

Sz
13404

Immunmodulation von Makrophagen-Subpopulationen
im Modell des Knochenmark-Kultursystems
der Maus mit Inosin Pranobex und seinen Komponenten
sowie OK432 und Dexamethason

von

Gunda Karin Elisabeth Lepel

**Immunmodulation von Makrophagen-Subpopulationen
im Modell des Knochenmark-Kultursystems der Maus mit Inosin Pranobex
und seinen Komponenten sowie OK432 und Dexamethason**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Gunda Karin Elisabeth Lepel
aus
Wilhelmshaven

Referent: Herr Universitätsprofessor
Dr. med. W. Schmutzler

Korreferent: Herr Privatdozent
Dr. med. K. Schweizer

Tag der mündlichen Prüfung: 22. August 1995



Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Einführung | 1 |
| 1.1 | Rolle der Makrophagen im Immunsystem | 1 |
| 1.2 | Differenzierung von Makrophagen in Subpopulationen | 3 |
| 1.3 | Murine Makrophagenantigenstrukturen | 4 |
| 1.3.1 | F4/80 | 4 |
| 1.3.2 | BM8 | 5 |
| 1.3.3 | I _A | 5 |
| 1.4 | Cytochemische Differenzierung von Makrophagen-Subpopulationen | 6 |
| 1.4.1 | Endogene Peroxidase | 6 |
| 1.4.2 | Esterase | 7 |
| 1.5 | Immunmodulatoren | 8 |
| 1.5.1 | OK432 | 9 |
| 1.5.2 | Dexamethason | 10 |
| 1.5.3 | Inosin Pranobex | 12 |
| 2. | Fragestellung der eigenen Untersuchung | 15 |
| 3. | Untersuchungsgut und Methoden | 17 |
| 3.1 | Tiere | 17 |
| 3.2 | Materialien | 17 |
| 3.2.1 | Medien | 17 |
| 3.2.1.1 | Waschmedium | 17 |
| 3.2.1.2 | Kulturmedium | 18 |
| 3.2.2 | Puffer | 18 |
| 3.2.2.1 | Phosphat gepufferte Saline (PBS) | 18 |
| 3.2.2.2 | Acetatpuffer | 18 |
| 3.2.2.3 | Soerensen-Puffer | 18 |
| 3.2.3 | Chemikalien, Färbelösungen und Materialien zur indirekten Immunperoxidase-Technik | 19 |
| 3.2.4 | Chemikalien, Färbelösungen und Materialien zur Acetat-Esterase-Färbung | 19 |
| 3.2.5 | Verwendete Antikörper und Antiseren | 20 |
| 3.2.6 | Pharmaka | 20 |
| 3.2.7 | Großgeräte | 22 |
| 3.2.8 | Materialien zur Präparation der Knochenmarkmakrophagen | 22 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3 | <i>Methoden</i> | 23 |
| 3.3.1 | Knochenmark-Kultursystem | 23 |
| 3.3.2 | Indirekte Immunperoxidase-Färbung | 24 |
| 3.3.3 | Cytochemische Esterase-Acetat-Färbung | 25 |
| 3.4 | Mikroskopische Auswertung | 26 |
| 3.5 | Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen | 26 |
| 3.6 | Statistische Auswertung | 27 |
| 4. | <i>Ergebnisse</i> | 29 |
| 4.1 | Einfluß der Immunmodulatoren auf die Gesamtzellzahl nach Inkubation mit einem Immunmodulator über 48 und 72 Stunden | 31 |
| 4.2 | Einfluß der Immunmodulatoren auf die Vitalität der Zellen nach 48 und 72 Stunden Zellkultur | 32 |
| 4.3 | Einfluß der Immunmodulatoren auf den I _A -positiven Makrophagen | 35 |
| 4.4 | Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Pharmaka unterschiedlicher Konzentration und Knochenmarkmakrophagen der Maus | 36 |
| 4.4.1 | BM8-Ausprägung | 36 |
| 4.4.2 | Esterase-Ausprägung | 36 |
| 4.4.3 | Bestimmung der optimalen Wirkkonzentration der Immunmodulatoren | 41 |
| 4.5 | Einfluß der Inkubationsdauer der Pharmaka auf die Immunmodulation der Knochenmarkmakrophagen | 42 |
| 4.5.1 | Einfluß der Inkubationsdauer auf die Immunmodulation des BM8-Makrophagen | 42 |
| 4.5.2 | Einfluß der Inkubationsdauer auf die Immunmodulation des Esterase-produzierenden Makrophagen | 43 |
| 4.6 | <i>Variationsbreite der Immunmodulation nach zwei und drei Tagen Zellkultur</i> | 47 |
| 4.6.1 | Variationsbreite der Immunmodulation des BM8-Makrophagen nach zwei Tagen Zellkultur | 48 |
| 4.6.2 | Variationsbreite der Immunmodulation des BM8-Makrophagen nach drei Tagen Zellkultur | 50 |
| 4.6.3 | Variationsbreite der Immunmodulation des Esterase-produzierenden Makrophagen nach zwei Tagen Zellkultur | 52 |
| 4.6.4 | Variationsbreite der Immunmodulation des Esterase-produzierenden-Makrophagen nach drei Tagen Zellkultur | 52 |

| | | |
|-----|--|----|
| 5. | Diskussion | 55 |
| 5.1 | Das Knochenmark-Kultursystem als in-vitro Modell für Untersuchungen an Makrophagenkulturen | 55 |
| 5.2 | Auswirkung der Immunmodulatoren auf die Gesamtzellzahl nach Knochenmarkkultur | 57 |
| 5.3 | Der I _A -Makrophage im Knochenmark-Kultursystem | 58 |
| 5.4 | Dosis-Wirkungsbeziehung der untersuchten Pharmaka auf die Makrophagen-Subpopulationen BM8- und Esterase-produzierender Makrophagen | 60 |
| 5.5 | Inosin Pranobex | 61 |
| | 5.5.1 Wirkung auf den BM8-Makrophagen | 62 |
| | 5.5.2 Wirkung auf den Esterase-produzierenden Makrophagen | 63 |
| 5.6 | OK432 | 64 |
| | 5.6.1 Wirkung auf den BM8-Makrophagen | 65 |
| | 5.6.2 Wirkung auf den Esterase-produzierenden Makrophagen | 65 |
| 5.7 | Dexamethason | 66 |
| | 5.7.1 Dexamethasonwirkung auf den BM8-Makrophagen | 67 |
| | 5.7.2 Dexamethasonwirkung auf den I _A -Makrophagen | 68 |
| | 5.7.3 Dexamethasonwirkung auf den Esterase-produzierenden Makrophagen | 70 |
| 6. | Zusammenfassung | 71 |
| 7. | Tabellenanhang | 72 |
| 8. | Literaturverzeichnis | 82 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| AG-AK-Reaktion | Antigen-Antikörper-Reaktion |
| APC | antigen-präsentierende Zelle |
| BCG | Bacille-Calmette-Guérin |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CD4 | cluster-defined (Gruppe von monoklonalen Antikörpern, die ein Antigen oder Epitop erkennen) |
| CSF-1 | koloniestimulierender Faktor 1 |
| Dip | 1,1-Dimethylaminopropanol |
| DipPacBa | 1,1-Dimethylaminopropanol-4-Acetamidobenzoesäure |
| Esterase | unspezifische Esterase |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor |
| I _A | Region I (Immun) assoziiertes Antigen |
| IgG | Immunglobulin der Klasse G |
| Il-1 | Interleukin-1 |
| Il-2 | Interleukin-2 |
| Il-6 | Interleukin-6 |
| Il-8 | Interleukin-8 |
| InPx | Inosin Pranobex |
| K | Mittelwert der Kontrollgruppe |
| kDa | Kilodalton |
| M | molar |
| M-CSF | Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MIF | Migration Inhibitory Factor |
| mRNA | Messenger RNA |

| | |
|---------------|-----------------------------------|
| OK432 | Picibanil |
| PacBa | 4-Acetamidobenzoensäure |
| PBS | Phosphat gepufferte Saline |
| Pha | Mittelwert der Pharmakongruppe |
| S_x | Standardabweichung vom Mittelwert |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor-Alpha |

1. Einführung

1.1 Rolle der Makrophagen im Immunsystem

Das Immunsystem stellt ein komplexes System spezifischer Immunzellen in mehreren Organen dar. Diese Zellen lassen sich ihrer Herkunft gemäß grob in zwei Gruppen einteilen. Zu den Zellen der lymphatischen Reihe zählen die B-Lymphozyten (bei Vögeln in der sog. Bursa fabricii, bei Säugetieren in der fetalen Leber, Milz sowie im fetalen und adulten Knochenmark gebildet), die T-Lymphozyten (aus dem Thymus stammend) sowie die sogenannten "0"-Zellen, auch "Dritte Population"-Zellen genannt, die wahrscheinlich aus dem Knochenmark stammen, und deren Hauptvertreter die NK-Zellen (natural killer cells) sowie die ADCC-Zellen (antibody-dependent-cytotoxic cells) sind. Die zweite Gruppe der Immunzellen bilden die Zellen der myeloischen Reihe. Dazu gehören u.a. die polymorphkernigen Granulozyten, die als Effektorzellen vor allem durch Phagozytose wichtige Funktionen im akuten Entzündungsgeschehen sowie bei der unspezifischen Erregerabwehr ausüben. Je nach histologischer Anfärbbarkeit ihrer Granula lassen sich neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterscheiden. Ebenfalls aus der myeloischen Stammzelle gehen die Zellen des mononukleären phagozytären Systems hervor, zu denen der Makrophage in all seinen Erscheinungsformen in den unterschiedlichen Organsystemen gehört.

Die Immunantwort des Körpers läßt sich ebenfalls in zwei Arten aufgliedern. Bei der humoralen Immunantwort kommt es über eine Aktivierung der B-Zell-Reihe zu einer spezifisch auf das Antigen ausgerichteten Antikörperproduktion, d.h. zu einer antikörpervermittelten Immunität, während bei der zellulären Immunantwort über die Aktivierung der T-Zell-Reihe spezifische cytotoxische T-Zellen gebildet werden.

Der Makrophage besitzt nun als zentrale Schaltstelle der Immunantwort zahlreiche regulative Funktionen in der Aktivierung der einzelnen Lymphozytenpopulationen (Unanue und Allen, 1987). Antigenes Material ("Fremdmaterial") wird vom Makrophagen erkannt, phagozytiert und weiterverarbeitet (sog. "processing" des Antigens). Teile des Antigens werden schließlich auf der Zelloberfläche exprimiert, der Makrophage ist jetzt eine antigen-präsentierende Zelle (APC) für die Lymphozyten. Meist ist jedoch zur Aktivierung der B- oder T-Lymphozyten die zusätzliche Erkennung über die Determinante des MHC-Komplexes (Major histocompatibility complex) notwendig. Der MHC-Komplex, beim Menschen auf Chromosom 6, bei der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert, kodiert drei Proteingattungen: die Antigenstrukturen des MHC I-Komplexes (Mensch HLA-A,B,C; Maus Region

K,D) sind auf allen kernhaltigen Zellen ausgebildet, die Antigene der MHC II-Region (Mensch HLA-D, DR; Maus: I (für Immun) -Region) befinden sich unter anderem auf B-Lymphozyten, einigen Makrophagen und Monozyten, einigen Epithelialzellen sowie auf einigen aktivierten T-Zellen. (Die MHC III - Region kodiert schließlich bestimmte Komplementfaktoren). CD4⁺-Zellen (T-Helfer-Zellen) können die antigenpräsentierende Zelle nur in Verbindung mit der MHC II-Struktur erkennen (MHC-II-Restriktion). Interleukin-1 Freisetzung aus den Makrophagen als APC führt jetzt zur Aktivierung und klonalen Expansion von T- und B-Zellen. Gleichzeitig werden die T-Zellen zur Freisetzung von Interleukin-2 angeregt, was einerseits die T-Zell-Proliferation weiterführt und andererseits zur Makrophagenaktivierung führt. Die Antigenpräsentation des Makrophagen stärkt so über eine zum Teil T-Helfer-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen die humorale Immunantwort, sowie über T-Zell-Aktivierung die zellvermittelte Immunität. Gleichzeitig wird über diese Aktivierung umgekehrt durch Ausschüttung mehrerer Cytokine die Makrophagenaktivierung und damit die Effektorphase der Immunantwort eingeleitet (Johnston, 1988).

