskelzellen aus der Tunica media erfolgt. Durch die Vermehrung der extrazellulären Matrix, insbesondere durch Kollagen, fibrosiert und kalzifiziert die Lipidplaque zunehmend und es bildet sich eine Deckplatte. Der somit entstehende atherosklerotische Plaque engt den Blutstrom und damit die Durchblutung der distaleren Gewebe ein. Des Weiteren trennt diese Platte den Blutstrom vom prothrombotischen zell- und cholesterinhaltigen Inhalt. Bricht diese Platte durch mechanische Belastung oder proteolytische Aktivität auf, kommt es durch

Aktivierung des zellulären und plasmatischen Gerinnungssystems zur Bildung eines Thrombus, der zum teilweisen oder vollständigen Verschluss des Gefäßes führen kann. In Folge der Umorganisation des Thrombus durch vermehrte Produktion von Kollagen durch Mediamyozyten und Kalzifizierung kann es dann zum irreversiblen Gefäßverschluss kommen (Riede 2004).

1.5 Die Bedeutung der Monozytensubpopulationen in der Pathogenese der Atherosklerose

Wie erwähnt sind Monozyten einer der bedeutendsten Zellen im Atherosklerosegeschehen. Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre versuchten die Frage zu klären, welche Bedeutung und Funktionen in der Pathogenese durch die jeweiligen Subpopulationen wahrgenommen werden. Zu Beginn etablierte sich hierbei nur die Aufteilung nach CD16 positiven und negativen Monozyten, so dass die Funktion und Bedeutung der intermediären CD14⁺⁺CD16⁺ Fraktion unberücksichtigt blieb. Dennoch zeigten epidemiologische Studien, dass eine erhöhte Anzahl CD16⁺ Monozyten mit der koronaren Herzerkrankung, erhöhter Plaque-Vulnerabilität und erhöhter Intima-Media-Dicke assoziiert sind (Hristov und Weber 2011). Weiterhin waren bestimmte Risikofaktoren wie ein erhöhter BMI, Bewegungsmangel und erhöhte Triglyceridwerte mit einer erhöhten Anzahl CD16⁺ Monozyten im Blut korreliert (Hristov und Weber 2011).

1.5.1 Funktionelle Besonderheiten der CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten (Mo1)

Um die funktionellen Besonderheiten genauer differenzieren zu können, wurden der Rezeptorbesatz, die Zytokinsekretion (insbesondere nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS)) und genetische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei stellte sich heraus, dass CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten im Vergleich zu den anderen Subgruppen im höheren Maße Zytokine wie Interleukin-6, -8 und -10 sowie TNF- α sezernieren. Wong et al analysierten 2011 die Geneexpression der drei Monozytensubpopulationen. Unter den meist exprimierten Genen fanden sich in der Gruppe der CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten unter anderem CD14, CCR2 (welcher der Rezeptor für das Monocyte-chemoattractant-protein 1 ist) und CD62L (welches als Oberflächenprotein für die Lymphozyten-Endothelzell-Adhäsion verantwortlich ist). Des Weiteren wurden in dieser Untersuchung die 1554 nachgewiesenen Gene nach Expressionshäufigkeit und Funktion entsprechend den monozytären Subgruppen zugeordnet. Es zeigte sich, dass die CD14⁺⁺CD16⁻

Monozyten im hohen Maße Gene in den Kategorien Angiogenese, Wundheilung, Koagulation und Bildung antimikrobieller Proteine besitzen. Schlussfolgernd nehmen CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten ihre Hauptaufgaben aufgrund der höheren Phagozytoseaktivität und Zytokinsekretion in der Abwehr mikrobiologischer Pathogene als auch in der Reparatur geschädigter Epithelien wahr (Wong et al. 2011; Idzkowska et al. 2015).

1.5.2 Funktionelle Besonderheiten der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten (Mo2)

In der Gruppe der CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten, welche als Übergangsform zwischen den CD14 hoch positiven (Mo1) und CD14 positiven Monozyten (Mo3) gilt, konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte Merkmale und Funktionen wie Rezeptorexpressionen von Mo1 und Mo3 vorhanden sind. So ist CCR2, das ausschließlich von CD16⁻ Monozyten (Mo1) exprimiert wird, zusammen mit CX3CR1, das nur von CD16⁺⁺ Monozyten (Mo3) gebildet wird, nachweisbar (Idzkowska et al. 2015). Nach LPS-Stimulation ist diese Gruppe in der Lage, hohe Mengen an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL1- β zu sezernieren (Wong et al. 2011). Des Weiteren können sie von allen Subgruppen die größte Menge an ROS (reactive oxygen species) produzieren und freisetzen (Zawada et al. 2011). Durch eine hohe Dichte an MHC-II-Rezeptoren sind sie in der Lage, mit CD4⁺ T-Lymphozyten zu interagieren (Wong et al. 2011).

1.5.3 Funktionelle Besonderheiten der CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten (Mo3)

Im Gegensatz zu den CD14 hoch positiven Monozyten (Mo1) zeigt die Gruppe der CD14 positiven Monozyten (Mo3) deutliche Unterschiede im Rezeptorbesatz. CCR2 und CD62L sind nicht nachweisbar. Außerdem besitzt diese Art der Monozyten im Vergleich eine höhere zytoskelettale Mobilität. Dies wurde durch in vitro-Tests als auch über genetische Untersuchungen nachgewiesen (Wong et al. 2011). Schlussfolgern lässt sich, dass aufgrund dieser Eigenschaften ein Kriechen über Endothelien möglich ist. Nach Stimulation mit Lipopolysacchariden werden hohe Mengen an TNF- α und IL-1 β sezerniert (Wong et al. 2011). Daher kann die Hauptaufgabe dieser Subgruppe in der immunologischen Überwachung von Geweben insbesondere auf beschädigte oder viral infizierte Zellen gesehen werden (Idzkowska et al. 2015). In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass sich CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten aus CD14⁺⁺CD16⁻ Monozyten entwickeln. Rogacev et al. wiesen nach, dass nach

Stammzelltransplantationen die erste nachweisbare Population die CD16 negative ist (Mo1). Im weiteren Verlauf erscheint dann die CD16 positive (Mo2), gefolgt von der CD16 hoch positiven Monozytensubpopulation (Mo3) (Rogacev et al. 2015). In in vitro-Studien konnten diese Entwicklungen ebenfalls bestätigt werden (Idzkowska et al. 2015). Basierend auf dieser Erkenntnis handelt es sich bei der Gruppe der CD16++ Monozyten wahrscheinlich um den höchsten Reifegrad der Monozyten.

1.6 Sport als präventiver Faktor

Die Ausübung von Sport und regelmäßige körperlicher Bewegung gelten als eine der Haupteinflussfaktoren zum Schutz der Gesundheit. Evolutionär war körperliche Leistungsfähigkeit einst ein relevanter Faktor, um ein Überleben sicherzustellen. Die Suche nach Nahrung, Jagd, Flucht vor Feinden und das Errichten eines Unterschlupfes machten regelmäßige Bewegung notwendig. In unserer Gesellschaft entwickelte sich bedingt durch Industrialisierung und der darauffolgenden Automatisierung, Fließbandfertigung und zunehmender Bürotätigkeit ein körperlich inaktives und monotones Bewegungsmuster, welches sich meist auch in der Freizeit fortsetzt. Man kann sagen, dass der Mensch insbesondere in industrialisierten Ländern der Welt nicht mehr artgerecht lebt. Dieser Lebensstil führt zur Entstehung von Zivilisationskrankheiten wie z.B. Bluthochdruck, Diabetes mellitus Typ II, Dyslipoproteinämie, Erkrankung des Bewegungsapparats und Adipositas. Gesundheitsfördernde gesellschaftliche Maßnahmen oder Public health sind deshalb schon seit Jahrzehnten Inhalt der Forschung. Hierbei muss zwischen Sport und regelmäßiger körperlicher Aktivität klar getrennt werden. Sport wird definiert als Tätigkeit, die mit dem Ziel der körperlichen Ertüchtigung, der Freude an körperlicher Bewegung und die im Wettkampf ausgeübt wird. Regelmäßige körperliche Aktivität hingegen beinhaltet alltägliche Tätigkeiten wie die Nutzung von Treppen, Bewältigung des Arbeitsweges zu Fuß oder per Fahrrad und Haushaltstätigkeiten wie Gärtnern oder Staubsaugen. In der Förderung des Gesundheitsbewusstseins bietet sich eben in diesen Bereichen eine Reihe von Ansatzpunkten, da nicht jeder Bürger zur Ausübung von Sport motiviert werden kann. Zur besseren Quantifizierung der Dosis-Wirkungsbeziehung von körperlicher Aktivität und Prävention kann als Einheit das Metabolische Äquivalent (MET) herangezogen werden. Ein MET entspricht hierbei einem Energieverbrauch von einer kcal pro Kilogramm Körpergewicht pro Stunde, also dem Ruheenergieverbrauch des menschlichen Körpers. Eine Aktivität die dreimal höher als der Ruheenergieverbrauch ist, entspricht demzufolge drei MET. Für Präventionsempfehlungen werden häufig MET-Minuten herangezogen. Die WHO empfiehlt eine körperliche Aktivität von 600 MET-

Minuten pro Woche (World Health Organisation 2011). Diese Empfehlung lässt sich alltäglich relativ leicht umsetzen. Beispielsweise entspricht Gehen mit 5 km/h 5 MET. Bei einer 30-minütigen Gehstrecke pro Arbeitstag (5 MET x 30 min x 5 Tage = 750 MET-Minuten) ist die WHO-Empfehlung bereits überschritten. Meta-Analysen, insbesondere in Bezug auf kardiovaskuläre Prävention, konnten deutliche Risikoreduktionen bei Zunahme der körperlichen Aktivität nachweisen. So konnten Kyu et al. in einer Meta-Analyse zeigen, dass die Risikoreduktion für Krankheiten wie Herzinfarkt, Schlaganfall, Diabetes, Kolon- und Brustkrebs bei einer körperlichen Aktivität von 3000 - 4000 MET-Minuten pro Woche am höchsten ist. Im Bereich der kardiovaskulären Erkrankungen zeigte sich hierbei eine Risikoreduktion von 23%. Eine zusätzliche Steigerung auf mehr als 8000 MET-Minuten zeigte allerdings nur eine geringe Zunahme der Risikoreduktion auf 25% (Kyu et al. 2016).

2. Zielstellung

Mehrere Arbeiten der Vergangenheit wiesen den Zusammenhang zwischen regelmäßiger körperlicher Aktivität und einer Reduktion der im Atherosklerosegeschehen relevanten CD16 positiven Monozyten nach. Hierbei fanden bisher lediglich Gatingschemata im Sinne einer Zweiparameterbetrachtung nach CD14 hoch positiv und CD16 negativ (CD14⁺⁺, CD16⁻) zu CD14 positiv und CD16 positiv (CD14⁺, CD16⁺) Anwendung. Ebenfalls nach diesem Schema wurden die Mobilisierung der Monozytensubpopulationen nach körperlicher Ausbelastung untersucht. Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der Monozytensubpopulationen zwischen zwei Probandenkollektiven, welche sich in ihrer körperlichen Aktivität stark unterschieden (Kontrollgruppe kleiner zwei Stunden Sport/Woche, Sportgruppe größer acht Stunden Sport/Woche). Die Darstellung der Subpopulationen erfolgte nach der heute gebräuchlichen Aufteilung in drei Monozytensubpopulationen (Mo1, Mo2, Mo3). Wir verglichen die Unterschiede der Populationen zwischen den Probandenkollektiven als auch die Veränderungen nach körperlicher Ausbelastung.

3. Material und Methodik

3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien:

- EDTA-Monovette 2,7 ml (Sarstedt®)
- Serum-Monovette 9 ml (Sarstedt®)
- Blutentnahmekanüle 21G/0,8 grün (Sarstedt®)
- Blutentnahmekanüle Multifly 21G/0,8 grün (Sarstedt®)
- Multiadapter für Sarstedt-Monovetten (Sarstedt®)
- Biosensor Laktat für Super GL easy (Dr. Müller Gerätebau)
- Reaktionsgefäße mit Hämolyse-Systemlösung (Dr. Müller Gerätebau)
- End to End Kapillaren (Dr. Müller Gerätebau)
- FACS-Rundbodenröhrchen PS 5 ml natur
- Reaktionsgefäße SafeLock 1,5 ml (Eppendorf®)
- Pipettenspitzen PP (autoklaviert)

Untersuchungsgeräte:

- Laufband MTM-1500 (Schiller®)
- EKG-Interface (General Electrics®)
- Spirometer (Jäger®)
- Software Masterscreen CPX (Cardinal Health®)

Laborgeräte:

- Laktatmessgerät Super GL easy (Dr. Müller Gerätebau)
- Drucker für Laktatmessgerät DPU 414 (Citizen® Japan)
- Zentrifuge Universal 320 (Hettich®)
- Vortexer Vortex Genie 2 (Scientific Industries®)
- Absaugeinheit
- Einkanalpipetten (5000 µl; 1000 µl; 200 µl; 100 µl; 20 µl; 10 µl) (VWR®)
- Durchflusszytometer MACS-Quant™ (Miltenyi Biotec®)
- Gatingsoftware MACS-Quantify™ (Miltenyi Biotec®)
- Hämatologiesystem XE-2100 (Sysmex®)

Chemikalien:

- MACS Running Buffer (Miltenyi Biotec®)
- Phosphate Buffered Saline (Miltenyi Biotec®)
- MACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec®)
- MACS Washing Solution (Miltenyi Biotec®)
- Fc-Block (Miltenyi Biotec®)
- Lyselösung BD FACS Lysing Solution 10x (BD Biosciences®)
- Sphero Beads; Sphero™ Calibration Particles

Antikörper:

- CD15 e Fluor 450; Klon HI98 (eBioscience®)
- CD14 PeCy 7; Klon 61D3 (eBioscience®)
- CD19 e Fluor 780; Klon HIB19 (eBioscience®)
- CD16 APC; Klon 3G8 (Invitrogen®)
- CD86 PEC 5; Klon IT 2.2 (eBioscience®)
- CD115 PE; Klon GHI/61 (eBioscience®)
- CD143 FITC; Klon 9B9 (AbD Serotec®)

3.2 Auswahl der Probanden, Routineuntersuchungen und Blutentnahme

Für die Durchführung der Studie wurden zwei Kollektive im Alter zwischen 18 und 30 Jahren rekrutiert, welche sich in ihrer sportlichen Aktivität stark unterschieden. Wichtigstes Einschlusskriterium für die Gruppe mit hoher sportlicher Aktivität war die Durchführung von mehr als acht Stunden Sport pro Woche, für die Kontrollgruppe weniger als zwei Stunden pro Woche. Des Weiteren sollten alle Teilnehmer körperlich und insbesondere kardiopulmonal gesund sein.

Um dies sicherzustellen, mussten alle Probanden vor Testbeginn eine umfangreiche Untersuchung bestehend aus Anamnese, klinisch-körperlicher Untersuchung, Ruhe-EKG, Lungenfunktionsanalyse und Herzechokardiographie durchlaufen.

Für die Teilnehmer gab es folgende Ausschlusskriterien:

- Fehlende schriftliche Einwilligung
- Geringe Kooperationsbereitschaft
- Bekannte Vorerkrankungen
- Auffällige Ergebnisse in den Voruntersuchungen

Die Kriterien zur Teilnahme waren:

- Körperliche und kardiopulmonale Gesundheit
- Kontrollgruppe weniger als zwei Stunden Sport pro Woche
- Sportgruppe mehr als acht Stunden Sport pro Woche

Jeder Proband wurde vor Beginn der Untersuchungen über Hintergründe, Ziele und Durchführung der Tests ausführlich aufgeklärt und ihm wurde ein Aufklärungsblatt ausgehändigt (siehe Anhang).

Die Risiken der Untersuchungen für die Probanden waren als gering einzustufen. Dennoch wurde jeder Teilnehmer von einem anwesenden Arzt auf folgende Punkte hingewiesen:

1. Durch die Blutentnahme kann es in sehr seltenen Fällen zur Verletzung von Nerven kommen. Es besteht das Risiko der Hämatombildung im Entnahmebereich.
2. Im Rahmen der Laufbandspiroergometrie kann es zu folgenden Komplikationen kommen:
 - Leichter Muskelkater am Tag nach der Untersuchung
 - Herzrhythmusstörungen, in extrem seltenen Fällen Herz-Kreislaufstörungen, Atemstillstand bis hin zum Herz-Kreislaufstillstand
 - In seltenen Fällen Schwindel, Übelkeit, Blutdruckanstieg oder -abfall
 - Sehr selten Verengung der Atemwege oder anhaltender Erschöpfungszustand
 - Sturz und/oder Verletzung des Bewegungsapparates
 - Reversible Druckstellen im Bereich der Spirometriemaske

Es bestand für die Teilnehmer jederzeit die Möglichkeit die Untersuchungen abubrechen.

Die Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg begutachtete die Studie und gab ein positives Votum ab. Richtlinien zur Durchführung von Studien und des Datenschutzes wurden strengstens eingehalten.

Jedem Probanden wurden vor und nach der körperlichen Belastung zwei EDTA-Monovetten und eine Serum-Monovette Vollblut entnommen, wobei eine EDTA-Monovette für die Monozytenpräparation, die andere zur Erstellung eines maschinellen Differentialblutbildes durch das Zentrallabor der Universitätsklinik Halle (Saale) vorgesehen war. Das Serum wurde für gegebenenfalls nachfolgende Untersuchungen aufbewahrt.

3.3 Laufbandspiroergometrie und Laktatbestimmung

Zur körperlichen Ausbelastung der Teilnehmer wurde eine Laufband-Spiroergometrie durchgeführt, da die Leistungssportler aus dem Bereich des Ballsports kamen und das Laufen für sie die physiologischere Belastungsform darstellte. Der Untersuchungsaufbau bestand aus einem Laufband der Firma Schiller (Modell MTM-1500), einem EKG-Interface von General Electrics und einem Spirometer der Firma Jäger. Die Geräte waren an einen Dualmonitorarbeitsplatz gekoppelt und wurden über eine Software (Masterscreen CPX) der Firma Cardinal Health gesteuert. Auf den Monitoren des Systems konnten die Daten der Spirometrie und des EKGs ständig überwacht werden.

Das für die Experimente verwendete Laufband konnte einen Geschwindigkeitsbereich von 0 bis 20 km/h abdecken. Bei einer Laufbandfläche von 150 x 50 cm war ein Laufen auch bei hohen Geschwindigkeiten sicher möglich. Alle Probanden waren zum Schutz vor Verletzungen im Falle eines Sturzes mit einem Gurt gesichert.



