

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Onkologisches Zentrum/ II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Sektion Pneumologie

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

## **Immunologische Antwort auf akute körperliche Belastung bei Patienten mit idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie (IPAH)**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Emilia Theresa Renk  
aus Berlin

Hamburg 2017

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.07.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Carsten Bokemeyer**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Christoph Sinning**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	PULMONAL-ARTERIELLE HYPERTONIE (PAH)	1
1.1.1	Definition und Einteilung	1
1.1.2	Klassifikation	2
1.1.3	Pathogenese	5
1.1.4	Diagnostik	10
1.1.5	Therapie	11
1.2	IMMUNSYSTEM UND TRAINING	15
1.2.1	Anti-inflammatorischer Effekt	15
1.2.2	Paradoxon: Ausdauer-Athleten	21
<b>2</b>	<b>Methodik</b>	<b>22</b>
2.1	STUDIENDESIGN	22
2.2	EINSCHLUSSKRITERIEN	23
2.3	REKRUTIERUNG DER PROBANDEN	24
2.3.1	IPAH-Gruppe	24
2.3.2	Kontrollgruppe	25
2.4	KLINISCHE UNTERSUCHUNG	25
2.4.1	Echokardiografie	26
2.4.2	6-Minuten-Gehtest (6MWD)	26
2.4.3	Spirometrie	27
2.4.4	Spiroergometrie	27
2.5	EXPERIMENTELLER TEIL	28
2.5.1	Vorbereitung der Blutproben	28
2.5.2	Durchflusszytometrie	31
2.5.3	ELISA	33
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	BASE-LINE PARAMETER	35
3.1.1	Korrelation innerhalb der Base-line Parameter	36
3.2	ERGEBNISSE DER ZELLZAHLMESSUNG	37
3.2.1	Leukozyten und Lymphozyten	38
3.2.2	B-, T-, TCRgd-, NK-, NKT-Zellen, Monozyten	40
3.2.3	T-Helfer-Zellen (Th1, Th2, Th17, Th1/17) und Treg-Zellen (CD25/CD127)	45
3.2.4	IL17, IL6	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	EFFEKTE DES KÖRPERLICHEN TRAININGS AUF PAH	50
4.2	EFFEKTE DES TRAININGS BEI TIERMODELLEN MIT EXPERIMENTELLER PH	52
4.3	EINFLUSS VON SPORT AUF DAS IMMUNSYSTEM UND PAH	55
4.4	UNTERSUCHUNGEN VON IMMUNMODULATORISCHEN BOTENSTOFFE BEIM MENSCHEN	57
4.4.1	IPAH und IL-6	58
4.4.2	IPAH und Th17	60
4.5	DIESE STUDIE	61
4.5.1	Mögliche Verbesserungen im Studiendesign	63
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis</b>	<b>67</b>

7	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	69
8	<i>Literaturverzeichnis</i> .....	72
9	<i>Danksagung</i> .....	79
10	<i>Lebenslauf</i> .....	80
11	<i>Eidesstattliche Erklärung</i> .....	81

# **1 Einleitung**

In der Einleitung der Dissertation wird zunächst das Krankheitsbild der pulmonal-arteriellen Hypertonie dargestellt. Nach kurzer Definition des Krankheitsbildes, der Klassifikation und Einteilung in die Untergruppen, werden die Mechanismen der Pathogenese erläutert. Diese sind von Wichtigkeit für die Entstehung dieses Dissertationsthemas, da eine immunologische Ursache in der Krankheitsentstehung eine Rolle spielt. Genauer werden auch die Therapiemöglichkeiten beschrieben, vor allem in Bezug zur Bewegungstherapie als unterstützende Maßnahme.

Als zweiter großer Pfeiler der Einleitung wird die Bedeutung des Immunsystems bei körperlichem Training beschrieben. Hier werden die möglichen Veränderungen durch körperliche Aktivität präsentiert.

## **1.1 Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)**

Zunächst gibt es eine Einführung in das Krankheitsbild der PAH. Diese beginnt mit einer Definition der Erkrankung. Nachfolgend wird die aktuelle Klassifikation dargestellt und die Pathogenese, Diagnostik und Therapie der PAH werden beschrieben.

### **1.1.1 Definition und Einteilung**

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine seltene und schwere Erkrankung, die mit erhöhtem Druck und mit vergrößertem Widerstand im kleinen Kreislauf des Menschen einhergeht. Die Diagnosestellung der PAH erfolgt nach Druckmessung in der Pulmonalarterie in Ruhe mittels Rechtsherzkatheter (Swan-Ganz-Katheter). Ein mittlerer pulmonal-arterieller Druck von 25 mmHg ist definiert als Grenzwert für die pulmonale Hypertonie (Badesch, Champion et al. 2009). Ferner darf der pulmonal-arterielle Verschlussdruck (Wedge-Druck), der abgeleitet wird, wenn der Rechtsherzkatheter mit insuffliertem Ballon bis zum Verschluss eines pulmonalen Gefäßastes vorgeschoben wird, den Grenzwert von 15 mmHg nicht überschreiten. Die Prävalenz der PH in der erwachsenen Bevölkerung liegt bei 5- 25 pro 1.000.000 Menschen. Der größte Anteil (65%) der Erkrankten sind mit 31- 60

Jahren Menschen des mittleren Lebensalters. Nur 10% der Patienten sind älter als 70 Jahre (Humbert, Sitbon et al. 2006).

Die Symptomatik dieser Krankheit beginnt schleichend und unspezifisch mit Müdigkeit, abnehmender Leistungsfähigkeit, Belastungsdyspnoe und teilweise leichter Zyanose und Brustschmerzen. Das Beschwerdebild ist nicht spezifisch für diese eine Erkrankung und kann bei vielen Krankheitsbildern des Herz-Lungenkreislaufs auftreten. Daher wird die PAH meistens sehr spät erkannt und die Diagnose erst im schon fortgeschrittenen Stadium gestellt (Gibbs 2007).

Die Stadien der PAH werden nach der World Health Organisation in funktionelle Klassen I-IV eingeteilt (Galie, Torbicki et al. 2004). Diese WHO Einteilung erfolgt synonym wie die der NYHA (New York Heart Association), beginnend mit Klasse I, in der die Erkrankten noch nicht in ihrer Belastbarkeit eingeschränkt sind. Patienten mit WHO Klasse I werden selten diagnostiziert, da die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt noch nicht symptomatisch ist. Häufiger gibt es neudiagnostizierte Patienten der Klassen II und III. Bei dem Krankheitsschweregrad WHO II werden vom Patienten unter Belastung bestehende leichte Dyspnoe, Schwächeanfälle, Müdigkeit oder thorakale Schmerzen geschildert. Ähnlich ist die Symptomatik der Klasse III, bei der die Beschwerden früher und stärker auftreten. In Ruhe bestehen bei den Patienten dieser WHO-Klassen keine Beschwerden. Dies ist auch die Unterscheidung zur Klasse IV, bei der die oben genannten Beschwerden auch ohne körperliche Belastung auftreten und bei leichter körperlicher Aktivität verstärkt sind. Patienten der WHO-Klasse IV sind stark eingeschränkt und es bestehen Zeichen einer manifesten Rechtsherzinsuffizienz (Galie, Torbicki et al. 2004).

Die Krankheit hat einen sehr progressiven Verlauf. Durch den chronisch erhöhten Druck kommt es zu einer starken Rechtsherzbelastung (Arcasoy, Christie et al. 2003), die zum Rechtsherzversagen und dem vorzeitigen Versterben des Patienten führen kann.

### **1.1.2 Klassifikation**

Die pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung, die vielseitige Ursprünge der Entstehung haben kann. Gleichzeitig jedoch haben alle verschiedenen Formen einen ähnlichen Pathomechanismus, klinische Symptome und ähnliche

Therapieansätze (Fishman 2001). Eine Einteilung in unterschiedliche Gruppen wurde auf dem ersten weltweiten Symposium für pulmonale Hypertonie 1973 vorgeschlagen (Hatano and Strasser 1975). Bei dieser ersten Klassifizierung wurde die PH in nur zwei Gruppen eingeteilt. Bei der einen Gruppe waren Risikofaktoren bekannt, bei der anderen nicht. Seit diesem ersten Symposium gab es vier weitere Sitzungen, organisiert von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und die Unterteilung in fünf Gruppen wurde 1998 in Evian auf dem zweiten Symposium durchgeführt. Seitdem wurden auf dem dritten Symposium in Venedig (2003), dem vierten in Dana Point (2008) und der letzten Versammlung im Jahre 2013 in Nizza einige Veränderungen der 1998 entstandenen Klassifikation durchgeführt. Die überarbeiteten Klassifikationen wurden immer nach der Stadt der Konferenz benannt.

Die zur Zeit aktuelle Klassifikation nach Nizza von 2013 besagt, dass es verschiedene Formen der pulmonalen Hypertonie gibt, die in fünf Gruppen eingeteilt werden. Zu der ersten Gruppe gehören die idiopathische PAH, die erblich bedingte (1.2 FPAH) und eine assoziierte Form, die mit Risikoverhalten, beispielsweise Drogenkonsum (1.3) oder mit anderen Krankheiten (1.4 APAH), wie HIV (Opravil, Pechere et al. 1997) oder Schistosomiasis, einhergehen. Bei der idiopathischen Form der klassischen PAH ist die Krankheitsursache nicht bekannt (Simonneau, Gatzoulis et al. 2013). Hier ist die Diagnosestellung einer IPAH eine Ausschlussdiagnose und die Erkrankung wird als diese bezeichnet, wenn dessen Entstehung keiner anderen Ursache zugeordnet werden kann.

In der vorliegenden Studie, auf welche diese Dissertationsschrift basiert, wurden Patienten der PAH-Gruppe 1.1 mit idiopathischer Krankheitsherkunft (IPAH) in die Untersuchungen eingeschlossen.

Die vier weiteren Gruppen der Einteilung werden nach ihrer Genese in kardiale (Gruppe 2), pulmonale (Gr. 3), embolische (Gr. 4) oder multifaktorielle (Gr. 5) Formen unterschieden (Abbildung 1). Bei der zweiten Gruppe liegt eine Linksherzerkrankung der pulmonalen Hypertonie zugrunde. Ursachen können systolische oder diastolische Dysfunktion oder Klappenerkrankungen sein, die zur Entstehung einer pulmonalen Hypertonie führen. Durch eine funktionelle Störung im linken Ventrikel oder einer Klappenstörung des linken Herzens kommt es zu einem erhöhten Druck im linken Vorhof. Dieser Druck kann eine passive

Druckübertragung auf den kleinen Kreislauf verursachen und somit einen erhöhten pulmonal-arteriellen Druck (PAP) hervorrufen. Bei dieser häufigen Ursache der PH kommt es demnach durch die rückwärtige Druckübertragung auch zu einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Verschlussdruckes (Wedge-Druck). Die zweite Gruppe wird nach ihrer Ätiologie in drei Untergruppen unterteilt, es gibt die pulmonale Hypertonie, die durch systolische oder diastolische Linksherzdysfunktionalität entstehen und eine Form, bei der die Erkrankung durch Herzklappenfehler verursacht wird.

In die dritte Hauptgruppe der PH-Einteilung werden die Hypertonien eingeteilt, die ihre Ätiologie in Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie finden. Eine Ursache kann die in der Bevölkerung sehr häufig auftretende chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) sein. Aber auch andere interstitielle Lungenerkrankungen können Triggerfaktoren einer PH sein.

Bei der vierten Gruppe ist die PH Folge einer chronischen Thromboembolie der Lunge (CTEPH), die eine Gefäßverengung bzw. -obliteration und somit eine Druckerhöhung verursacht. Es kommt durch einen Thromboembolus, durch Tumoren oder Fremdkörper zu einer Obstruktion der Pulmonalarterie. Bei Patienten nach einer akuten Thromboembolie tritt die CTEPH in 4% der Fälle auf (Pengo, Lensing et al. 2004). Die kurative Therapie der Wahl bei der CTEPH ist eine chirurgische Thrombendarteriektomie.

Bei der fünften und letzten Gruppe der PH-Einteilung hat die pulmonale Hypertonie eine unklare Ätiologie oder ist multifaktoriell entstanden. Ursachen für die Entstehung der PH können unter anderem hämatologische (z.B. Polycythemia vera, Chronisch Myelische Leukämie), systemische (z.B. Sarkoidose) oder metabolische (z.B. Glykogenspeicherkrankheiten) Funktionsstörungen sein.



- 1 Pulmonary arterial hypertension (PAH)
  - 1.1 Idiopathic PAH
  - 1.2 Heritable PAH
    - 1.2.1 BMPR2
    - 1.2.2 ALK-1, ENG, Smad9, CAV1, KCNK3
    - 1.2.3 Unknown
  - 1.3 Drug and toxin induced
  - 1.4 Associated with:
    - 1.4.1 Connective tissue disease
    - 1.4.2 HIV infection
    - 1.4.3 Portal hypertension
    - 1.4.4 Congenital heart disease
    - 1.4.5 Schistosomiasis
  - 1' Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and/or pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH)
  - 1'' Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN)
- 2 Pulmonary hypertension due to left heart disease
  - 2.1 Left ventricular systolic dysfunction
  - 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction
  - 2.3 Valvular disease
  - 2.4 Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies
- 3 Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia
  - 3.1 Chronic obstructive pulmonary disease
  - 3.2 Interstitial lung disease
  - 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern
  - 3.4 Sleep- disordered breathing
  - 3.5 Alveolar hypoventilation disorders
  - 3.6 Chronic exposure to high altitudes
  - 3.7 Developmental lung diseases
- 4 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension
- 5 Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms
  - 5.1 Hematologic disorders: chronic hemolytic anemia, myeloproliferative disorders, splenectomy
  - 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, and lymphangioleiomyomatosis
  - 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage diseases, Gaucher's disease, and thyroid disorders
  - 5.4 Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure, and segmental PH

*Abbildung 1: Einteilung pulmonale Hypertonie (Rosenkranz 2015)*

### **1.1.3 Pathogenese**

Nachfolgend sollen die Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung einer IPAH führen, kurz analysiert werden. Zuerst werden hier die Veränderungen der Gefäßwand erläutert und die Bedeutung der entzündlichen Komponente wird beschrieben.

### **1.1.3.1 Pathologische Veränderungen**

Progressive, das Lumen verengende Veränderungen der pulmonal-arteriellen Gefäßwände können bei Patienten mit IPAH beobachtet werden. Der Umbau der pulmonal-arteriellen Widerstandsgefäße, der unter dem Mikroskop sichtbar ist, wird kombiniert aus Verdickungen der Intima, Media und Adventitia. Die Veränderungen setzen sich zusammen aus Endothelhyperproliferation in der Intima, glatte Muskelzellhypertrophie und –hyperplasie in der Media und die Einlagerung inflammatorischer Zellen und Fibrose in der Adventitia. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer Intimafibrose und plexiformen Läsionen (Price, Wort et al. 2012). Die plexiformen Läsionen sind charakteristische Gefäßveränderungen, z.B. aus Endothelzellen entstandene abnormale Kanäle im Lumen und in der Adventitia. Diese verursachen eine weitere Verengung der Gefäße und sind somit für eine Druckerhöhung verantwortlich.

Dysregulierte Endothelzellen schütten Wachstumsfaktoren aus, die die glatten Gefäßmuskelzellen zu starker Proliferation anregen und somit eine Verdickung der Gefäßwände hervorrufen. Zu diesen proliferativ wirkenden Faktoren gehören beispielsweise Serotonin (Dewachter, Adnot et al. 2006) und FGF2 (Thompson and Rabinovitch 1996), die von Endothelzellen vermehrt sezerniert werden.

Gleichzeitig werden wichtige endotheliale Homöostasefaktoren wie Apelin, welches eine antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen hatn geringerem Ausmaß produziert (Alastalo, Li et al. 2011). Die pulmonal-arteriellen Endothelzellen IPAH erkrankter Patienten produzieren weniger NO, welches eine Vasodilatation induziert und unterdrückend auf die Proliferation glatter Muskelzellen wirkt (Rabinovitch 2012). Durch die Stimulation des Muskelzellwachstums in den Gefäßen und die verminderte Ausschüttung wachstumsinhibierender Substanzen wird bei der IPAH eine Wandverdickung und somit eine Druckerhöhung verursacht.

### **1.1.3.2 Inflammation und IPAH**

Bei der Entstehung der IPAH wird ein Zusammenhang mit einer inflammatorischen Komponente vermutet. Sowohl in Tiermodellen als auch bei Menschen mit IPAH wurde im Bereich der veränderten Gefäße ein vermehrtes Auftreten von inflammatorischen Infiltraten beobachtet (Rabinovitch, Guignabert et al. 2014). Dazu zählen eine erhöhte T- und B-Lymphozytenzahl, sowie ein gehäuftes

Vorkommen von Makrophagen. Eine tertiäre Lymphoidfollikelbildung, bestehend aus T-, B-Lymphozyten und dendritischen Zellen wurde in der Umgebung der veränderten Gefäße nachgewiesen (Perros, Dorfmueller et al. 2012). Das unterschiedlich ausgeprägte Vorhandensein dieser Zellen konnte mit der Gefäßdicke und dem mittleren pulmonal-arteriellen Druck in Zusammenhang gebracht werden (Stacher, Graham et al. 2012). Es wird daher vermutet, dass lokale Inflammation eine Gefäßveränderung in der Lunge hervorruft und durch diese lokale Entzündung eine IPAH verursacht werden kann (Tamosiuniene, Tian et al. 2011).

### Zytokine und Chemokine

Nicht nur eine lokale peri- und intravaskuläre Infiltration von Immunzellen konnte beobachtet werden, sondern auch systemisch wurde eine akzelerierte Konzentration von Zytokinen und Chemokinen nachgewiesen. Zu diesen im Kreislauf vermehrt vorkommenden Botenstoffe gehören die Interleukine 1, 6 und 8 (IL-1, IL-6), der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Monozytenattraktionsprotein 1 (MCP-1= monocyte chemoattractant protein 1), Fraktalkine und Chemokinligand 5 (CCL5). Bei einem Teil dieser Stoffe korreliert die im Blut gemessene Konzentration sogar mit dem klinischen Verlauf der Krankheit und könnten prognostisch für die Vorhersage des Progresses genutzt werden.

Die entzündungsfördernden Chemokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  rufen eine Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen, wie Fibronectin hervor, welches bei der Adhäsion und Migration von Zellen eine wichtige Rolle spielt (Stacher, Graham et al. 2012). IL-6 stimuliert die Proliferation glatter Muskelzellen (Courboulin, Tremblay et al. 2011) und führt somit zu einer erhöhten Kontraktilität und Gefäßwandhypertrophie. Die Bedeutung von IL-6 auf die Gefäßzusammensetzung konnte mit Hilfe einer Mausstudie bestätigt werden. In dieser Studie haben IL-6-Knockout-Mäuse keine hypoxieinduzierte PH entwickeln können, sondern waren resistent dieser gegenüber (Savale, Tu et al. 2009). Hingegen wurde bei Mäusen mit einer IL-6 Überexpression eine spontane PH-Entwicklung mit Gefäßremodelling beobachtet (Steiner, Syrkina et al. 2009). Über Aktivierung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors FGF2 (Fibroblast growth factor 2) regt IL-1 die Muskelproliferation an (Lee and Kay 2009).

Bei der IPAH kann weiter eine Funktionsstörung des BMPR2 (bone morphogenetic protein) - Signalwegs beobachtet werden, wodurch es zur Überexpression von Wachstumsfaktoren und vermehrter proinflammatorischer Immunantwort kommt (Atkinson, Stewart et al. 2002). Die Dysfunktion und somit der Rückgang von BMPR2 in pulmonal-arteriellen Endothelzellen verursacht über eine verminderte Apelinausschüttung eine verstärkte Muskelproliferation. Ein mutations-bedingter Funktionsverlust (Loss-of-function) des BMPR2 stellt die häufigste Ursache einer hereditären PAH dar. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass durch den BMPR2-Rückgang eine vermehrte IL-6-Produktion auftritt, welches wiederum das Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen fördert und eine erhöhte Kontraktilität bewirkt und somit eine Verengung der Gefäße hervorruft.

Weiterhin wird vermutet, dass ein BMPR2-Rückgang eine vermehrte Sekretion vom Granulozyten und Makrophagen stimulierendem Glykoprotein GM-CSF (granulozytes-macrophages colony-stimulating-factor) induziert und dadurch Entzündungszellen zum Wachstum angeregt werden und somit ebenfalls gefäßkonstringierend wirkt. In einem Tierversuch mit Ratten konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass eine erhöhte Konzentration von GM-CSF, welche mittels Infusion erzeugt wurde, die Entstehung einer PH fördert. Nach Injektion von GM-CSF neutralisierenden Antikörpern konnte ein Rückgang der hypoxieinduzierten PH-Entstehung beobachtet werden (Sawada, Saito et al. 2014).

#### Bedeutung der T-Zellen

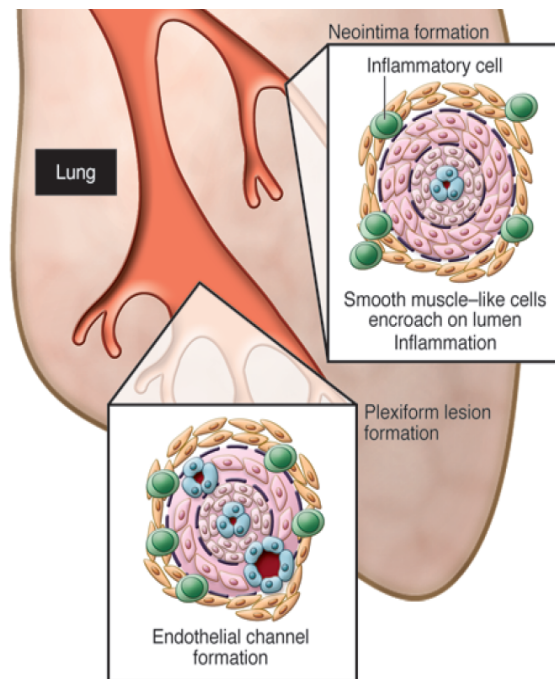
Eine wichtige Rolle spielt der BMPR2 für die T-Zell-Differenzierung (Hager-Theodorides, Outram et al. 2002). Über den BMP-Zytokin-Liganden (BMP= bone morphogenic protein) induziert der BMPR2 die Treg-Zell-Entwicklung. Diese regulatorischen T-Zellen kontrollieren T-Zellen und andere Entzündungszellen und supprimieren somit Autoimmunantworten. Bei Patienten mit PAH wurde eine veränderte Funktion nachgewiesen, wobei die Dysfunktion der regulatorischen T-Zellen als ein prädisponierender Faktor für eine PAH-Entstehung gilt. Bei einer Studie mit thymuslosen Ratten konnte noch einmal gezeigt werden, welche Bedeutung die im Thymus reifenden T-Zellen bei der Ausprägung einer PAH haben. Gefäßverletzungen in der Lunge haben bei den Ratten ohne Thymus einen starken Anstieg der Zahlen von Makrophagen, Mastzellen und B-Zellen ausgelöst.

Durch eine Gabe von regulatorischen T-Zellen wurden die wichtigsten immunsuppressiven Zellen des Thymus substituiert und daraus resultierte eine Reduktion der intravasalen Entzündungsreaktion (Tamosiuniene, Tian et al. 2011).

## Makrophagen

Makrophagen bilden eine wichtige Komponente bei der Entstehung einer PH. Die Infiltration der Lungengefäße wird vor allem von Makrophagen dominiert. Diese sind auch Bestandteil von plexiformen Läsionen, die in Gefäßen bei PAH sichtbar sind.

Ein Abbau oder eine Inaktivierung der Makrophagen verhindern eine PAH-Entstehung in Modellen wie zum Beispiel der hypoxieinduzierten PH. Häufig wurden Makrophagen in Zusammenhang mit einer infektiösen Genese der PAH gesetzt, aber auch bei der idiopathischen Form der PAH kann eine Makrophagenvermehrung in der Lunge beobachtet werden. Eine Aktivierung der Makrophagen verursacht epigenetische Veränderungen, die eine Fibroblastenproliferation induzieren und eine Produktion proinflammatorischer Zytokine vermehren (Li, Riddle et al. 2011). Leukotriene werden verstärkt sezerniert, die eine pulmonal-arterielle Apoptose fördern, und ein hypertrophes Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur induzieren. Tian et al. haben gezeigt, dass durch eine Leukotrienblockade eine experimentell hervorgerufene PH reversibel ist (Tian, Jiang et al. 2013) und eine Unterdrückung der CD68+ Makrophagen eine PH-Entwicklung verhindert.