Cytokine können für den Makrophagen Signal für eine spezifische Differenzierung sein. Sie können zur Proliferation anregen, d.h. mitogen wirken, oder den Makrophagen einfach nur im Rahmen der akuten Entzündung aktivieren, ihn also ins Entzündungsgebiet locken, seine Phagozytoseleistung oder Zytotoxizität steigern (Sorg, 1982). Botenstoffe aus Makrophagen können dabei die erste Phase einer akuten Entzündung einleiten. So können Interleukin1 (Il-1), Thrombin und der Tumornekrosefaktor -Alpha (TNF- α) am Gefäßendothel bestimmte Lektine induzieren, die zur Adhäsion und Diapedese von Granulozyten am Endothel führen. Gleichzeitig steigern Il-1 und TNF- α die Gefäßpermeabilität, Prostaglandine aus den Makrophagen bewirken eine Vasodilatation, so daß mehr Entzündungszellen in das Gebiet einströmen können (Seljelid und Busund, 1994).

Die Entzündungs- und Fieberreaktion des Organismus wird ebenfalls durch Makrophagen-Mediatoren aufrecht erhalten. Il-1 wirkt stark pyrogen, die Freisetzung von H₂O₂, sauren Hydrolasen, Komplementfaktoren, TNF- α führen eine Gewebeschädigung herbei, die in pathologisch gesteigerter Form in einer Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (allergische Typ IV-Reaktion) enden kann.

Als Effektorzellen der Immunantwort führen Makrophagen zur Eliminierung des Antigens. Sie entfalten eine antimikrobielle Aktivität durch Abtötung des Fremddorganismus mittels H₂O₂, Sauerstoffradikalen freier Hydroxylgruppen oder sauerstoffunabhängig im Lysosom, z. B. mittels Säurehydrolasen oder kationischen Proteinen. Die zytotoxischen Mediatoren wie z. B. Tumornekrosefaktor (TNF- α),

Proteasen, Arginase, Komplementfaktor 3, weisen dem Makrophagen auch eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von malignen Tumoren zu (Nathan, 1987).

Andere Makrophagenprodukte wie Elastase, Kollagenase, Hyaluronidase, Fibroblastenstimulierender Faktor V, Angiogenesefaktor, Wachstumsfaktoren wie der Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierende Faktor, leiten schließlich wieder die Organheilung ein (zusammengefaßt aus I. Roitt, 1991).

Für die meisten dieser Makrophagenfunktionen ist *in situ* die vorherige Aktivierung der Zelle, z. B. mittels spezieller Cytokine, notwendig.

In vitro lassen sich mononukleäre Phagozyten unter anderem durch Zugabe von Interleukinen, Endotoxinen wie LPS oder z. B. durch mechanische Faktoren wie Oberflächen von Glas oder Plastikgefäßen aktivieren (Malorny et al, 1981).

1.2 Differenzierung von Makrophagen in Subpopulationen

Die mononukleären Phagozyten sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die sowohl die im Blut zirkulierenden Monozyten als auch die residenten Makrophagen umfaßt, so z. B. die sogenannten Kupfferschen Sternzellen der Leber, die Mikrogliazellen des ZNS, Peritonealmakrophagen, Makrophagen der Milz etc.

Diese Gewebemakrophagen stellen in den einzelnen Organen einen Teil des sogenannten Retikulo-Endothelialen Systems dar.

Trotz ihrer großen funktionellen und morphologischen Unterschiede gilt es heute als sicher, daß sie sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle entwickeln (Johnston, 1982).

Granulozyten und Monozyten gehen dabei aus der gleichen Knochenmarkstammzelle hervor. Unter dem Einfluß von Makrophagenkolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF oder CSF-1) entwickeln sich jedoch aus dieser Stammzelle Makrophagenkulturen. Über mehrere Vorstufen bilden sich so aus der Stammzelle Monoblasten, Promonozyten und schließlich Monozyten, die in die Blutbahn ausgeschwemmt werden und an ihrem Zielgebiet im Gewebe zum Makrophagen ausreifen. *In vitro* reifen die Zellen in der Kultur zum Makrophagen aus (Austin et al, 1970).

Dieser Reifungsprozeß läßt sich sehr gut am Knochenmark-Kultursystem der Maus für nicht adhärenente Zellen beobachten, das als erstes von Summer und Goud als *in vitro*-Modell eingeführt wurde (Summer et al, 1972; Goud et al 1975). Knochenmarkstammzellen, gewonnen durch Ausspülen der Markhöhle langer Röhrenknochen der Maus, werden in ein Kulturmedium eingesetzt, das den Makrophagenkoloniestimulierenden Faktor M-CSF enthält. In unserer Untersuchung wurde dafür L-Zell-Medium zugesetzt (Austin et al, 1970), das den Faktor als 85 kDa

Glykoprotein enthält (Stanley und Heard, 1977). Neuere Untersuchungen zeigen, daß auch noch andere schwerere M-CSF existieren (Ohtsuki et al, 1992; Suzu et al, 1992).

Während ihrer Reifungsphase exprimieren die Zellen verschiedene Oberflächenantigene, korrelierbar mit unterschiedlichen Phänotypen (Nibbering et al, 1987). In dieser Phase der transienten Phänotypen üben sie bestimmte Funktionen aus, die sie in späterem Alter auch wieder verlieren können; so kann der junge Makrophage Plasminogenaktivator ausschütten, während die ältere Zelle statt dessen Fibrinolyse-Inhibitoren sezerniert (Neumann und Sorg, 1980; Sorg, 1982). Durch Lymphokinzusatz wie MIF (Migration inhibitory factor) kann der Differenzierungsprozeß des Makrophagen verändert werden (Sorg et al, 1984). Im Knochenmark-Kultursystem ist der reife Makrophage nur während einer begrenzten Zeit sensibel für MIF. Jüngere Makrophagen reifen durch MIF schneller aus, während bereits ausdifferenzierte Zellen sich wieder zurückentwickeln können. MIF wirkt also M-CSF-antagonistisch (Sorg et al, 1984).

Anhand der unterschiedlichen Phänotypen mit ihren spezifischen Funktionen lassen sich mehrere Subpopulationen abgrenzen, die die Heterogenität der Makrophagen unterstreichen.

1.3 Murine Makrophagenantigenstrukturen

Makrophagen-Subpopulationen lassen sich unter anderem durch Nachweis bestimmter Antigenstrukturen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern unterscheiden.

1.3.1 F4/80

Der als sogenannter Panmakrophagenmarker bezeichnete monoklonale Antikörper F4/80 erkennt ein 160 kDa Plasmamembranantigen auf Mäusezellen des monokleären phagozytären Systems.

Die pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks reagieren noch F4/80 negativ. Zugabe des Makrophagenkoloniestimulierenden Faktors (M-CSF) führt dann zur Ausbildung des Antigens, so daß mit F4/80 sowohl Vorläuferzellen als auch ausgereifte Makrophagen erkannt werden können. Zellen der Granulozytopoese bleiben jedoch F4/80-negativ (Gordon et al, 1985; Hume und Gordon, 1985). Dieser Antikörper grenzt damit die Makrophagenzelllinie eindeutig von der der Granulozyten ab, Makrophagen-Subpopulationen lassen sich mit ihm jedoch nicht unterscheiden.

1.3.2 BM8

Der BM8-positive Makrophage gilt als Vertreter eines inflammatorischen Makrophagensubtyps residenter Makrophagen (Malorny et al, 1986). Der BM8-Antikörper wurde durch Immunisierung von DA-Ratten mit Balb-c-Mäuse-Makrophagen und Fusion der Rattenmilzzellen mit Myeloma-Zellen aus Balb-c-Mäusen gewonnen (Malorny et al, 1986).

Dieser monoklonale Antikörper gehört zur IgG_{2a} - Subklasse und ist gegen ein 125 kDa Membranantigen des Makrophagen gerichtet. In situ erkennt der BM8-Antikörper zum Beispiel reife, gewebefixierte Makrophagen und Langerhanszellen der Haut, sowie in der Milz und den Lymphknoten die Makrophagen in der roten Pulpa und in den Marksträngen. In durch Freund's komplettes Adjuvans induzierten Granulomen reagieren die entzündlichen Zellen BM8-positiv, die Epitheloidzellen als postinflammatorische Zellen tragen das Antigen nicht. Die Makrophagenvorstufen einschließlich der Blutmonozyten sind BM8-negativ.

Dieses Antigen tritt erst im späten Differenzierungsstadium der Makrophagen auf. In vitro steigt im Knochenmark-Kultursystem der Anteil BM8-positiver Makrophagen von 0 auf ca. 80 % nach 7 - 10 Kulturtagen an. Funktionell gesehen gehören die BM8-positiven Zellen zu den Phagozytosezellen, d.h., alle Makrophagen mit diesem Phänotypen können Latexpartikel phagozytieren. Umgekehrt reagieren jedoch nicht alle phagozytierenden Zellen BM8-positiv. Ein Teil der BM8-positiven Makrophagen kann außerdem den Migration inhibierenden Faktor (MIF) produzieren (Malorny et al, 1988). Nur eine geringe Anzahl der Makrophagen bildet auf ihrer Oberfläche zusätzlich zum BM8-Antigen auch die Strukturen des MHC-II-Komplexes (I_A) aus. Andererseits reagieren nur sehr wenige I_A-tragende Makrophagen auch BM8-positiv. Die gleichzeitige Ausprägung von I_A ist also vom BM8-Antigen unabhängig (Malorny et al, 1986).

BM8-Makrophagen scheinen außerdem wichtig zu sein zur Regulation der T-Zell-Antwort, so können sie z. B. eine mitogen-induzierte Lymphozytenproliferation supprimieren (Zwadlo-Klarwasser et al, 1994).