Abbildung 3 Laufband Schiller MTM-1500 (Schiller 2018)

Alle Teilnehmer liefen nach einem standardisierten Belastungsprotokoll (siehe Anhang). Der Laufbandtest für die Kontrollgruppe und die Sportlerinnen startete mit einer fünfminütigen Einlaufphase bei 6 km/h. Die darauffolgenden Belastungsstufen dauerten jeweils drei Minuten. Die Belastungsphase begann mit einer Geschwindigkeit von 7,8 km/h. In den folgenden Stufen wurde das Tempo um jeweils 0,9 km/h gesteigert.

Da in der Gruppe der männlichen Sportler die Gesamtbelastungszeit durch die geringen Geschwindigkeitssteigerungen sehr hoch ausgefallen wäre, wurde das Testprotokoll mit höheren Steigerungen adaptiert. Der Test startete hier mit einer Einlaufzeit von fünf Minuten bei 7 km/h. Die erste Stufe begann bei 7,2 km/h. Die Steigerungen erfolgten mit 1,8 km/h pro Stufe.

Zwischen den Belastungsstufen bestanden 30 Sekunden Pause, in der Kapillarblut aus dem Ohrläppchen zur Bestimmung des Laktats abgenommen wurde. Hierzu wurde ein Laktatmessgerät der Firma Müller Gerätebau genutzt, welches vollautomatisch nach einem enzymatisch-amperometrischen Messprinzip arbeitete. Die mit Blut gefüllten Kapillaren wurden sofort in verschließbare Reaktionsgefäße gelegt, in denen 500 µl Hämolyserlösung vordosiert war. Durch kräftiges Schütteln wurde das Blut aus der Kapillare gewaschen und hämolysiert.

Nach Einlegen des Reaktionsgefäßes in das Gerät startete der Messzyklus automatisch. Die gemessenen Werte wurden in das Messprotokoll (siehe Anhang) übernommen. Ein starker Anstieg der Laktatkonzentration im Verlauf des Tests zeigte den Beginn einer anaeroben Stoffwechselsituation und damit einer körperlichen Ausbelastung an. Als weiteres Instrument zur Belastungsmessung verwendeten wir die Daten der Spirometrie. Das verwendete Spirometer der Firma Jäger vereinte drei Messsysteme für Atemfluss, Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxid-Konzentration. Die gewünschten Parameter konnten von der Software MasterScreen CPX grafisch dargestellt werden. Zur Validierung der körperlichen Ausbelastung wurde ein Diagramm gewählt, welches die Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgabe im Verhältnis zur Zeit darstellte. Im aeroben Bereich liegt die Kurve der Sauerstoffaufnahme über der der Kohlenstoffdioxidabgabe. Kreuzen sich beide Kurven, wird mehr Kohlenstoffdioxid abgegeben als Sauerstoff aufgenommen. Es ist in diesem Fall anzunehmen, dass nun der anaerobe Bereich erreicht ist. Zusätzlich signalisiert ein Abflachen der O₂-Kurve das Erreichen der maximal möglichen Sauerstoffaufnahme des Probanden.

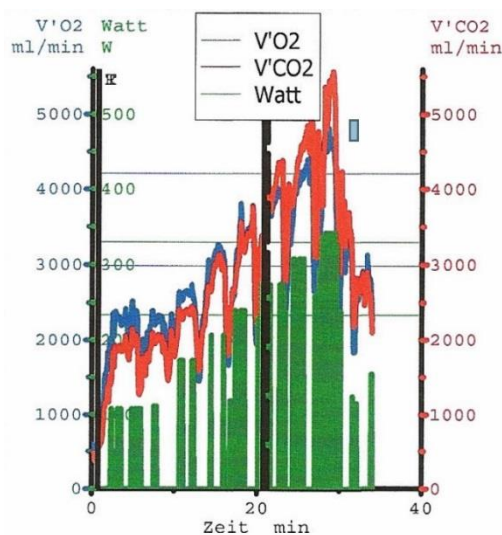


Abbildung 4 Sauerstoffaufnahme und CO₂ Abgabe zum Untersuchungszeitpunkt

Über das Zusammenführen der Daten aus der Laktatmessung und der Spiroergometrie konnte die gewünschte maximale körperliche Belastung der Probanden sichergestellt werden.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren zur Eigenschaftsanalyse von Zellen. Das Verfahren wurde 1968 an der Wilhelms-Universität Münster von Dittrich und Göhde entwickelt (Sysmex Partec GmbH 2015). Erste kommerzielle Geräte wie zum Beispiel das ICP 11 wurden im selben Jahr von der Firma Partec, welche heute zum Sysmex-Konzern gehört, angeboten. Das Herzstück des Durchflusszytometers ist eine optische Bank. Diese besteht aus der Messküvette, einer Lichtquelle (meist ein oder mehrere verschiedenfarbige Laser) und den Detektoren (meist Fotovervielfacherröhren oder Fotodioden). Die präparierten und gefärbten Zellen werden zunächst in einem laminaren Flüssigkeitsstrom fokussiert. Dies geschieht in einer hochpräzise gefertigten Messküvette aus Glas. In dem schnell fließenden Mantel- bzw. Hüllstrom vereinzeln sich die Zellen und passieren dann den Laserstrahl am so genannten Beobachtungspunkt.



Abbildung 5
Durchflusszytometer Partec
ICP11 (Sysmex Partec GmbH
2015)

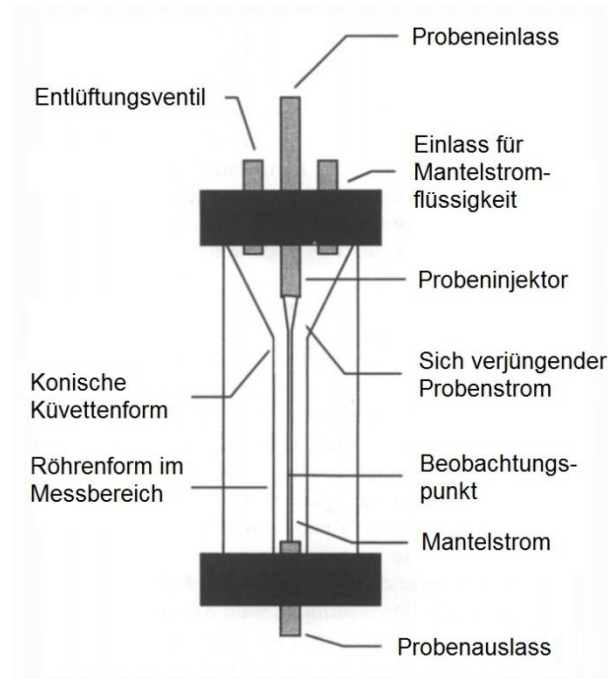


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Messküvette
(Shapiro 2005)

Direkt gegenüber dem Laser befindet sich der Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht, FSC).

Solange sich kein Messobjekt in der Küvette befindet, ist die Fotodiode des Forward Scatters durch eine fixe Blende verdunkelt.

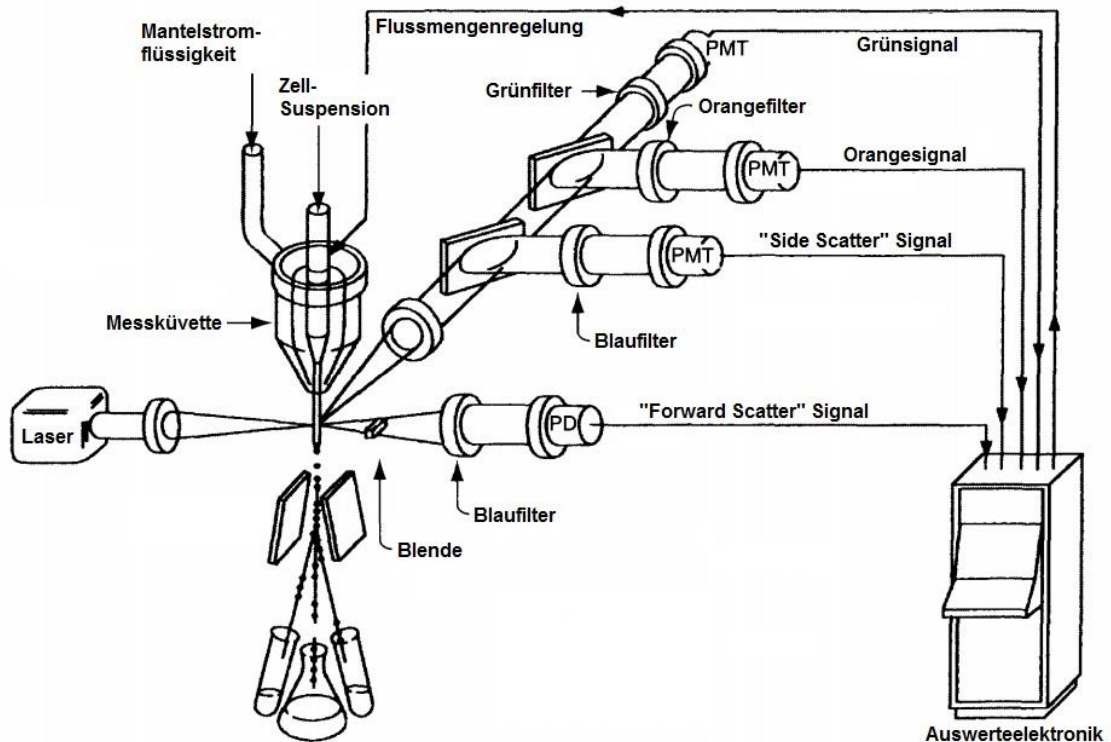


Abbildung 7 Schematischer Aufbau der optischen Bank (Givan 2010)

Wird eine Zelle in der Messküvette durch den Laser beleuchtet, kommt es an der Zellmembran zu einer Beugung des Lichtes, welches dann an der Blende des Forward Scatters vorbeistrahlt und durch die Fotodiode registriert wird. Je größer oder voluminöser die Zelle ist, desto größer ist die Menge des gebeugten Lichtes und desto größer ist das registrierte Signal. Das Signal des Forward Scatters beschreibt also die Größe der untersuchten Zelle.

Das zweite Messsystem der optischen Bank ist der Sideward Scatter (Seitwärtsstreulicht, SSC). Dieser befindet sich im 90°-Winkel zum Laserstrahl und empfängt das seitlich gestreute Licht. Wenn Zellen eine hohe Granularität oder z.B. große Zellkerne besitzen, wird das darauf treffende Licht intensiver gestreut. Das Sideward Scatter-Signal misst somit die Komplexität oder Granularität einer Zelle. In der optischen Einheit des Sideward Scatters befinden sich ebenfalls Detektoren für farbiges Streulicht. Hierzu sind vor jedem Detektor Farbfilter angebracht. Für das farbiges Streulicht besitzt die optische Bank des Sideward Scatters Farbauftrennungen über Filter in grün, orange und blau. So ist es möglich, das farbiges Streulicht von z.B.

antikörpermarkierten Zellen zu empfangen und zu differenzieren. Zur Detektion der Lichtsignale finden im Sideward Scatter-Modul Fotoelektronen-Vervielfacherröhren Anwendung. Diese ermöglichen eine präzise Messung auch bei kleinsten Lichtemissionen. Zur Selektion der Zelltypen über CD-Marker ist eine Reihe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf dem Markt verfügbar. Bei der Auswahl ist zu beachten, dass sich insbesondere bei Antikörpermischungen die emittierten Spektren nicht überschneiden, da dies die Auswertung erschweren oder unmöglich machen würde.

3.5.2 Das Durchflusszytometer MACS-Quant

Für die vorliegende Untersuchung ist das Durchflusszytometer MACS-Quant der Firma Miltenyi Biotec verwendet worden. Als Lichtquelle dienen drei Laser mit einer Wellenlänge von 405 nm (blau-violett), 488 nm (türkis) und 635 nm (rot). Durch entsprechende Farbfilter hat das Gerät sieben Farbkanäle im Sideward Scatter-Modul (1 x violett, 4 x blau, 2 x rot) und bietet so ein ausreichendes Messspektrum für die ausgewählten fluoreszenzmarkierten Antikörper. Alle Messschritte, inklusive Spül- und Reinigungsabläufe, laufen vollautomatisch ab. Der aktuelle Status des Geräts und der Messungen kann an einem Touchscreenmonitor verfolgt werden. Zur Qualitätssicherung und Kalibrierung wurden nach dem Hochfahren des MACS-Quants Messungen mit farbig markierten Kügelchen, so genannten Sphero-Beads, durchgeführt. Die Messergebnisse des Geräts wurden automatisch gespeichert und können zur weiteren Verarbeitung via Netzwerkschnittstelle oder USB in einen Computer exportiert werden.

3.5.3 Präparation der Monozyten

Die Präparation und Färbung der Monozyten erfolgte nach einem standardisierten Protokoll, welches durch das Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II der Universitätsklinik Halle (Saale) entwickelt und erprobt wurde.

Die Präparation und Herstellung des Antikörperansatzes erfordert ein sauberes und präzises Arbeiten. Um das Risiko von Verunreinigungen zu reduzieren und dem Arbeitsschutz gerecht zu werden, erfolgten alle Arbeitsschritte an einer speziellen Arbeitsbank mit kontinuierlicher Reinluftzirkulation. Von jedem Probanden existierten zur Monozytenpräparation zwei EDTA-Monovetten, jeweils vor und nach Belastung.

Nach ausreichender Durchmischung wurde aus der jeweiligen Monovette zweimal

100 µl Vollblut entnommen und auf zwei Reaktionsröhrchen (Probe und Kontrolle) verteilt. Damit ergaben sich insgesamt vier Reaktionsgefäße pro Proband. Ziel der Doppelbestimmung war es, Mess- und Präparierfehler zu minimieren. Zudem wurde in der Hauptprobe die Expression von CD115 und CD143 gemessen.

Um die im Vollblut enthaltenen Eiweiß- und Elektrolytverschmutzungen aus den Proben zu entfernen, waren zunächst Waschschrte erforderlich. Hierzu wurden dem Blut 2 ml MACS-Buffer zugesetzt und mit Hilfe eines Vortexers gründlich gewaschen.

Der MACS-Buffer setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 2 Zusammensetzung MACS-Buffer

	Substanz	Aufgabe
PBS	Phosphate Buffered Saline – phosphatgepufferte Salzlösung	pH-Wertstabilisierung auf 7,4
BSA	Bovine Serum Albumin Fraktion V – Serumalbumin des Rindes	Reduktion unspezifischer Antikörperbindung und Zellverklumpungen
NaN ₃	Natriumacid	Verhinderung bakterieller Besiedlung

Nach dem Waschen wurden die Proben für fünf Minuten bei 300 RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Danach konnte der klare Überstand mittels Glaskanüle und Unterdruckpumpe mit Wasserfalle abgesaugt werden. Insgesamt wurden die Waschschrte zweimal durchgeführt.

Für den nächsten Präparationsschrte musste zunächst ein Gesamtansatz eines Fc-Block-Reagenz hergestellt werden. Pro Probe bestand der Ansatz aus 4,4 µl Fc-Block (Miltenyi Biotech) und 50,6 µl MACS-Buffer. In jede Probe wurden 50 µl Fc-Block Reagenz pipettiert, mit Hilfe des Vortexers vermischt und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert.

Der Fc-Block hat die Aufgabe, unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptor exprimierende Zellen wie z.B. B-Zellen zu verhindern und die Affinität der verwendeten Antikörper zu erhöhen. Während der Inkubationszeit wurde der Antikörperansatz hergestellt.

Pro Proband ergab sich für diesen Ansatz folgende Zusammensetzung:

Tabelle 3 Zusammensetzung Antikörperansatz

Reagenz	Probe	Kontrolle
CD15 eF450	4,4 µl	4,4 µl
CD14 Pe Cy7	4,4 µl	4,4 µl
CD19 eF780	4,4 µl	4,4 µl
CD16 APC	2,2 µl	2,2 µl
CD86 PE C5	11 µl	11 µl
CD115 PE	10,5 µl	
CD143 FITC	22 µl	

Der Antikörpermix wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gründlich vermischt. In die Hauptprobe wurden 24,2 µl und in die Kontrolle 12 µl Antikörperansatz pipettiert. Nach ausreichender Vermischung des Ansatzes folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C. Die Proben wurden hiernach lichtgeschützt weiterverarbeitet. Nach der Inkubationszeit mussten die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten entfernt werden. Dafür wurde eine Lyselösung (Becton Dickinson) verwendet, die vor der Anwendung im Verhältnis 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt werden musste. Das Wirkprinzip der Lösung besteht darin, eine leicht hypotone Umgebung zu schaffen, welche die Erythrozyten zum Platzen bringt. Leukozyten sollten diese Bedingungen überstehen. Die Proben wurden mit 2 ml der Lösung versehen. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit sollte durch das freiwerdende Hämoglobin aus der trüben, hellroten Lösung unbedingt eine klare, hellrote Flüssigkeit werden. Nun wurden die Proben bei 300 RZB für fünf Minuten zentrifugiert und der zellfreie Überstand vorsichtig abgegossen.

Um Hämoglobinreste zu entfernen, waren weitere Waschschrte mit MACS-Buffer und PBS-Acid nötig. Die Proben wurden dazu zunächst mit 2 ml MACS-Buffer gewaschen, bei 300 RZB für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Dies wurde mit 400 µl PBS-Acid wiederholt. Vor der Messung wurden nun erneut jeweils 400 µl PBS-Acid den Proben zugegeben und durch Vortexen die Zellen in Suspension gebracht. Die Messung erfolgte zeitnah durch das Durchflusszytometer.

3.5.4 Auswertung der Messergebnisse – Gating

Die gemessenen Lichtsignale und Intensitäten des Durchflusszytometers konnten über die Software MACS-Quantify grafisch oder numerisch dargestellt werden; eine Bearbeitung war auch nach der Messung möglich. Die gewünschten Bereiche in den Dot-Plots konnten durch die Eingrenzung in Kästchen markiert werden. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einem Zählereignis. Um die Monozyten von anderen im Blut befindlichen Zellen wie z.B. Granulozyten oder B-Lymphozyten zu trennen, nutzten wir eine graphische Auswertung über einen Fünf-Felder-Dot-Plot.

