

H.H.W. Gabriel¹, J. Scharhag², M. Rätz², W. Kindermann²

Charakterisierung der sofortigen Leukozytose nach anaerober Belastung

Characterization of the immediate leukocytosis after anaerobic exercise

1 Lehrstuhl und Abteilung für Sportmedizin, Institut für Sportwissenschaften, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
2 Institut für Sport- und Präventivmedizin, Bereich Klinische Medizin, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Zusammenfassung

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die sofortige Leukozytose biphasisch ist, wurden 8 gesunde männliche Probanden einem 60sekündigen Maximaltest auf einem Fahrradergometer (Leistung: 489 ± 34 W, maximales Laktat: $14,1 \pm 2,8$ mmol·l⁻¹) und einem Kontrolltag ohne Belastung unterzogen. Wiederholte Blutentnahmen erfolgten vor Belastung, sofort sowie 2, 4, 8, 16, 32 und 48 min nach Belastungsende zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Leukozytensubpopulationen. Innerhalb der ersten Nachbelastungsminuten konnten folgende Phänomene beobachtet werden: 1.) Eine frühe Mobilisation der natürlichen Killerzellen (+521%, im Vergleich zu Vorbelastungswerten), T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen (+95%), und CD14⁺CD16⁻ reguläre Monozyten (+33%) mit maximalen Anstiegen 1-2 min nach Belastungsende und 2.) eine spätere Mobilisation der Neutrophilen (+26%), der CD14⁺CD16⁺ reifen Monozyten (Prämakrophagen; +372%), der T_{Helfer/Inducer}-Zellen (+43%) und der B-Zellen (+70%), beginnend 2-4 min nach Belastungsende und einem Maximum zwischen der 8.-16. Nachbelastungsminute. **Schlussfolgerung:** Die sofortige Leukozytose nach anaeroben Maximalbelastungen besteht aus zwei unterschiedlichen Phasen. Der im Vergleich zu den übrigen Monozyten überproportionale Anstieg der CD14⁺CD16⁺-Prämakrophagen legt eine Mobilisierung aus dem marginalen Pool nahe. Die Mobilisierung der Leukozyten aus dem marginalen Pool in zwei Phasen ist durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärbar. Einerseits können hämodynamische Effekte und andererseits catecholaminabhängige Änderungen der leukozytär-endothelialen Interaktionen zur Erklärung herangezogen werden.

Schlüsselwörter: Belastungsleukozytose, Leukozytenmobilisierung, leukozytär-endotheliale Interaktion, marginaler Pool, Monozytensubpopulationen

Einleitung

Als Reaktion des Immunsystems auf körperliche Belastung wurde die belastungsinduzierte Leukozytose in den letzten beiden Jahrzehnten in vielen Studien untersucht. Bekanntheitsmaß führen Belastungen von weniger als zwei Stunden

Summary

8 healthy male subjects performed a maximal exercise of 60 s duration on a cycle ergometer (mean intensity 489 ± 34 W, mean lactate_{max}: 14.1 ± 2.8 mmol·l⁻¹) and a control day without exercise to test the hypothesis that the immediate leukocytosis to anaerobic exercise contains at least two distinct phases of leukocyte mobilization. Repeated blood samples were taken before, immediately and 2, 4, 8, 16, 32 and 48 min after exercise, respectively, to determine leukocyte subpopulations by flow cytometry. Within the first minutes after exercise, two distinct phases of mobilization were seen: 1) An early mobilization of natural killer cells (+521%, compared to pre-exercise values), T_{cytotoxic/Suppressor} cells (+95%), and CD14⁺CD16⁻ regular monocytes (+33%) with maximal increases 1-2 min after the end of exercise and 2) a late mobilization of neutrophils (+26%), CD14⁺CD16⁺ mature monocytes (premacrophages) (+372%), T_{Helper/Inducer} cells (+43%) and B cells (+70%), starting 2-4 min and reaching their maximum 8-16 min after the end of exercise. We conclude that under anaerobic exercise conditions, leukocyte subpopulations are mobilized in two distinct phases. Furthermore, the overproportionate increase of CD14⁺CD16⁺ premacrophages related to circulating monocytes at rest suggests a predominant localization of mature monocytes in the marginal pool. Assuming recruitment out of the marginal pool of the blood vessels, the different mobilization phases indicate that within the immediate leukocytosis, the single subpopulations follow different mechanisms of mobilization from the endothelium, which can be discussed as a hemodynamic effect, and on the other hand as catecholamine-dependent changes of leukocyte-endothelium interactions.

Key words: Exercise-induced leukocytosis, marginal pool, leukocyte mobilization, monocyte subpopulations, leukocyte-endothelium interactions

Dauer zu einem biphasischen Anstieg der Leukozytenkonzentration im peripheren Blut: einer sofortigen Leukozytose innerhalb der ersten Minuten nach Beginn der Belastung und einer verzögerten Leukozytose während der ersten Stunden der Nachbelastungsphase. Der Anstieg und das Ausmaß dieser Zellkonzentrationsänderungen sind sowohl von der Be-

lastungsintensität als auch der Belastungsdauer abhängig (12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 24, 27).