1.3.3 I_A

Nach Aufnahme eines Fremdstoffes und Prozessierung dieses Antigens exprimieren Makrophagen an ihrer Oberfläche Teile dieser Antigenstrukturen. Lymphozyten-Helferzellen (CD4-Zellen, T₄ o. T_H-Zellen) erkennen dieses Antigen, wenn der Makrophage gleichzeitig die Moleküle des MHC-II-Komplexes exprimiert. Es kommt so einerseits zu einer Aktivierung der Lymphozyten (Unanue und Allen,

1987), andererseits zu einer Freisetzung von Il-1 aus den Makrophagen (Zimecki et al, 1988). Bei der Maus entspricht die MHC-II-Region dem I_A-Antigen (Region I assoziiertes Antigen). Das I_A-Antigen des Makrophagen ist dabei zur Induktion der primären Immunantwort notwendig, aber vor allem, um bei erneutem Antigen-Kontakt die spezifische Immunantwort des Organismus durch Stimulation der spezifischen -T-Zell-Klone auszulösen (Handa et al, 1989), gleichzeitig steigt die I_A-Expression der Makrophagen antigen-spezifisch an (Kaltreider et al, 1988). Der I_A-positive Makrophage nimmt als antigenpräsentierende Zelle (APC) wichtige Funktionen im Immunsystem wahr. Aber nur eine begrenzte Anzahl Makrophagen trägt das I_A-Antigen. Dieser Anteil ist jeweils typisch für die einzelnen Organe bzw. Herkunftsgewebe der Zellen. So finden sich z. B. in der Peritonealhöhle nur ca. 10 % I_A-positive Makrophagen (Schwartz R.H. et al, 1976), während Makrophagen der Milz zu mehr als 50 % das Antigen tragen (Cowing et al, 1978).

Das I_A-Antigen erweist sich *in vivo* wie *in vitro* als sehr labil. Es wird von manchen Zellen nur vorübergehend ausgebildet, und auch nur auf verschiedene Stimuli hin, wie z. B. Phagozytosereiz (Beller et al, 1980; Beller und Unanue, 1981). In der *in vitro*-Kultur verlieren die Makrophagen mit zunehmender Kulturdauer spontan das I_A-Antigen sowie die Fähigkeit, es neu zu synthetisieren (Beller und Unanue, 1981). Interferon-Gamma wirkt jedoch als Stimulus, um auch *in vitro* das I_A-Antigen zu exprimieren (Steeg et al, 1982; Salkowski und Vogel, 1992 a). In der Knochenmarkzellkultur werden spontan nur sehr wenige I_A-Makrophagen gebildet, ca. 2,5 % bei einer Kulturzeit bis zu 15 Tagen (Calamai et al, 1982). Unabhängig von seiner Funktion als antigen-präsentierende Zelle scheint der I_A-Typus des Makrophagen auch wichtig zu sein bei der Regulation eines supprimierenden Makrophagentyps. Dabei ist der I_A-positive Makrophage selbst weder cytotoxisch noch auf die Lymphozytenproliferation suppressiv wirksam (Boraschi und Niederhuber, 1982).

1.4 Cytochemische Differenzierung von Makrophagen-Subpopulationen

Als Effektorzellen des Immunsystems enthalten Makrophagen in ihrem Cytoplasma oder auch in speziellen Granula Enzyme, die sie zur Abtötung oder Lysierung des phagozytierten Materials befähigen. Durch spezielle Färbemethoden lassen sich unter Zugabe des spezifischen Enzymsubstrates die enzymtragenden Zellen anfärben.

1.4.1 Endogene Peroxidase

Die endogene Peroxidase ist das klassische Enzym des neutrophilen Granulozyten. Aber auch die Vorläuferzellen des mononukleären phagozytären Systems reagieren Peroxidase-positiv. Mit steigender Differenzierung zum Monozyten und schließlich

zum reifen Makrophagen findet sich nur noch in vereinzelt Granula eine schwache Restaktivität an Peroxidase (Yam et al, 1971).

Im Knochenmark-Kultursystem enthalten die unreifen Makrophagenvorstufen noch einen hohen Anteil an Peroxidase, mit zunehmendem Alter der Zellen nimmt dieser Anteil fast auf 0 ab (Neumann und Sorg, 1980). Als "Makrophagenmarker" eignet sich die endogene Peroxidase deshalb nicht.

1.4.2 Esterase

Esterase kommt in vielen Modifikationen in den Zellen der sogenannten weißen Reihe vor. Die für die Zellen des mononukleären phagozytären Systems typische Variante ist die unspezifische Esterase (Schmalz und Braunsteiner, 1968).

Durch Reaktion mit α -Naphthylacetat oder α -Naphthylbutyrat als Substrat färben sich Makrophagen diffus rötlich braun an, während Granulozyten nur schwach positiv reagieren. Vorläuferzellen der Granulozyten wie Myelozyten färben sich etwas stärker an, Lymphozyten können einzelne Esterase-positive Granula gelagert als typische "clumps" enthalten, Megakaryozyten zeigen eine starke unspezifische Esterase-Aktivität.

Das Enzym findet sich in geringen Mengen in Monoblasten und Promonozyten. Mit zunehmender Zellreife nimmt die Esterasemenge und dadurch die Stärke der Färbung deutlich zu. In vitro finden sich im Knochenmark-Kultursystem der Maus nach 9 Tagen 90 % Esterase-positiver Makrophagen (Neumann und Sorg, 1980; Sorg, Mol. Immunol. 1982).

Zur genauen Differenzierung der makrophagentypischen unspezifischen Esterase und Abgrenzung der granulozytären Esterasen kann zum einen die Hemmbarkeit der Färbereaktion durch NaF benutzt werden, (nur die unspezifische Esterase des Makrophagen ist damit zu hemmen), oder zum anderen die Reaktion des Azofarbstoffes mit hexazotiertem Pararosanilin sichtbar gemacht werden (Yam et al, 1971).

Dabei enthalten Monozyten und Makrophagen, aber auch die morphologisch gut davon zu unterscheidenden Histiocyten und Megakaryozyten den Farbstoff als dunkelrote Granula diffus im Cytoplasma verteilt, während Granulozyten nur eine sehr schwache Färbung zeigen.

Nicht alle reifen Makrophagen reagieren jedoch Esterase-positiv. Ein Teil der morphologisch eindeutig zu klassifizierenden Makrophagen bleibt ungefärbt, so daß mit der Esterasefärbung eine echte Subpopulation von Makrophagen erkannt werden kann (Ornstein et al, 1976).

1.5 Immunmodulatoren

Immunmodulatoren sind Substanzen, die die Immunantwort des Körpers verändern können. Mit zunehmendem Wissen über Aufbau und Funktion des Immunsystems wird versucht, durch Entwicklung immunmodulierender Pharmaka bestimmte Abwehrfunktionen gezielt zu beeinflussen, um so eine effektive Waffe gegenüber Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Immundefekten etc. zu finden.

Die Probleme sind dabei jedoch mannigfaltig. Ein Immunmodulator kann zunächst auf mehrere Zellpopulationen einwirken und dadurch sowohl immunosuppressive als auch immunstimulierende Funktionen ausüben, gleichzeitig kann durch Interaktion der einzelnen Immunzellen eine Reaktionskaskade ausgelöst werden, deren Effekte kaum voraussehbar sind (Shoham, 1985; Renoux, 1988).

So ist es durchaus möglich, durch fehlerkonzipierte Behandlungsprotokolle, z. B. durch zu hohe, zu häufige Dosis einer Substanz statt des gewünschten Effekts eine nachteilige Wirkung auf den Organismus auszuüben. Z. B. wird durch zu häufige Levamisolapplikation die Metastasenrate eines Mäusetumors erhöht im Vergleich zur Kontrolle, während sie durch ein optimiertes Behandlungsschema drastisch gesenkt wird (Amery und Butterworth, 1983). Problematisch bei der Anwendung von Immunmodulatoren ist weiterhin, daß erstens häufig die Pathophysiologie der Erkrankungen und damit der genaue Ansatzpunkt der Therapie noch nicht vollständig geklärt ist, und daß zweitens die Immunzellen selber je nach ihrem Herkunftsgewebe anders auf die Modulatoren reagieren können, so daß - je nachdem, wo und in welcher Menge die Substanz auf ihre Zielzelle trifft - andere therapeutische Effekte entstehen können (Spreafico, 1985).

Bisher wurden Immunmodulatoren vor allem empirisch ("nach Wirkung") eingesetzt. Um jedoch ihre gesamte Wirkpotenz ausnutzen zu können, sind genaue Informationen über optimale Dosis-Wirkungs-beziehungen der entsprechenden Substanz, ihrer Wirkstärke, ihrer Pharmakokinetik, d.h. des für die Substanz optimalen Applikationsweges und ihres Verteilungsmusters im Organismus, unerlässlich, ebenso wie Studien über die genauen Zielzellen und den exakten Wirkmechanismus.

Ihrer Wirkung gemäß können Immunmodulatoren in zwei Gruppen eingeteilt werden, wobei die Übergänge zwischen beiden fließend sind, da je nach Dosis und erreichter Zellpopulation einige Substanzen sowohl stimulierende wie supprimierende Eigenschaften entfalten können (Spreafico, 1985):

- Immunstimulantien, z.B. BCG, Corynebacterium parvum, Levamisol
- Immunsuppressiva, z.B. Chemotherapeutika (wie Doxorubicin, Cyclophosphamid, Antimetabolite wie 5-Fluorouracil) oder Glucocorticoide.

Ihrer Herkunft entsprechend lassen sie sich grob in drei Klassen einteilen (Shoham, 1985):

1. mikrobielle Substanzen wie bakterielle Stoffe, z.B. BCG, OK432, oder Lipopolysaccharide oder pflanzliche Polysaccharide
2. physiologisch relevante Substanzen, z. B. Stoffe aus dem Immunsystem selbst, wie Lymphokine, z. B. γ -Interferon, oder Hormone wie Glucocorticoide (körpereigenes Hydrocortisol oder synthetische Abkömmlinge wie z. B. Dexamethason)
3. synthetische Substanzen wie InPx oder Levamisol.

1.5.1 OK432

OK432 gehört zur Gruppe der mikrobiellen Immunmodulatoren. Es handelt sich dabei um eine Präparation aus hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A, Subtyp III (Streptococcus pyogenes), die nach Inkubation in einem penicillinhaltigen Medium und nachfolgender Hitzeinaktivierung durch Lyophilisieren gewonnen wird. Die Wirkstärke der Präparation wird in KE = klinische Einheit angegeben.

1 KE entspricht 0,1 mg getrockneter Streptokokkenpräparation (Chugai-Pharmaceuticals Co LTD / Tokyo Japan).

Unter dem Handelsnamen Picibanil wird OK432 in Japan bereits in der Tumorthherapie als tumorizide Substanz eingesetzt.

In klinischen Studien konnte an Krebspatienten gezeigt werden, daß OK432 die Cytotoxizität der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) steigert (Wakasugi et al, 1981). Als Adjuvans zur Steigerung der NK-Aktivität in Kombination mit Chemotherapie konnte die Überlebenszeit von Magenkarzinompatienten deutlich verbessert werden (Arinaga et al, 1992). Nach intratumoraler Injektion von OK432 kommt es beim Bronchialkarzinom zur Tumorverkleinerung (Lutz und Yang, 1992). Neben seiner antitumorösen Wirkung besitzt OK432 eine Vielzahl immunmodulierender Eigenschaften. Es steigert die zellulär vermittelte Immunität, die

allergische Typ-IV-Reaktion (delayed type Hypersensitivity) wird verstärkt, die T_H -Zell-Aktivität wird, eventuell durch Makrophagen vermittelt, gesteigert (Kai et al, 1979), die Induktion von T-suppressor-Zellen wird durch OK432 verringert (Toge et al, 1987).

Einen Hauptangriffspunkt für OK432 stellen die Makrophagen dar. Bei der Maus führt die intraperitoneale Injektion von OK432 zu einer Akkumulation von Makrophagen mit verringerter Motilität und verstärkter Adhäsivität, sowie einer erhöhten Interleukin-1-Produktion (Kawaguchi et al, 1983).