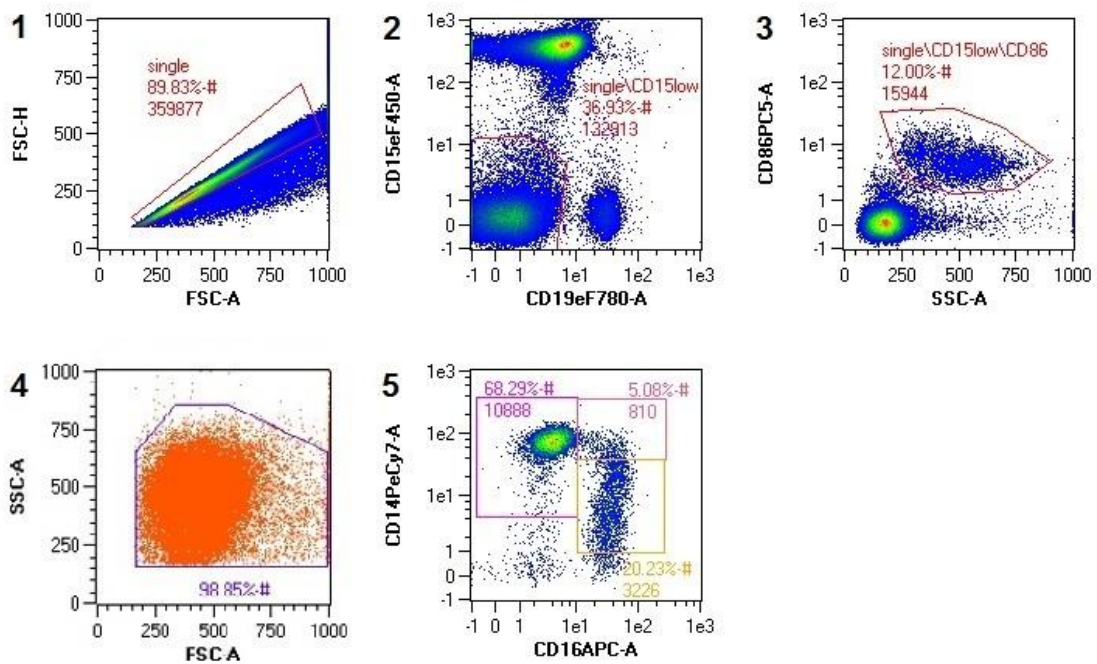


Abbildung 8 Fünf-Felder-Dot-Plot

Die Ergebnisse der Dot-Plots werden im jeweils folgenden Dot-Plot verwendet. So erschienen nur die im Plot markierten Zählereignisse des vorherigen Plots im nächsten Feld und so weiter. Im ersten Auswahlfeld werden die Messergebnisse der Forward-Scatter-Signalintensität (Forward Scatter High) zu der Messfläche (Forward Scatter Area) abgetragen.

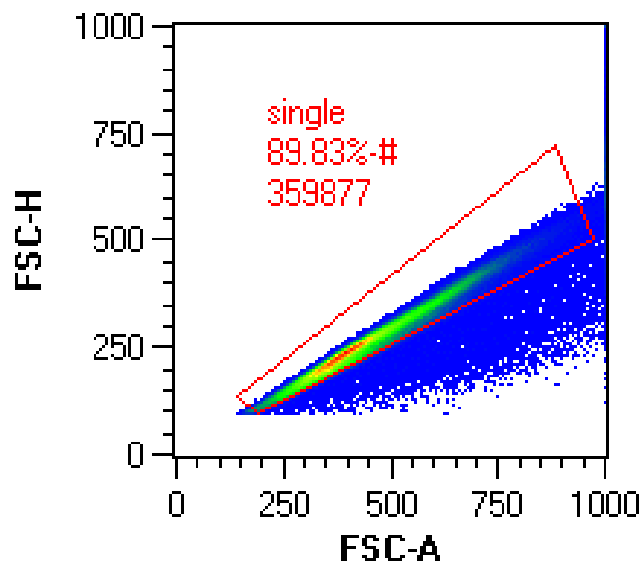


Abbildung 9 Gating Forward Scatter High zu Forward Scatter Area

Das Auswahlfenster wurde so gelegt, dass nur hell leuchtende Zellen in der nächsten Auswahl erscheinen. Die in der Probe befindlichen Zelldubletten und Debris konnten somit aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden. Im nächsten Plot wurden die CD15- und CD19-exprimierenden Zellen identifiziert und von der weiteren Messung abgetrennt. In der oberen Wolke befanden sich hierbei die CD15 hoch positiven Granulozyten; in der rechten Wolke die CD19 positiven B-Lymphozyten und dendritischen Zellen (Abbildung 10). Im Auswahlfenster befanden sich nach dieser Selektion noch T-Lymphozyten und die gewünschten Monozyten.

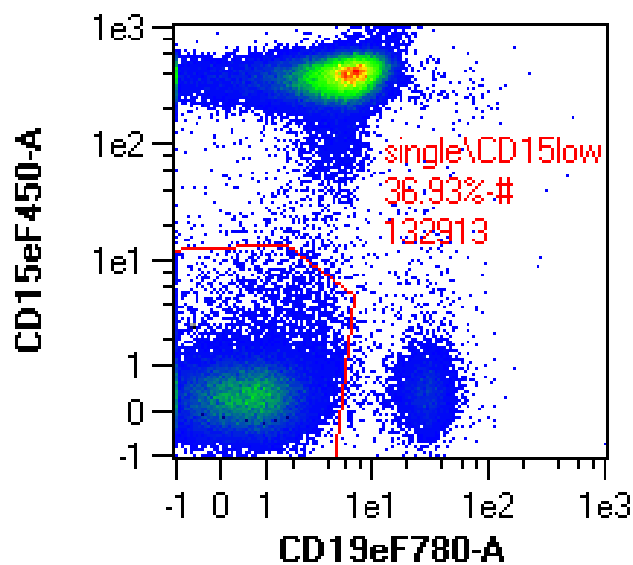


Abbildung 10 Gating CD15- zu CD19-Expression

Darauffolgend waren in der Auftragung CD86-Expression zu Sideward Scatter-Fläche (SSC-A) alle Zellen zur weiteren Auswertung hinzugefügt worden, die eine hohe Granularität aufwiesen und CD86 markiert waren (Abbildung 11).

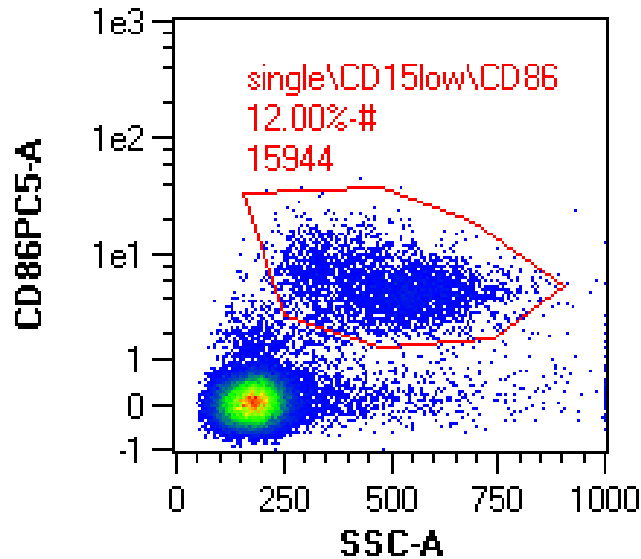


Abbildung 11 Gating CD86-Expression zu Sideward Scatter Area

Nun sollen nur noch T-Lymphozyten und Monozyten in der Auswahl enthalten sein. Aufgrund der unterschiedlichen Granularität konnten diese in der Auftragung Sideward Scatter-Fläche (SSC-A) zu Forward Scatter-Fläche (FSC-A) getrennt werden.

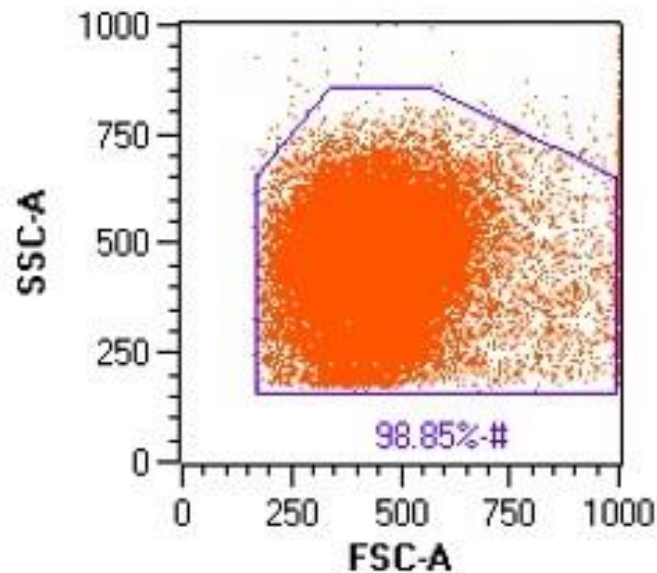


Abbildung 12 Gating Sideward Scatter Area zu Forward Scatter Area

Im letzten Feld konnte schließlich die Trennung von CD14 und CD16 positiven Monozyten erfolgen. Die Populationen waren hierbei in drei Felder aufgeteilt worden: CD14++CD16- (Mo1), CD14++CD16+ (Mo2) und CD14+CD16++ (Mo3).

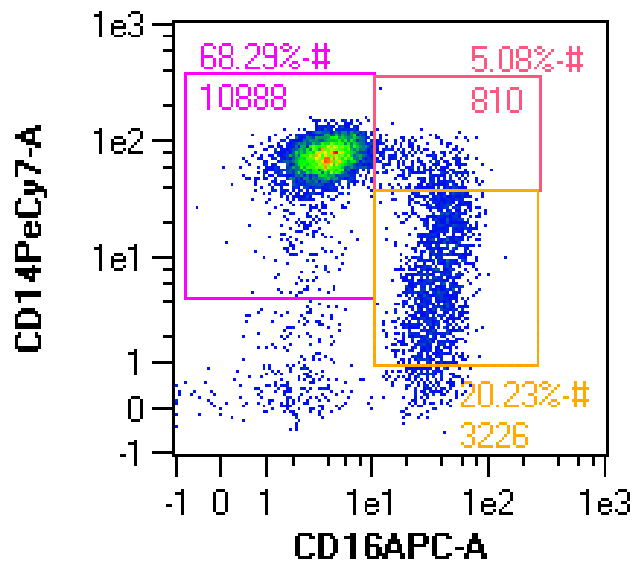


Abbildung 13 Gating CD14- zu CD16-Expression

In einem weiteren Plot erfolgte die Markierung der CD115-Expression. Da CD115 nur von Monozyten exprimiert wird (Abbildung 14), bezieht sich diese Grafik auf die erste Selektion des Fünf-Felder-Plots. Der Auswahlbereich wird auf fein granulierten Zellen mit CD115-Expression gelegt.

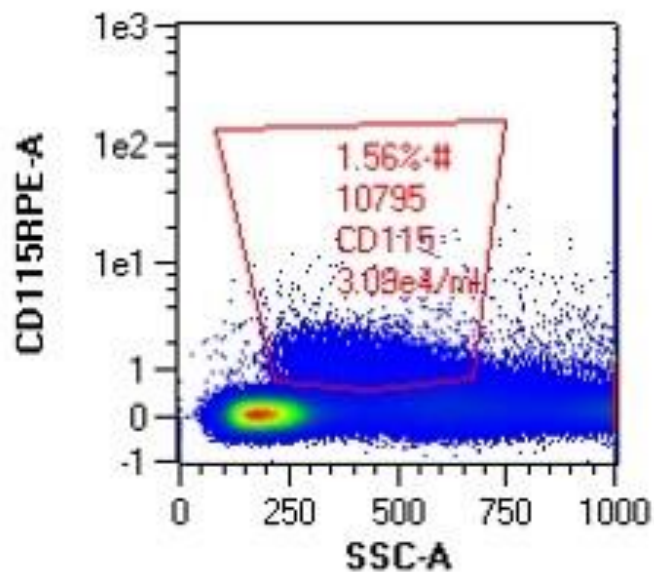


Abbildung 14 Gating CD115-Expression zu Sideward Scatter Area

Die genauen Zählergebnisse (Counts) und die prozentualen Verteilungen konnten anschließend in eine Microsoft-Excel-Tabelle exportiert werden.

3.6 Hämatologische Untersuchungen

Aus der zweiten EDTA-Monovette wurde durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Halle (Saale) ein großes Blutbild erstellt, welches folgende Werte beinhaltet: Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozytenzahl und ein Differentialblutbild (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile und basophile Granulozyten). Die Blutbilder wurden durch ein vollautomatisches Hämatologiesystem vom Typ Sysmex XE-2100 erstellt.

3.7 Berechnung der Daten

3.7.1 Monozytensubpopulationen

Nach dem Gating der Messdaten sind im nächsten Schritt die prozentuale Verteilung der Monozytensubpopulationen und mit Hilfe des Differentialblutbildes die Absolutzahlen der Monozyten in den Proben berechnet worden. Als Berechnungsgrundlage dienten die Zählereignisse (Counts) von Mo1, Mo2 und Mo3. Die prozentualen Werte a wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\left(\frac{100}{\text{Count Mo1} + \text{Count Mo2} + \text{Count Mo3}} \right) * \text{Count Mox} = a \% \text{ Mox}$$

x = 1; 2; 3

Aufgrund der Doppelbestimmung der Proben wurde aus beiden gewonnenen Werten der Mittelwert b bestimmt:

$$\frac{a \% \text{ Mox (Probe)} + a \% \text{ Mox (Kontrolle)}}{2} = b \% \text{ Mox}$$

Mit dem berechneten prozentualen Wert b der Monozytensubpopulationen konnte mit Hilfe der Monozytenzahl, die aus dem Differentialblutbild errechnet werden kann, die Absolutzahl der Subpopulationen ermittelt werden.

$$\begin{aligned} & \text{Leukozytenzahl in pt}/\mu\text{l} * \text{Monozytenfraktion} \\ & = \text{Monozytengesamtzahl in pt}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

$$\frac{\text{Monozytengesamtzahl in pt}/\mu\text{l} * b \% \text{ Mox}}{100} = \text{Mox absolut in pt}/\mu\text{l}$$

3.8 Statistische Auswertung

Zur Beschreibung kontinuierlicher, normal verteilter Variablen wurden Mittelwert und Standardabweichung, zur Beschreibung schief verteilter Median und das 25%- bzw. 75%-Quartil berechnet. Kategoriale Variablen wurden in % dokumentiert. Zum Vergleich der Mittelwerte metrischer, unabhängiger normalverteilter Variablen kam der T-Test zur Anwendung. Zur Prüfung auf Normalverteilung kam der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest zur Anwendung. Zum Vergleich schief verteilter Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Der Chi-Quadrat-Test wurde im Falle nominaler Variablen angewandt. P-Werte von $<0,05$ wurden als signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung der Daten kam SPSS-Statistics, Version 20 zur Anwendung.

4. Ergebnisse

4.1 Probandenbeschreibung

Die Teilnehmer wurden in Abhängigkeit von ihrer sportlichen Aktivität in eine Kontroll- und eine Sportgruppe eingeteilt. Die Sportgruppe bestand aus 42 Leistungssportlern der 1. bis 4. Liga, welche im Durchschnitt $11,80 \pm 3,73$ Stunden Sport pro Woche trieben. In der Aufteilung nach Sportart bestand diese Gruppe aus 17 Handballerinnen, 9 Basketballerinnen und 16 Fußballspielern. Im Geschlechtsverhältnis waren 38,1% der Sportler männlich. 14,3% der Gruppe waren Raucher. Die Kontrollgruppe bestand aus 29 Männern und Frauen, hauptsächlich Studierende und Angestellte des Universitätsklinikums Halle (Saale). 51,7% der Kontrollpersonen waren männlich. Die sportliche Aktivität lag im Durchschnitt bei $1,91 \pm 1,53$ Stunden/Woche. 20,7% der Kontrollprobanden gaben an, Raucher zu sein. Alle Teilnehmer waren kardiopulmonal gesund und hatten keine chronischen Krankheiten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden in der sportlichen Aktivität pro Woche (Kontrollgruppe $1,91 \pm 1,53$ h versus Sportler $11,80 \pm 3,73$ h, $p = <0,001$) und im Alter. Die Probanden der Kontrollgruppe waren im Durchschnitt 4,3 Jahre älter als die Sportgruppe.

Tabelle 4 Basisdaten

Variable	Nichtsportler	Sportler	p-Wert
männlich in %	51,7	38,1	0,255
Alter in Jahren	26,5 ± 4,4	22,2 ± 3,5	<0,001
Größe in m	1,76 ± 0,08	1,78 ± 0,07	0,376
Gewicht in kg	71,2 ± 14,0	71,9 ± 9,0	0,836
BMI in kg/m ²	22,8 ± 3,1	22,7 ± 1,9	0,848
Bauchumfang in cm	79,46 ± 10,3	78,09 ± 5,3	0,524
Hüftumfang in cm	87,43 ± 8,53	85,43 ± 5,72	0,271
Waist/Hip Ratio	0,91 ± 0,06	0,91 ± 0,04	0,583
Medikamenteneinnahme	7,1%	13,8%	0,356
Raucher	20,7%	14,3%	0,479
Sport pro Woche in h	1,91 ± 1,53	11,80 ± 3,73	<0,001
Blutdruck systolisch in mmHg	125,71 ± 9,56	123,82 ± 11,30	0,475
Blutdruck diastolisch in mmHg	79,29 ± 6,63	77,89 ± 8,43	0,472

4.2 Leistungsergebnisse des Tests

Die in der Spiroergometrie bestimmte VO₂ max, welche der maximal möglichen Sauerstoffaufnahme-fähigkeit des Probanden entspricht, gilt als ein Maß für den Trainingszustand. Hier zeigten sich signifikante Unterschiede. Die Kontrollgruppe erreichte im Durchschnittlich 37,34 ± 8,75 l/min, die Sportler 44,98 ± 12,81 l/min; p=0,007. Auch die auf dem Laufband erreichte Endgeschwindigkeit unterstrich die höhere körperliche Leistungsfähigkeit der Sportler (15,62 ± 1,76 km/h zu 11,68 ± 1,87 km/h Kontrollgruppe; p<0,001). Die nach der Belastung erfragte Einschätzung der Probanden nach der Borgskala, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Nichtsportler 17 ± 2 zu 17 ± 1 bei den Sportlern; p=0,077).