Die bisherige Charakterisierung der sofortigen Leukozytose war dahingehend, dass die innerhalb von Minuten mobilisierten Leukozyten aus dem sekundären intravaskulären Kompartiment der nicht zirkulierenden und dem Endothel anhaftenden Zellen stammen: dem sogenannten marginalen Pool (3, 9, 14, 15, 18, 21, 23). Dabei wurde von einer einzigen Phase der Mobilisation ausgegangen. Eine detaillierte Beschreibung der Mobilisation der verschiedenen Leukozytensubpopulationen während der sofortigen Leukozytose wurde bislang nicht vorgenommen. Zwar wurde das Verhalten der Leukozytensubpopulationen bei aeroben und anaeroben Belastungen bei den bisher durchgeführten Studien untersucht, jedoch wurden dabei nur ein oder zwei Zeitpunkte der Nachbelastungsphase - und hierbei insbesondere die erste Minute nach Belastungsabbruch - überprüft.

Die während und in der ersten Minute nach Belastung zirkulierenden Leukozytensubpopulationen konnten in einer vorangegangenen Studie bereits beschrieben werden (15). Hierbei zeigte sich, dass eine maximale Belastung über einen Zeitraum von 60 Sekunden auf dem Fahrradergometer zu einer signifikanten Mobilisation aller gemessenen Zellsubpopulationen führte. Darüber hinaus bestand die sofortige Leukozytose während der ersten 30 Minuten der Nachbelastungsphase aus zwei Gruppen von Leukozytensubpopulationen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten einen Anstieg der Zellkonzentrationen aufwiesen. Allerdings lagen die Zeitabstände der Blutentnahmen nicht eng genug beieinander, um die Konzentrationsmaxima der verschiedenen Leukozytensubpopulationen exakt zu erfassen.

Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, die Hypothese zu überprüfen, dass die sofortige Leukozytose nach anaerober Belastung zumindest aus zwei Phasen der Leukozytenrekutierung des marginalen Pools besteht. Zu diesem Zweck wurde die oben erwähnte und bereits früher beschriebene anaerobe Belastung gewählt (15). Um die sofortige Leukozytose nach Belastungsabbruch jedoch besser charakterisieren zu können, erfolgten mehrere Blutentnahmen innerhalb der ersten Stunde nach Belastungsabbruch.

Material und Methoden

Probanden

8 gesunde männliche Sportler (Alter 29 ± 4 Jahre, Körpergewicht 74 ± 5 kg, Größe 178 ± 7 cm) nahmen nach schriftlicher Einwilligung an der Studie teil. Zwei der Probanden waren Ausdauerathleten (ein Läufer, ein Triathlet), die übrigen sechs Probanden waren durchschnittlich trainierte Sportstudenten. Zum Zeitpunkt der Untersuchung bestanden keine Infektionen, intensive Trainingseinheiten wurden vor den Untersuchungen nicht absolviert. Um die ergometrische Leistungsfähigkeit zu bestimmen, erfolgte zunächst eine stufenweise ansteigende Fahrradergometrie im Sitzen (Excalibur Supersport, Lode, Gronigen, Holland), beginnend mit 50 W und dreiminütiger Steigerung um 50 W bis zur subjektiven Erschöpfung. Kapilläre Blutentnahmen von 20 μ l

wurden aus dem hyperämisierten Ohrläppchen vor, am Ende jeder Belastungsstufe, nach Belastungsabbruch und bis 10 Minuten in der Nachbelastungsphase abgenommen. Die Laktatkonzentrationen wurden enzymatisch bestimmt (Lac-T, Boehringer, Ingelheim, Deutschland [22]) und die individuelle anaerobe Schwelle nach *Stegmann* (25) anhand der Laktatleistungskurve ermittelt. Die maximale Sauerstoffaufnahme (VO_{2max}) wurde mittels der maximal erbrachten Leistung im Stufentest berechnet.

60 Sekunden-Test und Kontrolltag

Um den Einfluss einer einmaligen anaeroben Belastung auf die Mobilisation der Leukozyten und ihrer Subpopulationen zu untersuchen, absolvierten die Probanden einen maximalen Belastungstest von 60 Sekunden Dauer auf einem Fahrradergometer im Sitzen (Excalibur Supersport, Lode, Gronigen, Holland). Zur Bestimmung der Laktatkonzentration wurde Kapillarblut zu folgenden Zeitpunkten entnommen: vor der Belastung in Ruhe (vor) sowie während der Belastung und bis zur 12. Minute nach Belastungsabbruch.

Zur venösen Blutentnahme wurde eine Braunüle in eine Unterarmvene gelegt. Die Ruheblutentnahme erfolgte im Liegen nach 10 bis 15 Minuten. Weitere Blutentnahmen fanden zu folgenden Zeitpunkten statt: direkt nach Belastungsabbruch innerhalb einer Minute (0'p) sowie 2, 4, 8, 16, 32 und 48 Minuten nach Belastungsabbruch (2'p, 4'p, 8'p, 16'p, 32'p, 48'p). Bis zur vierten Nachbelastungsminute erfolgten die Blutentnahmen auf dem Fahrradergometer im Sitzen, danach im Liegen. Pro Blutentnahme wurden jeweils 2,7 ml EDTA-Blut zur Immunphänotypisierung und 2 ml heparinisiertes Blut für die radioenzymatische Bestimmung der Plasmakatecholamine (6) entnommen (Abnahmezeitpunkte: vor, 0' p, 2' p und 4' p).