*Abbildung 2: Pathologische Veränderungen mit inflammatorischen Zellen und plexiformen Läsionen (Rabinovitch 2012)*

#### **1.1.4 Diagnostik**

Zur Diagnosestellung einer PH muss eine Rechtsherzkatheteruntersuchung durchgeführt werden. Damit die invasive Untersuchung gerechtfertigt ist, muss in erster Linie die Herzultraschall-Untersuchung den Verdacht auf eine PH verstärken.

Verdächtig ist, wenn der systolische Pulmonalarteriendruck in der kardialen Sonographie auf über 50 mmHg geschätzt wird (physiologischer systolischer Pulmonalarteriendruck <28 mmHg) und somit eine weiterführende Diagnostik, die Rechtsherzkatheteruntersuchung, indiziert. Im Falle von Grenzwertmessungen (Werte zwischen 36-50 mmHg) kann bei symptomatischen Patienten oder Patienten mit Risikofaktoren eine weitere Untersuchung erfolgen. Auch eine in der Echokardiografie festgestellte Dilatation des rechten Ventrikels kann auf eine PH hinweisen und sollte abgeklärt werden. Eine Echokardiografie des Herzens ist zwar wegweisend, aber diagnosebringend ist nur die

Rechtsherzkatheteruntersuchung mit einem mittleren pulmonal-arteriellen Druck über 25 mmHg (mPAP >25 mmHg) (Arcasoy, Christie et al. 2003).

Weiterhin werden bei der Rechtsherzkatheteruntersuchung, neben dem systolischen Pulmonalarteriendruck, der diastolische sowie der Mitteldruck der Pulmonalarterie gemessen und dokumentiert. Zudem werden die Drücke im rechten Atrium und Ventrikel und der pulmonalkapilläre Verschlussdruck bestimmt. Diese oben genannten Werte können die Klassifizierung der PH erleichtern, aber auch als Verlaufsparemeter dienen.

Bei der Durchführung der Rechtsherzkatheteruntersuchung sollte bei PH-Patienten eine Reagibilitätstestung der pulmonalen Gefäße durchgeführt werden. Dieser Test teilt die PAH-Patienten in Responder (darauf reagierend) und Non-responder (nicht-reagierend) Patienten. Diese Einteilung hilft bei der bestmöglichen Therapiefindung. Zur Testung werden die Patienten mit kurzwirksamen Medikamenten mit geringem systemischen Effekt, wie Stickstoffmonoxid, behandelt. Als Responder (positive Akut-Responder) gelten Patienten, bei denen der mittlere pulmonalarterielle Druck um 10 mmHg bis 40 mmHg sinkt. Bei den wenigen Patienten, die mit dieser lokalen Vasodilatation auf den Test antworten, ist eine Langzeittherapie mit Kalziumantagonisten möglich. Zur Testung sollten diese jedoch nicht verwendet werden, da sie starke Nebenwirkungen hervorrufen könnten. Der Untersucher findet somit bei der Diagnosestellung heraus, ob der Patient über einen langen Zeitraum mittels der Kalzium-Monotherapie behandelt werden kann. Nur sehr wenige Patienten reagieren im Vasoreagibilitätstest als Responder, aber bei etwa der Hälfte der so positiv getesteten IPAH Patienten ist eine Therapie mit Kalziumantagonisten erfolgreich (Sitbon, Humbert et al. 2005).

### **1.1.5 Therapie**

Im April 2015 haben Richter et al. beim Springer-Verlag eine Erneuerung der Therapiemöglichkeiten der PAH publiziert. Richter und Kollegen beschreiben neben den Kalzium-Antagonisten vier für die Behandlung der PAH zugelassene Medikamentenklassen, die in unterschiedlicher Form verabreicht werden können (Richter, Gall et al. 2015).

### **1.1.5.1 Medikamentöse Therapie**

Die PH ist eine chronische Erkrankung, für die es bisher keine kurative Therapie gibt. Die Medikamente, die zur Zeit für die Behandlung der PAH zugelassen sind, bewirken eine symptomatische Verbesserung und verlängern die Zeit bis zum Eintritt einer klinischen Verschlechterung. Weiterhin konnte in Studien gezeigt werden, dass medikamentös therapierte Patienten im Vergleich zu mit Placebo behandelten Patienten eine deutliche Reduktion der Krankenhausliegetage und der Sterberate aufweisen (Galie, Manes et al. 2009).

*Kalzium-Antagonisten* (Amlodipin, Nifedipin, Diltiazem) gehören zu der ersten Medikamentenklasse, die für die Behandlung der PAH eingesetzt werden. Diese Medikamente sollten allerdings nur bei Patienten mit einer PAH, das heißt Klasse I nach Nizza, verschrieben werden.

Als weitere Medikamente zur Behandlung der PAH gibt es die *Endothelin-Rezeptor-Antagonisten*. Die drei Wirkstoffe Bosentan, Sitaxentan und Ambrisentan sind als orale Medikation zugelassen für Erkrankungsschweregrade der WHO-Klassen II-III. Eine jeden Monat durchgeführte Blutentnahme zur Leberwertkontrolle muss dringend erfolgen, da die Medikamente hepatotoxisch sind. Aus diesem Grund wird der Einsatz dieser Medikamente vom Gesundheitssystem überwacht, indem der verschreibende Arzt dafür registriert sein muss.

Die *Phosphodiesterase-5-Inhibitoren* Sildenafil und Tadalafil werden für PAH-Patienten im funktionellen Stadium WHO II und III eingesetzt. Die orale Einnahme beträgt 3x 20mg/d (Sildenafil) und 1x 40mg/d (Tadalafil). Bei der Langzeittherapie wird jedoch häufig eine Erhöhung der zugelassenen Sildenafilosis erforderlich, ohne die Ursache für diesen Effekt zu kennen. Möglicherweise ist der Grund dafür eine Toleranz auf das Sildenafil oder eine starke Progression der PAH einige Zeit nach Beginn der Behandlung.

Weiterhin kommen für die Behandlung der PAH *Prostanoide* in Frage. Dazu zählt das Iloprost, welches vor allem in Deutschland bei NYHA III inhalativ über einen Vernebler gegeben wird. Außerhalb Europas ist eine intravenöse Verabreichung



von Iloprost zugelassen. In Deutschland wird Iloprost für eine subkutane Pumpentherapie mit Katheter verschrieben, wobei strengstens auf unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen wie Katheterinfektion, Hypotension, Flush-Symptome, Kopfschmerzen und Durchfall, zu achten ist.

Als letztes Medikament kann hier die Substanzklasse der löslichen Stimulatoren der Guanylatzyklase, sGCS (= soluble guanylate cyclase stimulator), genannt werden. Dies ist eine neue, in Deutschland seit April 2014 für die PAH-Therapie zugelassene Medikamentenklasse, dessen Vertreter, Riociguat, in einer Studie von Ghofrani et al. als sehr wirksam bewertet wurde (Ghofrani, Galie et al. 2013).

In den meisten Fällen werden die Therapieziele mit einer Monotherapie nicht erreicht und eine Kombination zweier Medikamentengruppen wird etabliert. Dadurch sind verbesserte Behandlungsergebnisse bekannt und die Sicherheit der Patienten ist keinem erhöhten Risiko ausgesetzt. Bisher ist die Datenlage zur Fragestellung, welche Medikamentengruppen in welchen Fällen am ehesten miteinander kombiniert werden sollten, nicht ausreichend und die Kombination sollte individuell auf den Patienten abgestimmt werden. Eine häufig verwendete Kombination ist die von einem Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und einem Phosphodiesterase-5-Inhibitoren.

Für geeignete Patienten kommt als Therapie eine Lungentransplantation in Frage, bei der der Patient eine gespendete Lunge - bzw. Herz und Lunge bekommt. Geeignet für diese Therapie sind Patienten, bei denen trotz optimaler Therapie kein ausreichender Behandlungserfolg festzustellen ist.

#### **1.1.5.2 Supportive Therapie**

Zur Therapie zählen nicht nur das Verschreiben der Medikamente, sondern auch die Kontrolle der medikamentösen Wirkweise und die Überwachung der Patientenreaktion auf die Medikamente. Häufig müssen für den optimalen Therapieerfolg mehrere Medikamente miteinander kombiniert werden. Dafür ist wiederum eine sehr genaue Überwachung der Wirkung erforderlich und es wird empfohlen die Behandlung der PAH in den dafür vorgesehen Spezialzentren durchzuführen. Um den Progress und auch die Nebenwirkungen einzugrenzen

wird die Therapie beobachtet und die Patienten werden einmal im Quartal zur Wiedervorstellung ins PH-Zentrum eingeladen.

Neben den Möglichkeiten des oben im Text erläuterten breiten Spektrums der PAH-gezielten, pharmakologischen Therapie sollte bei Patienten mit PAH auf grundsätzliche Parameter geachtet werden. Es sollten Empfehlungen zum allgemeinen Verhalten ausgesprochen werden und die spezielle Therapie sollte durch entsprechende Komedikation unterstützt werden. Dazu zählen unter anderem orale Antikoagulantien. Es wird empfohlen bei IPAH-Patienten, sofern keine Kontraindikationen bestehen, eine Blutverdünnung mit einem Ziel-INR-Wert von 2- 3 durchzuführen (Galie, Hoepfer et al. 2009).

Bei individuellem Bedarf können Patienten mit Sauerstoff versorgt werden, um mögliche Atemnot zu lindern und eine höhere Sauerstoffversorgung zu gewährleisten (Ghofrani, Distler et al. 2010).

Generell sollte bei weiblichen Erkrankten der PAH eine Schwangerschaft vermieden werden, da eine 30- 50% Mortalität vorhanden ist und eine Gravidität somit kontraindiziert ist (Bedard, Dimopoulos et al. 2009). Bei der Kontrazeption muss dringend auf mögliche Arzneimittelwechselwirkungen geachtet werden.

Es wird ein körperliches Ausdauertraining empfohlen, welches in geschulten Einrichtungen durchgeführt wird (Galie, Hoepfer et al. 2009). Sportliche Überanstrengungen mit körperlichen Beschwerden wie Dyspnoe oder thorakalen Schmerzen sollten von betroffenen Patienten vermieden werden.

Um nicht nur das körperliche Befinden des Patienten zu betrachten, sollte der behandelnde Arzt eine psychologische Unterstützung bereit stellen, damit auch die psychische Gesundheit des Patienten erhalten bleibt.

### ***1.1.5.3 Körperliches Training als supportive Therapie***

Körperliches Training, in Form von geschultem Ausdauertraining, als unterstützende Therapiemaßnahme bei der Behandlung von Patienten mit PAH zeigte sich als äußerst wichtig und effektiv. Babu et al. demonstrierten in einem Abstrakt den Nutzen und die Effektivität vom körperlichen Training auf die Gesundheit und Lebensqualität der Patienten (Babu, Padmakumar et al. 2016). In dieser Arbeit fassten die Autoren bisherige Studien, welche sich mit einer sportlichen Intervention bei PAH-Patienten beschäftigten zusammen. In diesem

Zusammenhang wurden 15 Artikel zitiert, in denen eine Verbesserung der sportlichen Kapazität (mit einer deutlichen Verlängerung der Gehstrecke beim 6MWD (= 6 minutes-walking-distance)), eine Verbesserung der Überlebenschance, der funktionellen Klasse, sowie der Lebensqualität festgestellt wurden.

## **1.2 Immunsystem und Training**

Vielen Erkrankungen liegen Veränderungen des Immunsystems zugrunde. Häufig besteht im Körper ein inflammatorischer Zustand, der die Entstehung chronischer Krankheiten verursacht oder unterstützt. Diesbezüglich können zudem Veränderungen des Immunstatus durch körperliche Aktivität beobachtet werden, die anschließend aufgezählt werden.

### **1.2.1 Anti-inflammatorischer Effekt**

Es konnte gezeigt werden, dass sportliche Aktivität das Risiko der Krankheitsentstehung vieler Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre, respiratorische Erkrankungen, Demenz und Depression verringert. Da das Risiko der Krankheitsentstehung durch Sport reduziert werden könnte, wäre es von Bedeutung zu wissen, welchen Einfluss die Aktivität auf die Pathogenese hat.

Allen oben genannten Krankheiten liegt eine inflammatorische Komponente zu Grunde. Durch eine körperliche Inaktivität und mit einer daraus hervorgehenden möglichen Adipositas besteht eine chronische Entzündung, die eine Entstehung dieser Erkrankungen begünstigt (Hotamisligil 2006, Shoelson, Lee et al. 2006, Leonard 2007, Ouchi, Parker et al. 2011, Rook and Dalgleish 2011). Der dadurch hervorgerufene inflammatorische Zustand beinhaltet eine erhöhte Konzentration von Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor (TNF) und C-reaktivem Protein (CRP). Das häufig bei Adipositas hervorkommende viszerale Fett verursacht eine gesteigerte Sekretion von pro-inflammatorischen Adipokinen, durch welche entzündungsfördernde Zellen angelockt werden.

Körperliches Training kann diesen oben beschriebenen entzündeten Zustand reduzieren. Zum einen geschieht dieses durch den Abbau des viszeralen Fettes

und der damit verminderten Ausschüttung inflammatorischer Adipokine. Zum anderen wird durch körperliche Betätigung eine Produktion anti-inflammatorischer Botenstoffe induziert (Petersen and Pedersen 2005, Mathur and Pedersen 2008). In wissenschaftlichen Abhandlungen über die anti-inflammatorischen Effekte durch körperliches Training wurden drei mögliche Mechanismen des entzündungshemmenden Einflusses von körperlicher Aktivität diskutiert (Petersen and Pedersen 2005, Flynn and McFarlin 2006, Mathur and Pedersen 2008).

Der erste wichtige Mechanismus, der in der Arbeit beschrieben ist, ist die Reduktion des Bauchfettes mit einer daraus resultierenden Abnahme inflammatorischer Zytokine. Als weiterer Mechanismus wird vermutet, dass durch gesteigerte Muskelarbeit anti-entzündliche Zytokine vermehrt freigesetzt werden. Als dritte Ursache für die anti-inflammatorische Wirkweise wird die verminderte Expression von Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf Monozyten und Makrophagen vermutet, welche ebenfalls eine Abnahme der Produktion von entzündlich wirkenden Zytokinen hervorrufen.

In Mausstudien wurden zwei weitere Mechanismen beschrieben, zum einen die Verhinderung der Monozyten- und Makrophageneinwanderung in das Fettgewebe und zum anderen eine im Fettgewebe auftretende Phänotypänderung von Makrophagen (Kawanishi, Yano et al. 2010).

Diese Mechanismen konnten noch nicht auf den Menschen übertragen werden. Aber nach körperlicher Belastung konnte sowohl eine auffällige Veränderung der Monozytenzahlen im Blut (Timmerman, Flynn et al. 2008) als auch eine Erhöhung der Zahl der regulatorischen T-Zellen (Yeh, Chuang et al. 2006) festgestellt werden.

### **1.2.1.1 Reduktion des viszeralen Fettes**

Vor allem das intraabdominelle Fettgewebe verursacht eine gesteigerte Produktion von pro-inflammatorischen Adipokinen wie TNF, Leptin und IL-6. Gleichzeitig wird eine Reduktion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie Adiponectin (Ouchi, Parker et al. 2011) hervorgerufen, wodurch es zu einer chronischen Inflammation des Gewebes kommt. Durch körperliche Bewegung wird sowohl das Bauchfett als auch das viszerale Fett reduziert und dessen inflammatorische Wirkweise lässt nach. Sogar bei sportlich aktiven Probanden, die keine Gewichtsverluste vorzuweisen hatten, konnte eine Abnahme der im

Kreislauf zirkulierenden pro-inflammatorischen Adipokin-Werte und eine Zunahme vom entzündungshemmenden Adiponectin gemessen werden (Mujumdar, Duerksen-Hughes et al. 2011).

### **1.2.1.2 Vermehrte Muskelaktivität**

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach körperlicher Aktivität eine erhöhte Konzentration von IL-6 intrazellulär und im Blut gemessen wird. Nach einem Ausdauerkörpertraining von 2,5 Stunden wurde eine über 100-fach gesteigerte IL-6 Konzentration festgestellt. Bei kürzerer Belastung ist die Vervielfachung des IL-6 Wertes etwas geringer (Fischer 2006). Die Plasmakonzentration von IL-6 steigt exponentiell zur Trainingsdauer und normalisiert sich etwa eine Stunde nach Belastungsende. Durch Muskelkontraktion kommt es also zum IL-6 Anstieg. Die körperliche Aktivität führt zum Verbrauch der Glykogenvorräte im Muskel. Diese Glykogenabnahme stimuliert die Synthese und Ausschüttung von IL-6. Weitere Faktoren, die eine IL-6 Transkription im Muskel aktivieren sind der durch Sport bedingte intrazelluläre Kalziumanstieg und eine vermehrtes Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (Fischer 2006).

Der temporäre IL-6 Anstieg im Blut stimuliert eine Cortisolfreisetzung aus den Nebennierenrinden und verursacht einen Anstieg von anti-inflammatorischen Zytokinen. Es konnte gezeigt werden, dass durch IL-6 neben Cortisol die Plasmakonzentrationen von IL-10 und dem IL-1 Rezeptor Antagonist (IL-1RA) ansteigen (Steensberg, Fischer et al. 2003). Interleukin-10 ist ein wichtiger Promotor für die Gegenregulation der Inflammation. Er reguliert und beendet die Immunantwort und minimiert die entzündungsbedingte Gewebsverletzung (Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Weiterhin wird eine endotoxin-stimulierte TNF-Produktion supprimiert (Starkie, Ostrowski et al. 2003).

Durch Muskelaktivität wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und das Sympathische Nervensystem aktiviert, woraufhin es zur erhöhten Ausschüttung von Adrenalin und Cortisol kommt. Die Nebennierenrinde wird vom hypophysären adrenocorticotropen Hormon (ACTH) zur Cortisolfreisetzung angeregt und das Sympathische Nervensystem bewirkt innerhalb kürzester Zeit eine Adrenalin- und Noradrenalinausschüttung aus dem Nebennierenmark (Gleeson, Bishop et al. 2011). Adrenalin hat wie das IL-10 eine anti-

inflammatorische Wirkung ebenso das Cortisol, durch welches eine Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine erniedrigt wird.

Cortisol und Adrenalin werden beide durch die sportliche Betätigung ausgeschüttet und der Plasmaspiegel ist abhängig von Ausdauer und Intensität des Trainings.

### **1.2.1.3 Immunologische Zellen**

Nachfolgend werden die durch Sport bedingten Veränderungen der einzelnen immunologischen Zellen beschrieben, welche bisher in verschiedenen Studien entdeckt wurden.

#### **1.2.1.3.1 Makrophagen**

Cinti et al. haben die Hypothese aufgestellt, dass durch eine Hypertrophie der Adipozyten und der damit korrelierenden gehäuften Nekrose der Fettzellen vermehrt PBMC (= peripheral blood mononuclear cell: Makrophagen und T-Zellen) angelockt werden, die das Fettgewebe infiltrieren und die Überreste der abgestorbenen Adipozyten entfernen (Cinti, Mitchell et al. 2005). Makrophagen und T-Zellen wandern also, durch Chemokine angelockt, in das Fettgewebe, um die dort vorherrschenden Ausmaße der chronischen Entzündung zu regulieren (Jiao, Chen et al. 2009).

Die Migration der aus dem peripheren Blut stammenden Makrophagen wird über Chemokinausschüttung reguliert. Dazu muss es auf den Blutzellen zur Expression von komplementären Chemokinrezeptoren kommen. Damit die peripheren Blutzellen ins Gewebe einwandern können, müssen zusätzliche Adhäsionsmoleküle auf den PBMC exprimiert sein (Gleeson, Bishop et al. 2011).

Sport wirkt der adipozytären Anlockung der PBMC entgegen, indem durch die Bewegung Stress hervorgerufen wird und durch diesen im Blut vermehrt Chemokine ausgeschüttet werden. Durch die Belastung kommt es zu einer Chemokinerrhöhung, welche bewirkt dass die PBMC an diese gewöhnt werden und die für die Anlockung zum entzündeten Gewebe benötigten Chemokinrezeptoren von den Zellen internalisiert werden (Maffei, Funicello et al. 2009). Es kommt zur Herunterregulierung der Rezeptoren auf den PBMC und somit zu einer verringerten Einwanderung in das betroffene Gewebe.

Im Fettgewebe können die Makrophagen im aktivierten Zustand zwei verschiedenen polarisierte Formen annehmen M1 und M2. Diese haben unterschiedliche Auswirkungen auf die Entzündungsausmaße. M1, die klassisch aktivierte Form, hat eine pro-inflammatorische Funktion indem sie TNF, NO und IL-6 produzieren. Makrophagen vom M2-Typ hingegen sezernieren anti-inflammatorische Zytokine und bilden Arginase und wirken somit entzündungshemmend (Martinez, Sica et al. 2008). Bei inaktiven Personen gibt es vermutlich eine höhere Konzentration von M1-Makrophagen, sodass bei diesen die entzündungsfördernde Wirkung im Fettgewebe überwiegt (Lumeng, Bodzin et al. 2007).

In einer Studie mit überfütterten Mäusen konnte 2010 die Annahme bestätigt werden, dass durch körperliche Aktivität ein Switching der Makrophagen im Fettgewebe vom inflammatorischen M1-Typ zum antientzündlichen M2-Typ induziert wurde (Kawanishi, Yano et al. 2010). Neben der durch Sport reduzierten Migration von Makrophagen, ist diese Phänotypänderung von M1 zu M2 ein möglicher Mechanismus der entzündungshemmenden Wirkung von körperlicher Aktivität. Dies muss jedoch im menschlichen Organismus noch genauer untersucht werden.

#### 1.2.1.3.2 Monozytenpopulationen und TLR-Expression

Es gibt verschiedene Monozytensubpopulationen: die klassische (CD14<sup>hi</sup>CD16<sup>-</sup>) und nicht-klassische (CD14<sup>low</sup>/hiCD16<sup>+</sup>) Variante, die sich in der Ausprägung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) unterscheiden. TLR sind wichtige Bestandteile, die zur Erkennung von Pathogenen dienen. Als Membranproteine werden sie von Zellen des angeborenen Immunsystems, z.B. Makrophagen, Monozyten, exprimiert und sezernieren nach Pathogenbindung pro-inflammatorische Zytokine, um die adaptive Immunantwort zu induzieren. TLR sind somit an einer systemischen Entzündung beteiligt (Takeda, Kaisho et al. 2003). Die nicht-klassischen, inflammatorisch wirkenden CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten exprimieren die 2,5-fache Menge an TLR und spielen eine Rolle bei der Genese einiger Erkrankungen, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis (Baeten, Boots et al. 2000) und der koronaren Herzkrankheit (Schlitt, Heine et al. 2004).

Eine Vergleichsstudie zwischen einer aktiven und einer inaktiven Bevölkerungsgruppe hat gezeigt, dass bei aktiven Probanden eine deutlich verminderte Zahl inflammatorischer Monozyten im Vergleich zur inaktiven Kontrollgruppe vorhanden waren (Timmerman, Flynn et al. 2008). Durch

körperliches Training konnte bei inaktiven Probanden zudem die Monozytenkonzentration der inflammatorischen Zellen auf das Niveau der aktiven gesenkt werden und eine Reduktion der TNF-Produktion konnte erreicht werden. Weiterhin demonstrierte eine Studie, bei der inaktive und aktive Probanden teilnahmen, dass in vitro bei den aktiven Studienteilnehmern eine weniger starke Immunantwort auf ein Endotoxin auftritt als bei bewegungspassiven. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass diese Gruppe eine niedrigere TLR4-Expression aufzeigt (Flynn and McFarlin 2006). Es wird vermutet, dass Bewegung die TLR-Konzentration reduziert, daher weniger Pathogene erkannt werden und geringere Immunantworten hervorgerufen werden. Der genaue Mechanismus wie es durch Sport zur Reduktion der TLR-Expression kommt, wurde noch nicht gefunden und die Frage bleibt zu klären, ob die TLR abgeworfen oder von den Monozyten internalisiert werden.