In vitro kann OK432 zwei Makrophagensubtypen induzieren, nämlich I_A - negative cytostatische Zellen und I_A -positive, Interleukin-1-produzierende Zellen (Kawaguchi et al, 1983). In Milz und Knochenmark wird durch OK432 die GM-CSF- und MCSF-Produktion angeregt, so daß mehr Immunzellen (Granulozyten und Makrophagen) aus dem Knochenmark bereitgestellt werden können (Shimizu et al, 1983; Chirigos et al, 1987).

Die makrophagenvermittelte Interferonausschüttung der T-Zellen ist nach OK432-Behandlung erhöht, NK-Zellen werden durch OK 432 makrophagenunabhängig zur Interferonausschüttung stimuliert (Noda et al, 1986).

1.5.2 Dexamethason

Als Vertreter eines hormonalen Immunmodulators wurde das synthetisch hergestellte Glucocorticoid Dexamethason ausgewählt. Dexamethason, chemisch 9-Fluor-16 α -Methylprednisolon, besitzt eine 30fach stärkere Wirkung als das natürlich vorkommende, in der Nebenniere aus Cholesterin synthetisierte Cortisol (synonym: Hydroxycortison), aber keine natrium- und wasserretinierende Wirkung, d.h. die relative Mineralcorticoidpotenz ist gleich Null (Neumann und Schenck, 1992).

Grundgerüst jedes Glucocorticoids ist das Cyclopentanperhydrophenanthren-ringsystem, das nach Hydroxilierung an C 17, C 21 und C 11 seine Glucocorticoidwirkung erhält (Löffler et al, "Physiol. Chemie", 1988) (Abb. 1).

Die Biosynthese in der Nebenniere unterliegt der zentralen Steuerung durch CRH (corticotropin releasing hormon) aus dem Hypothalamus und ACTH (adrenocorticotropes Hormon) aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Hormonausschüttung ins Blut erfolgt in einem circadiaren Rhythmus mit höchsten Hormonspiegeln in den Morgenstunden und niedrigsten Werten um Mitternacht. Transportprotein im Blut ist Transcortin, ein α -Globulin, sowie bei sehr hohen Steroidkonzentrationen auch Albumin. Metabolisierung und Inaktivierung der Steroide erfolgt in der Leber.

Die Wirkung der Glucocorticoide ist rezeptorvermittelt, wobei die Verteilung der spezifischen Glucocorticoidrezeptoren zwischen Kern und Cytosol ebenfalls einer

circadiaren Periodik unterliegt (Doe et al, 1986). Über die genaue Aktivierung der Steroid-Rezeptor-Familie bestehen bisher nur Theorien (Power et al, 1992). Bindung des Steroids an den Rezeptor induziert nach Transport des gesamten Komplexes in den Zellkern die Bildung von Transkriptionsfaktoren, die z. B. die Transkription bestimmter Promotor-Gen-Sequenzen inhibieren können und so unter anderem die I_A-Ausprägung reduzieren können (Celada et al, 1993).

Glucocorticoide üben im Organismus lebenswichtige Funktionen aus (Übersicht Löffler et al, "Physiol. Chemie", 1988; Neumann und Schenck, 1992). Durch Förderung von anabolen (Steigerung der Gluconeogenese) und katabolen (Hemmung der Glykolyse und Steigerung der Proteolyse) Stoffwechselleistungen wird vermehrt Glucose bereitgestellt, gleichzeitig jedoch Muskel-, Knochen- und Fettgewebe eingeschmolzen.

Glucocorticoide wirken antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Die antiinflammatorische Wirkung der Glucocorticoide wird dabei einerseits auf die Induktion von speziellen second messenger-Proteinen, den sogenannten Annexinen, zurückgeführt, die als Inhibitoren des Schlüsselenzyms des Arachidonsäure-Stoffwechsels, der Phospholipase A₂ gelten, so daß die Prostaglandinbildung (cyclooxygenaseabhängig) und Leukotrienbildung (lipoxigenase-abhängig) unterdrückt wird (Flower, 1985; Pepinski et al, 1989). Andererseits scheinen Glucocorticoide auch direkt ohne second messenger-Protein die Phospholipase durch Inhibition der Enzymexpression hemmen zu können (Raynal und Pollard, 1994). Den Annexinen, einer Gruppe von Kalzium- und phospholipidbindenden Proteinen, mit ihrem bekanntesten Vertreter, dem Annexin 1 (Lipocortin 1) werden auch immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben (Goulding und Guyre, 1993). Im Blut kommt es nach Glucocorticoidgabe zu einer Vermehrung der neutrophilen Granulozyten, während die Monozyten- und Lymphozytenzahl abnimmt (Neumann und Schenck, 1992). Durch Veränderung der Mediatorfreisetzung aus den mononuklearen Phagozyten greifen sie direkt in die Steuerung der Immunantwort ein. Im Maussystem ist nach Hydrocortisongabe die Interleukin-1 (Il-1) -Freisetzung aus Makrophagen verringert mit der Folge der verminderten T-Zell-Proliferation und -Stimulation (Snyder und Unanue, 1982).

Beim Menschen führt Hydrocortison ebenfalls zu einer verminderten Il-1-Produktion und -Freisetzung (Lew et al, 1988; Hag, 1988; Arend und Massoni, 1986). bzw. wirkt auf T-Zellen Il-1-antagonistisch (Rhodes et al, 1986), so daß eine Aktivierung von T-Zellen auf Antigenreiz ausbleibt. Auch die Ausschüttung von Tumornekrosefaktor- α ist nach Glucocorticoidgabe deutlich vermindert (Waage und Bakke, 1988).

Durch Induktion, aber auch Inhibition bestimmter Makrophagenfaktoren wird die Migration der Leukozyten ins Entzündungsgebiet gestört. *HiMF*, *Hydrocortison induced monozyte factor*, führt z. B. zu einer Steigerung der Randmigration der Leukozyten (Frank und Roth, 1986); durch Verminderung des chemotaktischen Faktors der Monozyten wird die Leukozytenmigration auf Endotoxinreiz wie LPS unterdrückt. Diese Glucocorticoideffekte lassen sich nicht durch Störung des Arachidonstoffwechsels erklären (Cunha und Ferreira, 1986; Cunha et al, 1985). Andere Autoren führen die immunologischen und inflammatorischen Effekte zumindest teilweise auf die durch Glucocorticoide veränderten Enzymaktivitäten im Makrophagenstoffwechsel, wie Citratzyklus, Glykolyse oder Pentosephosphatzyklus, zurück (Rosa et al, 1992).

Die antimikrobielle Aktivität der Makrophagen ist nach Gabe von Glucocorticoiden stark vermindert, kann aber durch Interferongabe oder Zusatz von aktivierten Lymphozyten wieder gesteigert werden (Schaffner, 1985; Cunha und Ferreira, 1986; Rook et al, 1987). Die Funktion der Makrophagen als antigen-präsentierende Zelle wird durch Glucocorticoidgabe ebenfalls eingeschränkt (Snyder und Unanue, 1982). Da die Wirkungen der Glucocorticoide rezeptorvermittelt sind, lassen sie sich durch Rezeptorantagonisten wie Progesteron teilweise wieder aufheben (Cunha und Ferreira, 1986); dabei besitzen alle Immunzellen Rezeptoren gleicher Affinität und Kapazität (Katz et al, 1985).

Glucocorticoid-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Steuerung der Immunantwort. So führt eine Makrophagenaktivierung mit Lipopolysacchariden oder Interferon-Gamma gleichzeitig auch zu einer Erhöhung der Glucocorticoid-Rezeptoren der Zellen, so daß die Immunantwort durch diesen negativen Rückkopplungsmechanismus wieder gebremst werden kann (Salkowski und Vogel, a und b 1992).

1.5.3 Inosin Pranobex

Inosin Pranobex (InPx) gehört zur Gruppe der synthetischen Immunmodulatoren. Es handelt sich um einen Komplex in einer 1:3-molaren Mischung aus der Nucleinsäure Inosin und 1,1-Dimethylamino-2-propanol-p-Acetamidobenzoat (DipPacBa) mit einer Molekularmasse von 1132 U/kg (Abb. 2).

Handelsnamen der Substanz sind auch Inosiplex, Virexan, Pranosina, Isoprinosine, Methisoprinol, Immunoviral.

Pharmakologisch zeichnet sich InPx durch eine sehr gute Verträglichkeit bei fast völligem Fehlen unerwünschter Wirkungen aus. Nach oraler Aufnahme wird der

Salzanteil über die Niere als Dip-N-oxid bzw. als PacBa-o-Acylglucosuronid eliminiert. Inosin wird ebenfalls zu 90 % als Allantoin und Harnsäure ausgeschieden, nur ca. 5 % treten in den Purinstoffwechselweg ein (Hadden und Giner-Sorolla, 1980; Nielsen und Beckett, 1981).

InPx wurde ursprünglich als antivirale Substanz entwickelt. Es ist ein Hemmstoff der viralen Replikation. In klinischen Studien konnte bei einer Vielzahl von Virusinfektionen z. B. durch Herpes simplex (Darlath und O'Neill, 1988; Bunta und Peris, 1981; Wickett et al, 1976) oder bei der durch das Masernvirus ausgelösten subakut sklerosierenden Panencephalitis (Götz, 1981) deutliche Effekte erzielt werden. In zwei Multizenterstudien wurde außerdem eine verzögerte Progression bei HIV-Infizierten zur Entwicklung von "AIDS" unter InPx-Gabe beobachtet (De Simone et al, 1991).

Auf zellulärer Ebene wirkt InPx hauptsächlich auf T-Zell-Subpopulationen. Die Ausprägung von Oberflächenmarkern wie Fc-Rezeptoren wird an T-Lymphozyten gesteigert; der Anteil rosettenformender Zellen nach Inkubation mit Schafserythrozyten nimmt zu (De Simone et al, 1982).

Die Wirkung auf Makrophagen wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Nach InPx-Gabe konnte eine Steigerung der Interleukin-1-Ausschüttung beobachtet werden (Tsang et al, 1987), die chemotaktische Wirkung nimmt zu (Tsang et al, 1983), ebenso konnte eine vermehrte Phagozytosefähigkeit beobachtet werden (Hadden und Giner-Sorolla, 1980). Teilweise wurden jedoch auch keinerlei Wirkungen auf Makrophagen beobachtet (Vecchi et al, 1978).

Die stimulierenden Effekte auf die T-Lymphozyten scheinen jedoch makrophagenvermittelt zu sein (Tsang et al, 1987).