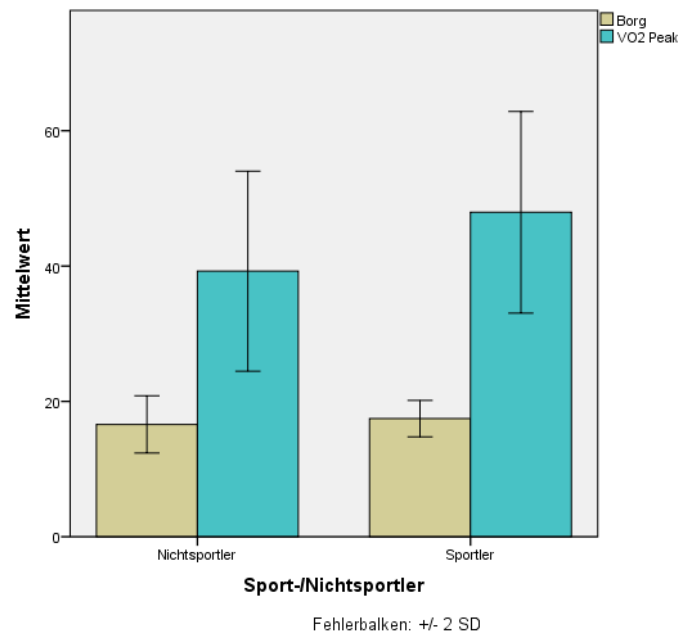


Abbildung 15 Mittelwertvergleich von Borgskala und VO2 Peak

4.3 Hämatologische Daten

Im Rahmen der Untersuchung wurden die in Tabelle 5 dargestellten hämatologischen Basisdaten erhoben. Vor Belastung lagen die Laborwerte bei beiden Gruppen innerhalb der Referenzwerte. Signifikante Unterschiede zeigten sich lediglich in den absoluten Lymphozytenzahlen. Bei der Kontrollgruppe bestanden höhere Werte als bei Sportlern (Nichtsportler 2503 ± 646 pt/ μ l, Sportler 2086 ± 597 pt/ μ l; $p=0,007$).

Tabelle 5 Hämatologische Basisdaten vor Belastung

Variable	vor Belastung		p-Wert
	Nichtsportler	Sportler	
Erythrozyten in Tpt/l	4,83 ± 0,51	4,77 ± 0,38	0,578
Hämoglobin in mmol/l	8,82 ± 0,95	8,73 ± 0,79	0,681
Hämatokrit in l/l	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,525
MCV	86,79 ± 2,99	86,55 ± 3,97	0,768
MCH	1,83 ± 0,07	1,83 ± 0,07	0,814
MCHC	27,15 ± 32,86	21,15 ± 0,75	0,334
Thrombozyten in Gpt/l	267,62 ± 44,76	261,62 ± 51,13	0,611
Leukozyten in pt/μl	7325 ± 1289	6686 ± 1376	0,052
Neutrophile in %	0,55 ± 0,09	0,58 ± 0,09	0,133
Neutrophile absolut in pt/μl	4029 ± 1023	3911 ± 1187	0,664
Lymphozyten in %	0,34 ± 0,08	0,32 ± 0,08	0,152
Lymphozyten absolut in pt/μl	2503 ± 646	2086 ± 597	0,007
Eosinophile in %	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,298
Eosinophile absolut in pt/μl	176 ± 118	135 ± 118	0,159
Basophile in %	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,113
Basophile absolut in pt/μl	74 ± 15	69 ± 13	0,298
Gesamtmonozyten in %	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,765
Gesamtmonozyten absolut in pt/μl	588 ± 162	525 ± 153	0,101

Bedingt durch die belastungsabhängige Leukozytose kam es nach der Belastung in beiden Gruppen zu einem Anstieg der absoluten Werte der Leukozytenfraktionen (Neutrophile, Lymphozyten, Eosinophile und Basophile). Die prozentuale Verteilung blieb im Normbereich.

Tabelle 6 Hämatologische Basisdaten nach Belastung

Variable	nach Belastung		p-Wert
	Nichtsportler	Sportler	
Erythrozyten in Tpt/l	4,96 ± 0,51	4,93 ± 0,36	0,786
Hämoglobin in mmol/l	9,14 ± 0,98	9,06 ± 0,78	0,713
Hämatokrit in l/l	0,43 ± 0,04	0,43 ± 0,03	0,741
MCV	86,90 ± 2,91	86,81 ± 3,93	0,919
MCH	1,84 ± 0,08	1,84 ± 0,10	0,832
MCHC	21,25 ± 0,66	21,19 ± 0,69	0,753
Thrombozyten in Gpt/l	324,41 ± 55,90	323,17 ± 61,76	0,931
Leukozyten in pt/μl	10540 ± 1766	10179 ± 1988	0,434
Neutrophile in %	0,49 ± 0,09	0,52 ± 0,10	0,238
Neutrophile absolut in pt/μl	5208 ± 1334	5317 ± 1582	0,761
Lymphozyten in %	0,41 ± 0,09	0,39 ± 0,09	0,464
Lymphozyten absolut in pt/μl	4302 ± 1157	3953 ± 1128	0,210
Eosinophile in %	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,378
Eosinophile absolut in pt/μl	190 ± 104	168 ± 143	0,495
Basophile in %	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,411
Basophile absolut in pt/μl	103 ± 18	108 ± 36	0,680
Gesamtmonozyten in %	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,111
Gesamtmonozyten absolut in pt/μl	801 ± 176	719 ± 253	0,138

4.4 Veränderungen der Monozytensubpopulationen

4.4.1 Vergleich Kontrollgruppe vor und nach Belastung

In der Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Leukozytenzahlen vor und nach der Belastung (7325 ± 1289 pt/μl vorher zu 10540 ± 1766 pt/μl nachher; p<0,001). Der prozentuale Anteil der Monozytenfraktion veränderte sich hierbei nur unwesentlich (0,08 ± 0,02% vorher zu 0,08 ± 0,01% nachher; p=0,155). Die absolute Monozytenzahl stieg demzufolge ebenfalls signifikant an (588 ± 162 pt/μl vor Belastung zu 801 ± 176 pt/μl nach Belastung; p<0,001). Innerhalb der Subpopulation von Mo1 kam es zu einem Abfall des prozentualen Anteils von 84,03 ± 6,28% auf 81,86 ± 6,48%; p<0,001. Der absolute Wert stieg allerdings signifikant an (495 ± 143 pt/μl vor zu 660 ± 172 pt/μl nach Belastung; p<0,001). Der Anteil von Mo2 an der Gesamtpopulation blieb vor und nach Belastung nahezu unverändert (4,11 ± 1,79% zu 4,28 ± 1,99%; p=0,369),

wohingegen der absolute Anteil signifikant anstieg ($25 \pm 16 \text{ pt}/\mu\text{l}$ zu $35 \pm 22 \text{ pt}/\mu\text{l}$; $p < 0,001$). Die Werte der Gruppe Mo3 stieg vor und nach dem Test prozentual ($11,85 \pm 5,49\%$ zu $13,85 \pm 5,92\%$, $p = 0,001$) und absolut ($68 \pm 34 \text{ pt}/\mu\text{l}$ zu $105 \pm 38 \text{ pt}/\mu\text{l}$; $p < 0,001$) signifikant an.

Tabelle 7 Vergleich Kontrollgruppe vor und nach Belastung

Variable	vor Belastung	nach Belastung	p-Wert
Leukozyten in $\text{pt}/\mu\text{l}$	7325 ± 1289	10540 ± 1766	$<0,001$
Monozytenfraktion in %	$0,08 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,01$	0,155
Monozyten gesamt in $\text{pt}/\mu\text{l}$	588 ± 162	801 ± 176	$<0,001$
Mo1 in %	$84,03 \pm 6,28$	$81,86 \pm 6,48$	0,001
Mo1 absolut in $\text{pt}/\mu\text{l}$	495 ± 143	660 ± 172	$<0,001$
Mo2 in %	$4,11 \pm 1,79$	$4,28 \pm 1,99$	0,369
Mo2 absolut in $\text{pt}/\mu\text{l}$	25 ± 16	35 ± 22	$<0,001$
Mo3 in %	$11,85 \pm 5,49$	$13,85 \pm 5,92$	0,001
Mo3 absolut in $\text{pt}/\mu\text{l}$	68 ± 34	105 ± 38	$<0,001$

Mo1 = Monozytensubpopulation 1; Mo2 = Monozytensubpopulation 2; Mo3 = Monozytensubpopulation 3

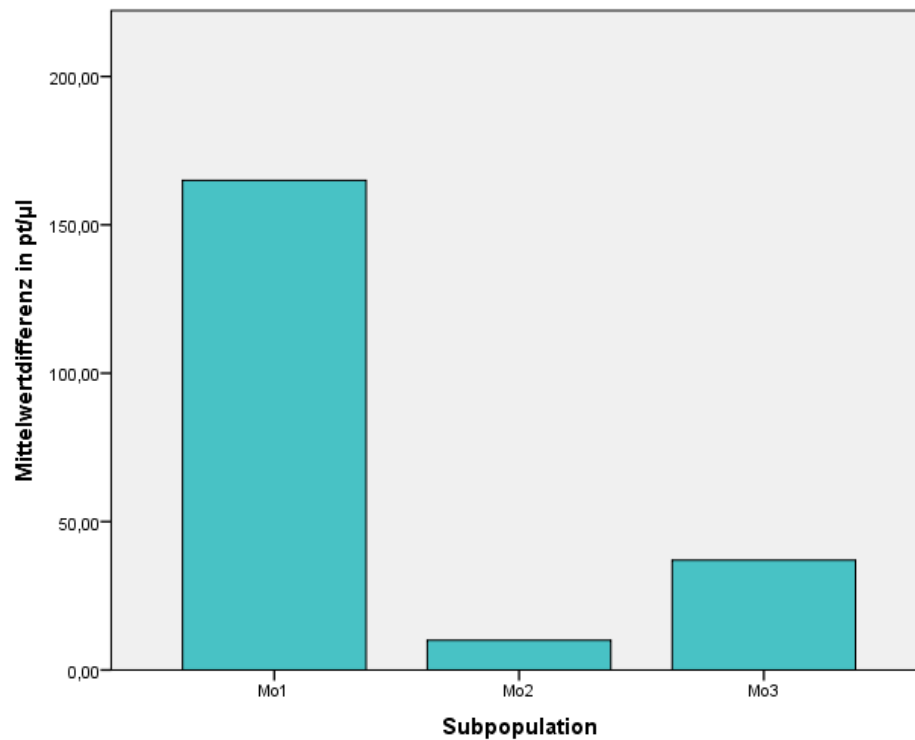


Abbildung 16 Mittelwertdifferenz absolut Kontrollgruppe

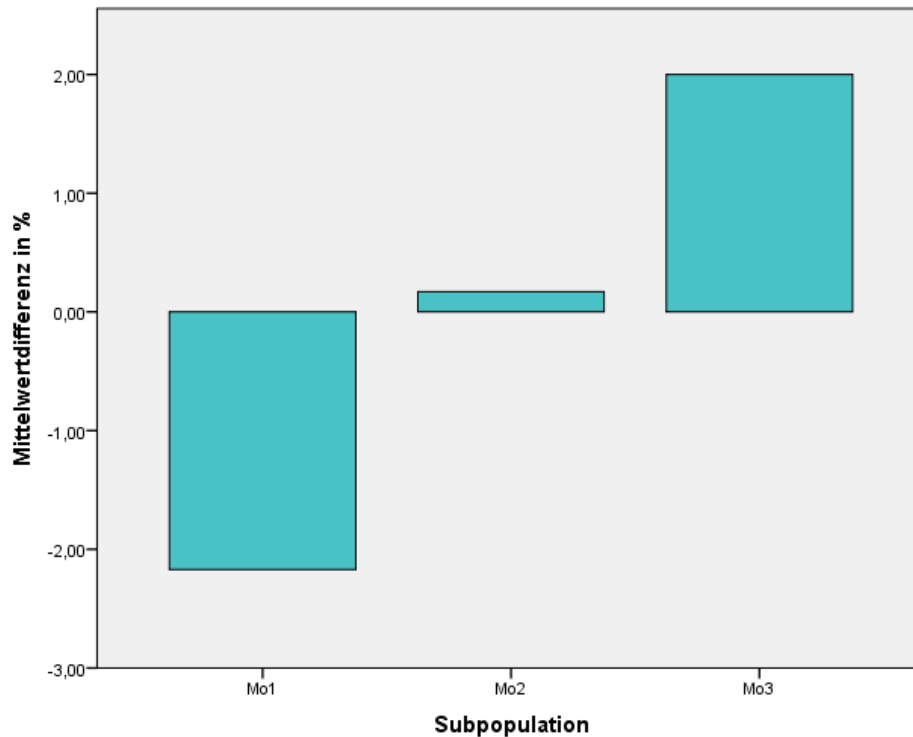


Abbildung 17 Mittelwertdifferenz prozentual Kontrollgruppe

4.4.2 Vergleich Sportler vor und nach Belastung

In der Gruppe der Sportler zeigte sich ein Anstieg der Leukozyten von 6686 ± 1376 pt/ μ l vor auf 10179 ± 1988 pt/ μ l ($p < 0,001$) nach Belastung. Außerdem kam es zu einem signifikanten Abfall des prozentualen Monozytenanteils von $0,08 \pm 0,02\%$ vor zu $0,07 \pm 0,02\%$ nach Belastung; $p < 0,001$.

Die absolute Monozytengesamtzahl stieg von 525 ± 153 pt/ μ l vor auf 719 ± 253 pt/ μ l nach Belastung an; $p < 0,001$. Innerhalb der Population Mo1 kam es zu einem signifikanten Abfall der prozentualen Werte und einer Zunahme der absoluten Werte ($87,38 \pm 4,72\%$ bzw. 459 ± 136 pt/ μ l vor zu $84,62 \pm 5,07\%$ bzw. 610 ± 215 pt/ μ l nach Belastung; $p < 0,001$). Die Population Mo2 zeigte prozentual nur einen geringen Anstieg unter der Belastung $3,09 \pm 2,01\%$ vor zu $3,27 \pm 1,73\%$ nach; $p = 0,147$. In den Absolutwerten hingegen war ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (17 ± 17 pt/ μ l zu 26 ± 25 pt/ μ l; $p < 0,001$). Der Anteil Mo3 stieg unter der Belastung signifikant prozentual als auch absolut an ($9,53 \pm 4,05\%$ bzw. 48 ± 23 pt/ μ l vor zu $12,11 \pm 4,71\%$ bzw. 84 ± 38 pt/ μ l nach; $p < 0,001$).

Tabelle 8 Vergleich Sportler vor und nach Belastung

Variable	vor Belastung	nach Belastung	p-Wert
Leukozyten in pt/ μ l	6686 \pm 1376	10179 \pm 1988	<0,001
Monozytenfraktion in %	0,08 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	<0,001
Monozyten gesamt in pt/ μ l	525 \pm 153	719 \pm 253	<0,001
Mo1 in %	87,38 \pm 4,72	84,62 \pm 5,07	<0,001
Mo1 absolut in pt/ μ l	459 \pm 136	610 \pm 215	<0,001
Mo2 in %	3,09 \pm 2,01	3,27 \pm 1,73	0,147
Mo2 absolut in pt/ μ l	17 \pm 17	26 \pm 25	<0,001
Mo3 in %	9,53 \pm 4,05	12,11 \pm 4,71	<0,001
Mo3 absolut in pt/ μ l	48 \pm 23	84 \pm 38	<0,001

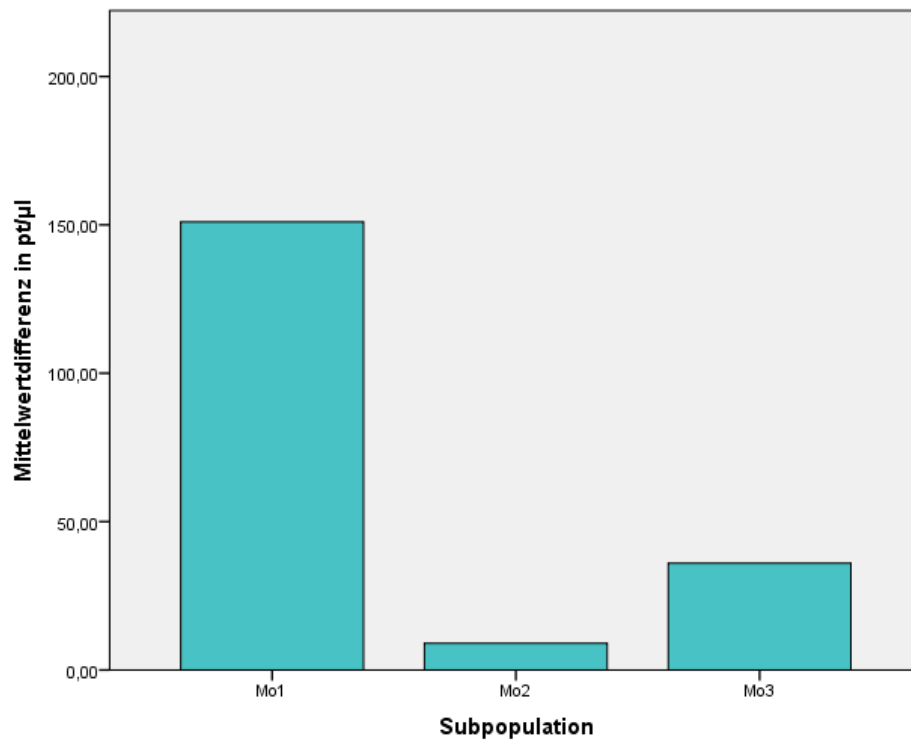


Abbildung 18 Mittelwertdifferenz absolut Sportler

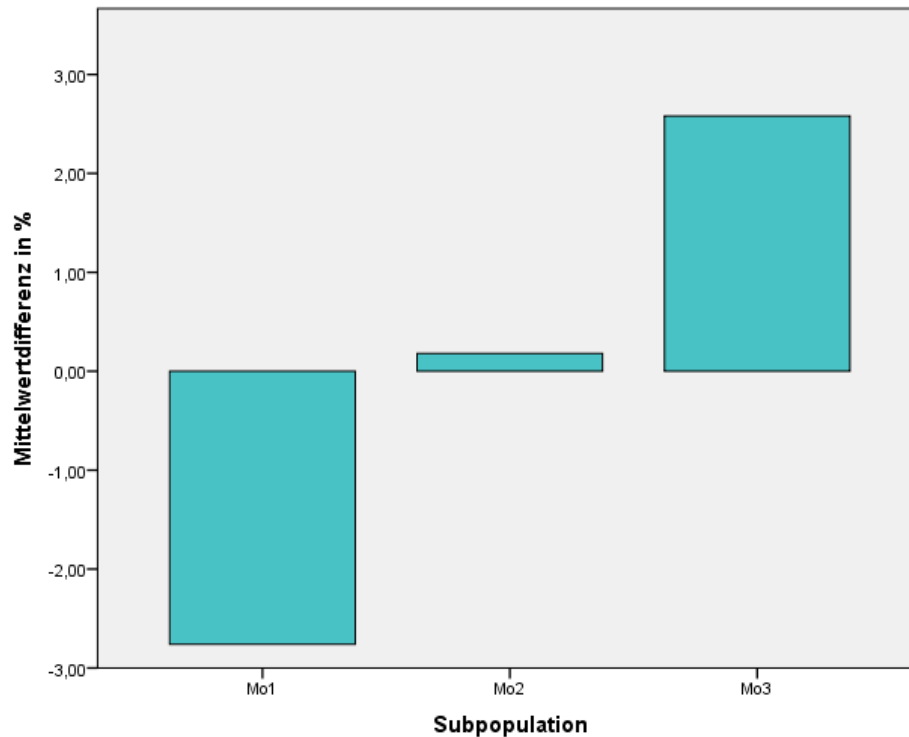


Abbildung 19 Mittelwertdifferenz prozentual Sportler

4.4.3 Vergleich Sportler und Kontrollgruppe vor und nach Belastung

Die Zahlen der Leukozyten (Sportler 6686 ± 1376 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 7325 ± 1289 pt/ μ l; $p=0,052$), Monozytenfraktion (Sportler $0,08 \pm 0,02\%$ versus Kontrollgruppe $0,08 \pm 0,02$; $p=0,765$) und die Absolutzahlen der Monozyten (Sportler 525 ± 153 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 588 ± 162 ; $p=0,101$) zeigten vor Belastung keine signifikanten Unterschiede. Innerhalb der Population Mo1 bestand im prozentualen Vergleich ein signifikanter Unterschied (Sportler $87,38 \pm 4,71\%$ versus Kontrollgruppe $84,03 \pm 6,28\%$; $p=0,012$), die absoluten Monozytenzahlen zeigten jedoch keinen Unterschied (Sportler 459 ± 136 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 495 ± 143 pt/ μ l; $p=0,291$). Gleiches war in der Population Mo2 zu dokumentieren, in der ebenfalls signifikante Unterschiede in prozentualen Messwerten, nicht aber in den absoluten bestanden (Sportler $3,09 \pm 2,01\%$ bzw. Nichtsportler $4,11 \pm 1,80\%$; $p=0,030$), (Sportler 17 ± 17 pt/ μ l versus Nichtsportler 25 ± 16 pt/ μ l; $p=0,054$). In der Population Mo3 zeigten sich in prozentualen als auch absoluten Messwerten signifikante Unterschiede (Sportler $9,53 \pm 4,05\%$ bzw. Nichtsportler $11,86 \pm 5,49\%$; $p=0,043$), (Sportler 49 ± 23 pt/ μ l vs. Nichtsportler 68 ± 34 pt/ μ l; $p=0,010$).