Mit der Grundlage aus einem vorhergegangenen Bericht, dass die Cortisoltherapie eine Reduktion der CD14<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> Monozyten provoziert (Fingerle-Rowson, Angstwurm et al. 1998), wird nun geschlussfolgert, dass der sportbedingte Cortisolanstieg eine Verringerung der inflammatorisch wirkenden Monozytenzahl bewirkt (Gleeson, Bishop et al. 2011).

#### 1.2.1.3.3 Lymphozyten

##### Regulatorische T-Zellen

In einer weiteren Studie, in der die Probanden an einem 12 Wochen dauernden Tai-Chi-Training teilgenommen haben, wurden Konzentrationsveränderungen einer weiteren Zellpopulation gemessen. Dabei handelt es sich um die regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (Treg-Zellen). Es wurde nach dem 12-wöchigen Training ein Anstieg von den Treg-Zellen im Blut festgestellt (Yeh, Chuang et al. 2006). Die regulatorischen T-Zellen sind wichtig für die Steuerung der Immunantwort. Eine Dysfunktion dieser Zellen kann zu Autoimmunerkrankungen und zur Hyperreaktivität auf fremde Antigene führen (Sakaguchi 2005). Somit hat körperliche Auswirkung auch dank der Treg-Zahl-Zunahme positive Auswirkungen auf den Entzündungsstatus in adipösen Menschen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Untersuchungen gezeigt haben, dass sportliche Aktivität einen positiven Effekt auf das Immunsystem hat und die anti-inflammatorische Wirkweise fördert. Bei leichter Aktivität, wie schnelles



Gehen, sind die als erstes dargestellten Mechanismen, die Reduktion des viszeralen Fettgewebes mit abnehmender pro-inflammatorischer Zytokinanzahl, wichtig. Für ausdauerndes, moderates Training und für hoch intensives Training spielen die anderen Mechanismen, wie die Monozytenzahlabnahme, die gesteigerte Treg-Zahl und veränderte Sekretion und Expression von entzündungshemmenden Faktoren eine wichtige Rolle für die anti-inflammatorische Wirkweise der körperlichen Aktivität (Gleeson, Bishop et al. 2011).

### **1.2.2 Paradoxon: Ausdauer-Athleten**

Im Vergleich zu inaktiven Personen konnte bei Probanden mit moderatem körperlichen Training eine deutliche Reduktion der Infektanfälligkeit von den oberen Atemwegen festgestellt werden (Matthews, Ockene et al. 2002). Bei den elitären Athleten konnte hingegen eine erhöhte Frequenz von Atemwegserkrankungen festgestellt werden, die vermutlich durch zu viel und zu intensives Training verursacht werden.

Eine Mausstudie hat gezeigt, dass bei Tieren, die exzessivem Training ausgesetzt waren, eine stärkere IL-10-Antwort auf Antigenexposition auftrat (Wang, Song et al. 2012). Eine Untersuchung mit Ausdauerathleten hat gezeigt, dass Sportler, die während des Wintertrainings anfällig für Krankheiten waren, eine deutlich höhere IL-10-Antwort auf Antigene aufwiesen als über die Zeit gesund gebliebene Sportler (Gleeson, Bishop et al. 2012). Sowohl aus Maus- als auch aus Menschenstudien gibt es Hinweise, dass durch eine erhöhte IL-10-Produktion die Effektivität der pathogenspezifischen Immunantwort vermindert wird. Vor allem die angeborene Immunantwort und die adaptive Th1-Zellantwort werden verändert.

## **2 Methodik**

Zunächst wird das Design der Studie, auf welches diese Dissertationsschrift basiert, präsentiert. Weiterhin werden die Einschlusskriterien der Patientenrekrutierung beschrieben sowie die durchgeführten Untersuchungen der Probanden und der daran anschließende experimentelle Teil der Arbeit dargelegt. Die klinischen Untersuchungen wurden durch das Votum der Ethikkommission (Nr. PV4333) genehmigt.

### **2.1 Studiendesign**

Aus dem zuvor Erläuterten ergibt sich die Vermutung, dass bei Patienten mit IPAH, körperliche Belastung eine Veränderung in der Zusammensetzung der zellulären Subpopulationen im peripheren Blut hervorruft. Des Weiteren wird angenommen, dass sich diese Veränderungen von denen gesunder Probanden unterscheiden. Ziel der Studie war es herauszufinden, welchen Zusammenhang es bei der IPAH zwischen körperlicher Aktivität und dem Immunsystem gibt. Um die Veränderungen und Zusammenhänge zu analysieren, ergibt sich hieraus das nachfolgend beschriebene Studiendesign:

In die Studie eingeschlossen wurde eine Gruppe von IPAH-Patienten und eine weitere von gesunden Kontrollen. Mittels Spiroergometrie wurden diese Probanden einer körperlichen Belastung ausgesetzt und ihnen zu drei Zeitpunkten (vor, nach Belastung und nach 1h körperlicher Ruhe) venöses Blut abgenommen, um dieses anschließend auf Lymphozytenveränderungen zu untersuchen (siehe Abb. 3: Projektskizze).

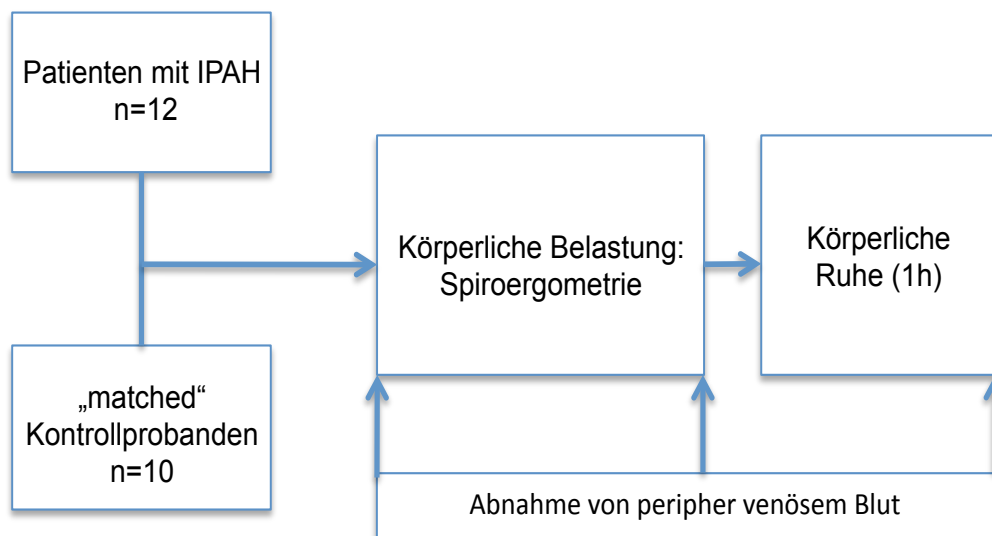


Abbildung 3: Projektskizze

## 2.2 Einschlusskriterien

Für die Studie wurden Patienten aus der Spezialambulanz für pulmonal-arterielle Hypertonie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf rekrutiert. Patienten konnten in die Studie eingeschlossen werden, wenn sie mit der Diagnose einer idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH, Nizza-Klasse 1.1) in der Ambulanz behandelt wurden. Es handelt sich somit um prävalente Fälle. Bedingung war, dass die Diagnose in der Vergangenheit durch eine Rechtsherzkatheteruntersuchung mit erhöhtem mPAP (über 25 mmHg) und einem pulmonalkapillären Verschlussdruck (unter 15 mmHg) bestätigt wurde. Weitere Kriterien wie die Volljährigkeit der ausgewählten Patienten mussten erfüllt sein, damit die Patienten in die Studie aufgenommen werden konnten. Patienten, die zu sehr in ihrer Belastbarkeit eingeschränkt sind (NYHA IV), wurden aus der Studie ausgeschlossen, da eine körperliche Belastung bis zur Erschöpfung ein zu großes Risiko birgt. Teilnehmen konnten nur Patienten, die im Stadium NYHA II oder III klassifiziert waren. Weiterhin wurden Patienten mit einer kürzlich stattgehabten klinischen Verschlechterung, die mit Zunahme einer Dyspnoe einherging, Patienten mit einer signifikanten restriktiven und/ oder obstruktiven Ventilationsstörung sowie mit chronischen oder passageren Komorbiditäten (zum

Beispiel des muskuloskeletalen Systems, wenn diese die Patienten stärker einschränkten als die PAH) und Patienten mit Gehhilfe von der Studie ausgeschlossen.

Damit die immunologischen Veränderungen auf körperliche Belastung bei IPAH-Erkrankten mit Nicht-Erkrankten verglichen werden konnten, musste auch eine gesunde, geschlechts- und altersangepasste Kontrollgruppe zusammengestellt werden. Dafür wurde gezielt, in Hinblick auf das Alter und Geschlecht, nach in Frage kommenden Probanden gesucht. Bei den Kontrollen war, ebenso wie bei den Patienten, die Volljährigkeit Bedingung zur Teilnahme. Weiterhin sollten die Probanden gesund sein und keine Medikamente einnehmen. Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, des Respirationstraktes oder des muskuloskeletalen Systems galten als Ausschlusskriterium.

## **2.3 Rekrutierung der Probanden**

Die Probanden dieser Studie setzten sich, wie auf Abbildung 3 gezeigt, aus PAH-Patienten und einer Kontrollgruppe zusammen. Nachfolgend wird kurz die Rekrutierung dieser Studienteilnehmer beschrieben.

### **2.3.1 IPAH-Gruppe**

Aus der Spezialambulanz der Sektion Pneumologie des Universitätsklinikums Eppendorf wurden die in Frage kommenden Patienten aus der Liste der geplanten Ambulanztermine herausgesucht und eine Teilnahme an der Studie „Immunologische Antwort auf akute körperliche Belastung bei Patienten mit idiopathischer pulmonal-arterieller Hypertonie (IPAH)“ wurde erfragt. Der Aufbau der Studie wurde in diesem Zusammenhang erörtert. Nach Darstellung der Ziele, der Risiken und Möglichkeiten der Studie und des auf den Teilnehmer zukommenden Aufwands hatten die Patienten die Möglichkeit über eine eventuelle Teilnahme an der Studie zur Untersuchung der Veränderungen des Immunsystems bei einer akuten Belastung bei Patienten mit IPAH nachzudenken. Die Patienten hatten die Möglichkeit jederzeit telefonisch Nachfragen zur Studie zu stellen, aber auch im Gespräch mit ihrem zuständigen Arzt in der Ambulanz konnten sie Unsicherheiten über die Studie beseitigen.

Bei den Patienten, die an einer Studienteilnahme interessiert waren, konnte der zuständige Ambulanzzarzt im anschließenden Arztgespräch die Aufklärung durchführen und ich konnte einen erneuten Termin für die für die Studie zusätzlich notwendigen Untersuchungen planen.

### **2.3.2 Kontrollgruppe**

Damit die Zellzahlveränderung der Immunzellen von den IPAH-Patienten mit einem gesunden Kollektiv verglichen werden konnten, musste eine Kontrollgruppe erstellt werden, die geschlechts- und möglichst altersangepasst ausgewählt wurde. Die Personen aus dem persönlichen Umfeld wurden ersucht, an der Studie teilzunehmen.

## **2.4 Klinische Untersuchung**

Die Untersuchungen, die für die Studie von Bedeutung waren, bestanden einerseits aus den Routineuntersuchungen der Ambulanz. Das heißt die Werte der Echokardiografie, eines Gehtests (6MWD= 6-minutes-walking-distance), der Spirometrie, Blutentnahmen und die Ergebnisse des ersten und letzten Rechtsherzkatheters wurden für die Studie dokumentiert. Als weitere Untersuchung kam die Spiroergometrie hinzu, welche als Routineuntersuchung nur einmal pro Jahr fällig ist. Beim Radfahren auf dem Spiroergometer werden die Probanden körperlicher Höchstbelastung ausgesetzt. Bei dieser Untersuchung wird schrittweise der Tritt Widerstand gesteigert bei Beibehaltung der Trittfrequenz. Dies war die zentrale Untersuchung für die Studie, da wir vor, im unmittelbaren Anschluss an die Untersuchung und eine Stunde nach dieser venöses Blut abgenommen haben, um in diesen Proben mögliche Immunzellveränderungen, die durch die Ausbelastung hervorgerufen werden, zu analysieren. Die Ausbelastung war durch das subjektive Empfinden des Probanden definiert.

Die Studienteilnehmer der Kontrollgruppe kamen für die klinische Untersuchung, ebenso wie die Patienten, in die Ambulanz des UKE und erhielten die gleichen diagnostischen Mittel: eine Ultraschalluntersuchung des Herzens, den sechs Minuten dauernden Gehtest, die Spirometrie, eine Blutentnahme mit Bestimmung des BNP-Wertes, eines kleinen Blutbildes und der klinischen Chemie mit CRP, Leberwerten (GOT, GPT, Gamma- GT) und Werten zur Nierenfunktionskontrolle

(Harnstoff, Kreatinin). Auch die Spiroergometrie wurde identisch zum Patientenkollektiv mit Atemgasmessung durchgeführt, so wie die zusätzlichen Blutentnahmen zu drei Zeitpunkten vor und nach der körperlichen Belastung zur Untersuchung der Immunzellen.

Für diese Studie wurden nur jene Parameter der nachfolgend genannten klinischen Untersuchung korreliert, die auch am Tag der Spiroergometrie erhoben wurden. Dazu zählen die Echokardiografie, der 6MWD und die Spirometrie sowie die abgenommenen Blutwerte.

#### **2.4.1 Echokardiografie**

Mittels transthorakaler Echokardiografie (TTE) wird in der IPAH- Ambulanz in regelmäßigen Abständen die Funktion des rechten Herzens beurteilt. Dazu wird der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP= right ventricle systolic pressure) bemessen, der vorlastabhängige Tei-Index (= myocardial performance index) abgeschätzt und die Auslenkung der Trikuspidalklappe (TAPSE= tricuspid annular plane systolic excursion), welche bei Herz- und Lungengesunden >2 cm beträgt, bestimmt. Die Werte geben Auskunft über die Leistung des Herzens und die durch den Lungenhochdruck hervorgerufenen Veränderungen und entstandenen Schäden. Auch wird ein Perikarderguss ausgeschlossen.

Bei den Kontrollen war eine uneingeschränkte Herzfunktion für die Studienteilnahme Voraussetzung und so wurde mit Hilfe eines Herzultraschalls diese vollständig erhaltene Funktion des Herzens beurteilt. Ebenso haben wir nach Zeichen für einen Perikarderguss gesucht.

#### **2.4.2 6-Minuten-Gehtest (6MWD)**

Der 6MWD ist eine Routineuntersuchung für Patienten mit idiopathisch pulmonal-arterieller Hypertonie, mit dem als Verlaufskontrolle die Belastbarkeit und körperliche Leistungsfähigkeit der Erkrankten gemessen werden kann. Der Belastungstest wird in der Spezialambulanz des UKE für IPAH alle drei Monate durchgeführt, um mit diesem den Therapieerfolg und die Krankheitsprogredienz einschätzen zu können.

Bei der Untersuchung ist die Aufgabe der Patienten, so weit wie möglich in sechs Minuten zu gehen. Dazu gibt es einen abgemessenen Bereich, in dem sie zügig gehend die sechs Minuten absolvieren. Der Untersucher notiert die Runden und

stoppt die Zeit. Der zu Untersuchende darf keinesfalls rennen oder joggen, sondern muss die Strecke im Laufschrift nehmen. Im Falle von Schwindel, Schwäche oder Atemlosigkeit können die Patienten stehend pausieren. Nach Möglichkeit sollen sie jedoch, sobald sie dazu fähig sind, zügig weiter gehen, da sie innerhalb der sechs Minuten eine möglichst weite Strecke zurücklegen sollten. Eine Unterhaltung ist nicht gestattet, da dadurch die Untersuchungsergebnisse verfälscht werden könnten. Nur regelmäßige Zeitansagen und standardisierte Motivationssprüche werden von dem Untersucher ausgesprochen.

Während der gesamten Untersuchung werden mittels Pulsoxymeter der Puls und die Sauerstoffsättigung überwacht. Selbstverständlich wird der Blutdruck vor und nach der Untersuchung kontrolliert.

Zur Abschätzung des Gehtests wird der aktuelle mit dem jeweils vorherigen verglichen. Es gibt jedoch zusätzlich zwei Formeln für Mann und Frau, mit denen man mit Berücksichtigung des Alters, Gewichts und der Größe einen spezifischen Streckensollwert für die sechs Minuten errechnet.

### **2.4.3 Spirometrie**

Die Spirometrie ist eine Untersuchung zur Messung der Lungenfunktion. Dazu sitzt die zu untersuchende Person im Glaskasten mit Mundstück und Nasenklemme. Durch maximale Expiration, mit darauf folgender maximalen Inspiration und anschließender maximalen, forcierten Expiration kann Aussage über die Vitalkapazität der Lunge (VC= vital capacity) und der Einsekundenkapazität (FEV1= forced expiratory volume in 1 second) betätigt werden. Neben weiteren Parametern der Lungenfunktion, wie z.B. dem Atemzugvolumen, wurde bei den Patienten der Kohlenmonoxid-Transferfaktor (TLCO= transfer factor of the lung for carbon monoxide) gemessen, welcher Auskunft über die Diffusionskapazität der Lunge gibt, was den Gasaustausch zwischen Blut und Luft darstellt.

### **2.4.4 Spiroergometrie**

Die zeitlich etwas aufwendigere Untersuchung auf dem Fahrrad mit Atemgasmessung und EKG-Ableitung musste vorerst mit Ankleben der EKG-Elektroden und Anpassung der Atemmaske vorbereitet werden. Auch ein Blutdruckmessgerät und ein Pulsoxymeter wurden zur kontinuierlichen

Überwachung der Herz-/Kreislauffunktion angeschlossen. Nach einer zwei minütigen Ruhephase des auf dem Fahrrad sitzenden Probanden, in der dessen Vitalfunktionen und Expirationsluft gemessen wurden, konnte die Belastungsphase beginnen.

Mit zehn Watt Leistung wurde die Phase eingeleitet und der Proband musste eine Minute lang mit einer Geschwindigkeit von 60 Umdrehungen/ Minute Fahrrad fahren. Das Fahrradergometer wurde von der Untersucherin auf ein Programm eingestellt, bei dem nach jeder Minute der Widerstand um zehn Watt stieg, so die Stufen der Belastbarkeit ausgereizt wurden und der Patient nach einigen Minuten das Ende der Untersuchung forderte. Ebenso hätten EKG-Veränderungen, sowie ein stark ansteigender Blutdruck (systolisch >240 mmHg) einen Abbruch der Belastung forciert.

Wichtig war, dass der Patient an die zehn Minuten Durchhaltevermögen zeigte, damit die Werte der Spiroergometrie auswertbar waren. Zur Normalisierung der Vitalparameter wurde nach Erreichen der körperlichen Höchstbelastung der Bremswiderstand entfernt. Die entspannende Auslaufphase, welche circa zwei Minuten dauerte, ließen Frequenz und Blutdruck auf Ausgangswerte fallen.

Ziel der Studie war, die Veränderungen der Immunzellen als Antwort auf die körperliche Ausbelastung von den IPAH-erkrankten Patienten mit den Veränderungen einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen. So wurden zu drei Zeitpunkten - vor, direkt nach, eine Stunde nach Belastung - mit Hilfe eines venösen Zugangs Blutentnahmen in EDTA-Röhrchen vorgenommen.

## **2.5 Experimenteller Teil**

Der experimentelle Teil wird gegliedert in drei Abschnitte. Zunächst wird die Vorbereitung und Bearbeitung der entnommenen Blutproben beschrieben sowie anschließend die Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse der Zellpopulationen. Außerdem wird die Untersuchung der Proben mittels ELISA beschrieben.

### **2.5.1 Vorbereitung der Blutproben**

Nach den dreizeitigen Blutentnahmen wurde von den Blutproben in der onkologischen Ambulanz des UKE ein kleines Blutbild angefertigt mit Hilfe eines



Differentialblutbildanalysators (Coulter Ac-T diff 2, Beckmann Coulter, Krefeld, Germany).

Im Anschluss begann die Arbeit im Labor, in welchem das Vollblut für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet wurde. Dafür wurden die einzelnen Proben mit FACS-Oberflächenmarkern gefärbt (FACS= fluorescence-activated cell sorter). Sieben verschiedene Antikörper-Mischungen waren für die Untersuchung vorgesehen (siehe Tabelle 1), sodass pro Proband 3x 7 Röhrchen mit Blut- und Antikörpergemischen zustande kamen.

Diese 21 FACS-Röhrchen wurden für die Färbung beschriftet, in jedes wurden 100 µl EDTA-Vollblut, je sieben Röhrchen für vor der Belastung, sieben für direkt nach der Untersuchung und sieben für eine Stunde nach Belastung, pipettiert und durchmischt. Nach einer dreißig minütigen Inkubationszeit in Dunkelheit bei Raumtemperatur, wurde 1 ml Lyse-Puffer (RBC Lyse/ Fixationslösung, BioLegend, CA, USA; 1: 10 verdünnt mit destilliertem Aqua) den Proben hinzugegeben und wieder mittels Reagenzglasschüttler (Vortexer) vermischt. Weitere 12 Minuten Inkubation bei oben genannten Bedingungen standen an. Nachfolgend wurde in jedes Röhrchen 2 ml FACS-Puffer (phosphatgepufferte Salzlösung, 0,1% bovines Serumalbumin and 0,02% NaN<sub>3</sub>) hinzugegeben, diese geschüttelt und bei einer Temperatur von 4°C und einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 350G (RCF) fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand, welcher entstand, konnte vorsichtig verworfen werden und die festen Bestandteile am Boden des Röhrchens wurden wiederum mit 2 ml FACS-Puffer gründlich vermischt und zentrifugiert. Auch beim zweiten Mal wurde der Überstand verworfen und übrig blieben die am Boden der Röhrchen festgesetzten, fast vollständig entfärbten Zellpellets, welche im letzten Schritt der Vorbereitung der FACS-Analyse mit 350 µl FACS-Puffer vermischt wurden.

*Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper*

Panel	Marker	Konjugat	Konzentration / 100µl	Multicolor Tube 20 Proben
1. Blood Cells Subset	CD3	AF700	0.05µl	1 µl
	CD14	FITC	1µl	20 µl
	CD16	PE	1µl	20 µl
	CD19	PB	0.05µl	1 µl
	CD45	APC	0,5µl	10 µl
	CD56	BV605	1µl	20 µl
				128 µl FACS-Puffer
2. T-Cells Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PE	0,5µl	10µl
	CD8	APC	1µl	20µl
	TCRgd	BV421	2,5µl	50µl
				100 µl FACS-Puffer
3. Isotypes –T-Cells Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PE	0,5µl	10µl
	APC Mouse IgG1		1µl	20µl
	BV421 Mouse IgG1		2,5µl	50µl
				100 µl FACS-Puffer
4. Th-Cell Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PerCP	2,5µl	50µl
	CXCR3	APC	1µl	20µl
	CCR4	PE	1µl	20µl
	CCR6	BV650	1µl	20µl
				70µl FACS-Puffer
5. Isotypes – Th-Cell Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PerCP	2,5µl	50µl
	APC Mouse IgG1		1µl	20µl
	PE Mouse IgG1		1µl	20µl
	BV650 Mouse IgG1		1µl	20µl
				70µl FACS-Puffer
6. T-Reg Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PE	1µl	20µl
	CD127	APC	1µl	20µl
	CD25	BV421	1µl	20µl
				120µl FACS-Puffer
7. Isotypes – T-Reg Subset	CD3	FITC	1µl	20µl
	CD4	PE	1µl	20µl
	APC Mouse IgG1		1µl	20µl
	BV421 Mouse IgG1		1µl	20µl
				120µl FACS-Puffer

## 2.5.2 Durchflusszytometrie

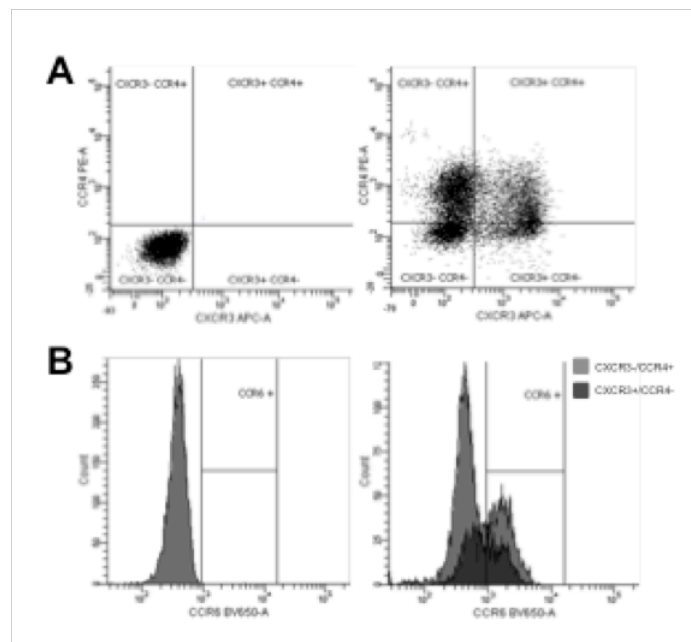
Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung mittels fluorescence-activated cell sorter LSR Fortessa (FACS; LSR Fortessa, BD Bioscience, NJ, USA) wurden in den Röhrchen 5.000- 20.000 der insgesamt auftretenden Zellen gezählt und mit Hilfe des FACS Diva Programmes Version 6.2 analysiert. Die Quantifizierung der Zellzahlen erfolgte relativ zur übergeordneten Zellpopulation (Tabelle 2). Die Expression verschiedener Oberflächenchemokinrezeptoren ermöglichte die Unterteilung der vier verschiedenen T-Helfer-Lymphozyten. Dazu zählten die Th1-Zellen (CXCR3<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup>/CCR6<sup>-</sup>), Th2-Zellen (CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>), Th17-Zellen (CXCR3<sup>-</sup>/CCR4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>) und Th1/Th17 (CXCR3<sup>+</sup>/CCR4<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>) (Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007, Clark, Page et al. 2011). T-Helfer-Zellen mit hoher CD25-Expression und geringer Expression von CD127 wurden als regulatorische T-Lymphozyten (Treg) identifiziert.