DEXAMETHASON

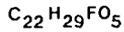
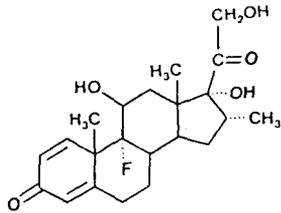


Abb. 1 Strukturformel von Dexamethason (9-Fluor-16α-methylprednisolon)

INOSIN PRANOBEX

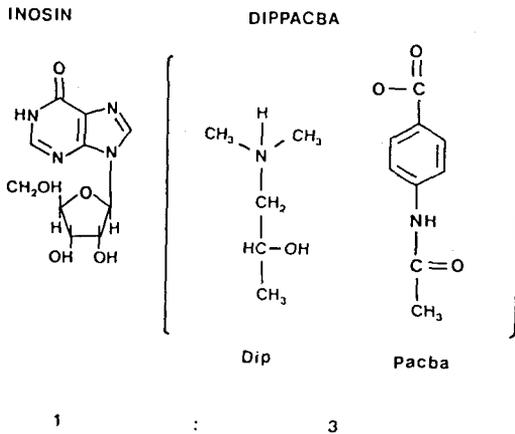


Abb. 2 Strukturformel von Inosin Pranobex (InPx)
Inosin-1,1-Dimethylamino-2-Propanol-4-Acetamidobenzoat

2. Fragestellung der eigenen Untersuchung

Makrophagen üben bei der Steuerung und Regulation der Immunantwort bedeutende Funktionen aus, die je nach Makrophagensubtyp zu einer Stimulierung oder auch Supprimierung des Immunsystems führen. Eine gezielte Beeinflussung bestimmter Subpopulationen, um zum Beispiel den Anteil antigen-präsentierender Zellen zu erhöhen, die Entzündungsreaktion durch Stimulierung der inflammatorischen Subtypen zu steigern oder durch deren Verminderung zu unterdrücken, wäre von erheblicher Bedeutung in der pharmakologischen Immuntherapie.

Bereits durch in-vivo-Untersuchungen konnte im Maussystem ein Effekt auf Makrophagen nach Gabe von immunmodulierenden Pharmaka wie InPx oder OK432 nachgewiesen werden (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a.).

Es blieb dabei jedoch offen, ob diese Stimulierung auf eine direkte Beeinflussung der Makrophagen zurückzuführen ist, oder durch Interaktionen mit anderen Immunzellen wie Lymphozyten oder durch Endothelien, oder erst nach Metabolisierung der Pharmaka im Organismus zustande kommt.

Ziel dieser Untersuchung ist, durch ein in-vitro-Modell, dem Knochenmark-Kultursystem der Maus, durch Züchten von Makrophagenmonokulturen die Wirkung von Immunmodulatoren auf die Einzelzelle zu untersuchen, so daß Zell-Zell-Interaktionen ausgeschlossen sind.

Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern wie BM8 oder I_A sowie enzymhistochemischen Methoden zum Nachweis unspezifischer Esterase werden Makrophagensubtypen identifiziert und so die immunmodulierende Wirkung auf die Subpopulation direkt überprüft.

Im ersten Teil der Arbeit sollen Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen Pharmakon und Makrophagen ermittelt werden, um so die optimalen Wirkkonzentrationen zu bestimmen.

Das Knochenmark-Kultursystem bietet die Möglichkeit, den gesamten Reifezyklus von der Stammzelle zum ausgereiften Makrophagen zu beobachten. Durch unterschiedlich lange Inkubationszeiten der Zellen mit dem Pharmakon über 1-5 Tage soll im zweiten Teil der Arbeit der Einfluß der Pharmaka auf den Reifungsprozeß zum Makrophagen hin untersucht werden, um so den optimalen Zeitpunkt zur Beeinflussung der Zellen zu finden. Als immunmodulierende Substanzen werden je ein Vertreter der biologischen Substanzklasse (OK432), ein synthetischer Immunmodulator (InPx) sowie Dexmethason als synthetisches Glucocorticoid als Beispiel für eine physiologische, hormonelle Substanz eingesetzt.

Die bereits durch die in-vivo-Untersuchungen als wirksam erkannte Substanz InPx soll in ihrem Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene weiter untersucht werden. Sie wird deshalb als Gesamtsubstanz sowie in ihren Einzelkomponenten Inosin und DipPacBa und den Einzelsubstanzen des Salzes DipPacBa: Dip und PacBa auf ihre Wirksamkeit auf die Makrophagensubtypen untersucht.

3. Untersuchungsgut und Methoden

3.1 Tiere

Zur Gewinnung der Knochenmarkstammzellen wurden die Oberschenkelknochen von weiblichen NMRI-Mäusen verwendet.

Die Mäuse wurden im Tierhaus der RWTH Aachen unter SPF-Bedingungen¹ gezüchtet und im Tierhaus der medizinisch-theoretischen Institute unter konventionellen Bedingungen der Tierhaltung vorrätig gehalten. Bei einer Temperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$, Luftfeuchtigkeit von 50-70 % und einem Licht/Dunkel-Verhältnis von 12/12 Stunden wurden in einem Makrolon-Typ 3 - Käfig mit Weichholzgranulat als Einstreu ca. 5 - 10 Mäuse gehalten. Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung; als Futter wurde die Haltungsdiät für Mäuse und Ratten Typ MR5 (Fa. Eggersmann Frankfurt) verwendet.

Im Alter von ca. 10 - 16 Wochen und einem Gewicht von ca. 15-18 g wurden die Mäuse zur Knochenmarkgewinnung verwendet. Pro Versuch wurden Femurknochen von 5 - 10 Mäusen gebraucht. Die Mäuse wurden dazu mit einer Äthernarkose betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

- ¹ SPF - Bedingungen = Mitteilungsnummer 3, 3. Auflage 1985
Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solar): Liste von
Erregern bei spezifisch pathogenfrei gehaltenen Versuchstieren.

3.2 Materialien

3.2.1 Medien

3.2.1.1 Waschmedium

Waschmedium wurde zur vorübergehenden Aufbewahrung der Zellen während der Zellgewinnung und zur Reinigung von Serumbestandteilen nach der Zellkultur verwendet.

Für 1000 ml Waschmedium wurde als Grundsubstanz 100 ml 10fach konzentriertes RPMI-1640 verwendet (Serva Heidelberg), komplettiert mit 0,202 % NaHCO_3 (= 26,8 ml 7,5 % NaHCO_3) (Merck Darmstadt), sowie 50.000 U/l Penicillin-Steptomycin (Sigma) und 1 mmol L-Glutamin (Sigma), aufgefüllt mit Aqua ad injectabile auf 1000 ml und durch 0,2 μm Filter steril filtriert (Millipore / Frankreich)

3.2.1.2 Kulturmedium

Grundsatz war auch hier RPMI-1640-Medium der Fa. Serva, Heidelberg. Für 1000 ml Kulturmedium wurden benötigt

| | |
|--|----------------------|
| 100 ml 10fach konz. RPMI-1640 | (Serva Heidelberg) |
| 0,0202 % NaHCO ₃ | (Merck, Darmstadt) |
| 4 mmol HEPES-Puffer | (Serva) |
| 2 mmol L-Glutamin | (Sigma) |
| 50.000 U/l Penicillin-Streptomycin | (Sigma) |
| 15 % (= 150 ml) Pferdeserum (steril filtriert) | (Sigma) |
| 10 % (= 100 ml) L-Zell-Überstand | (eigene Herstellung) |

3.2.2 Puffer

3.2.2.1 Phosphat gepufferte Saline (PBS)

PBS wurde als Waschmedium und zur Stabilisierung der Cytospin-präparate bei der indirekten Immunperoxidase verwendet.

100 ml Aqua bidestillata enthielten

150 mmol NaCl

11,8 mmol NaH₂PO₄

3,6 mmol KH₂PO₄ bei einem pH-Wert von 7,2

3.2.2.2 Acetatpuffer

Zur Lösung des Substrats der indirekten Immunperoxidase wurde Acetatpuffer verwendet

0,25 M CH₃COOH

0,13 M CH₃COONa

pH-Wert 4,9

3.2.2.3 Soerensen-Puffer

Lösung A = 27,6 g NaH₂PO₄ x H₂O / l

Lösung B = 28,4 g Na₂HPO₄ x H₂O / l

A und B werden im Verhältnis 4 : 1 gemischt
pH 6,3

Dieser Puffer wurde für die Acetat-Esterase-Färbung benötigt.

3.2.3 Chemikalien und Färbelösungen zur indirekten Immunperoxidase-Technik, Materialien

- PBS-Puffer pH 7,2
- 2,5 M NaN₃ (1,33 g) gelöst in 200 ml PBS + 240 µl H₂O₂ als Katalysator zur Hemmung der endogenen Peroxidase
- 1 % bovines Serum-Albumin in PBS gelöst BSA (Sigma)
- 10 % normal goat serum NGS (Dianova)
- 20 % Normal mouse Serum (Dianova)
- AEC-Substrat = 2 g Amino-Ethyl-Carbazol (Sigma)
in 500 ml Dimethylformamid (Merck)
lösen (AEC-Stammlösung)
- Acetatpuffer pH 4,9
- H₂O₂ 30 % (Merck)
- Perjodsäure: 0,6 g gelöst in 200 ml Aqua destillata zur Zerstörung der endogenen Peroxidase
- Mayer's Hämalaun (Merck)
zur Gegenfärbung der Zellen
- Aquamount zum Einbetten der Präparate (BDH-Gurr Groß-Britannien)
- Aqua destillata
- mehrere Küvetten als Behälter für die Färbelösungen und Waschvorgänge, verdunkelte (mit Alufolie umwickelte) Küvetten für die Färbereaktion
- Objektträgerhalter à 20 Objektträger
- Inkubationsgefäße: Plastikschalen mit Schaumstoffeinlage und Deckel zur Aufbewahrung von ca. 20 - 30 plan liegenden Objektträgern

3.2.4 Chemikalien, Färbelösungen und Materialien zur Acetat-Esterase-Färbung

- Soerensen-Puffer 0,2 M pH 6,3
- α-Naphthylacetat (Sigma):
10⁻⁶ g α-Naphthylacetat werden in 0,5 ml Ethylenglycoläther (Sigma) gelöst

- Lösung I: 4 g Pararosanilin, gelöst in 100 ml 2n HCl bei 60 °C filtriert
- Lösung II: 6 g NaNO₂ gelöst in 100 ml Aqua bidestillata
- PBS-Puffer 1 %, pH 7,2
- Hämalun nach Mayer (Merck)
- Aquamount (BDH-Gurr, Großbritannien)
- Abzug
- Färbeküvetten
- Inkubationsgefäße
- Papierfilter

3.2.5 Verwendete Antikörper und Antiseren

Als monoklonaler Antikörper wurde bei der indirekten Immunperoxidase-Technik der freundlicherweise von Prof. F. Sorg/Münster zur Verfügung gestellte Antikörper "BM8" verwendet, hergestellt als Kulturüberstand im Verhältnis 1 : 4 mit 1 % BSA in PBS angesetzt.

Als weiterer monoklonaler Antikörper wurde I_A der Firma Hybritech/Europa SA verwendet, im Verhältnis 1 : 100. Der konjugierte, sekundäre Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase, bestand aus Fab²-Fragmenten von Goat-Anti-Rat-IgG, bezogen von der Firma Dianova/Hamburg.

Zur Vermeidung von störenden Immunkomplexen bei der Färbereaktion wurde die Goat-Anti-Rat-Peroxidase im Verhältnis 1 : 100 mit 10 % Normal-Goat-Serum (Dianova) und 20 % Normal-Mouse-Serum (Dianova) vorinkubiert und die entstehenden Immunkomplexe abzentrifugiert.

3.2.6 Pharmaka

Die Wirkung auf Subpopulationen von Knochenmarkmakrophagen der Maus wurde mit folgenden Substanzen getestet (soweit nicht anders angegeben, wurden 10⁻² M Stammlösungen mit 0,9 % NaCl hergestellt, steril filtriert (0,2 µm Millipore-Filter) und bei + 4°C aufbewahrt):

1. InPx Inosin Pranobex
bezogen von Newport Pharmaceuticals International Inc./Newport Beach, California USA.
Molekulargewicht 1132 g/kg
InPx wurde in den Konzentrationen 10⁻⁵ - 10⁻⁹ M verwendet.