Tabelle 9 Vergleich Sportler zu Kontrollgruppe vor Belastung

Variable	vor Belastung		p-Wert
	Sportler	Kontrollgruppe	
Leukozyten in pt/ μ l	6686 \pm 1376	7325 \pm 1289	0,052
Monozytenfraktion in %	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,765
Monozyten gesamt in pt/ μ l	525 \pm 153	588 \pm 162	0,101
Mo1 in %	87,38 \pm 4,71	84,03 \pm 6,28	0,012
Mo1 absolut in pt/ μ l	459 \pm 136	495 \pm 143	0,291
Mo2 in %	3,09 \pm 2,01	4,11 \pm 1,80	0,030
Mo2 absolut in pt/ μ l	17 \pm 17	25 \pm 16	0,054
Mo3 in %	9,53 \pm 4,05	11,86 \pm 5,49	0,043
Mo3 absolut in pt/ μ l	49 \pm 23	68 \pm 34	0,010

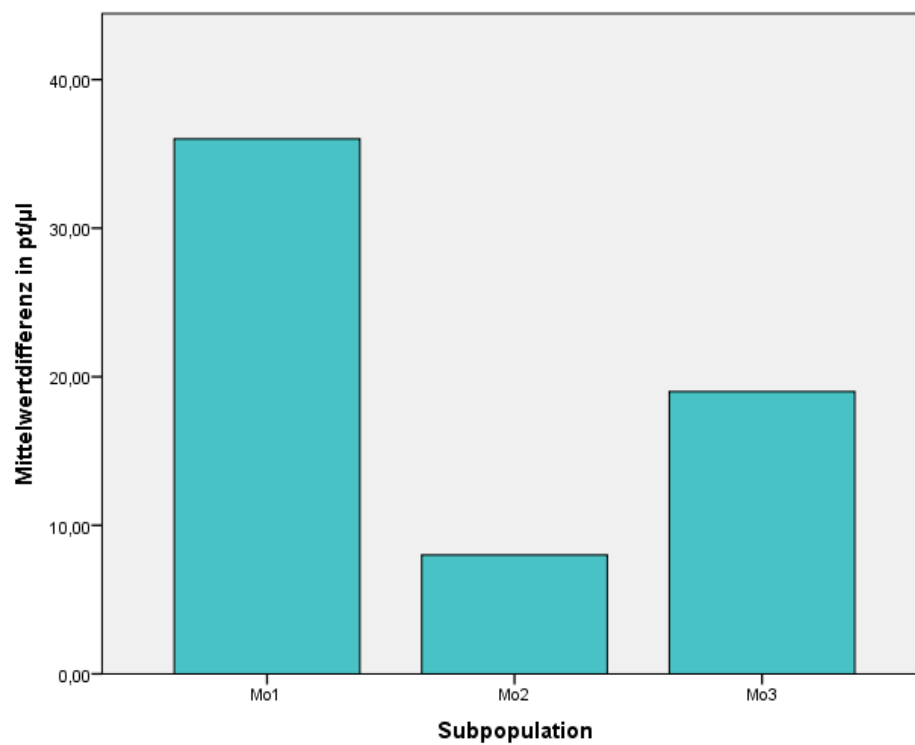


Abbildung 20 Absolute Mittelwertdifferenz vor Belastung Sportler zu Kontrollgruppe

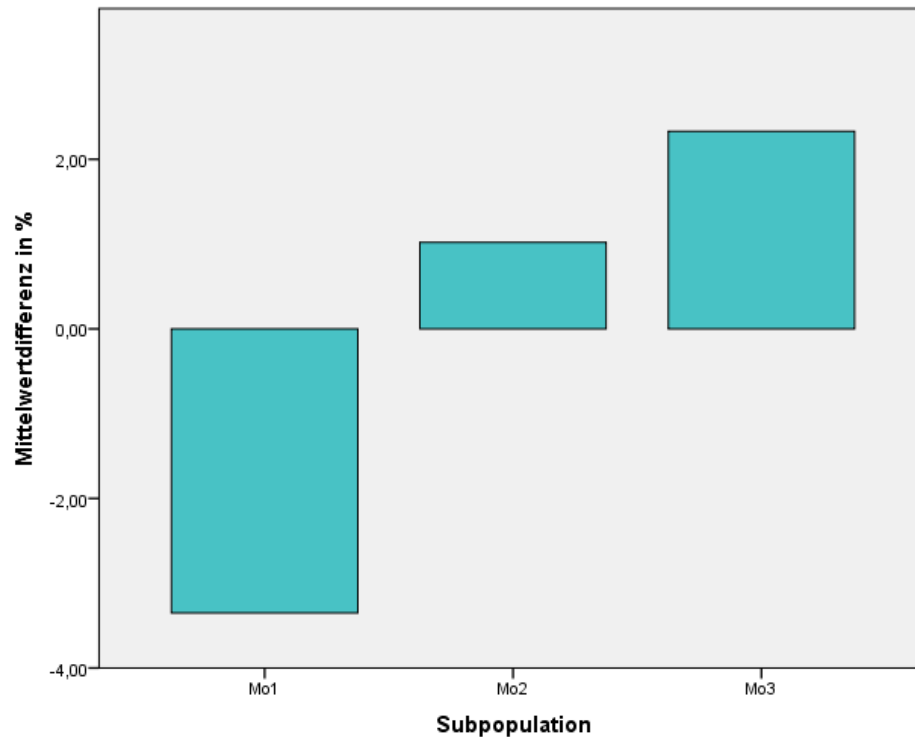


Abbildung 21 Prozentuale Mittelwertdifferenz vor Belastung Sportler zu Kontrollgruppe

Nach Belastung kam es in beiden Gruppen zu einer Leukozytose mit daraus resultierendem Anstieg der Monozytenabsolutzahlen. Signifikante Unterschiede zwischen Sportlern und Kontrollgruppe zeigten sich bei Leukozyten (Sportler 10179 ± 1988 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 10540 ± 1766 pt/ μ l; $p=0,434$), Monozytenfraktion (Sportler $0,07 \pm 0,02\%$ versus Kontrollgruppe $0,08 \pm 0,01\%$; $p=0,111$) und in den Absolutzahlen der Monozyten (Sportler 719 ± 253 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 801 ± 176 pt/ μ l; $p=0,138$) ebenfalls nicht. Prozentual betrachtet war bei der Kontrollgruppe die Population Mo1 signifikant niedriger (Sportler $84,62 \pm 5,08\%$ versus Kontrollgruppe $81,86 \pm 6,49\%$; $p=0,049$), absolut betrachtet bestand kein signifikanter Unterschied (Sportler 610 ± 215 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 660 ± 172 pt/ μ l; $p=0,298$). In der Population Mo2 zeigen sich bei prozentualer Darstellung bei Sportlern niedrigere Werte, die absoluten Zellzahlen waren hingegen nicht signifikant verändert (Sportler $3,27 \pm 1,73\%$ versus Kontrollgruppe $4,29 \pm 1,99\%$; $p=0,025$), (Sportler 26 ± 25 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 35 ± 22 pt/ μ l; $p=0,102$). In der Fraktion Mo3 zeigten sich in der prozentualen Darstellung keine signifikanten Unterschiede (Sportler $12,11 \pm 4,71\%$ versus Kontrollgruppe $13,85 \pm 5,92\%$; $p=0,173$), wohingegen in absoluter Betrachtungsweise die Kontrollgruppe signifikant höhere Werte aufwies (Sportler 84 ± 38 pt/ μ l versus Kontrollgruppe 105 ± 38 pt/ μ l; $p=0,021$).

Tabelle 10 Vergleich Sportler zu Kontrollgruppe nach Belastung

Variable	nach Belastung		
	Sportler	Kontrollgruppe	p-Wert
Leukozyten in pt/ μ l	10179 \pm 1988	10540 \pm 1766	0,434
Monozytenfraktion in %	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,111
Monozyten gesamt in pt/ μ l	719 \pm 253	801 \pm 176	0,138
Mo1 in %	84,62 \pm 5,08	81,86 \pm 6,49	0,049
Mo1 absolut in pt/ μ l	610 \pm 215	660 \pm 172	0,298
Mo2 in %	3,27 \pm 1,73	4,29 \pm 1,99	0,025
Mo2 absolut in pt/ μ l	26 \pm 25	35 \pm 22	0,102
Mo3 in %	12,11 \pm 4,71	13,85 \pm 5,92	0,173
Mo3 absolut in pt/ μ l	84 \pm 38	105 \pm 38	0,021

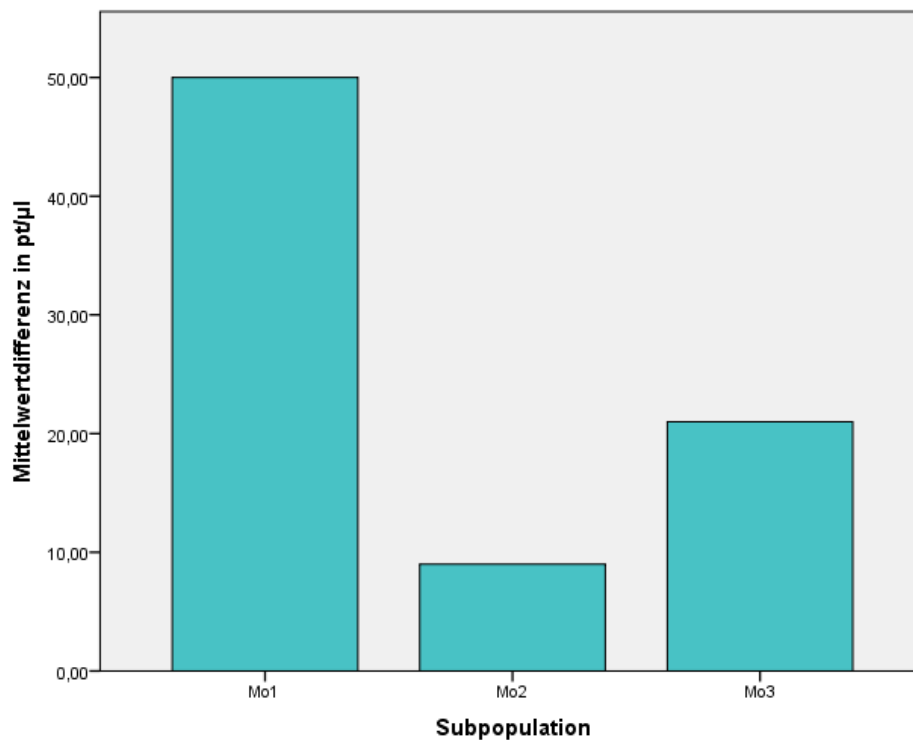


Abbildung 22 Absolute Mittelwertdifferenz nach Belastung Sportler zu Kontrollgruppe

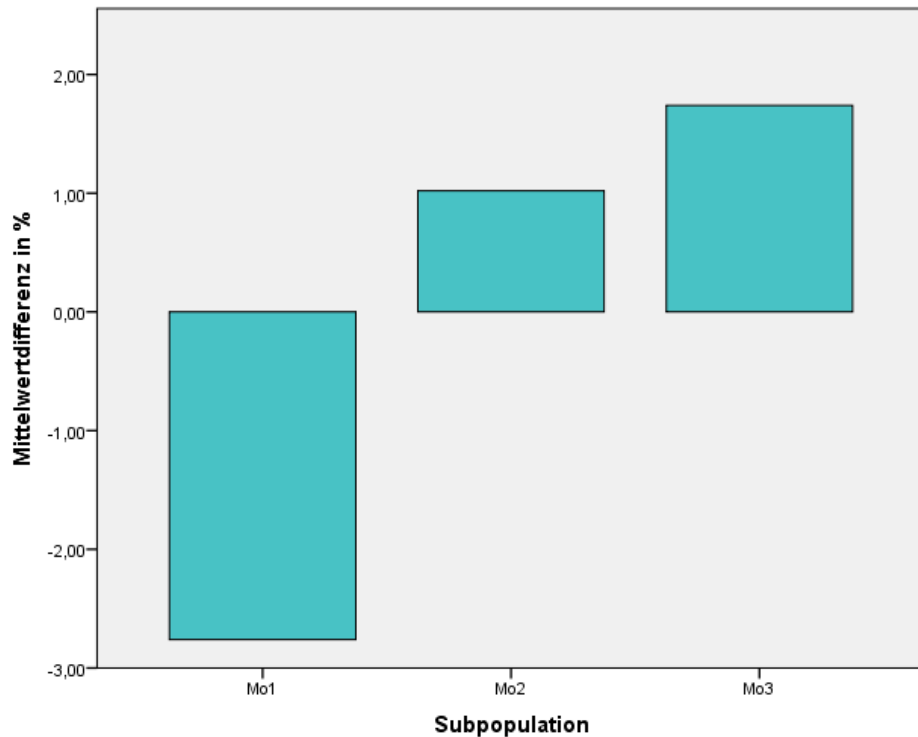


Abbildung 23 Prozentuale Mittelwertdifferenz nach Belastung Sportler zu Kontrollgruppe

4.4.4 Altersadaptierter Vergleich Sportler und Kontrollgruppe vor und nach Belastung

Aufgrund des signifikanten Unterschiedes in der Altersverteilung zwischen Sport- und Kontrollgruppe (Sportgruppe $22,24 \pm 3,48$ Jahre versus Kontrolle $26,52 \pm 4,39$; $p < 0,001$) wurde eine altersadaptierte lineare Regression durchgeführt. Wie in Tabelle 11 ersichtlich, zeigten sich vor Belastung signifikante Unterschiede in der prozentualen Verteilung von Mo1, Mo2 und Mo3, sowie in der absoluten Zellzahl von Mo 3.

Tabelle 11 Differenz der Monozytensubpopulationen ohne Altersadaptierung

Variable	Differenz vor Belastung	
	Sportler zu Kontrollgruppe	p-Wert
Mo1 absolut in pt/μl	- 36	0,291
Mo1 %	3,35	0,012
Mo2 absolut in pt/μl	-8	0,054
Mo2 %	-1,02	0,030
Mo3 absolut in pt/μl	-19	0,010
Mo3 %	-2,32	0,043

Nach Altersadaptierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, prozentual als auch absolut.

Tabelle 12 Differenz der Monozytensubpopulationen mit Altersadaptierung

Variable	Differenz vor Belastung altersadaptiert	
	Sportler zu Kontrollgruppe	p-Wert
Mo1 absolut in pt/μl	-34	0,386
Mo1 %	2,31	0,231
Mo2 absolut in pt/μl	-7	0,152
Mo2 %	-0,80	0,139
Mo3 absolut in pt/μl	-13	0,094
Mo3 %	-1,51	0,243

Gleiches stellte sich nach Belastung der Probanden dar. Es bestanden nach Belastung signifikante Unterschiede in den prozentualen Werten der Population Mo1 und Mo2, sowie im Absolutwert von Mo3.

Tabelle 13 Differenz der Monozytensubpopulationen ohne Altersadaptierung

Variable	Differenz nach Belastung	
	Sportler zu Kontrollgruppe	p-Wert
Mo1 absolut in pt/μl	-50	0,298
Mo1 %	2,76	0,049
Mo2 absolut in pt/μl	-9	0,102
Mo2 %	-1,02	0,025
Mo3 absolut in pt/μl	-21	0,021
Mo3 %	-1,74	0,173

Nach Altersadaptierung gingen diese Signifikanzen verloren (Tabelle 14).

Tabelle 14 Differenz der Monozytensubpopulationen mit Altersadaptierung

Variable	Differenz nach Belastung altersadaptiert	
	Sportler zu Kontrollgruppe	p-Wert
Mo1 absolut in pt/ μ l	-55	0,323
Mo1 %	2,18	0,170
Mo2 absolut in pt/ μ l	-10	0,148
Mo2 %	-0,96	0,063
Mo3 absolut in pt/ μ l	-17	0,106
Mo3 %	-1,22	0,403

4.4.5 Vergleich Sportlerinnen und Sportler vor und nach Belastung

Im Vergleich vor Belastung zwischen Mann und Frau in der Gruppe der Sportler konnten bis auf die absoluten Zahlen der Monozytensubpopulation 3 keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese waren bei Sportlerinnen niedriger als bei Sportlern (Sportlerinnen 43 ± 18 pt/ μ l versus Sportler 58 ± 28 pt/ μ l; $p=0,044$).