Im Antikörpergemisch 1 wurden 20.000 Zellvorkommnisse (Events) gezählt und in verschiedene Zellpopulationen aufgeteilt. Darunter befanden sich Leukozyten (B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen), Monozyten und Granulozyten. Im Röhrchen mit „Antikörper 2“ wurden die verschiedenen CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezählt und differenziert in die T-Zell-Teilmengen: T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), zytotoxische T-Zellen (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) und TCRgd-Zellen. Das Röhrchen mit dem dritten Gemisch beinhaltete Isotypen, um die Bindungsfähigkeit und -spezifität der Antikörper zu überprüfen. Im vierten Röhrchen wurden die T-Helferzellen in ihre verschiedenen Untergruppen aufgeteilt (Abbildung 4). Bei der Probe sechs zählte der Durchflusszytometer die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und zeigte, wie viele regulatorische T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) anteilmäßig im Blut vorkamen und wie viele davon CD25<sup>high</sup> und CD127<sup>low</sup> als Oberflächenmerkmale trugen (Tabelle 2).

Die Proben 5 und 7 dienten wie das Gemisch 3 als Kontrolle der Antikörperqualität der vorherigen Antikörpergemische, denn in ihnen waren statt der Antikörper Isotypen titriert.

*Tabelle 2: Vom Zytometer gemessene periphere Blutzellen*

Röhrchen	Lymphozytensubpopulation	Phänotypen	
		Übergeordnete Zellen	Abgeleitete Zellen
1	Natürliche Killer-T-Zellen	CD45 <sup>+</sup> /CD56 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>
	Natürliche Killerzellen		CD3 <sup>-</sup>
	B-Lymphozyten	CD45 <sup>+</sup> /CD16 <sup>low</sup> /CD14 <sup>-</sup>	CD19 <sup>+</sup>
	T-Lymphozyten		CD3 <sup>+</sup>
2	T-Helfer Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>
	Zytotoxische T-Lymphozyten		CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>
	TCRγδ Lymphocyten		CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup> /TCRγδ <sup>+</sup>
4	T <sub>H</sub> 1-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CXCR3 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /CCR6 <sup>-</sup>
	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 17-Lymphozyten		CXCR3 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>-</sup> /CCR6 <sup>+</sup>
	T <sub>H</sub> 17-Lymphozyten		CXCR3 <sup>-</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /CCR6 <sup>+</sup>
	T <sub>H</sub> 2-Lymphozyten		CXCR3 <sup>-</sup> /CCR4 <sup>+</sup> /CCR6 <sup>-</sup>
6	Regulatorische T-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup> /CD4 <sup>+</sup>	CD25 <sup>high</sup> /CD127 <sup>low</sup>



*Abbildung 4: Beispiel für FACS-Aufteilung der Zellpopulationen*

*(Th-Zellen (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>) durch CXCR3 und CCR4 in vier Subtypen unterteilt)*

### **2.5.3 ELISA**

Die Serumröhrchen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und nur für die Analysen mit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) aufgetaut. Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, bei dem eine enzymatische Farbreaktion die zu detektierende Substanz anzeigt. In dieser Studie wurden die Konzentrationen von IL-6 and IL-17A im Serum mittels IL-6-ELISA (Pierce Biotechnology, IL, USA) und IL-17-ELISA (Biosource IL-17 Cytoscreen, LifeTechnologies, CA, USA) nach Anweisung des Produzenten gemessen. Proben und Standards wurden als Doppelbestimmung angesetzt. Die Sensitivität der Proben erreichte  $1\text{pg/l}$  für IL-6 und  $2\text{pg/l}$  für IL-17A. Eine Verdünnung der Proben im Verhältnis von 1: 4 mit Pufferlösung wurde durchgeführt und auf Mikroplatten pipettiert. Mit Hilfe eines Photometers (Bio-Plex 200, Bio-Rad Laboratories, Germany) wurden die Daten zur optischen Dichte nach Farbumschlag gesammelt ( $450\text{ nm}$ ).

## **2.6 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Studienergebnisse wurde das Programm SPSS Statistics Version 21.0 genutzt (IBM, NY, USA). Für die Studie sollten die Immunzellveränderungen durch die körperliche Belastung bei einer Stichprobe IPAH-erkrankter Patienten mit einer Stichprobe gesunder Menschen der Bevölkerung verglichen werden.

Als statistische Verfahren wurden Methoden zur Beschreibung eines Merkmals angewendet. Mittels explorativer Datenanalyse beider Gruppen wurden Lagemaße, die Verteilung berechnet und Ausreißer innerhalb der beiden Gruppen bestimmt. Für die Lagemaßbestimmung wurden das arithmetische Mittel der beiden Stichproben, die Mediane und die Verteilung berechnet. Auch Streuungsmaße, wie Varianz und Standardabweichung waren relevant für die Studie. Dadurch konnte die Homogenität der Gruppe festgestellt und die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert berechnet werden. Mit Hilfe der Standardabweichung ließ sich die Verteilung der Werte abschätzen. Somit wurden von allen gemessenen Werten die Mittelwerte berechnet und diese mit den unterschiedlichen Belastungsphasen und innerhalb der beiden Gruppen verglichen.

Dazu wurde als statistisches Verfahren als erstes der K-S-Test angewendet, um die Verteilungen der Werte innerhalb der Patienten- und der Kontrollgruppe zu berechnen. Die Betrachtung der Mittelwerte dieser unabhängigen Stichproben erfolgte mit Hilfe des T-Tests bei normalverteilten Daten, beziehungsweise mittels MWU-Test bei nicht-normalverteilten (nicht parametrischen) Daten, je für die drei Zeitpunkte, vor der Belastung (pre), unmittelbar danach (post1) und eine Stunde nach dieser (post2).

Weiterhin wurde das statistische Verfahren der Korrelationsanalyse nach Pearson (bei parametrischer Verteilung) angewendet, um Zusammenhänge innerhalb der Ergebnisse der verschiedenen klinischen Untersuchungen (Base-line Parameter), wie die gelaufene Distanz des 6-Minuten-Gehtests (6MWD), NTproBNP, dem rechtsventrikulären systolischen Druck, TAPSE, Spiroergometrie mit maximaler Wattzahl und Watt an der anaeroben Schwelle, Peak\_VO2, Peak\_VO2kg, VO2\_AT, Ve\_Max, Ve\_AT, VCO2\_Max, VCO2\_AT, VEVCO2\_AT, Sauerstoffpuls zu messen.

Diese Base-line Parameter, welche alle am Tag der Spiroergometrie erhoben wurden, wurden untereinander verglichen sowie die Korrelation dieser Werte mit den verschiedenen Zellen im Blut zu den drei beschriebenen Belastungszeitpunkten wurde mittels Pearson betrachtet. Bei nicht-parametrischer Verteilung wurde das Verfahren nach Spearman angewendet.

Um den Einfluss von körperlicher Belastung zu untersuchen, wurde ein ANOVA mit Messwiederholungen (rANOVA) durchgeführt.

Das Signifikanzniveau war erreicht, wenn der Wert  $p < 0,05$  betrug. Bei einem Wert  $p < 0,1$  konnte eine Tendenz ohne Signifikanz vermutet werden.

### **3 Ergebnisse**

Hier werden die Ergebnisse der Studie dargestellt. Zunächst werden die Ergebnisse der Routineuntersuchung sowie Alter und BMI, nachfolgend base-line Parameter genannt, beschrieben. Die Korrelation dieser untereinander wird betrachtet. Ebenso werden die Ergebnisse der Zellzahlmessungen dargelegt.

Es wurden 12 Patienten mit IPAH und zehn gesunde Kontrollpersonen in die Studie aufgenommen und den vollständigen Studienuntersuchungen unterzogen. Beide Probandengruppen setzten sich zusammen aus vier Männern und sechs Frauen (mit zusätzlich zwei weiteren weiblichen Teilnehmerinnen in der Patientengruppe). Der Altersdurchschnitt der zwölf Patienten betrug 58,7 Jahre, sodass die Probanden der Kontrollgruppe geschlechtsspezifisch und altersentsprechend ausgewählt wurden. Es gab ein durchschnittliches Alter von 58 Jahren. Die Patientengruppe und die Kontrollen waren somit identisch („1:1 gemacht“).

#### **3.1 Base-line Parameter**

Als Base-line Parameter wurden einige Werte der klinischen Untersuchungen betrachtet. Davon wurden die Mittelwerte der beiden Gruppen berechnet und diese miteinander verglichen. Das Alter der zwei Kohorten war nahezu übereinstimmend (IPAH:  $59 \pm 14$ ; CTR:  $58 \pm 15$ ,  $p = 0,089$ ). Auch die Mittelwerte des Body-Mass-Index lagen mit  $23 \pm 4$  bei der IPAH-Gruppe und  $24 \pm 3$  CTR sehr nah beieinander (siehe Tabelle 3).

Beim Vergleich der Mittelwerte der klinischen Untersuchungen bestanden signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (6MWD: IPAH  $505 \pm 84$ , CTR  $638 \pm 110$ ,  $p = 0,004$ ; NTproBNP: IPAH  $750 \pm 637$ , CTR  $68 \pm 27$ ,  $p = 0,003$ ; Wmax: IPAH  $76 \pm 37$ , CTR  $130 \pm 46$ ,  $p = 0,006$ ).

*Tabelle 3: Base-line Parameter, IPAH vs. Kontrollen (CTR) und Signifikanz*

<b>Parameter</b>	<b>IPAH (n= 12)</b>	<b>Kontrollen (n= 10)</b>	<b>p-Wert</b>
Alter	59± 14	58± 15	0,89
Geschlecht weiblich/ männlich	8/4	6/4	0,75
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	23± 4	24± 3	0,55
6MWD [m]	505± 84	638± 110	<b>0,004</b>
NT-proBNP [ng/l]	750± 637	68± 27	<b>0,003</b>
<b>Spiroergometrie</b>			
Watt_maximal [W]	76± 37	130± 46	<b>0,006</b>
Peak VO <sub>2</sub> /kg [ml/min/kg]	16± 4	23± 5	<b>0,001</b>
Peak VO <sub>2</sub> [l/min]	1,1± 0,4	1,7± 0,6	<b>0,004</b>
VE/VCO <sub>2</sub> _AT [l/min/l/min]	48± 7,6	32± 2,2	<b>&lt; 0,001</b>
VO <sub>2</sub> _AT [l/min]	0,8± 0,2	1,2± 0,2	<b>0,008</b>
HR_Ruhe/ max [min]	76± 12/ 130± 27	77± 11/ 138± 18	0,79/ 0,43
RR systolisch_Ruhe/ max [mmHg]	98± 21/ 148± 28	118± 22/ 179± 22	<b>0,04/ 0,01</b>
RR diastolisch_Ruhe/ max [mmHg]	69± 11/ 80± 10	75± 10/ 81± 13	0,19/ 0,96
<b>Lungenfunktion</b>			
FEV <sub>1</sub> % relativ [%]	81± 13	94± 8	<b>0,01</b>
FVC % relativ [%]	90± 13	95± 8	0,29
FEV <sub>1</sub> /FVC [%]	90± 9	102± 7	<b>0,003</b>

### **3.1.1 Korrelation innerhalb der Base-line Parameter**

Zwischen den einzelnen Base-line Parameter konnten viele Zusammenhänge beobachtet werden. Das Ergebnis der 6MWD korrelierte mit vielen weiteren Ergebnissen der Routineuntersuchung. Zum Beispiel korrelierte die vom Probanden erreichte Gehstrecke signifikant mit dessen NTproBNP-Spiegel im Blut (p= 0,016). Auch war eine Korrelation der 6MWD mit den Ergebnissen der Spiroergometrie festzustellen. Sowohl die maximal erreichte Wattzahl (p< 0,001)



des Zu-Untersuchenden, als auch die Wattzahl an der anaeroben Schwelle ( $p < 0,001$ ) korrelierte signifikant mit der Gehstrecke. Hier ist zu ergänzen, dass die maximale erreichte Wattzahl die Auslastungsschwelle repräsentiert, da die Untersuchung, wegen muskulärer Überanstrengung oder Atemnot, die sich beim Untersuchten als Erschöpfungszustand präsentierten, beendet wurde. Einmalig wurde die Ergometrie wegen zu hoher Herzfrequenz ( $HF > 190$ ) vorzeitig abgebrochen. Neben der Korrelation zwischen Wattzahl und Gehstrecke traten signifikante Zusammenhänge zwischen der Peak  $VO_2$  ( $p = 0,001$ ) und der Peak  $VO_2/kg$  ( $p < 0,001$ ) auf, sowie der  $VCO_2_{max}$  ( $p = 0,001$ ),  $VCO_2_{AT}$  ( $p < 0,001$ ),  $VE/VCO_2_{AT}$  ( $p < 0,001$ ) und mit dem Sauerstoffpuls auf ( $p = 0,007$ ).

Ebenso wie die Gehstrecke waren die Werte des NTproBNP mit vielen Parametern zusammenhängend. Die einzelnen Parameter der Spiroergometrie, wie Peak  $VO_2$  und die Wattzahl, gingen auch mit vielen Untersuchungsergebnissen einher.

Die maximal erreichte Wattzahl, sowie die Wattzahl an der anaeroben Schwelle korrelierten mit dem  $VE_{max}$ . Auch der 6-Minuten-Gehtest wies einen Zusammenhang zum  $VE_{max}$  auf.

Die Werte der Spiroergometrie korrelierten mit dem Peak  $VO_2$ , aber auch die Höhe des BNP konnte mit den Spiroergometrie-Ergebnissen in Zusammenhang gebracht werden.

### **3.2 Ergebnisse der Zellzahlmessung**

Beim Auswerten der Ergebnisse der Zellpopulationen wurden zuerst die Gruppenunterschiede (IPAH und CTR) vor der Belastung betrachtet. Als zweites wurde auf eine möglicherweise bestehende Korrelation der Werte von vor der Belastung mit den oben aufgeführten Erkrankungsparametern geachtet. Der nächste wichtige Aspekt war die Berechnung der belastungsabhängigen Veränderungen der Zellkonzentrationen ( $\Delta pre\_post1 / \Delta pre\_post2$ ). Diese verhielten sich teilweise ähnlich in den Gruppen der IPAH-Patienten und der CTR. Als letztes wurden die Zellkonzentrationsveränderungen mit Ergebnissen der Routineuntersuchung (Base-line Parameter wie dem 6MWD oder der Spiroergometrie) in Zusammenhang gestellt, die teilweise hoch signifikant korrelierten.

Die Ergebnisse der Zellzahlmessung werden nach folgendem Schema erklärt: Zunächst werden (1) die Unterschiede zwischen IPAH und Kontrollen vor Belastung beschrieben, dann folgt (2) die Korrelation mit den Base-line Parametern (Spiro, 6MWD und NTproBNP) vor Belastung. Im dritten Absatz werden (3) die Unterschiede der Zellzahlen vor und nach Belastung erläutert. Als letztes wird (4) die Korrelation der unterschiedlichen Zellzahlen vor und nach Belastung mit den Parametern angegeben.

### **3.2.1 Leukozyten und Lymphozyten**

(1) Die gemessene Anzahl an Leuko- und Lymphozyten vor der körperlichen Aktivität unterschied sich nicht signifikant ( $p= 0,59$ ) zwischen der Patientengruppe ( $5,725 \pm 1,279$ ) und den Kontrollen ( $5,41 \pm 1,415$ ). Die Ergebnisse lagen nach dem K-S-Test in einer Normalverteilung vor.

(2) Die klinischen Untersuchungsergebnisse korrelierten nicht mit den Leukozyten- und Lymphozytenkonzentrationen.

(3) Es verhielten sich zum Beispiel die Leukozytenzahlen der IPAH-Patienten unter körperliche Aktivität ähnlich wie die der Kontrollen (CTR). Durch die Belastung stiegen die Leukozytenzahlen beider Gruppen an (IPAH: Delta pre\_post1  $+1,582 \pm 1,023$  Mrd. Leukozyten/l; CTR: Delta pre\_post1  $+1,930 \pm 0,550$  Mrd. Leukozyten/l, siehe Abbildung 5). Eine Stunde nach der Belastung sank die Konzentration der weißen Blutkörperchen auf Werte von 6,65 und 6,44 Mrd. Leukozyten/l, aber die Konzentrationen blieben über den Ausgangswerten.

Ähnlich wie die Leukozyten verhielten sich die Lymphozyten. Auch bei dieser Zellpopulation stiegen die Werte nach Belastung an (Abb. 6), um nach der Ruhephase von einer Stunde wieder annähernd den Ausgangswert zu erreichen. Im Gegensatz zu den nicht signifikanten Ergebnissen der Leukozyten bestand hier ein signifikanter Unterschied zwischen IPAH und Kontrollen. Bei den Kontrollen waren anfänglich mehr Lymphozyten im Blut nachweisbar. Diese Konzentrationen stiegen durch die Belastung deutlicher an als jene Konzentration bei der IPAH-Gruppe (bei den Kontrollen gab es einen Anstieg von  $0,8$  Mrd. Zellen/l  $\pm 0,302$  und bei IPAH-Patienten einen Anstieg von  $0,545$  Mrd. Zellen/l  $\pm 0,520$ ).

Die Differenz von den Werten vor der Belastung zu denen eine Stunde nach dieser (Delta pre\_post2) wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Probanden auf.

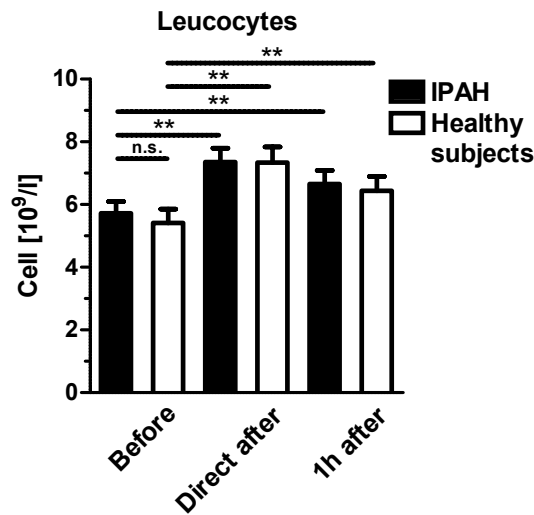


Abbildung 5: Veränderungen der Leukozytenpopulation bei erkrankten und gesunden Probanden im Vergleich, vor und nach Belastung

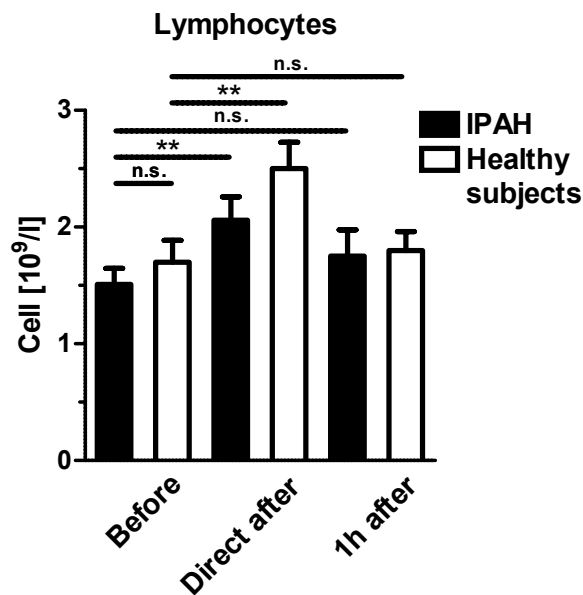


Abb. 6: Lymphozytenpopulationen, Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Studienteilnehmern, sowie vor und nach der Belastung

(4) Die Delta pre\_post1 Lymphozytenveränderung korrelierte mit dem 6MWD ( $p=0,01$ ). Weiterhin war eine Korrelation mit der Spiroergometrie festzustellen.

Die Lymphozytenveränderung im Zeitraum von vor zu nach der Belastung korrelierten mit der maximalen Wattzahl ( $p=0,002$ ) und mit der Belastung an der anaeroben Schwelle ( $p=0,007$ ), mit der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $p=0,005$ ), der maximalen Sauerstoffaufnahme pro kg ( $p=0,006$ ), mit der Sauerstoffaufnahme an der anaeroben Schwelle ( $p=0,002$ ), der maximalen Carbondioxideliminierung ( $p=0,003$ ) und mit dem respiratorischen CO<sub>2</sub>-Äquivalent an der anaeroben Schwelle ( $p=0,001$ ).

Bei der Delta pre\_post1 Leukozytenveränderung war wie bei den Lymphozyten eine Korrelation mit den Ergebnissen der Spiroergometrie festzustellen. Die Leukozytenveränderung im Zeitraum von vor zu nach der Belastung korrelierten mit der maximalen Wattzahl ( $p=0,043$ ), sowie der Wattzahl an der anaeroben Schwelle ( $p=0,007$ ), mit der Sauerstoffaufnahme an der anaeroben Schwelle ( $p=0,025$ ), der maximalen Carbondioxideliminierung ( $p=0,044$ ) und der Carbondioxidausatmung an der anaeroben Schwelle ( $p=0,022$ ).

### **3.2.2 B-, T-, TCRgd-, NK-, NKT-Zellen, Monozyten**

(1) Bei den B-, T-, NK-Zellen und Monozyten konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Bei den TCRgd-Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen IPAH- und Kontroll-Gruppe.

Nur bei den NKT-Zellen fiel beim T-Test eine Tendenz zu Gruppenunterschieden auf ( $p=0,093$ ; IPAH  $1,918 \pm 1,814$ ; CTR  $3,110 \pm 1,166$ ).

(2) Vor Belastung konnte eine Korrelation der B-Zellen mit dem mPAP ( $p=0,019$ ) festgestellt werden.

Weiterhin wurde ein Zusammenhang der NKT-Zellen mit Messergebnissen der körperlichen Aktivität, wie dem 6MWD ( $p=0,139$ ) und der Spiroergometrie (Watt\_max ( $p=0,025$ ), Watt\_AT ( $p=0,069$ ), Peak VO<sub>2</sub> ( $p=0,049$ ), Peak VO<sub>2</sub>/kg ( $p=0,011$ ), VO<sub>2</sub>\_AT ( $p=0,053$ ), VE\_max ( $p=0,046$ ), VCO<sub>2</sub>\_max ( $p=0,025$ ), VCO<sub>2</sub>\_AT ( $p=0,020$ )) gemessen. Ebenso wie die Belastungsparameter korrelierten der NTproBNP ( $p=0,173$ ) und TAPSE ( $p=0,105$ ) mit den NKT-Zellen. Die T-Zellen, Monozyten und TCRgd zeigten keine signifikanten Zusammenhänge.