2. DipPacBa (N,N-Dimethylamino-2-propanol-p-Acetamidobenzoat)
Firma Newport-Pharmaceuticals Int. Inc.
Molekulargewicht 282 g/kg
Konzentrationsbereich 10^{-4} - 10^{-9} M

3. Dip (N,N-Dimethylamino-2-propanol)
Molekulargewicht 104 g/kg
bezogen von Firma Merck/Darmstadt
Dip wurde als 10^{-6} M Lösung verwendet.

4. PacBa (p-Acetamidobenzoat)
Firma Merck/Darmstadt
Molekulargewicht 174 g/kg
Es wurde in der Konzentration 10^{-6} M angewendet.

5. Inosin
bezogen von Firma Serva/Heidelberg
Molekulargewicht 286,2 g/kg
Inosin wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-5} - 10^{-9} M eingesetzt.

6. Dexamethason (9-Fluor-16 α - Methylprednisolon)
Es wurde als Fortecortin^R - Ampullen der Firma Merck/Darmstadt bezogen. Eine 4 mg Monoampulle enthielt in 1 ml Injektionslösung 4,37 mg Dexamethason-21-Dihydrogenphosphat Dinatriumalz, entspr. 4 mg Dexamethason-21-Dihydrogenphosphat, 10 mg Benzylalkohol, Natriumformaldehydsulfoxylat NFxv.
Molekulargewicht 392,47 g/kg
Es wurde in Konzentrationen von 10^{-6} - 10^{-10} M verwendet.

7. OK 432 (Picibanil^R)
bezogen von Chugai Pharmaceutical Co Ltd./Japan
1 Ampulle OK 432 enthielt 5 KE (klinische Einheiten) = 0,5 mg Trockensubstanz der Streptokokkenpräparation.
Für jede Versuchsreihe wurde 1 Ampulle OK 432 verwendet und mit dem Knochenmark-Kulturmedium Verdünnungen von 0,25-0,00025 KE hergestellt, entsprechend einer molaren Konzentration von $10^{-0,6}$, $10^{-1,6}$, $10^{-2,6}$ und $10^{-3,6}$ M.

3.2.7 Großgeräte

- Mistral GC MSE - Zentrifuge
Zur Zentrifugation bei Gewinnung der Knochenmarkszellen und Ernte der Zellen nach Kultivierung
- Eppendorf - Zentrifuge
zum Abzentrifugieren von Immunkomplexen bei der indirekten Immunperoxidase-Technik
- Cytospin-2-Zentrifuge sowie Zubehör (Firma Shandon, Großbritannien) zur Herstellung der Cytospin-Präparate
- Mikroskope: Phasenkontrast-Durchlichtmikroskop und Leitz Laborlux B
- Brutschrank (Heraeus)
- Laminar Air Flow - Sterilbank

3.2.8 Materialien zur Präparation der Knochenmarkmakrophagen

- Diethyläther zur Narkotisierung der Tiere
- 70 % Ethanol zur Desinfektion der Tiere
- Waschmedium RPMI - 1640 komplett
- Kulturmedium RPMI -1640 komplett
- Eis
- kaltes Aqua bidestillata
- zweifach konzentriertes RPMI-1640 (Serva)
- Trypanblau (Serva)
- steriles Präparierbesteck, bestehend aus Schere, chirurgischer und anatomischer Pinzette, Skalpell
- steriles Sieb
- Kanülen 14 G und 12 G
- 30 ml - Spritze
- Zentrifugenröhrchen (Falcon)
- Neubauer-Zählkammer
- Mikroskop
- sterile Plastik-Petri-Schale (Heraeus)
- sterile Petri-Perm-Schale mit Teflon-Boden (Heraeus)
- Biofolie zur Herstellung steriler Teflon-Säckchen (Heraeus)
- Zentrifuge Mistral 6 C MSE
- sterile Pipetten

3.3 Methoden

3.3.1 Knochenmark-Kultursystem

Zur Anzüchtung von Makrophagen der Maus wurde das Knochenmark-Kultursystem der Maus für Suspensionskulturen verwendet (Summer et al, 1972; Goud et al, 1975). Pro Versuch wurden ca. 14 - 20 Femurknochen von 10-16 Wochen alten weiblichen NMRI-Mäusen freipräpariert und die Knochenmarkzellen nach Abschneiden des Hüftkopfes durch Ausspülen der Markhöhle mit RPMI-Waschmedium steril gewonnen.

Diese Zellsuspension, aus allen Femurknochen gepoolt, wurde dann gesiebt, um gröbere Verunreinigungen zu entfernen, und 10 Min. bei 1200 Umdrehungen/Minute bei 5°C in Waschmedium zentrifugiert.

Nach erneutem Aufnehmen der Zellpellets in Waschmedium wurde durch Zugabe von kaltem Aqua bidestillata eine osmotische Schockreaktion ausgelöst, die noch vorhandene Erythrozyten lysieren sollte. Durch Zugabe von äquimolaren Mengen 2fach konz. RPMI-Medium, um die Osmolarität wieder herzustellen (10 sec. nach Gabe des Aqua bidestillata) und erneuter Zentrifugation (10 Min. 1200 Umdrehungen/Minute bei 5°C) konnten die so gereinigten Zellen mit Knochenmarkmedium aufgenommen werden und nach Lebendzellzählung mit Trypanblau auf Petri-Permschalen bzw. in Teflon-Säckchen verteilt werden. Pro Schale/Säckchen wurden 1×10^7 Zellen in 10 ml Knochenmarksmedium eingesetzt und mit dem entsprechenden Immunmodulator versetzt. Als Quelle des Makrophagenkoloniestimulierenden Faktors M-CSF, der die Ausdifferenzierung der Stammzellen zum Makrophagen bewirkt, diente der Überstand aus kultivierten Mäuse-L-Zellen. Diese produzieren in Zellkultur den Faktor und geben ihn in ihr Kulturmedium ab. Die Anzahl an Zellkolonien pro eingesetzte Zellmenge ist dabei von der Konzentration des M-CSF im Überstand abhängig (Austin et al, 1970; Stanley und Heard, 1977). Alle Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit derselben Charge L-Zell-Überstand durchgeführt, so daß jeder Versuchsansatz den Faktor in identischer Konzentration enthielt. Die Knochenmarkzellen wurden dann bei 37 °C und 5 vol % CO₂-Spannung über 1 - 5 Tage kultiviert.

Für 1-3tägige Zellkulturen wurden Petri-Perm-Schalen, für 4-5tägige Kulturen wurden wegen einer besseren Zellausbeute Teflonsäckchen verwendet. Vor Ernte der Zellen wurden alle Kulturschalen zunächst im Durchlichtmikroskop auf Vitalität und bakterielle Infektion kontrolliert, dann 30 Min. mit der Teflon-Folienseite auf Eisstückchen gelegt, um die Zellen vom Gefäßboden abzulösen. Der Schaleninhalt wurde dann mit einer Pipette in ein Zentrifugenröhrchen aufge-

nommen, zweimal 10 Min. zentrifugiert (800 Umdrehungen/Minute, 5 °C) und zweimal mit Waschmedium vom Kulturmedium durch Zentrifugation gereinigt. Nach einer erneuten Lebendzellzählung zur Überprüfung der Vitalität mit Trypanblau (Verdünnung 1 : 10) wurde durch Zugabe von Waschmedium eine Zellzahl von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml/ Schale eingestellt und mit der Shandon Elliott-Zentrifuge Cytospin-Präparate hergestellt, die nach 12 Std. Lufttrocknung mit Aceton (5 Min.) fixiert und danach gefärbt oder zunächst bei -20 °C tiefgefroren wurden.

3.3.2 Indirekte Immunperoxidase-Färbung

Zur Färbung wurden die Präparate nach Auftauen und Lufttrocknen zunächst 5 Minuten mit Aceton fixiert und 5 Minuten getrocknet, und dann nach der indirekten Immunperoxidase-Technik gefärbt (Fair und Nakane, 1981; Malorny et al, 1988).

Die Methode soll im folgenden noch einmal kurz beschrieben werden.

Es wurde zunächst durch 20minütige Inkubation der Präparate in 2,5 M NaN_3 - Lösung in PBS-Puffer mit 240 μl H_2O_2 als Katalysator die endogene Peroxidase der Zellen gehemmt und die Rückstände der NaN_3 in drei Waschschritten à drei Minuten mit PBS entfernt.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf den Zellen wurde dann 30 Minuten in PBS mit 1 % BSA (bovines Serum Albumin) und 10 % NGS (Normal Goat Serum) inkubiert, die Präparate danach kurz mit PBS gespült.

Es folgte jetzt die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper. In jeder Färbung wurde 1 Präparat mit BM8 (1 : 4), 1 Präparat mit I_A (1 : 100) und 1 Präparat mit 1 % BSA als Negativ-Kontrolle der Färbereaktion mit einer Pipette beschichtet und 30 Minuten inkubiert. Die überschüssige, d.h. nicht gebundene, Antikörpermenge wurde wiederum mit PBS-Puffer ausgewaschen. Die Präparate wurden danach mit Goat-Anti-Rat-Peroxidase als konjugiertem Antikörper beschichtet, so daß eine AG-AK-Reaktion des von der Ratte stammenden monoklonalen Antikörpers BM8 und I_A mit den gegen Ratten-Ig-gerichteten Fab-2-Fragmenten der Goat-Anti-Rat-Peroxidase ablaufen konnte, und wieder 30 Minuten inkubiert. Die Goat-Anti-Rat-Peroxidase war vorher mit 10 % Normal-Goat-Serum und 20 % Normal-Mouse-Serum in 1 % BSA 30 Minuten im kalten Wasserbad zur Immunkomplexbildung inkubiert worden, und die bei der Färbung störenden Immunkomplexe (sichtbar als "Schleier" im Eppendorf-Zentrifugenröhrchen) durch Zentrifugieren entfernt worden. Der konjugierte Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen in PBS entfernt.

Nach Ansetzen des AEC-Substrats als Substrat der Peroxidase (20 ml der AEC-StammLösung wurden in 200 ml warmen Acetatpuffer filtriert) wurden die Präparate in einer verdunkelten Küvette im 37°C warmen Wasserbad unter Zusatz von 100 µl H₂O₂ als Katalysator zur Farbstoffbildung 12 Minuten inkubiert, und mit Aqua destillata gereinigt. Die endogene Peroxidase der Zellen wurde anschliessend nochmals mit Perjodsäure (0,6 g in 200 ml Aqua destillata) über 2 Min. zerstört und die Präparate schliesslich mit normalem Leitungswasser gereinigt.

Die Präparate wurden stichprobenweise unter dem Mikroskop auf Rotfärbung (Azofarbstoff der Peroxidase) d.h. auf erfolgreiche Färbung kontrolliert und zum besseren Erkennen der Zellen mit Hämalun nach Mayer über 1,5 Minuten gegengefärbt und nach Abspülen mit Wasser und 10 Minuten "Bläuen" in Leitungswasser mit Aquamount eingedeckelt.

3.3.3 Cytochemische Esterase-Acetat-Färbung

Zum Nachweis von unspezifischer Esterase in den Makrophagen wurden alle Präparate einer Esterase-Acetat-Färbung mit α -Naphthyl-Acetat und Pararosanilin als Azofarbstoff unterzogen, wie von Schmalzl und Braunsteiner (1968), Ornstein et al (1976) und Yam et al (1971) beschrieben.