Tabelle 15 Vergleich Sportlerinnen und Sportler vor Belastung

Variable	vor Belastung		p-Wert
	Sportlerinnen	Sportler	
Leukozyten in pt/ μ l	6843 ± 1397	6429 ± 1344	0,350
Monozytenfraktion in %	$0,08 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,02$	0,062
Monozyten gesamt in pt/ μ l	507 ± 134	553 ± 181	0,353
Mo1 in %	$88,18 \pm 4,58$	$86,09 \pm 4,79$	0,165
Mo1 absolut in pt/ μ l	449 ± 127	476 ± 152	0,541
Mo2 in %	$2,89 \pm 1,92$	$3,41 \pm 2,17$	0,418
Mo2 absolut in pt/ μ l	15 ± 14	20 ± 21	0,412
Mo3 in %	$8,93 \pm 4,11$	$10,50 \pm 3,88$	0,226
Mo3 absolut in pt/ μ l	43 ± 18	58 ± 28	0,044

In Tabelle 16 sind die Unterschiede nach Belastung dargestellt. Signifikante Unterschiede bestanden lediglich im prozentualen Anteil der Gesamtmonozyten. Sportlerinnen wiesen hier signifikant niedrigere Werte auf (Sportlerinnen $0,07 \pm 0,02\%$ versus Sportler $0,08 \pm 0,02\%$; $p=0,050$) als Sportler.

Tabelle 16 Vergleich Sportlerinnen und Sportler nach Belastung

Variable	nach Belastung		p-Wert
	Sportlerinnen	Sportler	
Leukozyten in pt/ μ l	10160 \pm 1999	10208 \pm 2035	0,941
Monozytenfraktion in %	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,050
Monozyten gesamt in pt/ μ l	676 \pm 230	790 \pm 280	0,157
Mo1 in %	84,75 \pm 5,05	84,39 \pm 5,27	0,828
Mo1 absolut in pt/ μ l	574 \pm 202	667 \pm 231	0,177
Mo2 in %	3,23 \pm 1,60	3,32 \pm 1,97	0,871
Mo2 absolut in pt/ μ l	25 \pm 23	28 \pm 28	0,667
Mo3 in %	12,01 \pm 5,11	4,15 \pm 4,15	0,863
Mo3 absolut in pt/ μ l	77 \pm 35	41 \pm 41	0,134

4.4.6 Vergleich Kontrollprobandinnen und Kontrollprobanden

Wie in Tabelle 17 dargestellt, zeigen sich im Vergleich der Kontrollprobandinnen mit Kontrollprobanden vor Belastung keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 17 Vergleich Kontrollprobandinnen zu Kontrollprobanden vor Belastung

Variable	vor Belastung		p-Wert
	Kontroll- probandinnen	Kontroll- probanden	
Leukozyten in pt/ μ l	7417 \pm 1495	7239 \pm 1109	0,717
Monozytenfraktion in %	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02	0,271
Monozyten gesamt in pt/ μ l	569 \pm 205	606 \pm 114	0,547
Mo1 in %	85,41 \pm 5,49	82,73 \pm 6,87	0,261
Mo1 absolut in pt/ μ l	485 \pm 172	504 \pm 117	0,736
Mo2 in %	4,31 \pm 2,22	3,93 \pm 1,35	0,580
Mo2 absolut in pt/ μ l	26 \pm 21,12	24 \pm 10	0,690
Mo3 in %	10,29 \pm 4,27	13,32 \pm 6,21	0,135
Mo3 absolut in pt/ μ l	57 \pm 28	78 \pm 37	0,097

Nach Belastung zeigte sich in der Kontrollgruppe der Frauen eine ausgeprägtere Leukozytose als bei der männlichen Gruppe (Frauen 11225 \pm 1988 pt/ μ l versus Männer 9901 \pm 1287 pt/ μ l; p=0,041). Die prozentualen als auch absoluten Werte der Monozytensubpopulationen waren nicht unterschiedlich.

Tabelle 18 Vergleich Kontrollprobandinnen zu Kontrollprobanden nach Belastung

Variable	nach Belastung		p-Wert
	Kontroll- probandinnen	Kontroll probanden	
Leukozyten in pt/ μ l	11225 \pm 1988	9901 \pm 1287	0,041
Monozytenfraktion in %	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,425
Monozyten gesamt in pt/ μ l	828 \pm 198	775 \pm 155	0,431
Mo1 in %	82,61 \pm 5,74	81,16 \pm 7,24	0,558
Mo1 absolut in pt/ μ l	687 \pm 180	635 \pm 166	0,428
Mo2 in %	5,00 \pm 2,44	3,63 \pm 1,18	0,073
Mo2 absolut in pt/ μ l	43 \pm 28	28 \pm 10	0,065
Mo3 in %	12,40 \pm 4,89	15,21 \pm 6,62	0,206
Mo3 absolut in pt/ μ l	98 \pm 31	113 \pm 43	0,306

5. Diskussion

5.1 Effekte körperlicher Aktivität auf inflammatorische Prozesse

Zunehmende körperliche Inaktivität prägt unseren alltäglichen Lebensstil in Deutschland und Mitteleuropa. Einhergehend damit ist insbesondere in Anbetracht des übermäßigen Nahrungsangebots eine Zunahme der Inzidenzen von Prä- und Adipositas. Erstmals in der Geschichte der neuzeitlichen Medizin kommt es bedingt durch die Zunahme der Adipositas zur Abnahme des zu erwartenden Lebensalters (Preston et al. 2018).

Regelmäßige körperliche Aktivität reduziert, bedingt durch die ausgewogenere Energiebilanz von Zufuhr und Verbrauch, als auch durch den Fakt, dass sich körperlich aktivere Menschen meist bewusster ernähren, das Risiko eine Adipositas zu entwickeln. Insbesondere die viszerale Adipositas ist hierbei im hohen Maße mit Folgeerkrankungen wie arterieller Hypertonie, Dyslipidämie, Insulinresistenz (metabolisches Syndrom) und der daraus resultierender Atherosklerose vergesellschaftet. Dies wiederum erhöht die Mortalitätsrate. Als ursächlich wird für diese Erkrankungen eine chronische, geringgradige Inflammation angesehen. (Gleeson et al. 2011; Ouchi et al. 2011)

Nachweislich korreliert ein höherer BMI mit höheren Inflammationsmarkern wie CRP und Interleukin-6 (Visser et al. 1999; Pradhan 2001). Mehrere Faktoren werden für die chronische Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht, so zum einen die vermehrte

Ausschüttung von proinflammatorischen Adipokinen durch das Fettgewebe. Zu diesen gehören beispielsweise Leptin, Resistin, Lipocalin-2, TNF- α und Adiponectin. Zum andern zu erwähnen ist die gesteigerte Expression von MCP-1 durch Adipozyten und damit die vermehrte Einwanderung von Makrophagen (Kanda et al. 2006).

Makrophagen können in zwei Subgruppen eingeteilt werden: den proinflammatorischen Subtyp M1, welcher eine vermehrte Sekretion von TNF- α und NO aufweist und einen antiinflammatorischer Subtyp M2. Im Tiermodel konnte ein vermehrter Phänotypen-Switch hin zum Subtyp M1 im Fettgewebe bei adipösen Mäusen nachgewiesen werden (Noriaki Kawanishi 2010). Diese Prozesse fördern eine chronische Entzündungsreaktion, welche Krankheiten wie Malignome (Khansari et al. 2009; Allavena et al. 2008), Diabetes mellitus Typ 2 (Pradhan 2001), Neurodegeneration (Gleeson et al. 2011) und Atherosklerose fördern. Letztere wird zusätzlich durch ein meist verschobenes Lipoproteinprofil gefördert.

Einer der präventiven Effekte regelmäßiger körperlicher Aktivität ist somit die Verminderung der Körperfettmaße, insbesondere der viszeralen. Daraus resultiert eine Reduktion der proinflammatorischen Adipokinsekretion und der Makrophageneinwanderung in das Fettgewebe. Ebenfalls wird der vermehrte Phänotypen-Switch hin zu proinflammatorischen M1-Makrophagen behindert (Gleeson et al. 2011).

Mehrere Studien konnten zudem eine Verringerung von proinflammatorischen Mustererkennungsrezeptoren auf Monozyten nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass durch regelmäßige körperliche Aktivität die monozytäre Expression von TLR-2 und TLR-4 abnimmt. Infolgedessen nimmt die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-1 β nach in vivo-Stimulation mittels Lipopolysachariden ab (McFarlin et al. 2006; Michael Gleeson).

Eine weitere Schlüsselrolle antiinflammatorischer Effekte durch körperliche Aktivität zeigt das Zytokin Interleukin-6. Pedersen et al konnten nach körperlicher Belastung eine Zunahme der IL-6-Konzentration um das 100-fache nachweisen (Pedersen und Hoffman-Goetz 2000). Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurde nach der Quelle der IL-6-Zunahme gesucht. Es zeigte sich, dass die belastete Skelettmuskulatur für die vermehrte IL-6-Konzentration verantwortlich zu sein scheint. Jonsdottir et al wiesen im Tiermodel nach, dass durch Reizstrom stimulierte Muskulatur mit einer erhöhten IL-6-mRNA-Synthese reagiert. Sie konnten ebenfalls einen systemischen Effekt ausschließen, da nicht stimulierten Muskulatur keine erhöhte Synthese zeigte (Jonsdottir et al. 2000). Die systemische Ausschüttung des Interleukin-6 löst in Folge den Anstieg einer Reihe antiinflammatorischer Zytokine aus, so z.B. Interleukin-10 und des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Pedersen et al. 2004). Eine der bedeutendsten

antiinflammatorischen Effekte ist allerdings die Reduktion der TNF- α -Sekretion. Starkie et al konnten nachweisen, dass Probanden, welche auf einem Ergometer belastet wurden (3h bei 75% ihrer VO₂ max) oder rekombinantes IL-6 in physiologischer Konzentration verabreicht bekamen, mit einer deutlich geringeren TNF- α -Sekretion auf eine Infusion von E. coli-Endotoxin reagierten als die Kontrollgruppe (Starkie et al. 2003). Zu dem ließ sich nach IL-6-Stimulation ein Anstieg des Plasmakortisolspiegels nachweisen (Pedersen et al. 2004). Die Anzahl der Studien und daraus resultierender Erkenntnisse zeigt auf, dass antiinflammatorische Effekte körperlicher Aktivität ein multifaktorielles Geschehen ist.

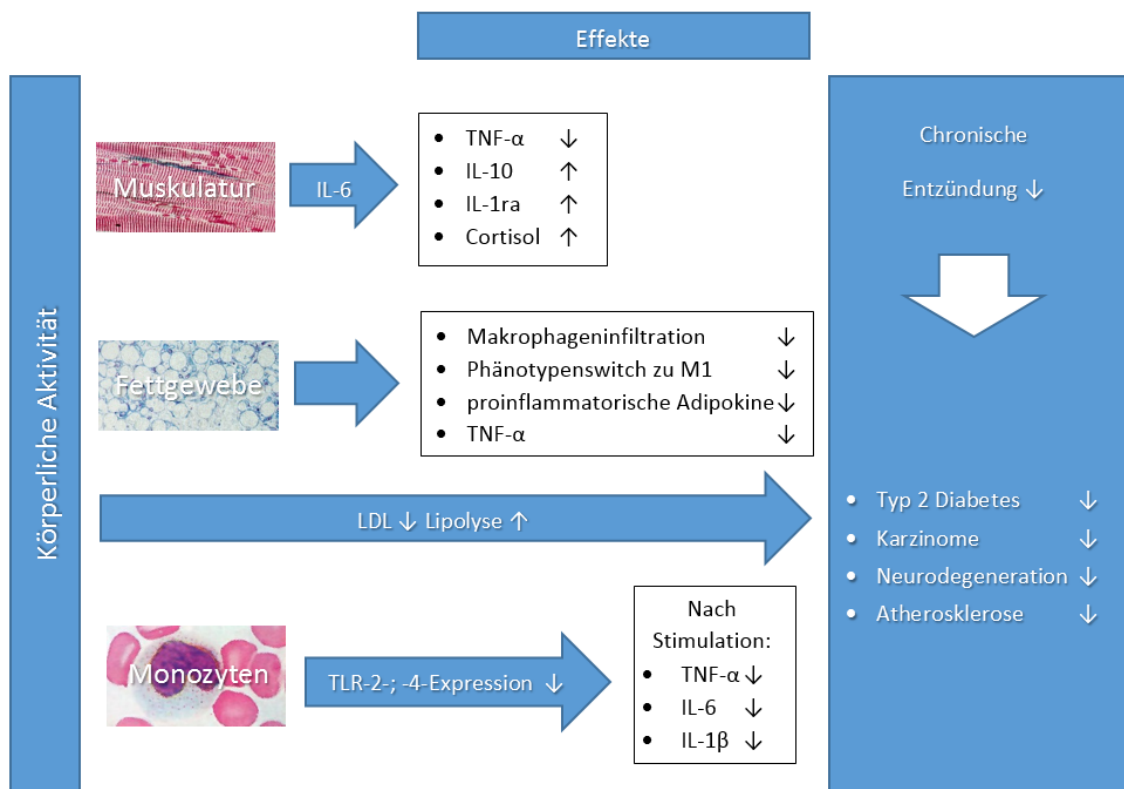


Abbildung 24 Effekte körperlicher Aktivität

5.2 Monozytensubpopulationen

Wie bereits einleitend dargestellt, ist körperliche Inaktivität mit einer systemischen, chronischen Inflammation assoziiert. Ein Effektor in dieser Inflammation sind CD16 positive Monozyten. Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass diese eine Schlüsselrolle insbesondere im Atherosklerosegeschehen einnehmen. So prägte Russel Ross den Satz „Atherosclerosis is an inflammatory disease“ (Ross 1999). Mit Entwicklung der Durchflusszytometrie und der fluoreszenzmarkierten Zellsortierung wurde es möglich, Morphologie, Rezeptorbesatz, Zytokinsekretion und

Phagozytoseverhalten der Monozyten genauer zu bestimmen. Mit diesen Verfahren unterschieden Passlick et al. erstmals 1989 zwischen zwei Monozytensubpopulationen. Diese konnten im Verlauf weiterer Forschungen in drei funktionell unterschiedliche Subpopulationen gegliedert und durch die International Union of Immunological Societies (IUIS) in die Gruppen Mo1, Mo2 und Mo3 unterteilt werden. Zahlreiche Studien untersuchten die Bedeutungen der Subgruppen bei akuten Erkrankungen wie der Sepsis (Mukherjee et al. 2015; Gunter Fingerle 1993) und dem Myokardinfarkt (Idzkowska et al. 2015), als auch bei chronisch-inflammatorischen Krankheiten wie beispielsweise der Rheumatoidarthritis (Radwan et al. 2016) und dem Lupus Erythematoses (Mukherjee et al. 2015). Nur sehr wenige Studienkollektive beschäftigten sich in der Vergangenheit mit Veränderungen der Monozytensubpopulationen bei völlig gesunden Probanden. Auf diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden prospektiven Arbeit zwei Gruppen, die sich in ihrer sportlichen Aktivität deutlich unterschieden, auf Monozyten und deren Subpopulationen untersucht. Die durchgeführte Gatingstrategie stellte die heute gebräuchliche Darstellung in drei Subpopulationen dar. So war insbesondere eine Beurteilung der Veränderungen der Subpopulation Mo2 möglich.

5.2.1 Bedeutung regelmäßiger sportlicher Aktivität auf die Monozytensubpopulationen

Der Einfluss sportlicher Aktivität gesunder Probanden auf die Zusammensetzung der Subpopulationen von Monozyten wurde in den vergangenen Jahren kaum untersucht. Die langfristigen Einflussmöglichkeiten durch körperliche Aktivität auf die Subpopulationsverteilung untersuchten 2008 Timmermann et al. Ihr Probandenkollektiv bestand aus jeweils 15 körperlich aktiven und 15 körperlich inaktiven Probanden im Alter von 65-80 Jahren, welche einem 12-wöchigen aeroben Fitnesstraining unterzogen wurden. Die Analyse der Subpopulationsverteilung erfolgte in zwei Populationen (CD16 positiv und CD16 negativ). Zu Beginn zeigten sich in dieser Arbeit bereits niedrigere prozentuale Werte proinflammatorischer CD16 positiver Monozyten in der körperlich aktiven Gruppe. Innerhalb der körperlich inaktiven Gruppe konnte nach Beendigung des 12-wöchigen Trainings eine Abnahme der proinflammatorischen Monozyten um bis zu 64% verzeichnet werden (Timmerman et al. 2008).

Im Laufe der Forschung etablierte sich, bedingt durch die entdeckten funktionellen Unterschiede der Gruppen, die Aufteilung der Monozyten laut IUIS 2010 in drei Monozytensubpopulationen (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Die Populationen werden dementsprechend eingeteilt in Classical Mo1 (CD14++CD16-), Intermediate Mo2

(CD14⁺⁺CD16⁺) und Nonclassical Mo3 (CD14⁺CD16⁺⁺). Alle bisherigen Arbeiten zum Effekt sportlicher Aktivität auf Monozytensubpopulationen teilten in ihren Gatingstrategien noch nicht nach dieser neueren Klassifikation auf. So wurden insbesondere die Veränderungen der intermediären Population Mo2 bisher nicht untersucht. Des Weiteren wurden die Populationen meist ausschließlich in ihrer prozentualen Verteilung bezogen auf die Gesamtmonozytenzahl beurteilt und nicht die absolute Monozytenzahl.

In den hier präsentierten Analysen und in anderen Untersuchungen (R. Lewicki 1987; Baum 1998) bestand kein signifikanter Unterschied in der Leukozytengesamtzahl im Vergleich von Trainierten versus Untrainierten. Es zeigten sich dennoch in unserer Untersuchung bei Ausdauersportlern niedrigere Leukozytengesamtwerte im Vergleich zu Untrainierten. Somit entstehen bei der reinen Darstellung nach prozentualer Verteilung Ungenauigkeiten, da Unterschiede in der Leukozytenzahl zwischen den Gruppen und damit auch der Monozytengesamtzahl unberücksichtigt bleiben. Am Prozess der Atherosklerose ist allerdings mit hoher Wahrscheinlichkeit die Anzahl einer bestimmten Zellart entscheidend und nicht der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den Gesamtleukozyten. Die absolute Darstellung ist somit als die präzisere anzusehen (Hristov und Weber 2011). So zeigten sich mit prozentualer Darstellung der Monozytenverteilung signifikante Unterschiede in allen Subpopulationen. Der Anteil der Mo1 war mit $87,4 \pm 4,7\%$ bei Sportlern signifikant ($p=0,012$) höher als bei der Kontrollgruppe mit $84,0 \pm 6,3\%$, währenddessen die Populationen Mo2 und 3 signifikant niedriger waren (Mo2: Sportler $3,1 \pm 2,0\%$ bzw. Nichtsportler $4,1 \pm 1,8\%$; $p=0,030$; Mo3: Sportler $9,5 \pm 4,1\%$ bzw. Nichtsportler $11,9 \pm 5,5\%$; $p=0,043$). Anders hingegen stellen sich die Unterschiede nach einer absoluten Betrachtungsweise dar. Bedingt durch den Unterschied der Leukozytengesamtzahlen zwischen Sportlern und Kontrollen (Sportler $6686 \pm 1376\text{pt}/\mu\text{l}$ bzw. Nichtsportler $7325 \pm 1289\text{pt}/\mu\text{l}$; $p=0,052$) gehen die prozentualen Signifikanzen in den Populationen Mo1 und Mo2 verloren. Lediglich in der wichtigen proinflammatorischen Subpopulation Mo3 bleibt der Unterschied signifikant (Sportler $49 \pm 23\text{pt}/\mu\text{l}$ versus Nichtsportler $68 \pm 34\text{pt}/\mu\text{l}$; $p=0,010$).