An einem zusätzlichen Kontrolltag ohne Belastung wurden ebenfalls Blutentnahmen zeitgleich zum Belastungstag durchgeführt, um eine zirkadiane Rhythmik der Leukozytenmobilisation auszuschließen. Die Blutentnahmen erfolgten in der gleichen Weise wie am Testtag, die Blutentnahmezeitpunkte waren: vor, 0' p, 8' p und 48' p. Die Laktatkonzentrationen wurden ebenfalls bestimmt. Darüber hinaus wurde an beiden Testtagen (Belastungstest-Tag und Kontrolltag) die Herzfrequenz aufgezeichnet (Sporttester, BE 3000, Polar, Finnland). Die Untersuchungen begannen sowohl am Tag des Belastungstests als auch am Kontrolltag um 8 Uhr morgens, zwischen den Tests lag ein Zeitraum von vier bis zehn Tagen. Die leistungsphysiologischen Daten des Eingangstests und des 60 Sekunden-Tests sind in Tabelle 1 dargestellt.

Immunphänotypisierung

Die Blutproben wurden innerhalb von 1 bis 2 Stunden nach dem Test analysiert. Die absoluten Zellkonzentrationen der Leukozyten, Hämoglobin und Hämatokrit wurden an einem automatisierten Zellzähler (Sysmex Microcell Counter, F 800, TOA Medical Electronics Company, Japan) ermittelt; Hämoglobin und Hämatokrit zur Berechnung der Plasmavolumenveränderung herangezogen (7).

Die Bestimmungen der Leukozytensubpopulationen im Vollblut wurden durchflusszytometrisch mittels direkter Immunfluoreszenz und 5-Parameter-Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden 20 µl EDTA-Blut 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen mit direkt konjugierenden monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die bestimmten Leukozytensubpopulationen und entsprechenden Kombinationen der monoklonalen Antikörper (Coulter Immunotec, Hamburg, Deutschland) sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nach Inkubation mit Erythrozytenlyse und Leukozytenfixierungslösung (Ammoniumchlorid, < 5% Dithylenglykol, < 1,5% Formaldehyd; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) wurden die Zellen zweimal in Phosphatpuffer-Lösung (PBS, 5 Minuten, 250 x g, Raumtemperatur) gewaschen und bis zur durchflusszytometrischen Messung (Facs Scan, Becton Dickinson, Laserwellenlänge 488 nm) für 1 bis 3 Stunden bei 4° C im Dunkeln gelagert. Es wurde ein "live-gate" im Vorwärtsscatter gegen den Seitwärtsscatter verwendet, um die Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten von Erythrozyten, Thrombozyten und Zelldetritus abzugrenzen. 15.000 Ereignisse wurden zur Analyse akquiriert und auf FCS 1.0-Listendaten gespeichert. Die Analyse der prozentualen Verteilung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen wurden mit dem Programm PC-Lysis (Becton Dickinson) bestimmt, die absoluten Leukozytenkonzentrationen dienten zur Berechnung der Leukozytensubpopulationen zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Statistik

Die Daten waren normal verteilt und sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die Überprüfung der Differenzen erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA), als post-

Tabelle 2: Leukozytensubpopulationen und ihre Charakterisierung anhand der CD-Nomenklatur (CD: Clusters of differentiation)

MAK	Leukozytensubpopulation
CD45 ⁺ CD14 ^{-/-}	Monozyten, Neutrophile, Lymphocyten
CD3 ⁺ CD16 ⁻	Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	T _{Helper/Inducer} -Zellen
CD3 ⁺ CD4 ⁻	T _{cytotoxic/Suppressor} -Zellen
CD19 ⁺	B Zellen
CD14 ⁺ CD16 ⁻	Reguläre Monozyten
CD14 ⁺ CD16 ⁺	Reife Monozyten (Prämakrophagen)

hoc-Test wurde der Newman-Keuls-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei p < 0,05 angesetzt. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm Statistica 5.0 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA).

Ergebnisse

Direkt nach Belastungsabbruch des 60-Sekunden-Tests war das Plasmavolumen um 10,5 ± 3,5% reduziert, das Maximum der Plasmavolumenveränderung war zum Zeitpunkt 2' p

Tabelle 1: Leistung und Laktat der stufenweise ansteigenden Belastung (Stufentest) und des 60sekündigen Maximaltests (60s-Test) auf dem Fahrradergometer (n=8.) Maximalwerte (max) sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt; VO₂max: maximal erreichte Sauerstoffaufnahme; IAS: individuelle anaerobe Schwelle.

VO ₂ max [ml·min ⁻¹ ·kg ⁻¹]	Leistung _{max} [W]	Stufentest		60s-Test	
		Leistung _{IAS} [W]	Laktat _{max} [mmol·l ⁻¹]	Leistung _{max} [W]	Laktat _{max} [mmol·l ⁻¹]
51,7 ± 5,5	308 ± 39	198 ± 38	12,7 ± 3,1	489 ± 34	14,1 ± 3,6

erreicht und lag im Vergleich zum Ruhewert vor Belastung zu diesem Zeitpunkt um 16,5 ± 4,8% niedriger. Aufgrund dieser Veränderungen wurden alle ermittelten Werte nach Dill und Costill (7) entsprechend den Änderungen des Plasmavolumens korrigiert.