Diese Färbung ist nicht für Makrophagen spezifisch, da auch Esterase in Monozyten, Histozyten und Megakaryozyten als deutliche Granula angefärbt wird, und Granulozyten durch die Färbung diffus und sehr schwach angefärbt sein können (Yam et al, 1971).

Es wurde bei der Auswertung deshalb der Makrophage anhand von Morphologie und gleichzeitiger Färbung dem nicht angefärbten, aber morphologisch erkennbaren Makrophagen gegenübergestellt. Die Cytospin-Präparate wurden nach Auftauen wieder zunächst fünf Minuten mit Aceton fixiert und fünf Minuten luftgetrocknet.

Nach Herstellung der Färbelösungen wurden Lösung I (Pararosanilin) und Lösung II (NaNO₂) im Verhältnis 1 : 1 unter dem Abzug in einem offenen Gefäß unter leichtem Schütteln gemischt, bis das Gemisch heller wurde, bzw. das entstehende Gas entwichen war (ca. zehn Minuten). Für 10 ml Färbelösung wurden 9,5 ml Soerensens-Puffer mit 500 µl α -Naphthylacetat-Lösung und 50 µl der Pararosanilin-NaNO₂-Lösung vermischt, so daß die zunächst trübe weiße Flüssigkeit fast klar wurde; dieses Gemisch wurde danach im Dunkeln filtriert.

Die filtrierte Lösung wurde auf die trockenen Cytospin-Präparate aufgetropft (ca. 100 µl/Präparat), und die Präparate anschließend 45 Min. mit der Lösung inkubiert.

Der überschüssige Farbstoff wurde dann durch Waschen in 1 % PBS-Puffer entfernt und die Azo-Farbstoffbildung mikroskopisch kontrolliert. Alle Präparate wurden schließlich wieder mit Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und mit Aquamount eingedeckelt.

3.4 Mikroskopische Auswertung

Die Präparate wurden lichtmikroskopisch (Leitz Laborlux B) mit 40-facher Vergrößerung ausgewertet.

Durch die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun stellten sich alle Zellen mit dunkelblauem Zellkern und blaßblauem Zytoplasma dar. Makrophagen wurden morphologisch anhand ihrer Zellgröße, ihres unregelmäßigem Cytoplasmas und des großen Kerns erkannt und von kleineren Zellen mit ringförmigen Kernstrukturen, Monozyten ("bohnenförmiger" Kern bei größerem Zellvolumen) oder Lymphozyten (großer runder Zellkern mit schmalen Zytoplasmasaum) unterschieden. Antikörperpositive Zellen waren rot angefärbt, sichtbar als feine rote Granula, die wegen der membranständigen Antigene BM8 und I_A diffus über die Zelle verteilt waren, bei blauem Zellkern.

Esterase-positive Zellen zeigten sich als rötliche Zellen mit feinen bis groben braunroten Granula im Cytoplasma bei bläulich-violetter Kern. Da auch Monozyten Esterase-positiv reagieren, mußte die Abgrenzung zum Makrophagen wie bei den nicht angefärbten Zellen anhand morphologischer Kriterien erfolgen. Alle angefärbten Zellen mit "bohnenförmigem" Kern wurden als Monozyten definiert und nur die Zellen, die einen großen Kern mit viel unregelmäßigem Cytoplasmasaum besaßen, als Makrophagen gewertet.

3.5 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen

Nach Ernte der Zellen wurde bei allen Kulturansätzen die Gesamtzellzahl mit der Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Durch Anfärben der geernteten Zellpellets mit Trypanblau konnte der Anteil toter Zellen pro Schale bestimmt werden. Dabei nahmen nur die toten, lysierten Zellen den Farbstoff auf (Trypanblau-Exklusionsmethode).

Eine Differenzierung in Makrophagen und andere Zellen (z. B. Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagenvorstufen) war durch die geringe mikroskopische Ver-

größerung bei Verwendung der Zählkammer und die ungefärbten Zellstrukturen nicht möglich.

3.6 Statistische Auswertung

Jeder Versuchsansatz enthielt eine gepoolte Zellsuspension aus Knochenmarkstammzellen von Femurknochen von 3-12 Mäusen. Es wurden Auszuchttiere (NMRI-Stamm) verwendet, so daß eine größtmögliche genetische Variabilität gegeben war.

Ein Ansatz bestand aus mindestens 3 bis maximal 15 Kulturschalen und war hinsichtlich der verwendeten Pharmaka immer unterschiedlich zusammengesetzt. Für die statistische Auswertung wurde daher von unverbundenen Stichproben ausgegangen. Jede Versuchsreihe wurde mindestens zweimal, die Versuche an Tag 2 und Tag 3 mindestens sechsmal wiederholt.

Pro Versuchsansatz wurde eine Null-Kontrolle mitgeführt, die statt Pharmakonzusatz 10 µl 0,9 % NaCl enthielt.

In jedem Präparat wurden drei zufällig ausgesuchte Gesichtsfelder ausgezählt und dabei zwischen 400 und 600 Makrophagen gezählt. Der Anteil positiver, d.h. BM8-, I_A- oder Esterase-positiv angefarbter Zellen wurde in % ausgezählter Makrophagen pro Präparat ausgedrückt.

Zur statistischen Auswertung wurde das Rechnerprogramm Statgraphics der Fachhochschule Köln angewendet (freundlicherweise von Prof. Dr. H. Stenzel zur Verfügung gestellt) und pro Präparat der Mittelwert, die Standardabweichung vom Mittelwert sowie der Standardfehler des Mittelwertes (Standard error of mean: SEM) berechnet.

Da wegen der relativ geringen Versuchsanzahl von durchschnittlich sechs Versuchen pro Versuchsreihe eine Normalverteilung der getesteten Stichproben im Sinne einer Gaußschen Verteilungskurve statistisch nicht anzunehmen war, wurde zur Überprüfung des Signifikanzniveaus der Ergebnisse von $p < 0,05$ der Wilcoxon-Paar-Test für unverbundene Stichproben herangezogen.

Der im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte oder erniedrigte Anteil positiver Zellen wurde als absolute und relative Stimulation (negative Stimulation = Suppression) ausgedrückt. Unter absoluter Stimulation ist zu verstehen der Differenzbetrag zwischen Pharmakongruppe und Kontrollgruppe, mit der relativen oder prozentualen Stimulation ist dieser Differenzbetrag in Bezug zur Kontrollgruppe gesetzt.

Abs. Stimulation = $Pha - K$

Rel. Stimulation = % Stimulation = $\frac{(Pha-K) \cdot 100}{K}$

Pha = Mittelwert des Pharmakons

K = Mittelwert der Kontrollgruppe.

4. Ergebnisse

Tabelle 1: Einfluß der Immunmodulatoren auf die Gesamtzellzahl pro Kulturansatz nach 48 Stunden Inkubation.

Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts SEM aus n Versuchen.

| Pharmakon [M] | n | Zellzahl $\times 10^6$ | SEM |
|------------------------|----|------------------------|-----|
| Kontrolle | 19 | 3,0 | 0,2 |
| InPx 10^{-5} | 4 | 2,4 | 0,4 |
| InPx 10^{-6} | 6 | 2,7 | 0,3 |
| InPx 10^{-7} | 4 | 2,5 | 0,4 |
| InPx 10^{-8} | 4 | 2,8 | 0,3 |
| InPx 10^{-9} | 2 | 3,2 | 0,2 |
| Inosin 10^{-5} | 4 | 2,4 | 0,1 |
| Inosin 10^{-6} | 6 | 3,1 | 0,2 |
| Inosin 10^{-7} | 4 | 3,2 | 0,5 |
| Inosin 10^{-8} | 4 | 2,8 | 0,4 |
| DipPacBa 10^{-5} | 6 | 3,2 | 0,3 |
| DipPacBa 10^{-6} | 6 | 2,6 | 0,2 |
| DipPacBa 10^{-7} | 4 | 2,6 | 0,4 |
| DipPacBa 10^{-8} | 4 | 2,6 | 0,5 |
| DipPacBa 10^{-9} | 2 | 3,0 | 0,3 |
| Dip 10^{-6} | 6 | 3,3 | 0,2 |
| PacBa 10^{-6} | 6 | 3,4 | 0,1 |
| OK432 $10^{-0,6}$ | 4 | 2,7 | 0,1 |
| OK432 $10^{-1,6}$ | 6 | 2,7 | 0,2 |
| OK432 $10^{-2,6}$ | 4 | 2,8 | 0,1 |
| OK432 $10^{-3,6}$ | 2 | 3,2 | 0,1 |
| Dexamethason 10^{-7} | 7 | 3,2 | 0,2 |
| Dexamethason 10^{-8} | 5 | 2,8 | 0,2 |

4.1 Einfluß der Immunmodulatoren auf die Gesamtzellzahl nach Inkubation mit einem Immunmodulator über 48 und 72 Stunden

Die Ergebnisse, dargestellt in Tabelle 1 (Tag 2) und Tabelle 2 (Tag 3), zeigen deutlich, daß kein Immunmodulator einen Einfluß auf die Zellzahl nach Zellkultur hatte. Auch bei hohen Pharmakondosierungen traten weder proliferative noch proliferationshemmende Effekte auf die Zellen auf. Keine Substanz hatte also mitogene oder cytostatische Eigenschaften. Alle Abweichungen von der Kontrollgruppe lagen im Rahmen der statistischen Standardabweichung und waren daher nicht signifikant.

Lediglich Dexamethason 10^{-7} M schien die Zellausbeute nach dreitägiger Zellkultur gering zu erhöhen, allerdings nicht statistisch signifikant. Die insgesamt geringere Zellzahl nach 72 Stunden Zellkultur war bekanntermaßen (Neumann und Sorg, 1980) durch das Absterben der in der Kultur vorhandenen Granulozyten und anderer Zellen und ihrer Phagozytose durch die reifenden Makrophagen bedingt.

Tabelle 2: Vergleich der Gesamtzellzahl pro Kulturansatz nach 72 Stunden Inkubation in Abhängigkeit des eingesetzten Immunmodulators.

Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts SEM aus $n = 6$ ($n = 7$ für Kontrolle) Versuchen.

| Pharmakon [M] | Zellzahl $\times 10^6$ | SEM |
|------------------------|------------------------|-----|
| Kontrolle | 1,9 | 0,1 |
| InPx 10^{-6} | 2,0 | 0,1 |
| Inosin 10^{-6} | 2,0 | 0,1 |
| DipPacBa 10^{-5} | 2,0 | 0,1 |
| DipPacBa 10^{-6} | 1,9 | 0,1 |
| Dip 10^{-6} | 1,9 | 0,1 |
| PacBa 10^{-6} | 2,0 | 0,2 |
| OK432 $10^{-1,6}$ | 1,9 | 0,1 |
| Dexamethason 10^{-7} | 2,4 | 0,2 |

4.2 Einfluß der Immunmodulatoren auf die Vitalität der Zellen nach 48 und 72 Stunden Zellkultur

Wie aus Abbildung 3 und 4 ersichtlich wird, nahm die toxische Wirkung eines Immunmodulators, ausgedrückt als Erhöhung des Anteils toter Zellen im Vergleich zur Kontrolle, mit steigender Dosierung des Pharmakons zu. Bei allen Immunmodulatoren deutete der Verlauf der Kurve sogar auf eine exponentielle Zunahme der Toxizität mit steigender Dosierung des Pharmakons hin. Dosissteigerungen auf 10^{-4} M erhöhten den Anteil toter Zellen auf über 25 % und wurden deshalb nicht weiter untersucht.