(3) Weiterhin wurde die B-Zellzahlveränderung durch Belastung gemessen und verglichen. Dort gab es einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen ( $p= 0,025$ ). Bei der Kontrollgruppe trat eine deutlichere Veränderung der Zellzahl auf. Durch körperliche Belastung sank die Zahl der im Blut gemessenen B-Lymphozyten (Delta Lymphozyten  $-0,54 \pm 0,564$ ). Bei der IPAH-Gruppe blieb die B-Lymphozytenzellzahl konstant (Delta Lymphozyten  $0 \pm 0,454$ ) (Abb. 7).

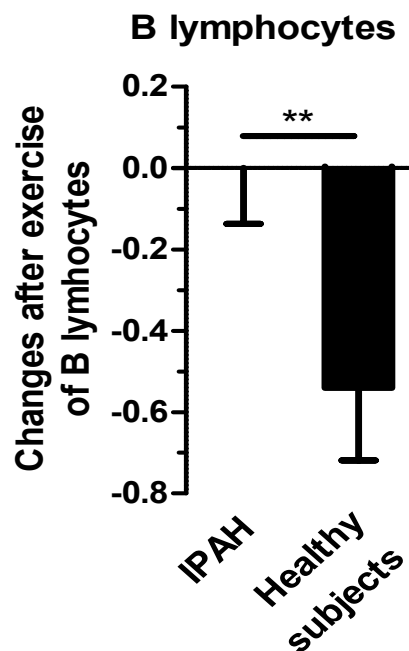


Abb. 7: Veränderungen der B-Lymphozyten durch körperliche Aktivität, Vergleich zwischen IPAH-Patienten und Kontrollen (healthy subjects)

Bei den T-Lymphozyten, TCRgd-, NK-, NKT-Zellen und den Monozyten konnte kein signifikanter Unterschied der Zellzahlen im Vergleich von vor der sportlichen Aktivität zu direkt danach festgestellt werden.

Bei Betrachtung der Unterschiede zwischen den Probandengruppen, genauer den Zellveränderungen im Zeitintervall vor der Belastung bis eine Stunde danach (Delta pre\_post2), konnte nur bei den CD3+CD4+-Zellen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p= 0,034$ ; IPAH  $-0,673 \pm 2,951$ ; CTR  $2,62 \pm 3,659$ ).

(4) Bei den B-Zellen gab es keine signifikante Korrelation mit den anderen Erkrankungsparametern.

Die Veränderung der T-Lymphozytenzahl wies mit den Routineuntersuchungen, wie dem 6-Minuten-Gehtest und der maximalen Sauerstoffaufnahme pro kg bei der Spiroergometrie, eine negative Korrelation auf (-4,83 ( $p= 0,027$ )). Je länger die geleistete Strecke beim Gehtest der IPAH-Patienten desto höher war die postbelastungsauffretende Abnahme der T-Lymphozytenzahl. Ein gewisser Zusammenhang dieser Werte war erkennbar, aber dieses Ergebnis erreichte nicht das Signifikanzniveau ( $p= 0,0589$ ).

Signifikant hingegen erschien die Korrelation zwischen der bei der Spiroergometrie gemessenen maximalen Sauerstoffaufnahme (Peak  $VO_2/kg$  ( $ml/min/kg$ )) und der T-Lymphozytenkonzentration ( $p= 0,042$ ). Hier zeigten Patienten mit größeren negativen  $\Delta T$ -Werten eine höhere Sauerstoffaufnahme unter Belastung (Abb. 8).

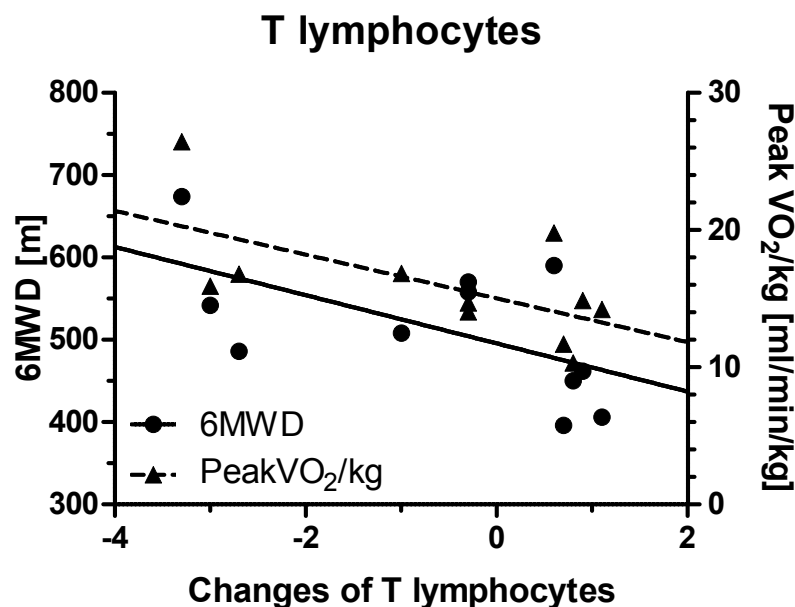


Abbildung 8: Korrelation T-Lymphozyten-Veränderungen mit dem Gehtest und maximaler Sauerstoffaufnahme/kg

Die in der Patientengruppe gemessene TCRgd-Konzentrationsdifferenz korrelierte signifikant mit dem 6MWD ( $p= 0,029$ ), der maximalen Wattzahl ( $p= 0,007$ ), der Wattzahl an der anaeroben Schwelle ( $p= 0,006$ ), der Sauerstoffaufnahme/kg und

dem Atemäquivalent für CO<sub>2</sub> zum Zeitpunkt der anaeroben Schwelle (AT= anaerobic threshold). Die maximale Sauerstoffaufnahme/kg korrelierte positiv mit der Veränderung der TCR $\gamma\delta$ -Zell-Konzentration ( $p= 0,047$ ), das heißt, bei Patienten, die eine hohe maximale Sauerstoffaufnahme unter Belastung erreichten, war auch eine stärkere Zunahme von TCR $\gamma\delta$ -Zellen feststellbar. Je höher die VE/CO<sub>2</sub>, desto kleiner war die Zunahme, bzw. teilweise sogar Abnahme der TCR $\gamma\delta$ -Zellen durch Belastung ( $p= 0,003$ ) (Abb. 9). VE<sub>max</sub> ( $p= 0,036$ ), VE<sub>AT</sub> ( $p= 0,021$ ), VCO<sub>2max</sub> und VCO<sub>2AT</sub> ( $p= 0,003$ ) korrelierten ebenso mit der Konzentrationsveränderung der TCR $\gamma\delta$ -Zellen (siehe Abb. 9).

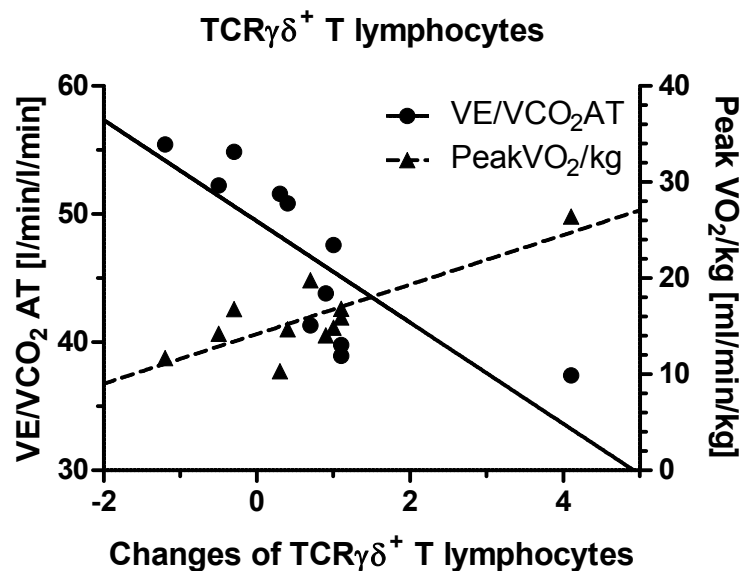


Abb. 9: Korrelation von TCR $\gamma\delta$ -Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und VE/VCO<sub>2</sub> an AT

Bei den NKT-Zellen korrelierte die Zahlveränderung von vor zu nach der Belastung sowohl mit der VO<sub>2</sub>/kg ( $p= 0,0013$ ), als auch mit dem Gehstest ( $p= 0,027$ ). Ein hoher O<sub>2</sub>-Wert, sowie eine lange Gehstrecke gingen einher mit einer stärkeren Zunahme der NK-Zellen im Blut.

Die Monozytenzahlveränderung zeigte keinen Zusammenhang mit den klinischen Parametern zur Beurteilung des Krankheitsprogresses.

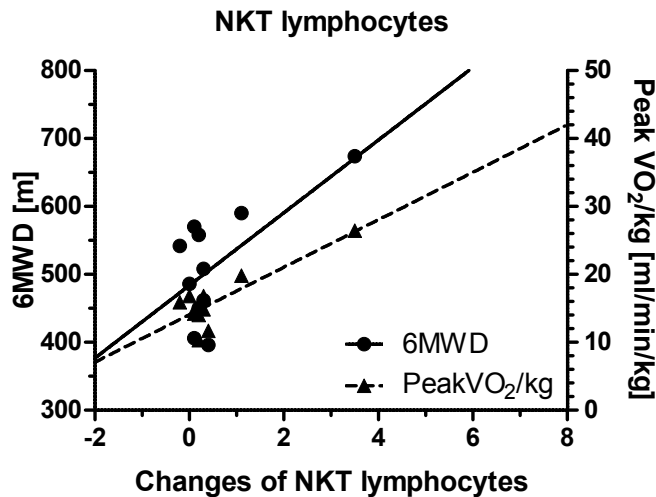


Abb. 10: Korrelation von NKT-Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und 6MWD

#### Zytotoxische T-Zellen

Die aktivitätsbedingte Veränderung der CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>-Zellen korrelierte signifikant mit den Werten der maximalen Sauerstoffaufnahme ( $p=0,0196$ ). Eine erhöhte Sauerstoffaufnahme ging einher mit einer Zunahme der zytotoxischen Zellen. Der Gehstest zeigte ähnliche Zusammenhänge (weite Gehstrecke - Zunahme der Zellen), aber es gab keine signifikante Korrelation mit der T-Zellzahlveränderung.

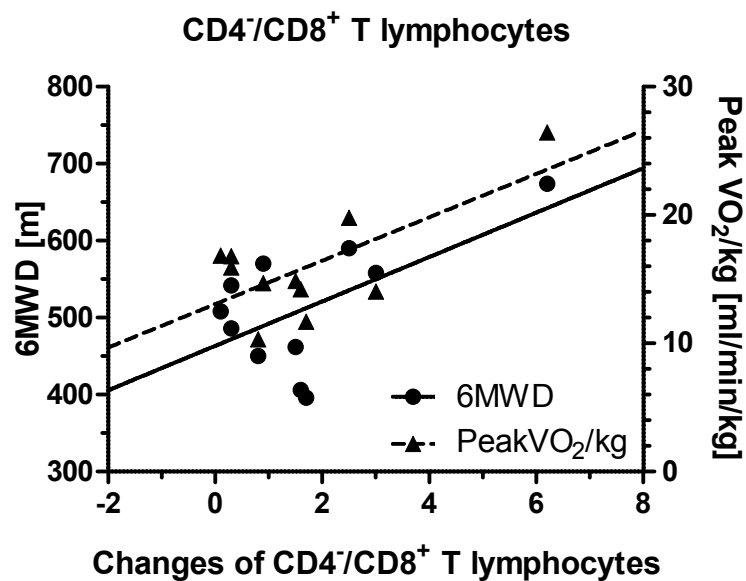


Abb. 11: Korrelation von zytotoxischen T-Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und 6MWD



### 3.2.3 T-Helfer-Zellen (Th1, Th2, Th17, Th1/17) und Treg-Zellen (CD25/CD127)

(1) Die Th2-Zellen der beiden Gruppen wiesen signifikante Unterschiede in der Blutkonzentration auf ( $p= 0,035$ ). Unabhängigkeit von der Blutentnahmezeit gab es prozentual von der Gesamt-T-Helferzahl deutlich mehr Th2-Lymphozyten in der IPAH-Gruppe ( $1,482\%$  aller T-Helferzellen  $\pm 0,751$ ) als bei den Kontrollen ( $0,850\% \pm 0,477$ ).

Genau entgegengesetzt verhielt sich der Anteil der Th1/Th17-Zellen an den gesamten CD3+/CD4+-Zellen. Es gab eine hochsignifikante Differenz zwischen den Mittelwerten der IPAH und den Kontrollen ( $p= 0,007$ ). Hier befand sich ein größerer Anteil im Mittel bei den gesunden Probanden ( $3,500\% \pm 1,597$ ) als bei der erkrankten Gruppe ( $1,764\% \pm 0,975$ ).

Die T-Helferzellen Th1 und Th17 wiesen keine signifikanten Unterschiede vor der Belastung zwischen Patientenkollektiv und Vergleichsprobanden auf.

Bei den regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25highCD127low) ergab sich vor der Belastung ein signifikanter Unterschied zwischen IPAH und CTR ( $p= 0,041$ ; IPAH:  $1,118\%$  der T-Helferzellen  $\pm 0,154$ ; CTR:  $0,92\% \pm 0,253$ ).

(2) Bei den IPAH-Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen Th1 und dem 6MWD ( $p= 0,049$ ) festgestellt werden. Weiterhin korrelierte die Th2-Zellzahl mit dem Peak VO<sub>2</sub>/kg ( $p= 0,041$ ).

Die Anzahl an Th1/Th17 vor der Belastung korrelierte mit den Werten der Spiroergometrie, z.B. der Wattzahl an der anaeroben Schwelle ( $p= 0,011$ ), dem Peak VO<sub>2</sub>/kg ( $p= 0,047$ ), VO<sub>2</sub>\_AT ( $p= 0,036$ ), VCO<sub>2</sub>\_AT ( $p= 0,014$ ), VE/VCO<sub>2</sub>\_AT ( $p= 0,036$ ).

(3) Ein aussagestarkes Ergebnis zeigte sich bei der Untersuchung der Th17-Lymphozyten. Direkt nach der Belastung fiel der Th17-Anteil der IPAH signifikant ab, wohingegen bei der Kontrollgruppe ein Anstieg der Zellanteile vermutet werden konnte (siehe Abb. 12). Prozentual verhielt sich die Th17-Konzentration gegensätzlich und auch beim Vergleich der absoluten Konzentration war ein signifikanter Unterschied der belastungsabhängigen Veränderung feststellbar ( $p= 0,026$ ; IPAH:  $-0,191 \pm 0,284$ ; CTR:  $0,8 \pm 0,220$ , siehe Abb. 13).

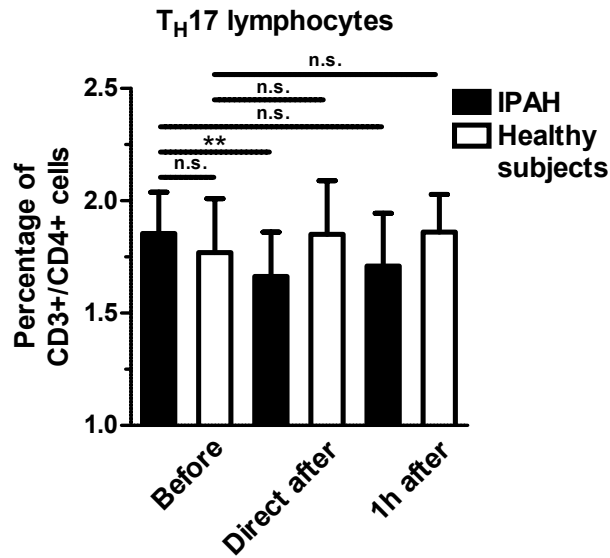


Abb. 12: Th17-Veränderungen durch Belastung

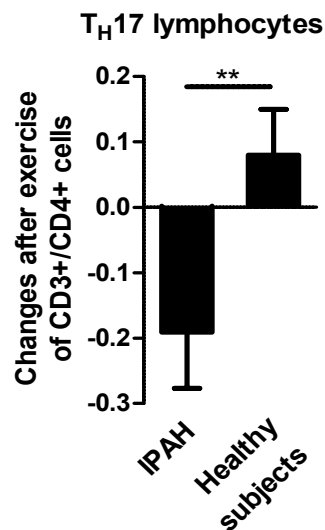


Abb. 13: Th17-Lymphozytenveränderung IPAH – CTR

Durch die Belastung ließ sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des Th1/Th17-Anteils vermuten (CTR > IPAH). Sowohl der Th1- als auch der Th2-Anteil der Helferzellen veränderten sich fast gar nicht durch die körperliche Aktivität.

Die Konzentrationsveränderung der Treg-Zellen durch die Belastung erreichte nicht das Signifikanzniveau.

Auch bei Betrachtung der Zellzahlveränderungen bis eine Stunde nach dem Sport (Delta pre\_post2), gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Das einzige Ergebnis, welches tendenzielle Unterschiede erscheinen ließ, war die Veränderung von Th1 in den beiden Gruppen ( $p=0,064$ ; IPA:  $-0,2 \pm 0,492$ ; CTR:  $0,11 \pm 0,074$ ).

(4) Brachte man das Verhalten der Th17-Zellen in Zusammenhang mit der maximalen Sauerstoffaufnahme/kg der Patienten, entdeckte man eine lineare Korrelation. Eine höhere Sauerstoffaufnahme bei der Spiroergometrie kam zusammen mit einem Abfall der Th17-Lymphozyten nach Belastung ( $p=0,0048$ ). Im Vergleich mit dem 6MWD konnte auch hier ein Zusammenhang zwischen Gehstrecke und Th17-Konzentration vermutet werden. Je weiter die Strecke der Patienten im Gehtest, desto negativer verhielt sich die Th17-Veränderung. Die Werte korrelierten nicht signifikant miteinander ( $p=0,204$ , siehe Abb. 14).

Hingegen korrelierte die Veränderung der Treg-Zahl mit der maximalen Sauerstoffaufnahme/kg signifikant (siehe Abb. 15).

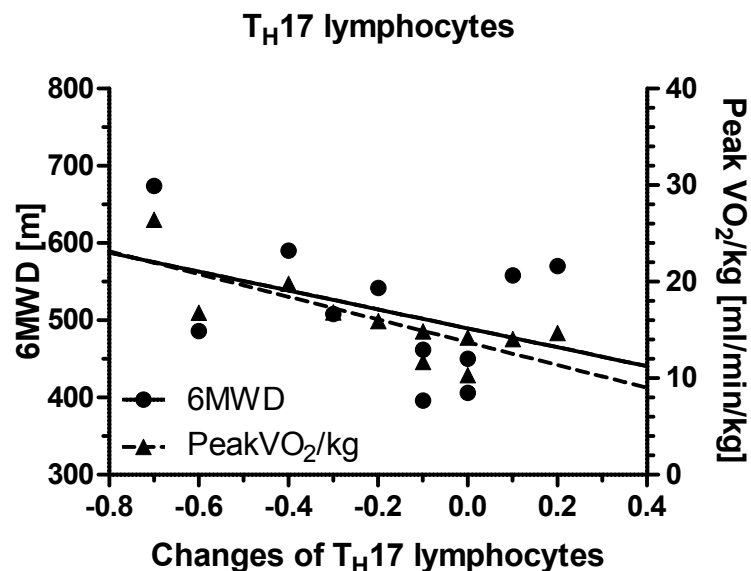


Abb. 14: Korrelation Th17-Lymphozyten mit 6MWD und Peak VO<sub>2</sub>/kg

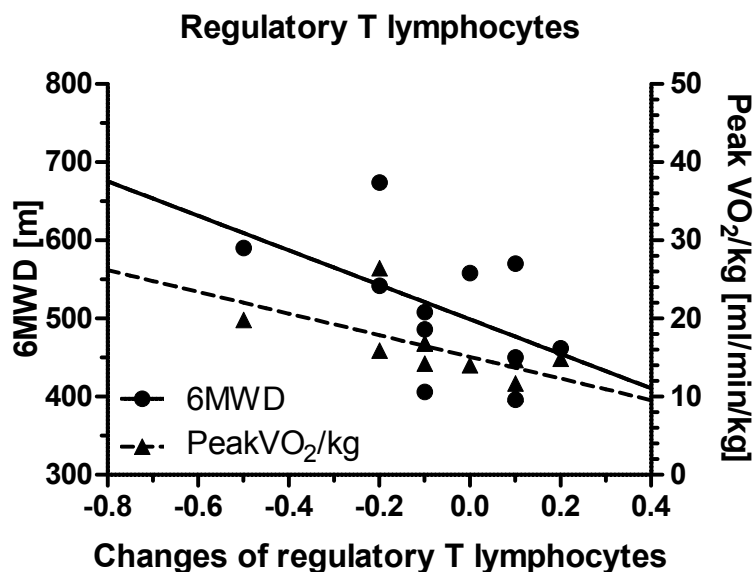


Abb. 15: Korrelation Treg mit 6MWD und Peak VO<sub>2</sub>/kg

### 3.2.4 IL17, IL6

(1) Die Konzentration von IL-17 konnte nur bei einem Patienten nachgewiesen werden. Die restlichen Werte schienen unter der Nachweisgrenze von 2 ng/l zu liegen. Sodass diese Daten nicht in diese Arbeit aufgenommen werden konnten.

Bei der Untersuchung der IL-6-Konzentrationen konnten vor der körperlichen Betätigung signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen festgestellt werden ( $p=0,01$ ; IPA:  $5,752 \pm 4,606$ ; CTR:  $0,809 \pm 1,512$ ).

(2) Die Messungen der IL-6-Konzentration korrelierte bei Patienten mit IPA mit dem mPAP ( $p=0,021$ ), sowie dem RAP ( $p=0,035$ ), Watt<sub>max</sub> ( $p=0,025$ ), Watt<sub>AT</sub> ( $p=0,006$ ), VO<sub>2</sub><sub>AT</sub> ( $p=0,024$ ), VE<sub>AT</sub> ( $p=0,025$ ), VCO<sub>2</sub><sub>AT</sub> ( $p=0,004$ ). Bei der Kontrollgruppe gab es keine Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der klinischen Untersuchung und der IL-6-Konzentration.

(3) Die bei dem einen Patienten gemessene IL-17-Konzentration nahm eine Stunde nach der Belastung ab, kann leider nicht als aussagekräftig gewertet werden.

Weiterhin verursachte das Training bei den IPA-Patienten eine Reduktion des IL-6-Wertes (Delta pre<sub>post2</sub>:  $-2,787 \pm 5,056$ ,  $p=0,022$ ; siehe Abb. 16).

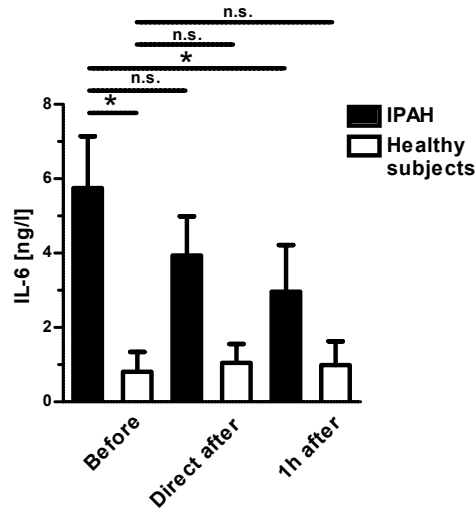


Abb. 16: Veränderungen der IL-6-Konzentration bei IPAH sowie CTR vor und nach Belastung

(4) Nach der Belastung zeigte sich bei den Patienten eine Reduktion von IL-6, welche signifikant mit der maximalen Sauerstoffaufnahme pro kg korrelierte ( $p=0,022$ ). Bei den CTR stellte sich dies nicht dar. Zudem gab es den Trend, dass eine höhere Sauerstoffaufnahme mit einer sportinduzierten Abnahme der IL-6 einherging. Weiterhin konnte hier ein Zusammenhang zwischen einer IL-6-Reduktion sowie einem reduziertem Carbondioxidäquivalent vermutet werden (Abb. 17).