Die maximale Laktatkonzentration wurde in der 6. Minute nach Belastungsabbruch erreicht und blieb bis zur 12. Nachbelastungsminute signifikant erhöht (Tab. 1). Die maxi-

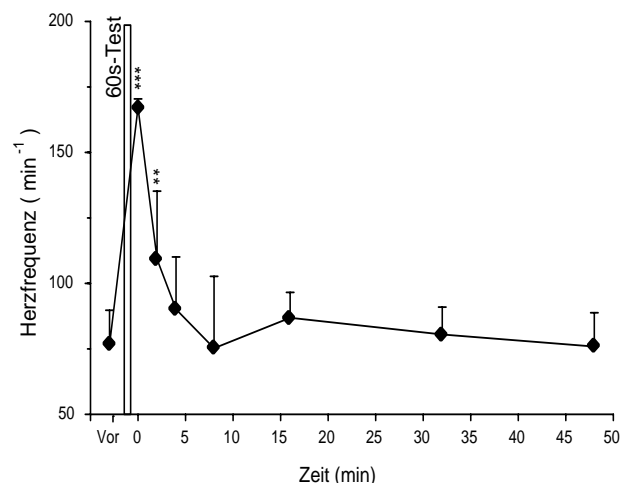


Abbildung 1: Herzfrequenzverläufe vor (vor) und inernerhalb der ersten Minute nach (0) sowie 2, 4, 8, 16, 32 bzw. 48 min nach Ende des 60sekündigen Maximaltests auf dem Fahrradergometer. Statistik: Mittelwerte und Standardabweichungen; Varianzanalysen, Newman-Keuls post hoc Test; ***/*/*: p<0,001/0,01/0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten vor Belastungsbeginn.

male Herzfrequenz war am Ende der Belastung erreicht und betrug im Mittel 167 ± 3 Schläge pro Minute. Bereits 4 Minuten nach Belastungsabbruch bestand kein signifikanter Unterschied mehr zum Ruhewert (Abb. 1).

Am Kontrolltag waren weder zirkadiane Rhythmen noch signifikante Differenzen zwischen den Ruhewerten vor dem 60-Sekunden-Test und dem Kontrolltag hinsichtlich der Leukozytensubpopulationen und der Herzfrequenz vorhanden.

Leukozytensubpopulationen

Der 60-Sekunden-Test führte zu einer sofortigen Leukozytose während Belastung und einem Anstieg, der zum Zeitpunkt 8' p sein Maximum in der Nachbelastungsphase erreichte (+ 57% im Vergleich zum Ruhewert). Die Zellkonzentrationen blieben bis zum Zeitpunkt 16' p signifikant erhöht und erreichten 32 Minuten nach Belastungsabbruch wieder den Ruhewert.

Frühe Mobilisation

Während der sofortigen Leukozytose fanden sich unter Berücksichtigung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen zwei Mobilisationsphasen.

Während der frühen Phase der Mobilisation kam es zu einer schnellen Zunahme von CD3⁺CD16⁺ natürlichen Killerzellen (die den höchsten Anstieg aller Leukozytensubpopu-

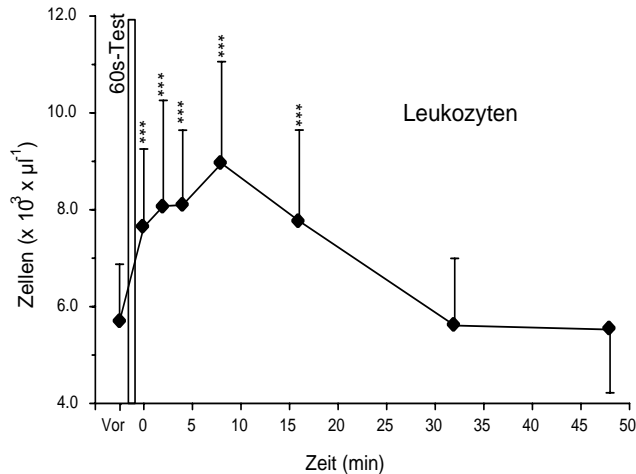


Abbildung 2: Absolute Zellkonzentrationen der Leukozyten vor und nach dem 60sekündigen Maximaltest auf dem Fahrradergometer. Weitere Informationen s. Legende zu Abbildung 1.

lationen zeigten), von CD3⁺CD4⁻ T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen und von CD14⁺CD16⁻ Monozyten. Die NK-Zellen waren unmittelbar nach Belastungsabbruch des 60 Sekunden-Tests um 411% angestiegen und erreichten ihr Maximum zum Zeitpunkt 2' p (+ 521%). Die T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen stiegen bis zum Zeitpunkt 8' p an (+ 95%), wobei der größte Anteil der T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen bereits zum Zeitpunkt der ersten Minute nach Belastungsabbruch mobilisiert war (+70%) (Abb. 3a und b).

Bei den Monozyten konnte ein unterschiedliches Mobilisationsverhalten von regulären CD14⁺ CD16⁻ Monozyten und reifen CD14⁺ CD16⁺ Monozyten (sog. Prämakrophagen) nachgewiesen werden (Abb. 4). Die regulären CD14⁺ CD16⁻ Monozyten waren nach Belastungsabbruch leicht angestiegen (+ 33%) und erreichten bereits zum Zeitpunkt 4' p wieder Ausgangswerte.

Späte Mobilisation

Die zweite Monozytensubpopulation der reifen CD14⁺CD16⁺ Monozyten zeigte - im Gegensatz zu den regulären CD14⁺ CD16⁻ Monozyten - keinen signifikanten Anstieg während Belastung. Dieser war erst zum Zeit-

punkt 2' p in der Zirkulation nachweisbar, wobei das Maximum zum Zeitpunkt 8' p der Nachbelastungsphase mit einer Erhöhung des Ruhewertes um das etwa 3,5-fache (+ 372%) erreicht war (Abb. 4).

Während dieser zweiten Phase der Mobilisation stiegen folgende Zellpopulationen ebenfalls an: Neutrophile und CD3⁺CD4⁺ T_{Helfer/Inducer}-Zellen waren zu den Zeitpunkten 4' p und 8' p erhöht (+ 26 bzw. +43%). Die B-Zellen zeigten einen leichten Anstieg während Belastung (+ 22%) und erreichten zum Zeitpunkt 8' p mit einem hochsignifikanten Anstieg von 70% ihr Maximum (Abb. 3c, d).