Es lässt sich hieraus postulieren, dass regelmäßiges Training zu einer Umverteilung der Monozytensubpopulationen hin zu nichtinflammatorischen Populationen führt und somit signifikant die in inflammatorischen Prozessen involvierte Monozytenpopulation 3 (CD14⁺CD16⁺⁺) senkt.

Es lässt sich ebenfalls darstellen, dass die übliche Betrachtungsweise nach prozentualer Verteilung fehlerbehaftet ist, da sich nach dieser ein gänzlich anderes Bild ergibt. So bestehen offensichtlich nach absoluter Betrachtungsweise im Vergleich zur

prozentualen Darstellung keine signifikanten Unterschiede in den Populationen Mo1 und Mo2 zwischen den Probandengruppen. Durch regelmäßiges Training kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung auf Mo1 und Mo2 und einer signifikanten Reduktion in der Subgruppe Mo3.

5.2.2 Veränderungen der Monozytensubpopulationen nach erschöpfender Belastung bei trainierten und untrainierten Probanden

Erstmalig untersuchten Gabriel et al. 1994 die Veränderungen der Monozyten nach körperlicher Maximalbelastung und Dauer der Belastung. Zur Auftrennung der Populationen wurde zwischen CD14 low (negativ) und CD 14 bright (positiv) unterschieden. Die körperliche Ausbelastung der Probanden, welche aus ausdauertrainierten Sportlern bestand, wurde mittels Laktatmessung verifiziert. Dabei konnten Gabriel et al. nachweisen, dass nach einer erschöpfenden Belastung von 24 Minuten Dauer die CD14 negativen Monozytenpopulationen deutlich anstiegen. Nach länger andauernder Belastung, wie einem 100 km Lauf, wiesen sie eine Wiederzunahme der CD14 positiven Monozyten nach. Drei Stunden nach oben genannten Ausbelastungen kehrten die relativen Monozytenwerte wieder zur Ausgangsverteilung vor körperlicher Belastung zurück. Sie schlussfolgerten und wiesen nach, dass das Ausmaß und die Dauer einer körperlichen Belastung temporäre und reversible Veränderungen in der Zusammensetzung der peripheren Monozytensubpopulationen hervorrufen können. (Gabriel et al. 1994)

Im Folgenden untersuchten Steppich et al. im Jahre 2000 die Möglichkeit, proinflammatorische CD16 positive Monozyten durch kurzzeitige körperliche Belastung zu mobilisieren. Die Auftrennung der Populationen erfolgte hierbei zwischen CD16 positiven und CD16 negativen Monozyten. Nach einer 45 Sekunden andauernden Belastung mit 400 W auf einem Ergometer konnte eine Verdoppelung der proinflammatorischen Monozytenwerte nachgewiesen werden. Nach einer Ruhepause von 20 Minuten gingen die Populationswerte auf den Ausgangswert zurück. Nach erneuter körperlicher Belastung ließ sich der Effekt wieder nachweisen. Probanden, welche im Rahmen der Studie zusätzlich mit dem β -Blocker Propranolol behandelt wurden, zeigten einen geringeren Anstieg CD16 positiver Monozyten. Steppich schlussfolgerte daraus, dass die proinflammatorischen Monozyten aus dem Marginalpool, welcher aus an Endothelzellen kleiner Gefäße anhaftenden Leukozyten besteht, vermehrt in den Blutkreislauf mobilisiert werden können. (Steppich et al. 2000)

Erschöpfende körperliche Belastung und Stress können über eine adrenerge Stimulation offensichtlich zur Mobilisation proinflammatorischer CD16 positiver Monozyten führen. So konnten Dimitrov et al. 2010 nachweisen, dass eine Mobilisation CD 16 positiver Monozyten auch ohne körperliche Belastung durch eine Gabe von Epinephrin möglich ist (Dimitrov et al. 2010). Es stellte sich die Frage, welcher Mechanismus für die adrenerg gesteuerte selektive Mobilisation der CD16 positiven Monozyten verantwortlich sein könne. Steppich interpretierte in seiner Arbeit eine höhere Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD11b, d und VLA-4 als möglichen Mechanismus (Steppich et al. 2000). VLA-4 vermittelt die Anbindung an von Endothelzellen gebildeten VCAM-1. Somit ist ein „rolling“ der Zellen über Endothelzellen möglich (Ronen Alon). Aufgrund dieser Eigenschaft wird den CD16 positiven Monozyten Mo3 ebenfalls eine höhere Präsenz im Blutkreislauf unterstellt. Aktuelle Gen- und Rezeptoranalysen, welche eine höhere zytoskelettale Mobilität dieser Subpopulation nachwiesen, unterstreichen diese Schlussfolgerung (Wong et al. 2011). Dimitrov et al untersuchten des Weiteren das Adhäsionsrezeptorprofil von 14 verschiedenen Leukozytensubtypen, darunter CD8 positive T-Zellen, NK-Zellen, und CD16 positive Monozyten, welche für eine adrenerge, selektive Mobilisation bekannt sind. Es stellte sich heraus, dass alle Zellen, welche mittels Epinephrin mobilisiert werden konnten, im hohen Maße das Adhäsionsmolekül CD11a und CX3CR1 exprimierten. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Expressionsdichte dieser Moleküle mit dem Grad der adrenergen Mobilisierbarkeit korreliert. Adrenalin kann offensichtlich Adhäsionsmoleküle wie CD11a und CX3CR inaktivieren und somit die Mobilisation bestimmter (insbesondere zytotoxischer) Zellen (darunter CD16 positive Monozyten) hervorrufen (Dimitrov et al. 2010).

Wie Gabriel et al. 1994 und Steppich et al. 2000 untersuchten wir ebenfalls die Verteilungsveränderungen innerhalb einer Gruppe nach körperlicher Ausbelastung. Wir stellten diese Veränderungen in drei Monozytenpopulationen dar, um zum einen der gebräuchlichen Einteilung der IUIS zu entsprechen und zum anderen die Veränderungen innerhalb der CD14 positiven Monozytenpopulationen Mo1 und Mo2 zu untersuchen. Die favorisierte Darstellung nach Absolutwerten ist in diesem Fall jedoch nicht möglich, da bedingt durch die Belastungsleukozytose falsch hohe Werte im Vergleich vor zu nach Belastung zu erwarten wären. Wie auch in den Arbeiten von Gabriel und Steppich beschrieben, zeigte sich nach körperlicher Ausbelastung eine signifikante Zunahme der CD 16 positiven Population Mo3 bei Sportlern ($9,5 \pm 4,1\%$ vor zu $12,1 \pm 4,7\%$ nach; $p < 0,001$) als auch bei den Kontrollgruppen ($11,9 \pm 5,5\%$ zu $13,9 \pm 5,9\%$; $p = 0,001$). Signifikant kam es bei beiden Gruppen zur Abnahme innerhalb der Population Mo1 um 3% bei Sportlern und um 2,8% bei den Kontrollgruppen. Mo2 zeigte in keinen der Gruppen eine wesentliche Verschiebung. Veränderungen innerhalb der

Monozytensubpopulationen nach akuter Belastung finden nach unseren Erkenntnissen demzufolge innerhalb der Populationen Mo1 und Mo3 statt.

5.2.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in den Monozytensubpopulationen

Als einer der nicht beeinflussbaren Risikofaktoren für die Atherosklerose gilt das männliche Geschlecht. Als weiblichen präventiven Faktor rückten bisherige Forschungen Östrogen als „präventives“ Hormon in den Vordergrund der Diskussion. Ursächlich wurden beispielsweise Veränderungen der Lipoproteinzusammensetzung im Serum (Kavanagh et al. 2009), eine Reduktion der monozytären Integrinexpression (Bindungspartner für VCAM-1) (Nofer 2012) und antiinflammatorische Effekte (Chakrabarti et al. 2008) gesehen. Nur wenige Forschungsgruppen untersuchten allerdings geschlechtsassoziierte Unterschiede in den Monozytensubpopulationen. Heimbeck et al. fanden im Rahmen der Validierung eines standardisierten Single-Plattform Assays signifikant niedrigere Werte CD16 hochpositiver Monozyten bei Frauen. Die in dieser Studie verwendete Gatingstrategie teilte allerdings nur zwischen CD14 hochpositiven und CD16 hochpositiven Monozyten auf. Monozyten der Klassifikation Mo2 wurden nicht analysiert und größtenteils in die Gruppe der CD16 hochpositiven Monozyten integriert (Heimbeck et al. 2010).

Die auf diese Weise entstehenden Unterschiede konnten wir in unserer Untersuchung, bestehend aus einer Gatingstrategie in drei Subpopulationen, weder prozentual noch nach absoluter Betrachtungsweise bestätigen. Lediglich innerhalb der Sportgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach absoluter Betrachtungsweise (Sportlerinnen 43 ± 18 pt/ μ l versus Sportler 58 ± 28 pt/ μ l; $p=0,044$). Ältere Untersuchungen, die ebenfalls nur in zwei Subpopulationen auftrennten und nur prozentual betrachteten, sahen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (Tollerud et al. 1989). Auch im Vergleich vor und nach Belastung ließen sich in unserem Probandenkollektiv keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Es lässt sich demnach postulieren, dass bei Auftrennung der Monozytensubpopulationen in drei Gruppen, mit sauberer Abtrennung der proinflammatorischen Kategorie Mo3, kein geschlechtsspezifischer Unterschied nachzuweisen ist.

5.2.4 Einfluss des Alters auf die Monozytensubpopulationen

Nach Auswertung der Daten war innerhalb unseres Probandenkollektivs ein signifikanter Unterschied in der Alterszusammensetzung auffällig. So waren Leistungssportler mit

22,2 ± 3,5 Jahren signifikant jünger als unsere Kontrollen mit 26,5 ± 4,4 Jahren ($p < 0,001$). Um einen Fehler in unseren Betrachtungen auszuschließen, führten wir eine altersadaptierte lineare Regression durch. Nach dieser gingen alle Signifikanzen mit Ausnahme derer in den absoluten Werten nach Belastung verloren, die jedoch bedingt durch die Belastungsleukozytose keine sichere Aussage erlauben.

Heimbeck et al. gruppierten in ihrer Untersuchung zum Alterseinfluss auf die Monozytensubpopulation ihre Probanden in Gruppen von 18-30, 31-40- 41-50 und 51-60 Jahren mit jeweils fünf männlichen und fünf weiblichen Probanden. Mittels einer Regressionsanalyse konnten sie keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Monozytensubpopulation (wenn auch nur nach Zweiparameteraufteilung) mit zunehmenden Alter finden (Heimbeck et al. 2010).

Untersuchungen von Sadeghi et al. kamen zu einem anderen Ergebnis. In dieser Untersuchung konnten sie eine signifikante Zunahme CD 16 hoch positiven Monozyten nachweisen. Die Altersstaffelung war in eine Altersgruppe mit 72-100 Jahren und eine Kontrollgruppe von 20-47 Jahren eingeteilt. Als Gatingschema fand eine Zweiparameteraufteilung in CD14 positiv/CD16 positiv oder CD14 positiv/CD16 hochpositiv Anwendung. Sie wiesen eine signifikante Zunahme CD16 hochpositiver Monozyten nach (Sadeghi et al. 1999).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Seidler et al. Sie staffelten die Altersgruppen in 18-30, 30-50 und 51-88 Jahre und wiesen ebenfalls eine signifikante Zunahme CD16 positiver Monozyten nach. Das verwendete Gatingschema trennte nur im Bereich zwischen CD14 hochpositiv und CD16 negativ und positiv. Dies würde allerdings nach aktueller Klassifikation einer Trennung zwischen Mo1 und Mo2 entsprechen. Die CD14 positive und CD16 hochpositive Gruppe Mo3 blieb in dieser Arbeit unberücksichtigt (Seidler 2010).

Basierend auf der aktuell verfügbaren Studienlage, welche teilweise große Alterssprünge in ihren Untersuchungskollektiven aufweist (Seidler 2010; Sadeghi et al. 1999), dem zwar rechnerisch signifikanten, aber dennoch geringeren Altersunterschied von vier Jahren in unseren Gruppen, ist von keiner Beeinflussung auf die Subpopulationsverteilung auszugehen.

6. Zusammenfassung

Auf der Suche nach Ursachen für die in unserer Gesellschaft dominierenden Zivilisationskrankheiten wie Malignome, Diabetes mellitus, neurodegenerative Erkrankungen und Atherosklerose bzw. deren Folgen wie pAVK, Schlaganfall und Myokardinfarkt konnte eine chronische, geringgradige Inflammation als ursächlich für diese Erkrankungen nachgewiesen werden. Körperliche Aktivität und Sport zeigten in zahlreichen Untersuchungen positive Effekte zur Lebenszeitverlängerung, Krankheitsreduktion und Senkung der chronischen Inflammation.

Die Atherosklerose zählt ebenfalls zu einer chronisch verlaufenden, entzündlichen Erkrankung. Die Monozyten zählen zu den Haupteffektorzellen dieser Erkrankung. Diese konnten im Rahmen der Forschung basierend auf deren Rezeptorexpression von CD14 und CD16 in drei funktionell unterschiedliche Subgruppen eingeteilt werden (Mo1, Mo2, Mo3). Insbesondere die CD16 positive, proinflammatorische Subgruppe Mo3 scheint eine Schlüsselrolle in der Pathogenese und dem Progress der Atherosklerose einzunehmen. Da Sport und körperliche Aktivität als „antiinflammatorische Medizin“ ebenfalls die Inzidenz der Atherosklerose reduziert, untersuchten wir den Einfluss regelmäßiger körperlicher Ertüchtigung auf die Subgruppenverteilung der Monozyten. In den hier vorgelegten Analysen konnte gezeigt werden, dass regelmäßiges Training zu einer Umverteilung der Monozytensubpopulationen hin zu nichtinflammatorischen Populationen führt und somit signifikant die im Atherosklerosegeschehen involvierte Monozytensubpopulation 3 (CD14+CD16++) senkt. Weiterhin wurde die Verteilung der Monozytensubpopulationen aus dem Marginalpool nach körperlicher Ausbelastung unter erstmalig verwendeter Aufteilung in drei Subpopulationen untersucht. Es zeigte sich, dass nach körperlicher Ausbelastung die Zellzahl der Subgruppe Mo1 abnahm und die der proinflammatorischen Gruppe Mo3 signifikant anstieg. Die Subgruppe Mo2 bleibt nach körperlicher Belastung konstant. Dieser Effekt ließ sich in beiden Probandenkollektiven nachweisen. Genderspezifische Veränderungen innerhalb der Monozytensubpopulationen waren nicht nachzuweisen. Basierend auf der Erkenntnis, dass CD16 positive Monozyten eine Schlüsselrolle im Atherosklerosegeschehen einnehmen, ist somit zu schlussfolgern, dass regelmäßiger Sport signifikant zu einer Senkung der proinflammatorischen Monozytensubpopulation führt.

7. Literaturverzeichnis

- Acierno LJ (1994) The history of cardiology. Parthenon Publ. Group, London
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical reviews in oncology/hematology* 66:1–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.07.004
- Baum M (1998) Sport und Immunsystem. *Deutsches Ärzteblatt*:A538 - A541
- Chakrabarti S, Lekontseva O, Davidge ST (2008) Estrogen is a modulator of vascular inflammation. *IUBMB life* 60:376–382. doi:10.1002/iub.48
- Dimitrov S, Lange T, Born J (2010) Selective mobilization of cytotoxic leukocytes by epinephrine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 184:503–511. doi:10.4049/jimmunol.0902189
- Fogelstrand P, Borén J (2012) Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD* 22:1–7. doi:10.1016/j.numecd.2011.09.007
- Gabriel H, Urhausen A, Brechtel L, Müller HJ, Kindermann W (1994) Alterations of regular and mature monocytes are distinct, and dependent of intensity and duration of exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 69:179–181
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature reviews. Immunology* 11:607–615. doi:10.1038/nri3041
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ (1998) Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor–Deficient Mice. *Molecular Cell* 2:275–281. doi:10.1016/S1097-2765(00)80139-2
- Gunter Fingerle (1993) The Novel Subset of CD14+/CD16+ Blood Monocytes Is Expanded in Sepsis Patients
- Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U (2001) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, s.l.
- Heimbeck I, Hofer TPJ, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L (2010) Standardized single-platform assay for

human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 77:823–830. doi:10.1002/cyto.a.20942

Hristov M, Weber C (2011) Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis* 106:757–762. doi:10.1160/TH11-07-0500

Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musial WJ, Tycinska AM, Moniuszko M (2015) The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scandinavian journal of immunology* 82:163–173. doi:10.1111/sji.12314

Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK (2000) Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *The Journal of Physiology* 528:157–163. doi:10.1111/j.1469-7793.2000.00157.x

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K-i, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation* 116:1494–1505. doi:10.1172/JCI26498

Kavanagh K, Davis MA, Zhang L, Wilson MD, Register TC, Adams MR, Rudel LL, Wagner JD (2009) Estrogen decreases atherosclerosis in part by reducing hepatic acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) in monkeys. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29:1471–1477. doi:10.1161/ATVBAHA.109.191825

Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M (2009) Chronic Inflammation and Oxidative Stress as a Major Cause of Age- Related Diseases and Cancer. *IAD* 3:73–80. doi:10.2174/187221309787158371

Kühnel W (2002) *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie*. Thieme, Stuttgart

Kyu HH, Bachman VF, Alexander LT, Mumford JE, Afshin A, Estep K, Veerman JL, Delwiche K, Iannarone ML, Moyer ML, Cercy K, Vos T, Murray CJL, Forouzanfar MH (2016) Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *BMJ (Clinical research ed.)* 354:1 - 9

Lüllmann-Rauch R (2006) *Taschenlehrbuch Histologie; 10 Tabellen*. Thieme, Stuttgart

McFarlin BK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, Stewart LK, Timmerman KL, Coen PM (2006) Physical activity status, but not age, influences

inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 61:388–393

Michael Gleeson Exercise and Toll-like receptors:34–52

Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B (2015) Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Scientific reports* 5:1–14. doi:10.1038/srep13886

Murphy KM, Travers P, Walport M (2014) *Janeway Immunologie*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg

Newill A (2016) *Elias Metschnikoff und der Tuberkelbazillus; Grundlagen der Immunologie und Klinik der Tuberkulose*

Nofer J-R (2012) Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems. *Journal of molecular endocrinology* 48:R13-29. doi:10.1530/JME-11-0145

Noriaki Kawanishi (2010) Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet induced obese mice:105–118

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature reviews. Immunology* 11:85–97. doi:10.1038/nri2921

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527–2534

Pedersen BK, Hoffman-Goetz L (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews* 80:1055–1081. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1055

Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, Wolsk-Petersen E, Febbraio M (2004) The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *The Proceedings of the Nutrition Society* 63:263–267. doi:10.1079/PNS2004338

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2001) C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327–334

Pradhan AD (2001) C-Reactive Protein, Interleukin 6, and Risk of Developing Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA* 286:327–334. doi:10.1001/jama.286.3.327

Preston SH, Vierboom YC, Stokes A (2018) The role of obesity in exceptionally slow US mortality improvement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115:957–961. doi:10.1073/pnas.1716802115

- R. Lewicki (1987) Effect of Physical Exercise on Some Parameters of Immunity in Conditioned Sportsmen:309 - 314
- R. Van Furth (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells*:845–852
- Radwan WM, Khalifa KA, Esaily HA, Lashin NA (2016) CD14++CD16+ monocyte subset expansion in rheumatoid arthritis patients; Relation to disease activity and interleukin-17. *The Egyptian Rheumatologist* 38:161–169.
doi:10.1016/j.ejr.2015.12.002
- Riede U-N (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie; 168 Tabellen*. Thieme, Stuttgart
- Rogacev KS, Zawada AM, Hundsdorfer J, Achenbach M, Held G, Fliser D, Heine GH (2015) Immunosuppression and monocyte subsets. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30:143–153. doi:10.1093/ndt/gfu315
- Ronen Alon The Integrin VLA-4 Supports Tethering and Rolling in Flow on VCAM-1 1994:1243 - 1253
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* 340:115–126. doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thomas JK, Nishanian P, Fahey JL (1999) Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons☆. *Experimental Gerontology* 34:959–970. doi:10.1016/S0531-5565(99)00065-0
- Schittenhelm A (1925) *Handbuch der Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organe; Haemophilie, Haemoglobinurie, Haematoporphyrie*. Springer, Berlin
- Seidler S (2010) Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults:1–11
- Sobotta J, Welsch U (Hrsg) (2009) *Lehrbuch Histologie; Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen ; [+ mit dem plus im Web, Zugangscode im Buch, www.studentconsult.de]*. Elsevier Urban & Fischer, München
- Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK (2003) Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- α production in humans. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17:884–886. doi:10.1096/fj.02-0670fje
- Statistisches Bundesamt Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2015

- Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HW (2000) Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *American journal of physiology. Cell physiology* 279:C578-C586. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.3.C578
- Sysmex Partec GmbH (2015) Partec Flow Museum. <http://www.sysmex-partec.com/company/flow-museum/icp-11-1968.html>
- Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD (2008) Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *Journal of leukocyte biology* 84:1271–1278. doi:10.1189/jlb.0408244
- Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN (1989) The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *Journal of clinical immunology* 9:214–222
- Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB (1999) Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 282:2131–2135
- Willem J. S. de Villiers (1994) Macrophage-Colony-stimulating Factor Selectively Enhances Macrophage Scavenger Receptor Expression and Function:705–709
- Wong KL, Tai JJ-Y, Wong W-C, Han H, Sem X, Yeap W-H, Kourilsky P, Wong S-C (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118:e16-e31. doi:10.1182/blood-2010-12-326355
- World Health Organisation (2011) *Global Recommendations on Physical Activity for Health 2011*
- Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell R-R, Fliser D, Heine GH (2011) SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118:e50-e61. doi:10.1182/blood-2011-01-326827
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116:e74-e80. doi:10.1182/blood-2010-02-258558

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Monozytennomenklatur (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).....	3
Tabelle 2 Zusammensetzung MACS-Buffer	18
Tabelle 3 Zusammensetzung Antikörperansatz.....	19
Tabelle 4 Basisdaten.....	26
Tabelle 5 Hämatologische Basisdaten vor Belastung	28
Tabelle 6 Hämatologische Basisdaten nach Belastung	29
Tabelle 7 Vergleich Kontrollgruppe vor und nach Belastung.....	30
Tabelle 8 Vergleich Sportler vor und nach Belastung	32
Tabelle 9 Vergleich Sportler zu Kontrollgruppe vor Belastung	34
Tabelle 10 Vergleich Sportler zu Kontrollgruppe nach Belastung	36
Tabelle 11 Differenz der Monozytensubpopulationen ohne Altersadaptierung.....	37
Tabelle 12 Differenz der Monozytensubpopulationen mit Altersadaptierung.....	38
Tabelle 13 Differenz der Monozytensubpopulationen ohne Altersadaptierung.....	38
Tabelle 14 Differenz der Monozytensubpopulationen mit Altersadaptierung.....	39
Tabelle 15 Vergleich Sportlerinnen und Sportler vor Belastung.....	39
Tabelle 16 Vergleich Sportlerinnen und Sportler nach Belastung	40
Tabelle 17 Vergleich Kontrollprobandinnen zu Kontrollprobanden vor Belastung	40
Tabelle 18 Vergleich Kontrollprobandinnen zu Kontrollprobanden nach Belastung	41

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Monozyt (Kühnel 2002).....	1
Abbildung 2 Monozytenmigration (Jaffer et al. 2006).....	5
Abbildung 3 Laufband Schiller MTM-1500 (Schiller 2018)	13
Abbildung 4 Sauerstoffaufnahme und CO ₂ Abgabe zum Untersuchungszeitpunkt	14
Abbildung 5 Durchflusszytometer Partec ICP11 (Sysmex Partec GmbH 2015)	15
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Messküvette (Shapiro 2005)	15
Abbildung 7 Schematischer Aufbau der optischen Bank (Givan 2010)	16
Abbildung 8 Fünf-Felder-Dot-Plot.....	20
Abbildung 9 Gating Forward Scatter High zu Forward Scatter Area	21
Abbildung 10 Gating CD15- zu CD19-Expression	21
Abbildung 11 Gating CD86-Expression zu Sideward Scatter Area	22
Abbildung 12 Gating Sideward Scatter Area zu Forward Scatter Area	22
Abbildung 13 Gating CD14- zu CD16-Expression	23

Abbildung 14 Gating CD115-Expression zu Sideward Scatter Area	23
Abbildung 15 Mittelwertvergleich von Borgskala und VO2 Peak.....	27
Abbildung 16 Mittelwertdifferenz absolut Kontrollgruppe	30
Abbildung 17 Mittelwertdifferenz prozentual Kontrollgruppe	31
Abbildung 18 Mittelwertdifferenz absolut Sportler.....	32
Abbildung 19 Mittelwertdifferenz prozentual Sportler.....	33
Abbildung 20 Absolute Mittelwertdifferenz vor Belastung Sportler zu Kontrollgruppe ..	34
Abbildung 21 Prozentuale Mittelwertdifferenz vor Belastung Sportler zu Kontrollgruppe	35
Abbildung 22 Absolute Mittelwertdifferenz nach Belastung Sportler zu Kontrollgruppe	36
Abbildung 23 Prozentuale Mittelwertdifferenz nach Belastung Sportler zu Kontrollgruppe.....	37
Abbildung 24 Effekte körperlicher Aktivität	43

8. Thesen

1. Regelmäßige körperliche Ertüchtigung und Sport gelten als einer der Hautpräventionsfaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen.
2. Die Atherosklerose gilt als ein chronisch-inflammatorischer Prozess, dessen Haupteffektorzellen die Monozyten sind.
3. Monozyten können anhand ihres Rezeptorbesatzes in drei funktionell unterschiedliche Subgruppen eingeteilt werden und wurden durch die International Union of Immunological Societies in Mo1, Mo2 und Mo3 eingeteilt.
4. Ein erhöhtes Vorkommen proinflammatorischer Monozyten der Subpopulation Mo3 im Blut ist mit vaskulären Pathologien wie erhöhter Plaque-Vulnerabilität, stärkerer Intima-Media-Dicke und Erkrankungen wie der KHK assoziiert.
5. Regelmäßiges Training führt langfristig zu einer Umverteilung der Monozytensubpopulationen hin zu nichtinflammatorischen Subgruppen und einer Reduktion der absoluten Zellzahlen CD16-positiver Monozyten der Gruppe Mo3.
6. Körperliche Ausbelastung führt zur Mobilisation CD16 positiver Monozyten der Gruppe Mo3 aus dem Marginalpool und einer Abnahme von Mo1.
7. Die Subpopulation Mo2 zeigt unter Ausbelastung keine Veränderungen, weder bei Leistungssportlern noch bei Kontrollprobanden.
8. Die Darstellung der Subpopulationsverteilungen nach prozentualen und absoluten Werten differieren.
9. Genderspezifische Unterschiede in der Subpopulationsverteilung konnten nicht nachgewiesen werden.

9. Anhang

9.1 Probandeninformation

Probandeninformation

„Auswirkung einer kurzfristigen Maximalbelastung auf die Inhibition/Reduktion proinflammatorischer Monozyten im Vergleich von Hochleistungssportlern/innen versus altersadaptierten Gesunden“

Sehr geehrte/r Proband/in,

Die Ursachen für die Entstehung der Atherosklerose (Verkalkung/Verengung von Arterien) sind zum Teil noch unbekannt. Bei vielen Patienten findet man die so genannten klassischen Risikofaktoren Diabetes mellitus, Rauchen, Bluthochdruck, erhöhte Blutfettwerte oder eine bekannte Familienanamnese für diese Erkrankungen. Häufig ist jedoch kein Risikofaktor zu finden. Heutzutage ist bekannt, dass die Entzündungen, die man im Laufe seines Lebens erleidet, eine weitere potentielle Ursache für die Atherosklerose sein kann. Hierbei scheinen bestimmte Zellen, die man im Blut nachweisen kann, haupt- oder zumindest maßgeblich mitbeteiligt zu sein. Diese Zellen werden CD16+ Monozyten genannt. Wir haben in einer vorherigen Studie zeigen können, dass diese Zellen im Vergleich von Patienten mit Koronarer Herzerkrankung und Gesunden, im peripheren Blut vermehrt bei Patienten mit Koronarer Herzerkrankung nachweisbar sind. Weiterhin ist bekannt, dass diese Zellen bei sportlich aktiven Menschen und dauerhafter körperlicher Belastung vermindert, im Gegensatz dazu aber nach einer körperlichen Höchstleistung vermehrt im Blut nachzuweisen sind.

Die vorliegende Studie soll nun erstmalig die Frage untersuchen, ob die Konzentration dieser Zellen bei Gesunden, die nicht oder wenig sportlich aktiv sind im Vergleich zu Hochleistungssportlern/innen vor und nach einer körperlichen Belastung unterschiedlich sind.

Studienablauf

Wir planen bei Ihnen ca. 30ml Blut (aus einer peripheren Vene) vor und nach einer körperlichen Maximalbelastung zu entnehmen. Die Maximalbelastung findet in Form einer Laufband-Spiroergometrie statt, bei der Sie unter ärztlicher Aufsicht bis zur Ausbelastung laufen werden. Während der Untersuchung werden kontinuierlich Ihre Herzfrequenz, ihr Blutdruck, sowie die Ausatmung/Einatmung von Sauerstoff und Kohlendioxid gemessen.

Vor dieser Maximalbelastung werden Sie ausführlich zu potentiellen Erkrankungen befragt, sowie einer ärztlichen Untersuchung und einer Herzultraschalluntersuchung unterzogen, um relevante Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die eine relative Gegenanzeige zur Ausbelastung darstellen könnten, auszuschließen.

Wir werden mittels spezieller Laboranalysen die genannten Zellen bestimmen. Weiterhin wird Blutserum für andere Marker im Blut, die weitere Hinweise auf die Entzündung im Körper oder andere Risikokonstellationen aufzeigen können, untersucht. Weiterhin wird ein Kernspintomogramm des Herzens bei Ihnen durchgeführt.

Ihr Arzt wird die Studie nochmals detailliert mit Ihnen besprechen. Nach Erhalt Ihres Einverständnisses werden Ihre Daten in einem Prüfbogen festgehalten, der nicht mit Ihrem Namen, sondern lediglich mit einer anonymen Kennziffer versehen ist. Dieses Verfahren nennt man Pseudonymisierung. Diese Daten werden pseudonymisiert in eine Datenbank eingegeben.

Risiken

Die Risiken sind in dieser Studie als gering einzuschätzen. Trotzdem bitten wir Sie, diesen Abschnitt sorgfältig zu lesen.

Es kann im Rahmen von Blutentnahmen in seltensten Fällen zu Nervenverletzungen oder zur Entwicklung von relevanten Blutergüssen kommen. Eine Infektion ist bei sachgerechtem Vorgehen nicht zu erwarten. Ein relevanter Abfall des Blutfarbstoffs (Hämoglobin) ist nicht zu erwarten, jedoch potentiell möglich. Dennoch bitten wir Sie - auch nach Beendigung der Studie - bei Auftreten von Beschwerden jederzeit den Prüfarzt zu kontaktieren.

Eine körperliche Ausbelastung kann in seltenen Fällen zu Herzrhythmusstörungen und/oder erhöhtem Blutdruck führen. Dies ist bei Ausschluss einer relevanten Vorerkrankung jedoch unwahrscheinlich und wird durch die kontinuierliche Aufzeichnung von Herzfrequenz und Blutdruck überwacht und gegebenenfalls durch Abbruch der Untersuchung verhindert.

Zur Sicherung vor Stürzen werden Sie während der Untersuchung in einem Haltegurt fixiert, zur weiteren Sicherung werden bei jeder Untersuchung mindestens zwei geschulte Personen, hiervon mindestens ein Arzt, anwesend sein.

Rechte

Die bei dieser Studie erhobenen Daten werden in einem Prüfbogen festgehalten, der nicht mit Ihrem Namen, sondern lediglich mit einer anonymen Kennziffer versehen ist. Der Prüfarzt kontrolliert die Daten. Vertreter der zuständigen Überwachungsbehörden erhalten auf Wunsch ebenfalls Einsicht in die Unterlagen. Wir garantieren Ihnen, dass Ihr Name und Ihre Teilnahme sowie alle anderen Informationen streng vertraulich behandelt werden. Die kommerzielle Nutzung der Blutproben wird ausgeschlossen.

Diese Studie wurde von einer Ethikkommission zustimmend bewertet. Die international geltenden Richtlinien für die Durchführung von Studien werden streng eingehalten.

Wenn Sie teilnehmen möchten, geben Sie dazu bitte Ihr schriftliches Einverständnis. Dieses können Sie während der Studie zu jedem Zeitpunkt zurückziehen und Ihre Studienteilnahme beenden. Wann immer Sie Fragen haben, wenden Sie sich bitte an Ihren Prüfarzt.

Namen der Prüfarzte: Frank Noack, PD Dr. med. habil. Axel Schlitt

Krankenhausadresse: Klinik und Polikliniken für Innere Medizin I und III,
Universitätsklinikum der Martin Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Telefon: 0345 557 0

Wir wären Ihnen dankbar, wenn Sie an dieser Studie teilnehmen. Sie wird einen wesentlichen Anteil zur weiteren Erforschung der Ursachen und eventuell auch der Therapie der Atherosklerose beitragen.

9.2 Protokoll Sportgruppe Mann

Sportart/Umfang:	Name:	Vorname:	Datum:



Geburtsdatum:	Hüftumfang:	Bauchumfang:	HWR:

Studiennummer:
letzte Malzeit:
Letztes Training:
Boreskala:

Lauf

Verletzungen in den Jahren 2012 & 2013:		
-		
Labor:	Vor:	Nach:

Prüfer:

Dauer [min]	v [km/h]	Hf [min^{-1}]	Laktat [mmol/l]	Glukose [mmol/l]
Ruhe	0			
5	7,0			
3	7,2			
3	9,0			
3	10,8			
3	12,6			
3	14,4			
3	16,2			
3	18,0			
3	19,8			
VO₂ max:				
	E 2			
	E 4			

Bemerkungen:

- Erfassung der Ruhewerte nach 10minütigem Sitzen
- Pausenlänge: 30 s
- E2 und E4 bei 8,0 km/h (Laufen!)

9.3 Protokoll Sportgruppe/Kontrollen

Sportart/Umfang:	Name:	Vorname:	Datum:

Geburtsdatum:	Hüftumfang:	Bauchumfang:	HWR:

Studiennummer:
letzte Malzeit:
Boreskala:



Lauf

Labor:	Vor:	Nach:

Prüfer:

Dauer [min]	v [km/h]	Hf [min^{-1}]	Laktat [mmol/l]	Glukose [mmol/l]
Ruhe	0			
5	6,0			
3	7,8			
3	8,7			
3	9,6			
3	10,5			
3	11,4			
3	12,3			
3	13,2			
3	14,1			
3	15,0			
3	15,9			
VO₂ max:				
	E 2			
	E 4			

10. Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Auswirkung einer kurzfristigen Maximalbelastung auf proinflammatorische Monozyten im Vergleich von Hochleistungssportlern versus einer altersadaptierten gesunden Kontrollgruppe“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen in Anspruch genommen habe bzw. dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit verwendeten fremden Quellen, auch aus dem Internet (einschließlich Tabellen, Grafiken u.ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich ausnahmslos sowohl bei unverändert übernommenen Tabellen, Grafiken u.ä. als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen bzw. von mir abgewandelten Tabellen, Grafiken u.ä. anderer Autorinnen und Autoren die Quelle angegeben habe.

Dresden, 07.10.2018

Tobias Wehnert

11. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Tobias Wehnert, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Dresden, 07.10.2018

Tobias Wehnert

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den an dieser Arbeit beteiligten Personen sehr herzlich danken. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Schlitt für die Überlassung des Themas der Dissertationsarbeit und die ausdauernde Unterstützung.

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Christof Ulrich, meinem Laborleiter, der für mich ein stetiger Ansprechpartner und Hilfesteller war, bedanken. In diesen Zusammenhang gilt weiterer Dank allen MTAs des Labors und der Funktionsabteilung des Universitätsklinikums Halle (Saale).

Nicht zu vergessen sind Frank Noack, Markus Hollenbach und René Schwesig, die bei der Rekrutierung von Probanden, deren Untersuchung und der Organisation entscheidende Arbeit geleistet haben.

Ich bedanke mich bei allen Ärzten, die außerhalb ihrer Dienstzeit bei der Untersuchung der Probanden beteiligt waren.

Nicht zu letzt möchte ich meiner Frau für die Hilfe, Rücksichtnahme und Geduld bei der Fertigstellung der Dissertation in den letzten Jahren danken.

Tobias Wehnert