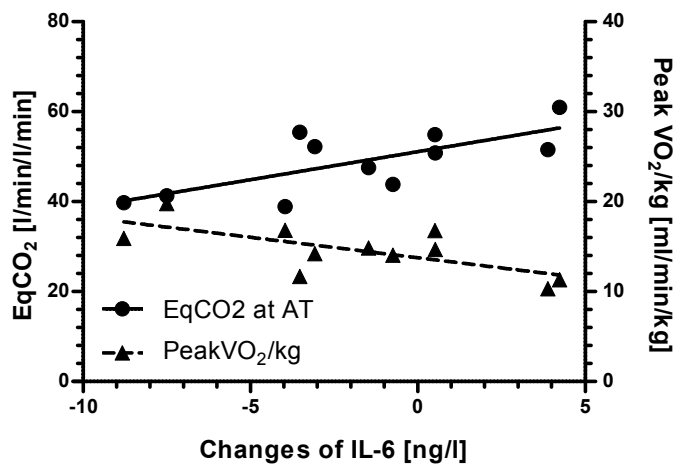


Abb. 17: Korrelation von IL-6-Veränderung mit der maximalen Sauerstoffaufnahme/kg und dem Äquivalent der Carbondioxideliminierung

## **4 Diskussion**

Nachfolgend werden die wichtigsten Ergebnisse diskutiert und mit bekannten Effekten des körperlichen Trainings in Bezug gebracht. Weiterhin werden die Auswirkungen des körperlichen Trainings anhand von Tiermodellen mit medikamentös-induzierter PAH dargelegt und eine Verbindung zum menschlichen Organismus hergestellt. Es wird der Einfluss des Immunsystems, vor allem des Interleukin 6 und Th17-Zellen, auf die Pathogenese der PAH erläutert sowie der Effekt des körperlichen Trainings auf diese immunmodulatorischen Botenstoffe und Zellen diskutiert. Abschließend wird die Bedeutung der körperlichen Aktivität für den Krankheitsverlauf und Therapie analysiert.

### **4.1 Effekte des körperlichen Trainings auf PAH**

Die Studie dieser Arbeit untersuchte die Auswirkung körperlichen Trainings auf immunologische Zellen und Zytokine der Probanden. Die erreichten Aktivitätsparameter konnten mit den Zellveränderungen, die durch Belastung auftraten, in Verbindung gebracht werden. Eine Reduktion der immunologischen Zellen konnte beobachtet werden und eine Korrelation dieser mit der Leistungsfähigkeit der Patienten wurde festgestellt. Genauer gesagt wurde ein Zusammenhang zwischen Belastbarkeit, Krankheitsstadium und dem inflammatorischen Zustand in dieser Studie beobachtet.

Es konnte schon in einigen Studien bestätigt werden, dass körperliche Aktivität den Krankheitsprogress der PAH verlangsamt. Chan, Chin et al. erhoben eine Studie, in der eine Patientenkohorte kontinuierlich zehn Wochen Laufbandtraining erhielt und die andere Gruppe keiner körperlichen Betätigung ausgesetzt war. Die zur Gruppe der belasteten Probanden erhielten Wochen lang ein Laufbandtraining auf einem Niveau 70- 80% der maximalen Herzfrequenz. Die beiden Kohorten wurden in Hinsicht auf die körperliche Leistung und der eigens eingeschätzten Lebensqualität nach einem Zeitraum von zehn Wochen verglichen. Hierzu betrachteten die Kollegen die Ergebnisse vom 6MWD, die Dauer bis zum Eintritt eines Erschöpfungszustands und die maximal erreichte Wattzahl. Chan, Chin et al. konnten in ihrer Arbeit veranschaulichen, dass es bei der körperlich aktiven Kohorte eine erhöhte funktionelle Kapazität gab. Diese wurde repräsentiert durch

verbesserte Resultate im 6-Minuten-Gehtest ( $56 \pm 45$  m), einer gesteigerten Übungsintoleranzgrenze ( $1,9 \pm 1,3$  min) und einer Erhöhung der maximal erreichten Wattzahl ( $26 \pm 23$  W). Zudem wurde eine Verbesserung der Lebensqualität von den Teilnehmenden als Folge des Sports angegeben. Diese wurde gemessen mit Hilfe des Short Form Health Survey, Version 2 (SF-36v2) und dem Cambridge Pulmonary Hypertension Outcome Review (CAMPHOR) (Chan, Chin et al. 2013). Wie in genannter Studie beobachtet, konnte auch in der Studie, auf welche diese Dissertation basiert, eine Assoziation von Training zur körperlichen Kapazitätsgrenze festgestellt werden. Hier zeigten sich Zusammenhänge zwischen 6MWD und Ergebnissen der Spiroergometrie. Je sportlicher, gemessen an der Ausdauer und an Parametern der Spiroergometrie, sich die Patienten auf dem Fahrradergometer verhielten, desto besser waren die Ergebnisse des 6MWD. Es stellte sich hier eine Korrelation zwischen den Werten des 6MWD und der Leistung auf dem Fahrradergometer der Erkrankten dar. Zudem wurde die erfasste Leistung der Patienten mit den Veränderungen der Immunzellen in Verbindung gebracht.

In einer anderen Studie von de Man et al. wurde wie in der Arbeit von Chan und Chin Verbesserungen der Funktionalität bei Patienten mit sportlicher Betätigung beobachtet. Hier wurde in einer Prä-Post-Studie bei IPAH-Patienten ein 12-wöchiges Training mit Fahrradfahren und Quadrizepstraining durchgeführt. Nach diesem Zeitraum von drei Monaten zeigten sich bei den Teilnehmern verbesserte Ergebnisse im 6-Minuten-Gehtest. Diese waren jedoch nicht signifikant. Veränderungen durch das körperliche Training wurde auch an der zu schaffenden Last unterhalb der anaeroben Schwelle gemessen. Hier zeigten sich signifikante Zahlen (Watt\_AT: 32 auf 46 Watt) (de Man, Handoko et al. 2009).

Grünig et al. veröffentlichten 2011 eine Studie zum Effekt von körperlichem und respiratorischem Training auf den Progress der PH-Erkrankung und den Einfluss auf das Überleben von Patienten mit schwerer PH. Es wurde vor allem die längerfristige Wirkung des Trainings auf die Erkrankung beobachtet. Für diese Studie schlossen die Autoren 58 Patienten ein, bei denen die Zeit bis zur klinischen Verschlechterung und das Überleben der Patienten evaluiert wurden. Eingeschlossen wurden nur solche Patienten, welche sich mit zielgerichteter Medikation in stabiler Therapie befanden. Diese erhielten zunächst drei Wochen im stationären Bereich oben genanntes Training, anschließend erfolgte dies

ambulant. Über zwei Jahre (24 Monate $\pm$  12 Monate) wurden die Probanden beobachtet. Nach 15 Wochen erschienen signifikante Verbesserungen im Vergleich zu den Ergebnissen vor dem Training hinsichtlich des 6MWD (von 440 $\pm$  90 m auf 527 $\pm$  74 m), der funktionellen WHO Klasse (von 2,9 $\pm$  0,5 auf 2,6 $\pm$  0,6), dem maximalen Sauerstoffverbrauch (von 12,5 $\pm$  3,0 auf 14,6 $\pm$  3,9 ml/min/kg), der Herzfrequenz in Ruhe (von 75 $\pm$  12 auf 61 $\pm$  18 Schläge/min) und der maximal erreichten Leistung (von 65 $\pm$  21 auf 80 $\pm$  25 W). Das Überleben nach einem und nach zwei Jahren war 100% und 95% (Grunig, Ehlken et al. 2011).

Hingegen der beschriebenen Studien, welche vor allem den längerfristigen Erfolg des sportlichen Trainings auf die PAH beobachteten, betrachtete diese Arbeit nur eine durch die körperliche Betätigung hervorgerufene kurzzeitige Veränderung des Immunsystems. Die Studie, auf der diese Dissertationsschrift basiert, zeigte eine positive Korrelation in der einzeitigen Kontrolle der Routineuntersuchungen, wie der Spiroergometrie und dem 6MWD. Weiterhin wurde eine signifikante Korrelation vom 6MWD mit den NTproBNP-Werten beobachtet. Das heißt je belastbarer die Patienten im klinischen Test waren, desto geringer war der Wert, der eine mögliche Herzinsuffizienz anzeigt. Die besseren Ergebnisse der körperlichen Belastbarkeit zeigten Zusammenhänge zum Entzündungszustand der Patienten, welcher durch Sport gesenkt wurde. Zusammenfassend kann vermutet werden, dass es durch Sport zur Immunmodulation kommt, welche mit der Belastungskapazität der Probanden zusammenhängt. Je ausgeprägter die Immunantwort auf körperliche Belastung ausfiel, desto besser waren die erreichten Aktivitätsparameter der Patienten. Es kann somit vermutet werden, dass dieses Phänomen der anti-entzündlichen Wirkung des Trainings auch die längerfristige Prognoseverbesserung der PAH indiziert.

## **4.2 Effekte des Trainings bei Tiermodellen mit experimenteller PH**

Um die Wichtigkeit der körperlichen Aktivität auf den PAH-Verlauf zu verdeutlichen sollen hier exemplarisch einige Studien mit Tiermodellen genannt werden, in denen signifikante Effekte der Aktivität auf den Verlauf der PH gezeigt wurden.

Natali et al. demonstrierten in einer Publikation von 2015, den positiven Effekt der körperlichen Aktivität auf die Überlebenszeit von PAH-betroffenen Ratten und der Zeit bis zum Eintreten eines Rechtsherzversagens (Natali, Fowler et al. 2015). In



der Studie wurde dies an Ratten untersucht, bei welchen durch Monocrotalin die Entstehung von einer PAH induziert wurde. Monocrotalin (MCT) ist ein Alkaloid der Pflanze *Crotalaria spectabilis*, welches nach einmaliger subkutaner Injektion in Ratten eine pulmonale Hypertonie mit vaskulärem Remodeling hervorruft (Hislop and Reid 1974). Die somit PAH-betroffenen Tiere wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. Eine Gruppe hatte Zugang zu einem Laufrad, die andere besaß keine Möglichkeit der zusätzlichen körperlichen Aktivität. Die Nutzung des Laufrades war für die Tiere freiwillig. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass die Ratten mit Laufrad ein längeres Überleben von im Mittel 5 Tagen hatten. Die aktiven Ratten, welche im Mittel 2 km/Tag im Laufrad liefen, hatten ein längeres Intervall bis zur Entwicklung von Herzversagen und ein Überleben von 28 Tagen. Die passiven Tiere starben nach 23 Tagen an Herzversagen. Mit dieser Untersuchung wurde schon bei Tieren gezeigt, dass eine körperliche Aktivität einen Überlebensvorteil gegenüber den Tieren mit einem passiven Lebensstil beinhaltete. Es gab jedoch keine Korrelation zwischen der täglichen Laufstrecke oder der gesamten Laufstrecke und der Überlebenszeit.

Eine andere Arbeitsgruppe beschäftigte sich auch mit Ratten, welche durch eine Monocrotalingabe und Hypoxie eine PAH entwickelten. Hargett und Mitarbeiter unterteilten die PAH-erkrankten Ratten in eine aktive und eine passive Gruppe. Zudem wurden eine aktive und eine passive Kontrollkohorte gebildet. Die aktive Gruppe musste am Laufbandtraining teilnehmen. Untersucht wurden die Tiere mit Hilfe des 6MWD und echokardiografischen Kontrolluntersuchungen. Im Herzultraschall der Ratten wurde das Verhältnis vom rechten Ventrikel zum linken Ventrikel und Septum gemessen. Im Laufe der Studie wurde zu mehreren Zeitpunkten eine Echokardiografie durchgeführt. Hierbei wurde zunächst kein Unterschied zwischen ruhenden und aktiven PAH-Ratten festgestellt. Die PAH der Ratten verhielt sich in beiden Gruppen progredient. Trotz dieser sich verschlechternden PAH hatten die Ratten der Laufgruppe keine Abnahme ihrer Leistung zu verzeichnen. Die Distanz der Trainingsstrecke sowie die zu absolvierende Zeit der körperlichen Aktivität zeigte keine Verschlechterung im Vergleich zu den Kontrollratten. Die PAH-erkrankten Ratten, die in der Gruppe des Trainings waren, hatten die gleiche Laufbandtrainingskapazität wie die Kontrollen (Hargett, Hartman et al. 2015). Es konnte somit ein sehr positiver Effekt des

körperlichen Trainings auf das klinische Erscheinungsbild der Ratten mit durch Monocrotalin-induzierter PAH festgestellt werden.

Eine weitere Arbeit untersuchte ebenso den Einfluss von Training auf die PAH. Es handelt sich um eine Studie von Moreira-Goncalves et al. Ebenso wie die Vorherigen wurde diese mit Ratten durchgeführt. Wiederum erhielten die Tiere eine MCT-Gabe, welches eine PAH induzierte. Untersucht wurde der Einfluss auf die Rechtsherzfunktion, auf den Gefäßumbau und auf das Überleben in experimenteller PAH. In dieser Arbeit differenzierten die Wissenschaftler den Einfluss von frühem Training auf oben genannte Faktoren, in Unterscheidung zur Wirkung von im späteren Stadium der PAH begonnenem Training. Eine dritte Gruppe erhielt kein Training, sondern war der gewöhnlichen Aktivität im Tierkäfig ausgesetzt. Beide Kohorten mit Übungsintervention resultierten in einer verbesserten kardialen Funktion obgleich die Persistenz des Hypertonus im rechten Herzen erhalten blieb. Zudem präsentierte sich dort eine erhöhte Trainingstoleranz mit besserem Überleben, vor allem in PAH-Ratten mit frühzeitig begonnenem Training. Begleitet wurde dies von Verbesserungen in Markern für kardialen Umbau, neurohumorale Aktivierung (reduziertes Endothelin-1, BNP und VEGF mRNA), Metabolismus und mitochondrialem oxidativen Stress. Die früh sportlichen Ratten erhielten zusätzlich Verbesserungen in Fibrose, TNFa und BNP.

Die Studie zeigt einerseits welche Wichtigkeit aerobes Training in experimentell zugefügter PAH besitzt, andererseits welchen kardioprotektiven Effekt dieses hat. (Moreira-Goncalves, Ferreira et al. 2015).

Zur Verdeutlichung des Effekts von Sport auf Tiermodelle mit experimenteller PAH wird hier nun eine Studie beschrieben, die mit einer großen Anzahl von Metriken etwas detaillierter ist und eventuell auf den menschlichen Organismus übertragen werden kann. Die von Colombo et al. durchgeführte Studie untersuchte die Einflüsse von Sport auf die rechtsventrikuläre Funktion. Es wurden vier Kohorten von Ratten gebildet, zwei von diesen bekamen eine intraperitoneale Monokrotalininjektion (MCT). Diese wurden unterteilt in eine Übungsgruppen und eine bewegungsarme. Zu beiden dieser Gruppen wurde eine Kontrollgruppe erstellt: diese hatten keine Monokrotalin-induzierte PAH. Die Ratten erhielten

zunächst zwei Wochen Übungen, danach wurden eine Echokardiografie und ein Geschwindigkeitstest durchgeführt. Daraufhin bekamen die Ratten das MCT gespritzt, welchem ein drei wöchiges Training mit regelmäßigen Leibesübungen auf einem Laufband für Nagetiere beinhaltet. Nach dieser Episode wurden der Geschwindigkeitstest und die Echokardiografie wiederholt und mit den Ausgangswerten, sowie mit den Werten der Kontrollratten verglichen (Colombo, Siqueira et al. 2015). In dieser aktuellen Studie wurden neben den echokardiografischen Parametern wie dem pulmonal-arteriellen Druck nach Rechtsherzhypertrophiezeichen gesucht. Der PAP zeigte nur Unterschiede zwischen MCT und CTR. Das Training rief keine Unterschiede hervor. Bei den Hypertrophiezeichen zeigten sich keine Differenzen zwischen CTR und MCT. Signifikante Veränderungen, die in dieser Studie auffielen, waren eine durch Sport induzierte Abnahme der Konzentration von Wasserstoffperoxid, welche mit einer Reduktion apoptotischer Proteine im rechten Ventrikel einhergeht.

Somit gab es schon einige Studien, die den positiven Effekt des körperlichen Trainings vor allem bei Tieren mit experimenteller PAH belegen. Ein großer Fortschritt für die PAH-Forschung wäre es herauszufinden, ob es eine spezifische Ursache für den positiven Trainingseffekt auf die Morbidität und Mortalität der PAH-Kranken gibt. Zudem stellt sich die Frage, ob bei Menschen dieser Effekt ähnlich ausgeprägt vorkommt wie bei oben genannten Tiermodellen.

In diesem Fall kommt die Bedeutung des Immunsystems zur Geltung. Eine inflammatorische Komponente der PAH ist bekannt (Rabinovitch, Guignabert et al. 2014) und eine Immunmodulation durch körperliche Aktivität bei anderen chronischen Erkrankungen (Bilski, Mazur-Bialy et al. 2016) wurde mehrfach beschrieben. Es gibt jedoch noch keine Datenlage zum immunmodulatorischen Effekt des Trainings auf die PAH-Erkrankung. Dies wurde somit erstmalig in dieser Studie untersucht wurde.

#### **4.3 Einfluss von Sport auf das Immunsystem und PAH**

Wie schon zuvor beschrieben gibt es einige Arbeiten, die einen positiven Effekt der körperlichen Aktivität auf den Krankheitsverlauf von diversen chronischen Erkrankungen sowie der PAH dokumentieren. Vor allem wurden diese an

Beispielen von Studien mit Tiermodellen durchgeführt. Bisher gibt es keine Studien, die den genauen Einfluss von Sport auf das Immunsystem bei Menschen mit PAH untersucht haben und beschreiben. Bei anderen chronischen Erkrankungen sind jedoch Einflüsse vom körperlichen Training auf das Immunsystem bekannt. Nun konnte in dieser Arbeit endlich der Einfluss von Training auf das Immunsystem bei PAH-Patienten gezeigt werden. Dies wurde in dem Studiendesign einer Querschnittsstudie punktuell veranschaulicht.

Um die positive Wirkung auf Krankheitsverläufe hervorzuheben, werden einige Studien vorgestellt, die vor allem mit Hilfe von Tiermodellen, die immunmodulatorischen Effekte der körperlichen Aktivität untersucht haben. Beispielhaft wird hier ein sehr aktuelles Paper vorstellen, welches im Mai 2016 veröffentlicht wurde (Bilski, Mazur-Bialy et al. 2016). In dieser Studie wurden Menschen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), sowie Tiermodelle mit experimenteller Colitis untersucht. Es wurde beobachtet, dass ein moderates Training positive Effekte auf die CED haben kann, sowie die Heilung der experimentell hervorgerufenen Colitis beschleunigt. Diese protektiven Effekte werden hervorgerufen durch die Aktivität von Myokinen, wie Irisin, welche aus dem arbeitenden Muskel freigesetzt werden. CED Patienten mit einem höheren Level von Training hatten ein deutlich geringeres Risiko eine Aktivierung der Erkrankung innerhalb von sechs Monaten zu entwickeln. Darüber hinaus hatte die körperliche Aktivität einen positiven Effekt auf die Stimmung, das Gewichtverhalten und Osteoporose. Andererseits bestand die Gefahr, je nach Ausdauer und Intensität der Übungen, eine milde Inflammation durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu provozieren und somit gastrointestinale Symptome auszulösen.

Schon im Jahre 2000 gab es eine Veröffentlichung zu einer prospektiven Studie. Diese umschloss 1500 Teilnehmer, die über einen Zeitraum von 18 Jahren (1978-1996) regelmäßig untersucht wurden. Hier wurde zu Beginn der Studie eine Blutentnahme mit Analyse der Akute-Phase-Proteine, wie dem CRP-Wert, der Leukozytenzahl, dem Serum-Amyloid-A-Protein, aber auch dem Anti-Akute-Phase-Protein wie z.B. dem Serumalbumin abgenommen. Bei den Teilnehmern im Alter von 40- 59 Jahren wurde überprüft, ob es zur Entstehung einer koronaren Herzkrankheit oder zum Herzinfarkt kam. Von den anfänglich in die Studie aufgenommenen Männern erlitten 500 ein kardiovaskuläres Ereignis, 1000 blieben

verschont. Darunter hatten Teilnehmer mit einem CRP-Wert im oberen Drittel ein deutlich erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit (Odds Ratio von 2,13). Ebenso zeigte sich eine erhöhte Gefahr für eine KHK bei erhöhten Leukozytenzahlen (Odds Ratio: 1,12), beim Serum-Amyloid-A-Protein (1,65) und eine Risikoreduktion um 0,67 bei einer anfänglich höheren Konzentration des Albumins (Danesh, Whincup et al. 2000). Hier wurde schon ein Zusammenhang zwischen leichtgradiger chronischer Inflammation und der Entstehung von kardiovaskulären Ereignissen festgestellt.

Weiterhin sei eine Studie erwähnt, die Zusammenhänge zwischen dem metabolischen Syndrom und Inflammation untersucht. Bei Patienten mit metabolischem Syndrom (Übergewicht, Typ 2 Diabetes, Hyperlipidämie, KHK, Atherosklerose, essenzielle Hypertonie) wurden die Entzündungsmarker im Blut untersucht. Hierbei zeigten sich bei Patienten mit metabolischen Syndrom häufig erhöhte Entzündungswerte (CRP-Wert, IL-6, TNFa) (Das 2004).

Eine entzündliche Komponente scheint somit bei einigen chronischen Erkrankungen von großer Bedeutung zu sein. Mehrmals wurde ein Stadium der Inflammation mit chronischen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Das Training, welches anti-inflammatorisch wirkt, scheint prognoseverbessernd und könnte vor allem bei der PAH als Ansatzpunkt für eine wichtige unterstützende, eventuell sogar kurative Therapie der PAH angesehen werden. Ein positiver Effekt von Sport auf den Erkrankungsverlauf wurde bestätigt. Es erscheint nun äußerst spannend den Entzündungszustand zu messen und diesen mit dem Krankheitszustand in Verbindung zu bringen und zu analysieren.

#### **4.4 Untersuchungen von immunmodulatorischen Botenstoffe beim Menschen**

Die Entstehung der PAH durch Veränderungen im Immunsystem wurde in der Literatur von einigen Veröffentlichungen dargelegt. Hier zeigten sich vor allem Auffälligkeiten bei der Konzentration von Interleukinen und Th-Zellen. Die Bedeutung von dem untersuchten IL-6 und den Th17-Zellen auf den Krankheitsverlauf wird im Folgenden dargelegt und mit der sportlichen Aktivität in Zusammenhang gebracht.

#### 4.4.1 IPAH und IL-6

In dieser Arbeit wurde die Konzentration der IL-6-Konzentration bei PAH-Patienten als wichtig erachtet und diese untersucht. Diese Einschätzung der Wichtigkeit wurde durch folgende Arbeiten verursacht. Zum Beispiel wurde das Interleukin-6 schon in einigen Veröffentlichungen als ein die PH-Entstehung beeinflussender Parameter beschrieben. Die Übersichtsarbeit zur Entstehung der PH von Rabinovitch et al. von 2012 veranschaulichte die Bedeutung des Interleukins. Hier beschreiben die Autoren eine bei den PH-erkrankten Probanden beobachtete abnormale Erhöhung des IL-6. IL-6 ist ein Interleukin, welches proinflammatorisch wirkt und die Migration, Zellproliferation und die Differenzierung der Gefäßzellen beeinflusst. Dieser Botenstoff fördert die Produktion von glatten Muskelzellen über die Induktion der FGF2 (Courboulin, Tremblay et al. 2011). Somit ruft das Interleukin ein Gefäßremodelling der Pulmonalarterien hervor und verstärkt die hypertensive Antwort der Gefäße auf chronische Hypoxie (Miyata, Sakuma et al. 1995, Golembeski, West et al. 2005).

In einer Mausstudie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit IL-6-Überexpression spontan eine PH entwickelten und dadurch ein Gefäßumbau provoziert wurde. Zudem zeigten IL-6-Knockoutmäuse eine Resistenz gegen die durch chronische Hypoxie induzierte PH-Entwicklung (Savale, Tu et al. 2009, Tu, De Man et al. 2012).

Weiterhin demonstrierten Soon et al. in ihrer Publikation einen Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen im Blut und dem Überleben der Patienten mit IPAH oder HPAH (Soon, Holmes et al. 2010). Patienten mit einer höheren Konzentration von IL-6 hatten eine schlechtere Überlebenszeit als Patienten mit geringeren Interleukin-Werten.