Nach 32 Minuten der Nachbelastungsphase hatten alle Leukozyten-, Monozyten- und Lymphozyten-Populationen wieder die Ausgangswerte vor Belastung erreicht.

Katecholamine

Den zuvor beschriebenen Laktatkonzentrationen entsprechend, stiegen die Katecholaminplasmaspiegel von Adrenalin und Noradrenalin signifikant während des 60-Sekunden-Tests an (230 bzw. 260%). Die maximalen Konzentrationen wurden innerhalb der ersten Minute nach Belastung erreicht, um wieder nahezu linear innerhalb der ersten 4 Minuten in der Nachbelastungsphase abzufallen (Abb. 5).

Diskussion

Ziel der Studie war, den Einfluss einer einmaligen anaeroben Belastung auf das Mobilisationsverhalten verschiedener Leukozytensubpopulationen des marginalen Pools zu untersuchen und Ausmaß sowie zeitlichen Verlauf der Mobilisationen der sofortigen Leukozytose detailliert zu beschreiben. Hierbei sollte die Hypothese überprüft werden, dass die so-

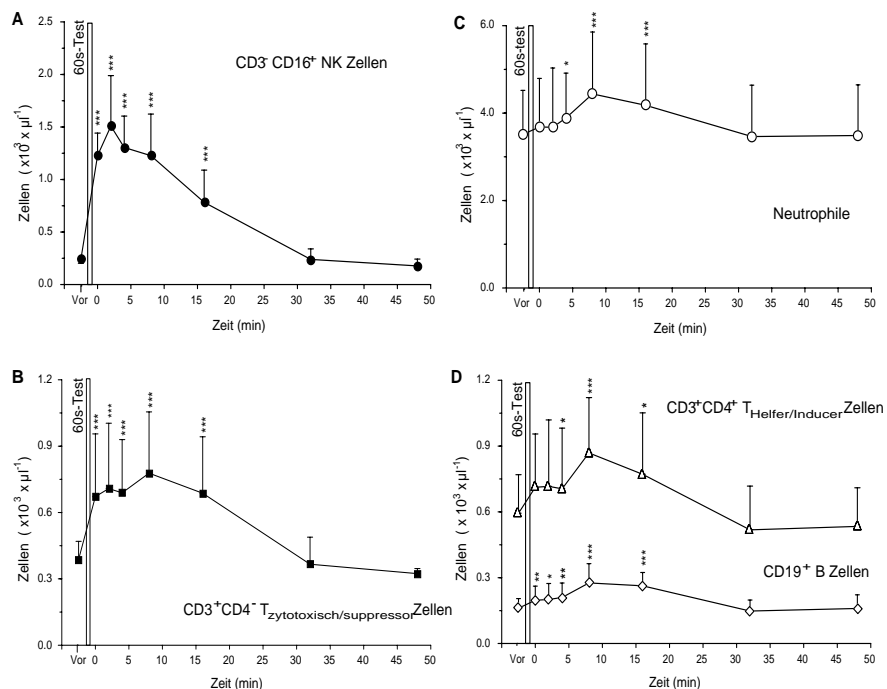


Abbildung 3: Absolute Zellkonzentrationen von A: NK Zellen; B: T_{cytotoxisch/Suppressor}-Zellen; C: Neutrophilen und D: T_{Helfer/Inducer}-Zellen und B Zellen vor und nach dem 60sekündigen Maximaltest auf dem Fahrradergometer. Weitere Informationen s. Legende zu Abbildung 1.

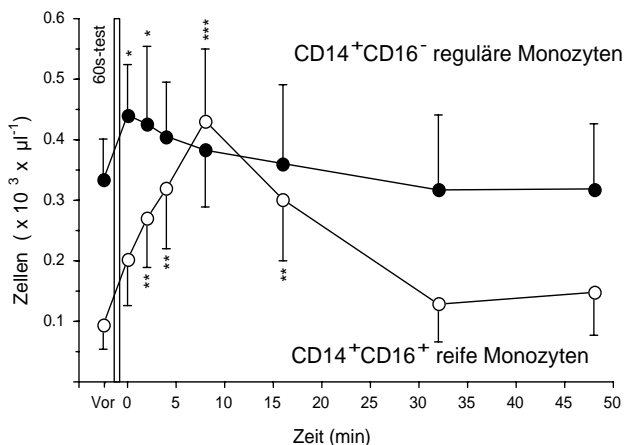


Abbildung 4: Absolute Zellkonzentrationen der Monozytensubpopulationen vor und nach dem 60sekündigen Maximaltest auf dem Fahrradergometer. Weitere Informationen s. Legende zu Abbildung 1.

fortige Leukozytose bei anaerober Belastung während der ersten Stunde nach Belastung aus einem biphasischen Anstieg der Leukozytensubpopulationen besteht. Die anaerobe Belastung wurde analog zu dem bereits früher beschrieben 60-Sekunden-Test durchgeführt (15).

Die Ergebnisse zeigen, dass die sofortige Leukozytose nach anaerober Belastung innerhalb von 30 Minuten erfolgt. Die mobilisierten Leukozyten stiegen innerhalb einer Minute während Belastung an, erreichten das Maximum nach 8 Minuten in der Nachbelastungsphase und hatten das Ausgangsniveau nach 32 Minuten wieder erreicht. Somit beschreibt dieses Verhalten eine reversible Mobilisation aus dem marginalen Pool.

Hinsichtlich der untersuchten Leukozytensubpopulationen konnten während der sofortigen Leukozytose zwei Mobilisationsphasen nachgewiesen werden. Der erste Zellanstieg bestand aus NK-Zellen, T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen und regulären CD14⁺CD16⁻-Monozyten. Dieser Anstieg ist durch eine schnelle Zellmobilisation charakterisiert, die bereits während

Belastung beginnt und das Maximum während 1 - 2 Minuten nach Belastungsabbruch des 60-Sekunden-Tests erreicht (mit Ausnahme der T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen, die einen etwas langsameren und diskreteren Anstieg aufwiesen). Die natürlichen Killerzellen zeigten den größten Anstieg aller Lymphozytensubpopulationen mit einem mehr als fünffachen Anstieg, gefolgt von den T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen. Entsprechend vorangegangener Studienergebnisse sind diese Zellpopulationen diejenigen, die den größten Anstieg bei hochintensiven Belastungen aufweisen (8, 14, 15, 21).

Eine zweite (langsamere) Phase der sofortigen Leukozytose konnte durch die Mobilisation von Neutrophilen, T_{Helfer/Inducer}-Zellen, B-Zellen und reifer CD14⁺CD16⁺-Monozyten (Prämakrophagen) nachgewiesen werden, deren Maximum zum Zeitpunkt 8 Minuten nach Belastungsabbruch vorlag. Hierbei ist anzumerken, dass sowohl Neutrophile als auch T_{Helfer/Inducer}-Zellen zunächst weder während Belastung noch bis 4 Minuten nach Belastungsabbruch einen signifikanten Anstieg aufwiesen.

Das bemerkenswerteste Mobilisationsverhalten konnte für die Monozytensubpopulationen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den regulären CD14⁺CD16⁻-Monozyten wiesen die aktivierten CD16 (Fc-gamma III-Rezeptor) exprimierenden Prämakrophagen (CD14⁺CD16⁺-Monozyten) (13, 29) einen späteren und überproportionalen Anstieg auf. Bei Gesunden in Ruhe beträgt der Anteil der Prämakrophagen 10 bis 15% der zirkulierenden Monozyten. Der nahezu 4-fache Anstieg der Prämakrophagen führte zu einem Anteil von nahezu 50%. Dieses Ergebnis zeigt, dass im Gegensatz zu den regulären CD14⁺CD16⁻-Monozyten die CD14⁺CD16⁺-Prämakrophagen zu einem Großteil dem marginalen Pool angehören und somit dessen Funktion als ein Pool aktivierter Immunzellen angesehen werden kann, die dazu bereitstehen, in das Zielgewebe zu migrieren.

Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen somit die Hypothese einer zweiphasigen sofortigen Leukozytose. Dies war in der vorliegenden Studie durch die eng beieinander liegenden

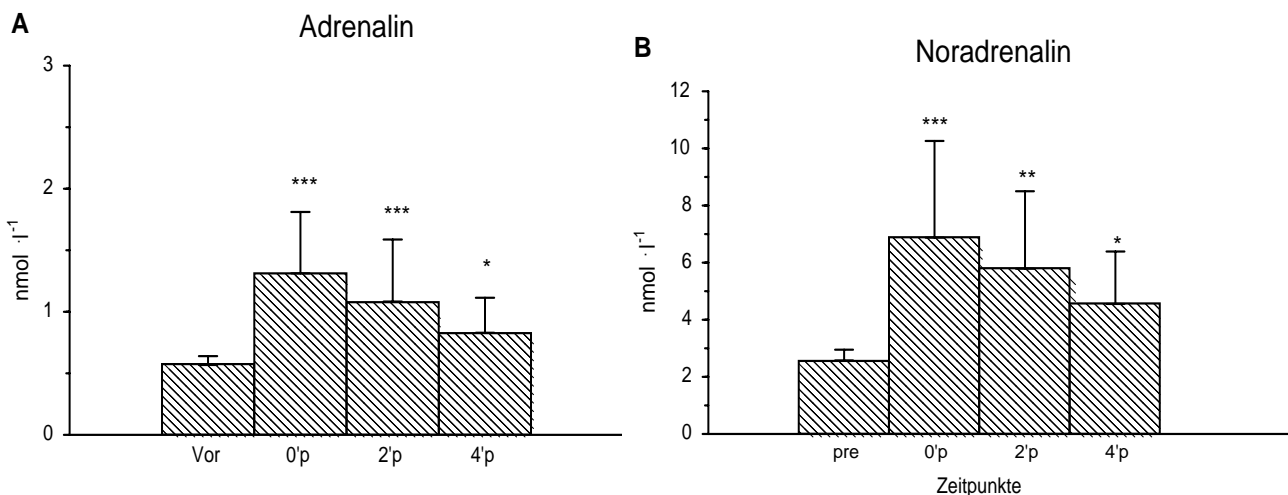


Abbildung 5: Plasmakonzentrationen von A: Adrenalin und B: Noradrenalin vor und nach dem 60sekündigen Maximaltest auf dem Fahrradergometer. Weitere Informationen s. Legende zu Abbildung 1.

Blutentnahmezeitpunkte möglich, wodurch die maximalen Anstiege der jeweiligen Zellsubpopulationen bestimmt werden konnten. Anstiege mobilisierter Zellen wie z. B. Monozyten, für die ein schnelles An- und Abfluten innerhalb drei bis vier Minuten typisch ist, oder Neutrophile und T_{Helfer/Inducer}-Zellen, die nur für einige Minuten während der Nachbelastungsphase ansteigen, können nur durch rasch aneinander folgende Blutentnahmen nachgewiesen werden. Somit belegen die vorliegenden Ergebnisse die Bedeutung der Blutentnahmezeitpunkte zur Charakterisierung der sofortigen Leukozytose.