Die IPAH-Gruppe, welche in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigte in Ruhesituation enorm hohe IL-6-Werte im Vergleich zur CTR (IPAH:  $5,752 \pm 4,606$ ; CTR:  $0,809 \pm 1,512$ ;  $p = 0,01$ ). Nach einer körperlichen Belastung konnten signifikant erniedrigte Level von IL-6 bei IPAH-Patienten im Vergleich zur Ruhesituation aufgezeigt werden. Die in der Einleitung genannte Arbeit von Fischer beschrieb hingegen einen aktivitätsbedingten Anstieg von IL-6 und es wurden zudem die möglichen Mechanismen der IL-6-Zunahme erläutert. Vor allem bei längerer körperlicher Aktivität kam es durch Muskelaktivität und Abbau von viszeralem Fett zum starken Anstieg von IL-6 (Fischer 2006). Dieser Anstieg

schien jedoch von der Dauer der Belastung abzuhängen. Eine längere Belastung verursachte einen expressionellen Prozess, der zu einem IL-6-Anstieg führte. Dieser Vorgang trat bei kurzer Belastungsdauer nicht oder nur in geringerem Ausmaße auf. Bei einem kleineren Zeitintervall von körperlicher Aktivität konnte eine leichte IL-6-Erhöhung nach Belastung beobachtet werden. Dies konnte auch in dieser Studie verzeichnet werden, jedoch nur in der gesunden Kontrollgruppe. Bei der IPAH-Gruppe hingegen, welche in Ruhesituation vermehrte IL-6-Werte im Vergleich zur CTR aufzeigte (IPAHA:  $5,752 \pm 4,606$ ; CTR:  $0,809 \pm 1,512$ ;  $p = 0,01$ ), kam es zur signifikanten Abnahme von IL-6 (Delta pre\_post2:  $-2,787 \pm 5,056$ ,  $p = 0,022$ ). Die vermuteten Mechanismen der Interleukinzunahme scheinen bei den IPAH-Patienten nicht zu wirken. Zudem könnte die stark erhöhte IL-6-Konzentration, welche die Ausgangssituation darstellte, andere Auswirkungen hervorrufen.

Weiterführend konnte in meiner Studie eine Korrelation von IL-6-Abnahme und der maximalen Sauerstoffaufnahme bei der Kohorte der Patienten beobachtet werden. Je größer die Abnahme der IL-6 war, desto belastbarer, dargestellt mit der maximalen Sauerstoffaufnahmekapazität, waren die Patienten (siehe Abb.17). Damit kann gefolgert werden, dass die durch Sport provozierte Abnahme der Interleukine 6 möglicherweise einen positiven Effekt auf die Erkrankungsschwere gemessen an der körperlichen Belastbarkeit hat.

In der durchgeführten Studie zeigten sich signifikante Differenzen der IL-6-Konzentration zwischen IPAH und CTR. Ebenso korrelierte im Patientenkollektiv die gemessenen IL-6-Werte mit Ergebnissen des Rechtsherzkatheters (mPAP, RAP), sowie mit den Ergebnissen der Spiroergometrie (z.B. Watt\_max, Watt\_AT, VO2\_AT, VE\_AT, VCO2\_AT). Es kann die Hypothese ausgesprochen werden, dass es möglich sein könnte, mit Hilfe des Interleukin-Wertes frühzeitig eine Prognose der Erkrankungsschwere und des Krankheitsprogresses zu stellen. Dies wäre sehr hilfreich, denn so könnte dieses wenig invasive Verfahren als Verlaufs- und Prognoseparameter genutzt werden. Eine Möglichkeit wäre es, in einer weiteren, längerfristigen Studie, die Korrelation des IL-6-Wertes mit dem Krankheitsverlauf zu eruieren. Bei einem erfolgreichen, diese Datenlage bestätigenden Ausgang weiterer Studien, könnte man mit Hilfe einer Blutentnahme mit anschließender Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) den Krankheitsprozess einschätzen und möglicherweise die häufigen, teils

vierteljährlich stattfinden Rechtsherzkatheteruntersuchungen reduzieren. Zudem kann die Reduktion des IL-6-Spiegels unter körperlichem Training bzw. unter einem kontrollierten Trainingsprogramm dessen Effektivität anzeigen. Als Folge kann sich daraus die Möglichkeit der Personalisierung eines Trainingsprogrammes ergeben. Patienten, deren IL-6-Spiegel weniger stark unter Trainingsbedingungen abfallen, können möglicherweise von einer Intensivierung des Trainingsprogrammes profitieren.

In diesem Studienaufbau wurde der kurzfristige immunmodulatorische Effekt der sportlichen Aktivität dargestellt. Es kam zur Abnahme des entzündlichen IL-6. Eine signifikante Korrelation zeigte sich hier mit der Belastungskapazität. Nachfolgend wäre der Einfluss von längerfristigem, kontinuierlichen Training auf die Entzündungsbotenstoffe und der körperlichen Belastbarkeit interessant.

#### **4.4.2 IPAH und Th17**

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von autoimmunen Krankheitsbildern (Damsker, Hansen et al. 2010). Die Untergruppe der Th17-Zellen können Entzündungsreaktionen verursachen, die Autoimmunerkrankungen herbeiführen können, indem die Th17-Zellen proinflammatorische Botenstoffe, wie IL-6 und TNF $\alpha$  produzieren. In einigen Arbeiten konnte schon die Wichtigkeit der Th17-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunität gezeigt werden. So beschreiben Luger et al. in ihrer Veröffentlichung von 2008 den Effekt der Th1- und Th17-Zellen. Die Autoren untersuchten Patientin mit autoimmuner Uveitis (Luger, Silver et al. 2008).

Auch spezifisch bei der PAH konnte eine erhöhte Konzentration von Th17 im Blut festgestellt werden. Hautefort et al. führten eine Studie durch, in der sie von PAH-Patienten und einer Kontrollkohorte Blut mittels Fluoreszenzzytometrie auf dendritische Zellen und Lymphozyten untersuchten (Hautefort, Girerd et al. 2015). Hier wurden die Th17-Konzentrationen bei PAH und CTR verglichen, wobei eine deutliche Th17-Polarisierung bei den Patienten beobachtet wurde. Die sportliche Aktivität hatte eine sofortige signifikante Abnahme der Th17-Zellen zur Folge. Diese Reduktion der Th17-Lymphozyten korrelierte mit der Belastbarkeit der Patienten, je stärker die Abnahme, desto belastbarer erschienen die Patienten. Wie bei Hautefort et al. konnte auch in der Studie, auf welcher diese Dissertationsschrift basiert, eine deutliche Abnahme der Th17-Zellen verzeichnet



werden. Zudem korrelierte die Stärke der Reduktion umgekehrt proportional mit der maximalen Sauerstoffaufnahme. Somit kann mit der Veränderung der Th17-Zellen die Krankheitsprogression eingeschätzt werden. Wie schon bei der IL-6-Konzentration beschrieben, könnte dann auch über die Bestimmung der Th17-Konzentration der Krankheitsverlauf bewertet werden. Womöglich würde die Effektivität der Therapie über die Analyse der CD4+-Zellen-Konzentration eingeschätzt und danach moduliert werden.

Die Bedeutung der sportlichen Aktivität auf den Immunstatus wurde bestätigt und zudem zeigte eine Reduktion der inflammatorischen Botenstoffe und Zellen einen positiven Effekt auf die Leistungsfähigkeit der Patienten. In den anfänglich erwähnten Studien wurde schon die soeben genannte positive Wirkung auf den Krankheitsverlauf beschrieben, aber die detaillierte Bedeutung des Sports spezifisch auf das Immunsystem in Bezug zur PAH konnte erstmalig in dieser Arbeit dargelegt werden.

#### **4.5 Diese Studie**

Ein chronisches Stadium der Inflammation bei Patienten mit IPAH konnte, wie schon in der Einleitung zitiert, wiederholt demonstriert werden. Dieses wurde durch erhöhte Level von zirkulierenden Markern, wie IL-6 oder den T-regulatorischen Lymphozyten, welche den Zustand einer chronischen Entzündung darlegen, präsentiert (Soon, Holmes et al. 2010, Perros, Dorfmueller et al. 2012, Cracowski, Chabot et al. 2014). Zu diesen bekannten Daten passend wurden auch in dieser Studie eine erhöhte Konzentration von IL-6 und CD4+-Lymphozyten nachgewiesen. Vor der Belastung zeigte sich im Blut der Patienten eine höhere Konzentration von Th2-Lymphozyten, eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Zahl an Treg-Zellen, sowie eine erhöhte IL-6-Konzentration. Gleichzeitig zeigte sich vor der körperlichen Belastung bei dem Patientenkollektiv eine niedrigere Th1/Th17-Lymphozytenzahl.

Wie diese Studie mit Ergebnissen veränderter T-Lymphozyten-Konzentrationen bestätigt, ruft körperliches Training eine Veränderung des chronischen Entzündungsstatus bei den Erkrankten hervor. Eine einzige Sporeinheit provozierte bei den Probanden der Patientengruppe eine Reduktion der Th17-Lymphozyten, dessen Verminderung zudem mit der Belastungskapazität der

Teilnehmenden korrelierte. Die Belastbarkeit, gemessen durch den maximalen Sauerstoffverbrauch, war umso höher, je stärker die Th17-Abnahme war. Hautefort et al veröffentlichten 2015 hierzu einen Artikel, in welchem gezeigt wurde, dass Patienten mit pulmonal-arterieller Hypertonie ein dysreguliertes Immunsystem mit erhöhter Th17-Konzentration besitzen (Hautefort, Girerd et al. 2015). Th17 ist in verschiedene Autoimmunprozesse involviert. Somit kann hergeleitet werden, dass Autoimmunität ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und für das Fortschreiten einer PAH ist. Bisher gab es jedoch keine Studien, welche Th17-Veränderungen von PAH-Patienten mit klinischen Parametern wie der Belastungskapazität in Verbindung bringen.

Körperliches Training, das körperlichen Stress verursacht, scheint eine Umverteilung von T-Lymphozyten, sowohl in lymphatischen Organen, als auch in nicht lymphatischen Organen, zu provozieren. Als Folge sportlicher Anstrengung wurde eine Lymphozytenabnahme in der Milz beobachtet, sowie eine Zunahme von Lymphozyten in der Lunge, im Knochenmark und in Peyer Plaques (Krüger and Mooren 2007, Adams, Zaldivar et al. 2011, Walsh, Gleeson et al. 2011). Wie schon in den zuvor genannten Arbeiten, wurde auch in dieser Arbeit ein durch körperliche Aktivität hervorgerufener Anstieg der zirkulierenden Lymphozytenzahl beobachtet. Nach der Belastung war eine signifikante Erhöhung von Leukozyten und Lymphozyten festzustellen. Die Lymphozytenverteilung wird durch diverse Fähigkeiten der Lymphozyten mit Endothelzellen unterschiedlicher Gewebe zu interagieren kontrolliert und somit wird die Immunregulation variiert (Krüger and Mooren 2007). Sportliche Aktivität könnte hierbei die krankheitsspezifischen Adhäsionsmoleküle auf den Lymphozyten, sowie die Liganden auf den Endothelzellen verändern, welches durch eine durch Sport verursachte Veränderung der Zytokinlevel im Blut hervorgerufen werden (Kakanis, Peake et al. 2014), (Perry, Pick et al. 2013), (Zhao, Zhou et al. 2012). Die Umverteilung der Lymphozyten als eine Reaktion auf die körperliche Aktivität könnte ebenso durch eine lymphozyteneigene Aktivierung entstehen. Randständige Lymphozyten, welche möglicherweise eine andere Funktionalität aufweisen als die schon vor der Belastung zirkulierenden Zellen, gehen durch körperliche Aktivität ins zirkulierende Blut über (Walsh, Gleeson et al. 2011).

#### **4.5.1 Mögliche Verbesserungen im Studiendesign**

Bei Rekapitulation des Studienaufbaus ergibt sich ein Verbesserungspotential für weitergehende und reproduzierbare Studien. Da nur zwölf Probanden aus dem IPAH-Patientenkollektiv und zehn in der Kontrollgruppe untersucht wurden, bestand ein kleines Probandenkollektiv. Dies könnte bewirken, dass die Ergebnisse nicht signifikant sind und somit nicht zuverlässig auf die Allgemeinbevölkerung übertragen werden können. Daher wäre es äußerst spannend den Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und Immunantwort in einer größeren Kohorte zu untersuchen. Weiterhin wäre ein interessanter Aspekt die körperliche Aktivität und dessen Auswirkungen auf die Erkrankung über einen längeren Zeitraum zu betrachten.

In dieser Studie wurden nur die kurzzeitigen Auswirkungen der körperlichen Aktivität auf den Entzündungsstatus der Patienten und die Immunmodulation beobachtet und analysiert. Weitergehend wäre nun die Erhebung der Wirkung von andauernder, konsequenter, sportlicher Aktivität auf das Immunsystem der folgerichtige nächste Schritt für die praxistaugliche Anwendbarkeit der vorliegenden Erkenntnisse. Dies sollte in einer weiteren länger andauernden Studie mit einer größeren Probandenzahl untersucht werden. Mit einer weiterführenden Studie kann die Wichtigkeit und die Wirkweise des kontrollierten Trainings verdeutlicht werden.

## 5 Zusammenfassung

Abschließend wird diese Dissertationsschrift in Kurzform zusammengefasst. Zunächst erfolgt eine kurze Darstellung des Hintergrunds, welcher zur Entwicklung des Studienaufbaus geführt hat. Der Versuchsablauf wird beschrieben, sowie die wichtigsten Ergebnisse und die Diskussion mit Fazit für den klinischen Alltag werden resümiert.

**Hintergrund:** Die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH) gilt als eine sehr seltene Erkrankung, welche mit unspezifischen Symptomen beginnt. Ein progressiver Krankheitsverlauf ist charakteristisch für diese Erkrankung. Durch eine Lumenverengung der Pulmonalarterien, die durch Vasokonstriktion sowie Hyperproliferation von Endothel, glatten Muskeln und Einwanderung von inflammatorischen Zellen in der Gefäßwand verursacht wird, kommt es zum chronisch erhöhten Druck im Lungenkreislauf. Im Verlauf dekompensiert das rechte Herz mit der Folge eines Rechtsherzversagens und eines frühzeitigen Ablebens der Betroffenen. Zunehmend wird dabei eine Rolle des Immunsystems bei der Erkrankungsentstehung und –progression festgestellt, dessen Modulation einen therapeutischen Ansatz darstellen kann.

**Methoden:** In diese Studie wurden zwölf IPAH-Patienten und zehn Kontrollen (CTR) aufgenommen und vor und nach körperlicher Auslastung auf dem Spiroergometer Blutproben entnommen, die mittels Durchflusszytometrie und ELISA auf Veränderungen von zirkulierenden Leukozyten und Zytokinen untersucht wurden. Ferner wurden weitere klinische Untersuchungen, die den Krankheitsverlauf überwachen, durchgeführt und mit den Veränderungen in Zusammenhang gebracht.

**Ergebnisse:** Es ließen sich signifikante Differenzen der Zellkonzentrationen zwischen IPAH und CTR messen. Vor Belastung zeigten IPAH-Patienten eine höhere Konzentration von Th2-, regulatorischen T-Zellen und IL-6 sowie einen geringen Th1/Th17-Anteil. Durch körperliche Aktivität war eine transiente Zunahme der Leuko- und Lymphozytenzahl zu verzeichnen. Diese verhielt sich in beiden Studiengruppen vergleichbar. Weiterhin rief die körperliche Belastung eine signifikante Th17-Abnahme hervor, welche mit der maximalen Sauerstoffaufnahme korrelierte. Diese kann als Maß für die Belastungskapazität

angesehen werden. Ebenso reduzierte sich die Konzentration von IL-6 mit einer negativen Korrelation mit der maximalen Sauerstoffaufnahme.

**Diskussion:** In dieser deskriptiven Studie konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen dem Immunsystem und einer körperlichen Belastung bei Patienten mit IPAH demonstriert werden. Die körperliche Belastung scheint die chronische Entzündung, die bei Patienten mit IPAH festzustellen ist, nicht zu aggravieren. Ferner kann eine Modulation der zirkulierenden Untergruppen der T-Lymphozyten und Zytokine beobachtet werden, welche bei Patienten mit IPAH mit der Trainingskapazität, gemessen an dem Sauerstoffspitzenverbrauch, korreliert.

Durch diese Studie kann somit ein besseres Verständnis über den Effekt des körperlichen Trainings bei IPAH-Patienten und einer möglichen Überwachung des Trainings gewonnen werden. Ferner kann durch diese Arbeit vermutet werden, dass die vorbekannte beschriebene Verbesserung des PAH-Krankheitsverlaufs mit Hilfe von Training möglicherweise zu einem Teil durch eine Immunmodulation verursacht wird.

## **Abstract**

**Introduction:** Idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) is a rare disease starting with unspecific symptoms following progressive aggravation. A loss of lumen of pulmonary arteries due to vasoconstriction, endothelial hyperproliferation and migration of inflammatory cells induces higher pressure in blood circulation through lungs. Consequences are right heart failure leading to a premature death of patients. Changes of immune system are reasons for the appearance and development of IPAH. Therefore, modulations of the immune system could afford an improvement in therapeutic options.

**Methods:** In this clinical trial twelve patients and ten controls (CTR) were involved. The participants were stressed by physical activity on a bicycle. Before and two times after physical activity blood samples were taken. Changes of circulating leucocytes and cytokines were investigated using flow cytometry and ELISA. Additional clinical tests were carried out to supervise the progression of disease. Correlations between clinical tests and changes of leucocytes and cytokines were explored.

**Results:** Concentrations of cells in IPAH were significantly different to those of CTR. IPAH patients had a higher concentration of Th2-, regulatory T-cells and interleukin 6. Furthermore there was a smaller amount of Th1/Th17-cells. Physical activity induced a transient increase of leucocytes and lymphocytes. This increase was similar between patients and controls. After physical activity there was a significant reduction of Th17-cells. This reduction correlated with the capacity represented by the maximum oxygen consumption. Furthermore a reduction of IL-6 was noticed which also correlated with the maximum oxygen consumption.

**Discussion:** This trial could demonstrate a relation between immune system and physical activity among patients with IPAH. Patients have a higher level of inflammatory cells. Activity seems not to worsen the inflammatory state. Modulations of circulating subtypes of T-lymphocytes and cytokines were noticed. This change correlates with the loading capacity. Therefore, the clinical trial at hand enables a better comprehensibility of meaning and effects of physical activity among patients with IPAH. At least it can be assumed that the changes of immune system induce the already known effect of improved prognosis of IPAH by physical activity.

## **6 Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis**

- S. 5 *Abb. 1: Einteilung pulmonale Hypertonie (Rosenkranz 2015)*
- S. 10 *Abb. 2: Pathologische Veränderungen mit inflammatorischen Zellen und plexiformen Läsionen (Rabinovitch 2012)*
- S. 23 *Abb. 3: Projektskizze*
- S. 30 *Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Antikörper*
- S. 32 *Tabelle 2: Vom Zytometer gemessene periphere Blutzellen*
- S. 32 *Abb. 4: Beispiel für FACS-Aufteilung der Zellpopulationen*
- S. 36 *Tabelle 3: Base-line Parameter, IPAH vs. Kontrollen (CTR) und Signifikanz*
- S. 39 *Abb. 5: Veränderungen der Leukozytenpopulation bei erkrankten und gesunden Probanden im Vergleich, vor und nach Belastung*
- S. 39 *Abb. 6: Lymphozytenpopulationen, Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Studienteilnehmern, sowie vor und nach der Belastung*
- S. 41 *Abb. 7: Veränderungen der B-Lymphozyten durch körperliche Aktivität, Vergleich zwischen IPAH-Patienten und Kontrollen (healthy subjects)*
- S. 42 *Abb. 8: Korrelation T-Lymphozyten-Veränderungen mit dem Gehstest und der maximaler Sauerstoffaufnahme/kg*
- S. 43 *Abb. 9: Korrelation von TCRgd-T-Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und VE/VCO<sub>2</sub>*
- S. 44 *Abb. 10: Korrelation von NKT-Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und 6MWD*
- S. 44 *Abb. 11: Korrelation von zytotoxischen T-Zellen mit Peak VO<sub>2</sub>/kg und 6MWD*
- S. 46 *Abb. 12: Korrelation Th17-Veränderung durch Belastung*
- S. 46 *Abb. 13: Th17-Lymphozytenveränderung IPAH – CTR*
- S. 47 *Abb. 14: Korrelation Th17-Lymphozyten mit 6MWD und Peak VO<sub>2</sub>/kg*
- S. 48 *Abb. 15: Korrelation Treg mit 6MWD und Peak VO<sub>2</sub>/kg*
- S. 49 *Abb. 16: Veränderungen der IL-6-Konzentration bei IPAH sowie CTR vor und nach Belastung*

S. 49      *Abb. 17: Korrelation von IL-6-Veränderung mit der maximalen Sauerstoffaufnahme/kg und dem Äquivalent der Carbondioxideliminierung*



## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropen Hormon
AT	anaerobe Schwelle
BMI	Body-Mass-Index
BMP	bone morphogenic protein
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor 2
BNP	brain natriuretic peptide
B-Zellen	Lymphozyten, gereift im Knochenmark (bone marrow)
CAMPHOR	Cambridge Pulmonary Hypertension Outcome Review
CCL5	Chemokinligand 5
CD	Cluster of differentiation
CED	chronisch entzündlichen Darmerkrankungen
COPD	chronisch obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
CTEPH	chronic thromboembolic pulmonary hypertension
CTR	Kontrollgruppe
EKG	Elektrokardiografie
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FEV1	forced expiratory volume in 1 second
FVC	funktionelle Vitalkapazität
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FPAH	familiäre pulmonalerterielle Hypertonie
Gamma-GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GM-CSF	granulozytes-macrophages colony-stimulating-factor
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gr.	Gruppe der PH-Klasse
HIV	human immunodeficiency virus
HR	Herzfrequenz
IL-1RA	IL-1 Rezeptor Antagonist
INR	international normalized ratio
IL-1, IL-6	Interleukine 1, 6

IPAH	idiopathisch pulmonalarterielle Hypertonie
K-S-Test	Kolmogorow-Smirnow-Test: statistischer Test auf Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MCT	Monokrotalin
mPAP	Mittlerer PAP
MWU-Test	Man-Whitney-U-Test
M1 und M2	Makrophagen Typ 1, Typ 2
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NTproBNP	n-terminales proBNP
NYHA	New York Heart Association
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	pulmonal-arterieller Druck
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCWP	pulmonal-kapillärer Verschlussdruck= Wedge-Druck
Peak VO <sub>2</sub>	maximale Sauerstoffaufnahme
Peak VO <sub>2</sub> /kg	max. Sauerstoffaufnahme pro Kilogramm
PH	pulmonale Hypertonie
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand
rANOVA	repeated analysis of variance
RR	Blutdruck
RVSP	right ventricle systolic pressure
2SF-36v2	Short Form Health Survey, version
sGCS	soluble guanylate cyclase stimulator
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences; Programm für die statistische Analyse
T-Zellen	im Thymus gereifte Lymphozyten
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TCRgd-Zellen	gamma delta T-Zellen mit T-Zell-Rezeptor
Tei-Index	myocardal performance index
Th1	T-Helferzellen

TLR	Toll-like-Rezeptoren
TLCO	transfer factor of the lung for carbon monoxide
Treg-Zellen	regulatorische T-Zellen
TTE	transthorakaler Echokardiografie
TNF-a	Tumornekrosefaktor a
T-Test	Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf
VC	vital capacity
VEGF	vascular endothelial growth factor
VO <sub>2</sub> _AT	maximale Sauerstoffaufnahme an AT
VE_max	maximales Atemminutenvolumen
VE_AT	Atemminutenvolumen an AT
VCO <sub>2</sub> _Max	maximale Karbondioxidabgabe
VCO <sub>2</sub> _AT	maximale Karbondioxidabgabe an AT
VE/CO <sub>2</sub> _AT	ventilatory equivalents for carbon dioxide at AT
WHO	World health organisation
6MWD	6-minutes-walking-distance= 6-Minuten-Gehtest

## 8 Literaturverzeichnis

Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-646.