Die aufeinanderfolgende Mobilisation mit zwei verschiedenen Phasen legt die Vermutung nahe, dass der belastungsinduzierte Anstieg der unterschiedlichen Subpopulationen des marginalen Pools verschiedenen Mechanismen unterliegt. Zwei mögliche Mechanismen wurden bereits in der Literatur diskutiert:

- Erstens beeinflussten die Hämodynamik mit Abnahme der leukozytär-endothelialen Interaktionen und die mechanische Ablösung der wandständigen Zellen von der Gefäßwand die Zusammensetzung des zirkulierenden und marginalen Zellpools. Hierbei führt die Aktivierung des sympathischen Systems zu einem Anstieg des Herzzeitvolumens, der wiederum zu einem Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit in Verbindung mit erhöhten Scherkräften am Endothel führt und zusätzlich eine erhöhte Perfusion in zuvor weniger perfundierten Regionen, wie z. B. der Lunge, ermöglicht, die einen intravaskulären Pool der Leukozyten und Neutrophilen darstellt (1, 9, 16). Das sogenannte "Rolling and sticking" der Leukozyten an den Endothelzellen, das durch Selektine gesteuert wird, wird als ein dynamischer und reversibler Prozess angesehen, der von den hämodynamischen Gegebenheiten abhängig ist (1, 16). Veränderungen der oben erwähnten Parameter münden in einer Verschiebung des Gleichgewichts von anhaftenden und zirkulierenden Blutzellen im Gefäßsystem, was hinsichtlich des Einflusses von sportlicher Belastung zu einem Nettoanstieg der zirkulierenden Leukozyten führt.
- Zweitens führen biochemische Mechanismen zu einer veränderten Adhärenz der Leukozyten. Wichtigstes Adhäsionsmolekül für die endotheliale Bindung und den Beginn der transendothelialen Migration ist das Integrin LFA-1, welches an die endothelialen Rezeptoren ICAM 1 und ICAM-2 bindet. In einem Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die LFA-1-Expressionsdichte bei Leukozyten des marginalen Pools - mit Ausnahme der Neutrophilen - höher ist als diejenige der zirkulierenden Zellen (18). Zusätzlich zur Expressionsdichte spielt die Avidität dieser Moleküle eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Adhäsion und ist abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle bzw. vom Zellrezeptor (5, 11). Die sympathische Aktivierung während Belastung verursacht erhöhte Plasmakatecholamin-Konzentrationen. In verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Studien konnte insbesondere gezeigt werden, dass Adrenalin einen direkten, über β_2 -Adrenozeptoren vermittelten Einfluss auf die Leukozytenadhäsion an den Endothelzellen hat, die

auf der Oberfläche beider Zellen (Leukozyten und Endothelzellen) exprimiert werden. Darüber hinaus scheinen auch Alpha-Adrenozeptoren einen Einfluss zu haben, allerdings nur bei der Mobilisation der Neutrophilen (3). Sowohl Infusionen mit Adrenalin als auch mit β_2 -Agonisten (z. B. Isoproterenol) führen zu einem Anstieg der Leukozyten-Konzentrationen in der Zirkulation, der überwiegend durch Lymphozyten und NK-Zellen bedingt ist. Darüber hinaus führte diese Behandlung in-vitro unabhängig vom Blutfluss an Endothelkulturen zu einer Ablösung adhärenter NK-Zellen. β_2 -Antagonisten führten hierbei zu einer Abschwächung dieses Effekts (2, 3, 28). Es wurde postuliert, dass eine Adrenalin-abhängige Stimulationen von Leukozyten und/oder Endothelzellen über den β_2 -Adrenorezeptor zu einer Modifizierung der oben erwähnten Adhäsionsmoleküle und somit einer verminderten Avidität der Bindungskräfte am Endothel führt (2, 4, 10, 11, 26).

Bezüglich der unterschiedlichen Mobilisationsphasen kann davon ausgegangen werden, dass während der ersten Mobilisationsphase bei den natürlichen Killerzellen, T_{zytotoxisch/Suppressor}-Zellen und regulären CD14⁺CD16⁻-Monozyten beide Mechanismen eine synergistische Rolle spielen. Im Gegensatz dazu scheinen hämodynamische Effekte während der zweiten Mobilisationsphase bei Neutrophilen, T_{Helfer/Inducer}-Zellen, B-Zellen und reifen CD14⁺CD16⁺-Monozyten (Prämakrophagen) einen geringeren Einfluss als die Katecholamine zu haben, die länger als die Herzfrequenz erhöht bleiben (s. Abb. 2). Allerdings sind zeitverzögerte Effekte beider Einflussgrößen (Hämodynamik und Katecholamine) nicht sicher auszuschließen.

Fazit

Erstmals konnte nachgewiesen werden, dass die sofortige Leukozytose aus zwei unterschiedlichen Phasen besteht. Dies muss insbesondere im Rahmen von Untersuchungen mit anaeroben Belastungsformen bei der Interpretation immunologischer Parameter berücksichtigt werden. Darüber hinaus sollten Blutentnahmen in der täglichen Praxis – falls anders nicht möglich – erst nach ausreichend langem zeitlichen Abstand (ca. 30 Minuten) zu vorangegangenen kurzen, aber intensiven Belastungen erfolgen.