Adams, G. R., F. P. Zaldivar, D. M. Nance, E. Kodesh, S. Radom-Aizik and D. M. Cooper (2011). "Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle." Brain, behavior, and immunity **25**(4): 658-666.

Alastalo, T. P., M. Li, J. Perez Vde, D. Pham, H. Sawada, J. K. Wang, M. Koskenvuo, L. Wang, B. A. Freeman, H. Y. Chang and M. Rabinovitch (2011). "Disruption of PPARgamma/beta-catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival." J Clin Invest **121**(9): 3735-3746.

Arcasoy, S. M., J. D. Christie, V. A. Ferrari, M. S. Sutton, D. A. Zisman, N. P. Blumenthal, A. Pochettino and R. M. Kotloff (2003). "Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension in patients with advanced lung disease." Am J Respir Crit Care Med **167**(5): 735-740.

Atkinson, C., S. Stewart, P. D. Upton, R. Machado, J. R. Thomson, R. C. Trembath and N. W. Morrell (2002). "Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor." Circulation **105**(14): 1672-1678.

Babu, A. S., R. Padmakumar, A. G. Maiya, A. K. Mohapatra and R. L. Kamath (2016). "Effects of Exercise Training on Exercise Capacity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review of Clinical Trials." Heart Lung Circ **25**(4): 333-341.

Badesch, D. B., H. C. Champion, M. A. Sanchez, M. M. Hoeper, J. E. Loyd, A. Manes, M. McGoon, R. Naeije, H. Olschewski, R. J. Oudiz and A. Torbicki (2009). "Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S55-66.

Baeten, D., A. M. Boots, P. G. Steenbakkers, D. Elewaut, E. Bos, G. F. Verheijden, G. Berheijden, A. M. Miltenburg, A. W. Rijnders, E. M. Veys and F. De Keyser (2000). "Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(6): 1233-1243.

Bedard, E., K. Dimopoulos and M. A. Gatzoulis (2009). "Has there been any progress made on pregnancy outcomes among women with pulmonary arterial hypertension?" Eur Heart J **30**(3): 256-265.

Bilski, J., A. Mazur-Bialy, B. Brzozowski, M. Magierowski, J. Zahradnik-Bilska, D. Wojcik, K. Magierowska, S. Kwiecien, T. Mach and T. Brzozowski (2016). "Can exercise affect the course of inflammatory bowel disease? Experimental and clinical evidence." Pharmacol Rep.

Chan, L., L. M. Chin, M. Kennedy, J. G. Woolstenhulme, S. D. Nathan, A. A. Weinstein, G. Connors, N. A. Weir, B. Drinkard, J. Lamberti and R. E. Keyser (2013). "Benefits of intensive treadmill exercise training on cardiorespiratory function and quality of life in patients with pulmonary hypertension." Chest **143**(2): 333-343.

Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2005). "Adipocyte death defines macrophage

localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-2355.

Clark, S., E. Page, T. Ford, R. Metcalf, A. Pozniak, M. Nelson, D. C. Henderson, D. Asboe, F. Gotch, B. G. Gazzard and P. Kelleher (2011). "Reduced T(H)1/T(H)17 CD4 T-cell numbers are associated with impaired purified protein derivative-specific cytokine responses in patients with HIV-1 infection." J Allergy Clin Immunol **128**(4): 838-846 e835.

Colombo, R., R. Siqueira, A. Conzatti, T. R. Fernandes, A. M. Tavares, A. S. Araujo and A. Bello-Klein (2015). "Aerobic Exercise Promotes a Decrease in Right Ventricle Apoptotic Proteins in Experimental Cor Pulmonale." J Cardiovasc Pharmacol **66**(3): 246-253.

Courboulin, A., V. L. Tremblay, M. Barrier, J. Meloche, M. H. Jacob, M. Chapolard, M. Bisserier, R. Paulin, C. Lambert, S. Provencher and S. Bonnet (2011). "Kruppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension." Respir Res **12**: 128.

Cracowski, J. L., F. Chabot, J. Labarere, P. Faure, B. Degano, C. Schwebel, A. Chaouat, M. Reynaud-Gaubert, C. Cracowski, O. Sitbon, A. Yaici, G. Simonneau and M. Humbert (2014). "Proinflammatory cytokine levels are linked to death in pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **43**(3): 915-917.

Damsker, J. M., A. M. Hansen and R. R. Caspi (2010). "Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators." Ann NY Acad Sci **1183**: 211-221.

Danesh, J., P. Whincup, M. Walker, L. Lennon, A. Thomson, P. Appleby, J. R. Gallimore and M. B. Pepys (2000). "Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses." BMJ **321**(7255): 199-204.

Das, U. N. (2004). "Metabolic syndrome X: an inflammatory condition?" Curr Hypertens Rep **6**(1): 66-73.

de Man, F. S., M. L. Handoko, H. Groepenhoff, A. J. van 't Hul, J. Abbink, R. J. Koppers, H. P. Grotjohan, J. W. Twisk, H. J. Bogaard, A. Boonstra, P. E. Postmus, N. Westerhof, W. J. van der Laarse and A. Vonk-Noordegraaf (2009). "Effects of exercise training in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **34**(3): 669-675.

Dewachter, L., S. Adnot, E. Fadel, M. Humbert, B. Maitre, A. M. Barlier-Mur, G. Simonneau, M. Hamon, R. Naeije and S. Eddahibi (2006). "Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **174**(9): 1025-1033.

Fingerle-Rowson, G., M. Angstwurm, R. Andreesen and H. W. Ziegler-Heitbrock (1998). "Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy." Clin Exp Immunol **112**(3): 501-506.

Fischer, C. P. (2006). "Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?" Exerc Immunol Rev **12**: 6-33.

Fishman, A. P. (2001). "Clinical classification of pulmonary hypertension." Clin Chest Med **22**(3): 385-391, vii.

Flynn, M. G. and B. K. McFarlin (2006). "Toll-like receptor 4: link to the anti-inflammatory effects of exercise?" Exerc Sport Sci Rev **34**(4): 176-181.

Galie, N., M. M. Hoeper, M. Humbert, A. Torbicki, J. L. Vachiery, J. A. Barbera, M. Beghetti, P. Corris, S. Gaine, J. S. Gibbs, M. A. Gomez-Sanchez, G. Jondeau, W. Klepetko, C. Opitz, A. Peacock, L. Rubin, M. Zellweger, G. Simonneau and E. S. C. C. f. P. Guidelines (2009). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS),

endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)." *Eur Heart J* **30**(20): 2493-2537.

Galie, N., A. Manes, L. Negro, M. Palazzini, M. L. Bacchi-Reggiani and A. Branzi (2009). "A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension." *Eur Heart J* **30**(4): 394-403.

Galie, N., A. Torbicki, R. Barst, P. Darteville, S. Haworth, T. Higenbottam, H. Olschewski, A. Peacock, G. Pietra, L. J. Rubin, G. Simonneau, S. G. Priori, M. A. Garcia, J. J. Blanc, A. Budaj, M. Cowie, V. Dean, J. Deckers, E. F. Burgos, J. Lekakis, B. Lindahl, G. Mazzotta, K. McGregor, J. Morais, A. Oto, O. A. Smiseth, J. A. Barbera, S. Gibbs, M. Hoeper, M. Humbert, R. Naeije, J. Pepke-Zaba and F. Task (2004). "Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology." *Eur Heart J* **25**(24): 2243-2278.

Ghofrani, H. A., O. Distler, F. Gerhardt, M. Gorenflo, E. Grunig, W. E. Haefeli, M. Held, M. M. Hoeper, C. M. Kahler, H. Kaemmerer, H. Klose, V. Kollner, B. Kopp, S. Mebus, A. Meyer, O. Miera, D. Pittrow, G. Riemekasten, S. Rosenkranz, D. Schranz, R. Voswinckel, H. Olschewski, t. G. S. o. R. M. German Society of Cardiology and C. the German Society of Pediatric (2010). "[Treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH): recommendations of the Cologne Consensus Conference 2010]." *Dtsch Med Wochenschr* **135 Suppl 3**: S87-101.

Ghofrani, H. A., N. Galie, F. Grimminger, E. Grunig, M. Humbert, Z. C. Jing, A. M. Keogh, D. Langleben, M. O. Kilama, A. Fritsch, D. Neuser, L. J. Rubin and P.-S. Group (2013). "Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension." *N Engl J Med* **369**(4): 330-340.

Gibbs, J. (2007). "Making a diagnosis in PAH." *European Respiratory Review* **16**(102): 8-12.

Gleeson, M., N. Bishop, M. Oliveira, T. McCauley, P. Tauler and A. S. Muhamad (2012). "Respiratory infection risk in athletes: association with antigen-stimulated IL-10 production and salivary IgA secretion." *Scand J Med Sci Sports* **22**(3): 410-417.

Gleeson, M., N. C. Bishop, D. J. Stensel, M. R. Lindley, S. S. Mastana and M. A. Nimmo (2011). "The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease." *Nat Rev Immunol* **11**(9): 607-615.

Golembeski, S. M., J. West, Y. Tada and K. A. Fagan (2005). "Interleukin-6 causes mild pulmonary hypertension and augments hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." *Chest* **128**(6 Suppl): 572S-573S.

Grunig, E., N. Ehlken, A. Ghofrani, G. Staehler, F. J. Meyer, J. Juenger, C. F. Opitz, H. Klose, H. Wilkens, S. Rosenkranz, H. Olschewski and M. Halank (2011). "Effect of exercise and respiratory training on clinical progression and survival in patients with severe chronic pulmonary hypertension." *Respiration* **81**(5): 394-401.

Hager-Theodorides, A. L., S. V. Outram, D. K. Shah, R. Sacedon, R. E. Shrimpton, A. Vicente, A. Varas and T. Crompton (2002). "Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation." *J Immunol* **169**(10): 5496-5504.

Hargett, L. A., L. J. Hartman, A. K. Scruggs, J. M. McLendon, A. K. Haven and N. N. Bauer (2015). "Severe pulmonary arterial hypertensive rats are tolerant to mild exercise." *Pulmonary circulation* **5**(2): 349.

Hatano, S. and T. Strasser (1975). Primary Pulmonary Hypertension: Report on a WHO Meeting, Geneva, 15-17 Oct., 1973, World Health Organisation.

Hautefort, A., B. Girerd, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, L. Price, B. N. Lambrecht, M. Humbert and F. Perros (2015). "T-helper 17 cell polarization in pulmonary arterial hypertension." *Chest* **147**(6): 1610-1620.

Hautefort, A., B. Girerd, D. Montani, S. C. Kaminsky, B. Lambrecht, M. Humbert and F. Perros (2015). "Th17 polarization in pulmonary arterial hypertension." Revue des Maladies Respiratoires **32**(3): 308.

Hislop, A. and L. Reid (1974). "Arterial changes in *Crotalaria spectabilis*-induced pulmonary hypertension in rats." Br J Exp Pathol **55**(2): 153-163.

Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." Nature **444**(7121): 860-867.

Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J. F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla and G. Simonneau (2006). "Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry." Am J Respir Crit Care Med **173**(9): 1023-1030.

Jiao, P., Q. Chen, S. Shah, J. Du, B. Tao, I. Tzamelis, W. Yan and H. Xu (2009). "Obesity-related upregulation of monocyte chemotactic factors in adipocytes: involvement of nuclear factor-kappaB and c-Jun NH2-terminal kinase pathways." Diabetes **58**(1): 104-115.

Kakanis, M. W., J. Peake, E. W. Brenu, M. Simmonds, B. Gray and S. M. Marshall-Gradisnik (2014). "T helper cell cytokine profiles after endurance exercise." J Interferon Cytokine Res **34**(9): 699-706.

Kawanishi, N., H. Yano, Y. Yokogawa and K. Suzuki (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." Exerc Immunol Rev **16**: 105-118.

Krüger, K. and F. Mooren (2007). "T cell homing and exercise." Exerc Immunol Rev **13**: 37-54.

Lee, J. G. and E. P. Kay (2009). "Common and distinct pathways for cellular activities in FGF-2 signaling induced by IL-1beta in corneal endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(5): 2067-2076.

Leonard, B. E. (2007). "Inflammation, depression and dementia: are they connected?" Neurochem Res **32**(10): 1749-1756.

Li, M., S. R. Riddle, M. G. Frid, K. C. El Kasmi, T. A. McKinsey, R. J. Sokol, D. Strassheim, B. Meyrick, M. E. Yeager, A. R. Flockton, B. A. McKeon, D. D. Lemon, T. R. Horn, A. Anwar, C. Barajas and K. R. Stenmark (2011). "Emergence of fibroblasts with a proinflammatory epigenetically altered phenotype in severe hypoxic pulmonary hypertension." J Immunol **187**(5): 2711-2722.

Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C.-C. Chan and R. R. Caspi (2008). "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category." The Journal of experimental medicine **205**(4): 799-810.

Lumeng, C. N., J. L. Bodzin and A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184.

Maffei, M., M. Funicello, T. Vottari, O. Gamucci, M. Costa, S. Lisi, A. Viegi, O. Ciampi, G. Bardi, P. Vitti, A. Pinchera and F. Santini (2009). "The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2)." BMC Biol **7**: 87.

Martinez, F. O., A. Sica, A. Mantovani and M. Locati (2008). "Macrophage activation and polarization." Front Biosci **13**: 453-461.

Mathur, N. and B. K. Pedersen (2008). "Exercise as a mean to control low-grade systemic inflammation." Mediators Inflamm **2008**: 109502.

Matthews, C. E., I. S. Ockene, P. S. Freedson, M. C. Rosal, P. A. Merriam and J. R. Hebert (2002). "Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection." *Med Sci Sports Exerc* **34**(8): 1242-1248.

Miyata, M., F. Sakuma, A. Yoshimura, H. Ishikawa, T. Nishimaki and R. Kasukawa (1995). "Pulmonary Hypertension in Rats 2." *International archives of allergy and immunology* **108**(3): 287-291.

Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman and A. O'Garra (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.

Moreira-Goncalves, D., R. Ferreira, H. Fonseca, A. I. Padrao, N. Moreno, A. F. Silva, F. Vasques-Novoa, N. Goncalves, S. Vieira, M. Santos, F. Amado, J. A. Duarte, A. F. Leite-Moreira and T. Henriques-Coelho (2015). "Cardioprotective effects of early and late aerobic exercise training in experimental pulmonary arterial hypertension." *Basic Res Cardiol* **110**(6): 57.

Mujumdar, P. P., P. J. Duerksen-Hughes, A. F. Firek and D. A. Hessinger (2011). "Long-term, progressive, aerobic training increases adiponectin in middle-aged, overweight, untrained males and females." *Scand J Clin Lab Invest* **71**(2): 101-107.

Natali, A. J., E. D. Fowler, S. C. Calaghan and E. White (2015). "Voluntary exercise delays heart failure onset in rats with pulmonary artery hypertension." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**(3): H421-424.

Opravil, M., M. Pechere, R. Speich, H. I. Joller-Jemelka, R. Jenni, E. W. Russi, B. Hirschel and R. Luthy (1997). "HIV-associated primary pulmonary hypertension. A case control study. Swiss HIV Cohort Study." *Am J Respir Crit Care Med* **155**(3): 990-995.

Ouchi, N., J. L. Parker, J. J. Lugus and K. Walsh (2011). "Adipokines in inflammation and metabolic disease." *Nat Rev Immunol* **11**(2): 85-97.

Pengo, V., A. W. Lensing, M. H. Prins, A. Marchiori, B. L. Davidson, F. Tiozzo, P. Albanese, A. Biasiolo, C. Pegoraro, S. Iliceto, P. Prandoni and G. Thromboembolic Pulmonary Hypertension Study (2004). "Incidence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after pulmonary embolism." *N Engl J Med* **350**(22): 2257-2264.

Perros, F., P. Dorfmuller, D. Montani, H. Hammad, W. Waelput, B. Girerd, N. Raymond, O. Mercier, S. Mussot, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert and B. N. Lambrecht (2012). "Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* **185**(3): 311-321.

Perry, C., M. Pick, N. Bdolach, I. Hazan-Halevi, S. Kay, I. Berr, A. Reches, Y. Harishanu and D. Grisaru (2013). "Endurance exercise diverts the balance between Th17 cells and regulatory T cells." *PLoS One* **8**(10): e74722.

Petersen, A. M. and B. K. Pedersen (2005). "The anti-inflammatory effect of exercise." *J Appl Physiol* (1985) **98**(4): 1154-1162.

Price, L. C., S. J. Wort, F. Perros, P. Dorfmuller, A. Huertas, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky and M. Humbert (2012). "Inflammation in pulmonary arterial hypertension." *Chest* **141**(1): 210-221.

Rabinovitch, M. (2012). "Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." *J Clin Invest* **122**(12): 4306-4313.

Rabinovitch, M., C. Guignabert, M. Humbert and M. R. Nicolls (2014). "Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension." *Circ Res* **115**(1): 165-175.

Richter, M., H. Gall, K. Tello, N. Sommer, W. Seeger, F. Grimminger and H. Ghofrani (2015). "Medikamentöse Therapie der pulmonalen Hypertonie." *Der Internist* **56**(5): 573-582.



Rook, G. A. and A. Dalgleish (2011). "Infection, immunoregulation, and cancer." Immunol Rev **240**(1): 141-159.

Rosenkranz, S. (2015). "Pulmonary hypertension 2015: current definitions, terminology, and novel treatment options." Clin Res Cardiol **104**(3): 197-207.

Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-352.

Savale, L., L. Tu, D. Rideau, M. Izziki, B. Maitre, S. Adnot and S. Eddahibi (2009). "Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice." Respir Res **10**: 6.

Savale, L., L. Tu, D. Rideau, M. Izziki, B. Maitre, S. Adnot and S. Eddahibi (2009). "Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice." Respir Res **10**(6): 236-244.

Sawada, H., T. Saito, N. P. Nickel, T. P. Alastalo, J. P. Glotzbach, R. Chan, L. Haghghat, G. Fuchs, M. Januszyk, A. Cao, Y. J. Lai, J. Perez Vde, Y. M. Kim, L. Wang, P. I. Chen, E. Spiekerkoetter, Y. Mitani, G. C. Gurtner, P. Sarnow and M. Rabinovitch (2014). "Reduced BMP2 expression induces GM-CSF translation and macrophage recruitment in humans and mice to exacerbate pulmonary hypertension." J Exp Med **211**(2): 263-280.

Schlitt, A., G. H. Heine, S. Blankenberg, C. Espinola-Klein, J. F. Dopheide, C. Bickel, K. J. Lackner, M. Iz, J. Meyer, H. Darius and H. J. Rupprecht (2004). "CD14+CD16+ monocytes in coronary artery disease and their relationship to serum TNF-alpha levels." Thromb Haemost **92**(2): 419-424.

Shoelson, S. E., J. Lee and A. B. Goldfine (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.

Simonneau, G., M. A. Gatzoulis, I. Adatia, D. Celermajer, C. Denton, A. Ghofrani, M. A. Gomez Sanchez, R. Krishna Kumar, M. Landzberg, R. F. Machado, H. Olschewski, I. M. Robbins and R. Souza (2013). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **62**(25 Suppl): D34-41.

Sitbon, O., M. Humbert, X. Jais, V. Ioos, A. M. Hamid, S. Provencher, G. Garcia, F. Parent, P. Herve and G. Simonneau (2005). "Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **111**(23): 3105-3111.

Soon, E., A. M. Holmes, C. M. Treacy, N. J. Doughty, L. Southgate, R. D. Machado, R. C. Trembath, S. Jennings, L. Barker, P. Nicklin, C. Walker, D. C. Budd, J. Pepke-Zaba and N. W. Morrell (2010). "Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension." Circulation **122**(9): 920-927.

Stacher, E., B. B. Graham, J. M. Hunt, A. Gandjeva, S. D. Groshong, V. V. McLaughlin, M. Jessup, W. E. Grizzle, M. A. Aldred, C. D. Cool and R. M. Tuder (2012). "Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **186**(3): 261-272.

Starkie, R., S. R. Ostrowski, S. Jauffred, M. Febbraio and B. K. Pedersen (2003). "Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans." FASEB J **17**(8): 884-886.

Steensberg, A., C. P. Fischer, C. Keller, K. Moller and B. K. Pedersen (2003). "IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans." Am J Physiol Endocrinol Metab **285**(2): E433-437.

Steiner, M. K., O. L. Syrkina, N. Kolliputi, E. J. Mark, C. A. Hales and A. B. Waxman (2009). "Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension." Circ Res **104**(2): 236-244, 228p following 244.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-376.

Tamosiuniene, R., W. Tian, G. Dhillon, L. Wang, Y. K. Sung, L. Gera, A. J. Patterson, R. Agrawal, M. Rabinovitch, K. Ambler, C. S. Long, N. F. Voelkel and M. R. Nicolls (2011). "Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension." Circ Res **109**(8): 867-879.

Thompson, K. and M. Rabinovitch (1996). "Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor." J Cell Physiol **166**(3): 495-505.

Tian, W., X. Jiang, R. Tamosiuniene, Y. K. Sung, J. Qian, G. Dhillon, L. Gera, L. Farkas, M. Rabinovitch, R. T. Zamanian, M. Inayathullah, M. Fridlib, J. Rajadas, M. Peters-Golden, N. F. Voelkel and M. R. Nicolls (2013). "Blocking macrophage leukotriene b4 prevents endothelial injury and reverses pulmonary hypertension." Sci Transl Med **5**(200): 200ra117.

Timmerman, K. L., M. G. Flynn, P. M. Coen, M. M. Markofski and B. D. Pence (2008). "Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?" J Leukoc Biol **84**(5): 1271-1278.

Tu, L., F. S. De Man, B. Girerd, A. Huertas, M.-C. Chaumais, F. Lecerf, C. François, F. Perros, P. Dorfmüller and E. Fadel (2012). "A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents." American journal of respiratory and critical care medicine **186**(7): 666-676.

Walsh, N. P., M. Gleeson, R. J. Shephard, M. Gleeson, J. A. Woods, N. Bishop, M. Fleshner, C. Green, B. K. Pedersen and L. Hoffman-Goete (2011). "Position statement part one: immune function and exercise."

Wang, J., H. Song, X. Tang, Y. Yang, V. J. Vieira, Y. Niu and Y. Ma (2012). "Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response." Scand J Med Sci Sports **22**(5): 643-652.

Yeh, S. H., H. Chuang, L. W. Lin, C. Y. Hsiao and H. L. Eng (2006). "Regular tai chi chuan exercise enhances functional mobility and CD4CD25 regulatory T cells." Br J Sports Med **40**(3): 239-243.

Zhao, G., S. Zhou, A. Davie and Q. Su (2012). "Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance." Exerc Immunol Rev **18**: 98-114.

## 9 Danksagung

Mit der Fertigstellung meiner Doktorarbeit wird es Zeit mich bei denjenigen zu bedanken, die mich beraten und begleitet haben.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer (Klinikdirektor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Betreuung und für die Möglichkeit, die Dissertationsarbeit am pulmonologischen Institut durchzuführen, danken.

Ein großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Lars Harbaum für seine wertvolle Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Studie. Ebenso möchte ich mich für sein unermüdliches Engagement und seinen Einsatz bedanken. Vielen Dank für die zahlreichen Treffen, die mir sehr halfen, meine Arbeit voranzubringen.

Weiterhin möchte ich dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie für die Möglichkeit der, für meine Arbeit essenziellen, Nutzung der Räumlichkeiten danken. Zudem war die Unterstützung im Labor von Frau A. Steenpaß und Frau M. Kastner sehr hilfreich sowie der Einsatz von Frau A. Glatzel.

Ein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern der Pneumologischen Ambulanz für die Ermöglichung der klinischen Untersuchungen, sowie den Studienkoordinatorinnen Frau A. Paulsen und Frau U. Dickschas.

Vielen Dank an das Team der FACS Core facility im Campus Forschung, welches bei Fragen jederzeit mit ihrer technischen und fachlichen Kompetenz zur Verfügung stand.

Zudem danke ich der onkologischen Ambulanz, die mich das Gerät zur Erstellung des Differentialblutbilds nutzen ließen.

Zuletzt möchte ich mich bei den Patienten und freiwilligen Probanden bedanken, die sich zur Teilnahme an meiner Studie entschlossen haben. Sie haben nicht den zeitlichen und geografischen Aufwand gescheut, an den Untersuchungen motiviert teilzunehmen. Ohne die geduldigen Studienteilnehmer wäre dies nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür.

## 10 Lebenslauf

*„Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen“*

## **11 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....