Literatur

1. Benschop R, Godaert G, Geenen R, Brosschot J, De Smet M, Olf M, Heijnen C, Ballieux R: Relationships between cardiovascular and immunological changes in an experimental stress model. *Psychol Med* 25 (1995) 323-327
2. Benschop R, Nijkamp F, Ballieux R, Heijnen C: The effects of β -adrenoceptor stimulation on adhesion of human natural killer cells to cultured endothelium. *Br J Pharmacol* 113 (1994) 1311-1316
3. Benschop R, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M: Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Immun* 10 (1996) 77-91
4. Boxer L, Allen J, Baehner R: Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine. *J Clin Invest* 66 (1980) 268-274
5. Carlos T, Harlan J: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84 (1994) 2068-2101

6. *Da Prada M, Zürcher G*: Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline, and dopamine within femotole range. *Life Sci* 19 (1976) 1161-1174
7. *Dill DB, Costill DL*: Calculation of percentage changes in volume of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37 (1974) 247-248
8. *Ferry A, Picard F, Duvallet A, Weill B, Rieu M*: Changes in blood leucocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol* 59 (1990) 435-442
9. *Foster NK, Martyn JB, Rangno RE, Hogg JC, Pardy RL*: Leukocytosis of exercise: Role of cardiac output and catecholamines. *J Appl Physiol* 61 (1986) 2218-2223
10. *Gabriel H, Kindermann W*: The acute immune response to exercise: What does it mean? *Int J Sports Med* 18 (1997) S28-S45
11. *Gabriel H, Kindermann W*: Adhesion molecules during immune response to exercise. *Can J Physiol Pharmacol* 76 (1998) 1-12
12. *Gabriel H, Schwarz L, Born P, Kindermann W*: Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol* 65 (1992) 529-534
13. *Gabriel H, Urhausen A, Brechtel L, Müller HJ, Kindermann W*: Alterations of regular and mature monocytes are distinct and dependent of intensity and duration of exercise. *Eur J Appl Physiol* 69 (1994) 179-181
14. *Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W*: Circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after intensive endurance exercise to exhaustion. *Eur J Appl Physiol* 63 (1991) 449-457
15. *Gabriel H, Urhausen A, Kindermann W*: Mobilization of circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations during and after short, anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 65 (1992) 164-170
16. *Kuhnle G, Kuebler W, Groh J, Goetz A*: Effect of blood flow on the leucocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. *Am J Respir Crit Care Med* 152 (1995) 1221-1228
17. *Hansen JB, Wilsgard L, Osterud B*: Biphasic changes in leucocytes induced by strenuous exercise. *Eur J Appl Physiol* 62 (1991) 157-161
18. *Klonz A, Wonigeit K, Pabst R, Westermann J*: The marginal blood pool of the rat contains not only granulocytes, but also lymphocytes, NK-cells and monocytes: a second intravascular compartment, its cellular composition, adhesion molecule expression and interaction with the peripheral blood pool. *Scand J Immunol* 44 (1996) 461-469
19. *McCarthy DA, Dale MM*: The leucocytosis of exercise - A review and model. *Sports Med* 6 (1988) 333-363
20. *Nieman D, Nehlsen-Cannarella SL, Donohue KM, Chritton DBW, Haddock BL, Stout RW, Lee JW*: The effects of acute moderate exercise on leukocyte and lymphocyte subpopulations. *Med Sci Sports Exerc* 23 (1991) 578-585
21. *Nieman DC, Henson DA, Johnson R, Lebeck L, Davis JM, Nehlsen-Cannarella SL*: Effects of brief, heavy exertion on circulating lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Med Sci Sports Exerc* 24 (1992) 1339-1345
22. *Noll F*: L-(-)-lactate: Determination with LDH, GPT and NAD, in: Bergmeyer, H.U. (eds): *Methods of enzymatic analysis*. Chemie Academic Press, Weinheim New York (1974) 1475-1485
23. *Pabst R, Binns R, Licence S, Peter M*: Evidence of a selective major vascular marginal pool of lymphocytes in the lung. *Am Rev Respir Dis* 136 (1987) 1213-1218
24. *Pedersen BK*: Influence of physical activity on the cellular immune system: mechanisms of action. *Int J Sports Med* 12 Suppl 1 (1991) S23-S29
25. *Stegmann H, Kindermann W, Schnabel A*: Lactate kinetics and individual anaerobic threshold. *Int J Sports Med* 2 (1981) 160-165
26. *Steppich B DF, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HWL*: Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *Am J Cell Physiol* 279 (2000) C578-C586
27. *Tvede N, Kappel M, Halkjaer-Kristensen J, Galbo H, Pedersen BK*: The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int J Sports Med* 14 (1993) 275-282
28. *Van Tits LJH, Michel MC, Grosse-Wilde H, Happel M, Eigler FW, Brodde OE*: Catecholamines increase lymphocyte β_2 -adrenergic receptors via a β_2 -adrenergic, spleen-dependent process. *J Appl Physiol* 258 (1990) E191-E202
29. *Ziegler-Heitbrock HWL*: Heterogeneity of human blood monocytes: The CD14+CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17 (1996) 424-428

Korrespondenzadresse:
 Univ.-Prof. Dr. med. Holger Gabriel
 Friedrich-Schiller-Universität
 Lehrstuhl für Sportmedizin
 Wöllnitzer Str. 42
 D-07749 Jena
 Fax: 03641-945 652
 E-Mail: holger.gabriel@uni-jena.de