Statistisch signifikant war die toxische Wirkung hoher Dosen DipPacBa (10^{-5} M und 10^{-6} M), InPx und OK432. Auch Dexamethason 10^{-7} M führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Anteils toter Zellen; mit 13 % lag dieser Anteil jedoch deutlich unter der als Ausschlußgrenze gesetzten Maximalgröße von ca. 15 %. Obwohl DipPacBa 10^{-5} M oberhalb dieses Limits lag, wurde es wegen seiner überdurchschnittlichen Wirkungen weiter untersucht. Alle anderen Pharmaka wurden bei den weiteren Versuchen in Dosierungen verwendet, die bei noch zu erwartender Wirkung eine tolerable Toxizität aufwiesen.

Wie aus Tabelle 4 (s. Anhang) deutlich wird, hatten sich nach dreitägiger Zellkultur die Kulturbedingungen im System stabilisiert, abgestorbene Zellen z. B. der Granulozytopoese waren durch die reifenden Makrophagen phagozytiert (Neumann und Sorg, 1980), so daß der Anteil toter Zellen in allen Zellkulturen mit oder ohne Immunmodulatorzusatz deutlich reduziert war. DipPacBa 10^{-5} und InPx 10^{-6} M hatten jedoch noch eine statistisch signifikante toxische Wirkung auf die Zellen. (Die Einzelwerte für Tag 2 sind als Tabelle 3 im Anhang aufgelistet).

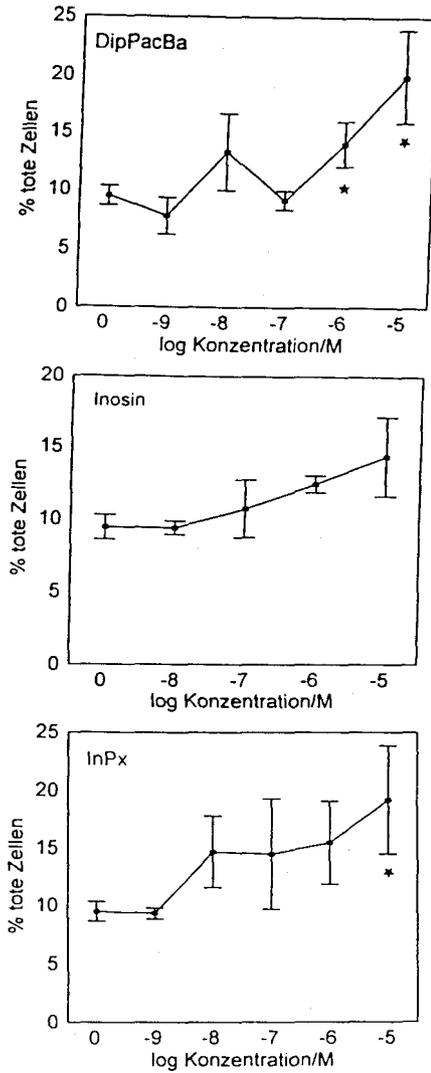


Abb. 3 Dosisabhängige Wirkung von InPx und seinen Komponentenauf die Zellvitalität (% tote Zellen) nach zweitägiger Zellkultur, Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ (10^{-9} M $n = 2$) * geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

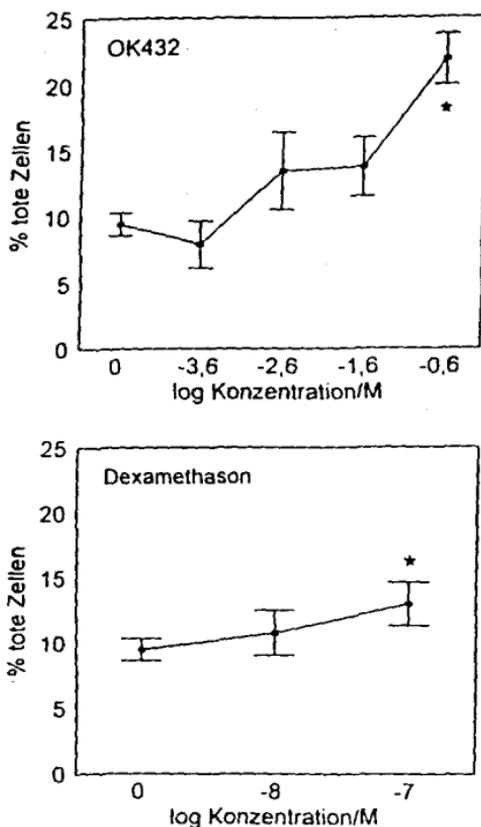


Abb. 4 Dosisabhängige Wirkung von OK432 und Dexamathason auf die Zellvitalität (% tot Zellen) nach zweitägiger Zellkultur, Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ ($10^{-3,6}$ M $n = 2$)
 * geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

4.3 Einfluß der Immunmodulatoren auf den I_A-positiven Makrophagen.

Es zeigte sich, daß in den Zellkulturen nur ein sehr kleiner Anteil aller Makrophagen das I_A-Antigen trug. Nach dreitägiger Inkubation reagierten unabhängig vom zugesetzten Pharmakon lediglich 0,1 % aller Zellen I_A-positiv.

Nach einer Inkubationsdauer von 4 Tagen waren im Mittel nur zwischen 3,1 und 3,6 % der Zellen I_A-positiv.

Kein Immunmodulator konnte also die Ausprägung des I_A-Antigens des Makrophagen stimulieren. Dexamethasonzusatz zur Zellkultur reduzierte hingegen den Anteil positiver Zellen von 3,1 % der Kontrolle auf 0,6 %. Wegen der sehr niedrigen Zahlen war ein supprimierender Effekt durch lichtmikroskopisches Auszählen der Präparate erst ab dem vierten Kulturtag nachweisbar.

Die Ergebnisse dieses Versuchstages sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Immunmodulation des I_A-Makrophagen
Stimulation Tag 0 - 4

Angegeben sind der Mittelwert, die Standardabweichung vom Mittelwert S_x , sowie der Standardfehler des Mittelwerts SEM.

| Pharmakon [M] | Versuch A | Versuch B | X | S_x | SEM |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----|-------|-----|
| Kontrolle | 2,8 | 3,3 | 3,1 | 0,4 | 0,3 |
| InPx 10 ⁻⁶ | 3,9 | 2,9 | 3,4 | 0,7 | 0,5 |
| Inosin 10 ⁻⁶ | 3,6 | 3,0 | 3,3 | 0,4 | 0,3 |
| DipPacBa 10 ⁻⁶ | 3,3 | 3,8 | 3,6 | 0,4 | 0,3 |
| Dexamethason 10 ⁻⁷ | 0,8 | 0,3 | 0,6 | 0,4 | 0,3 |

4.4 Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen den Immunmodulatoren und den Knochenmarkmakrophagen

Der Einfluß der Pharmakondosierung auf die Modulation des Knochenmarkmakrophagen wurde nach zweitägiger Zellkultur überprüft und so die optimale Wirkkonzentration der Immunmodulatoren ermittelt.

4.4.1 BM8-Ausprägung

Aus der graphischen Darstellung (Abb. 5 und 6, Tab. 6 - 8 mit Einzelwerten, siehe Anhang) wird deutlich, daß nur die Salzkomponente DipPacBa und die Streptokokkenpräparation OK432 die Anzahl der BM8-Makrophagen dosisabhängig vermehren konnten, Dexamethason hingegen mit steigender Konzentration zu einer drastischen Verminderung der BM8-Makrophagen führte.

Inosin und InPx blieben dagegen in jeder Dosierung wirkungslos. Der stimulierende Effekt des DipPacBa nahm mit höherer Konzentration zwar immer weiter zu, gleichzeitig stieg allerdings die toxische Wirkung auf die Zellen (siehe 4.2.). Das Wirkprofil des OK432 war dagegen eher glockenkurvenartig, die optimale Konzentration lag bei $10^{-1,6}M$.

Dexamethason supprimierte schon im unteren Dosisbereich von $10^{-9}M$ die BM8-Ausprägung. Dieser Effekt war jedoch nach dreitägiger Zellkultur nicht mehr statistisch signifikant (siehe Abb. 6, Tab. 8).

4.4.2 Esterase-Ausprägung

Ähnliche Ergebnisse wie für den BM8-Makrophagen ergaben sich auch für den Esterase produzierenden Makrophagen, graphisch in Abb. 7 und 8 sowie in Tabelle 9-11 im Anhang dargestellt. DipPacBa führte mit steigender Dosierung zu einer Zunahme des Anteils Esterase produzierender Makrophagen. InPx zeigte eine eher glockenkurvenartige Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem statistisch signifikanten Effekt bei der Konzentration $10^{-6}M$. Inosin blieb in allen Dosierungen wirkungslos, und auch bei OK432 konnte aufgrund großer Schwankungen der Meßwerte keine statistisch signifikante Vermehrung des Esterasemakrophagen festgestellt werden. Dexamethason, das hinsichtlich der Esterase-Produktion lediglich als $10^{-7}M$ und $10^{-8}M$ Konzentration überprüft wurde, führte zu einer dosisabhängigen Suppression der Esterase-Produktion.

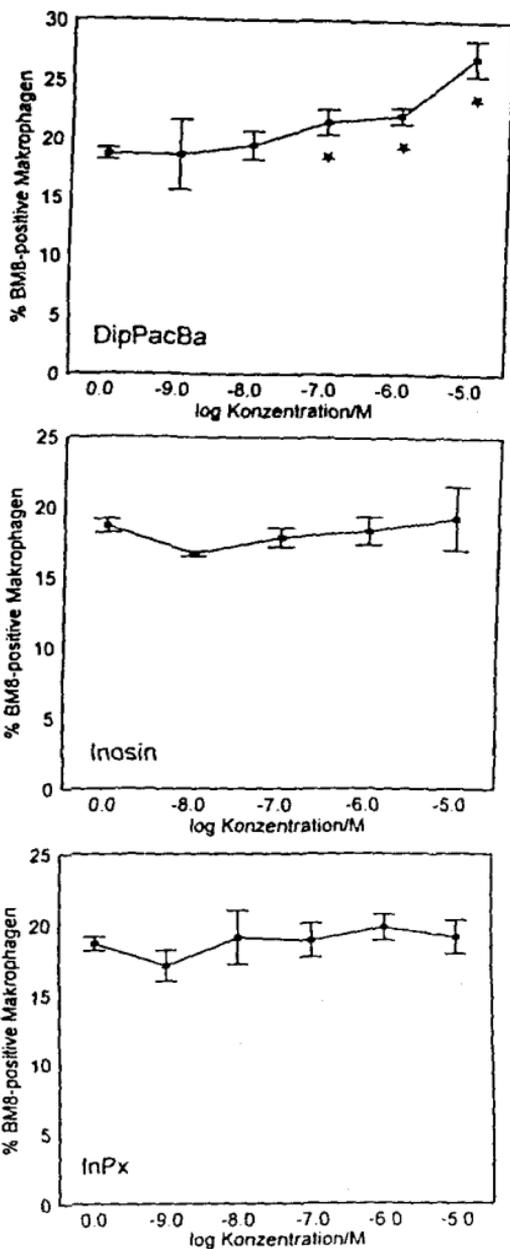


Abb. 5

Dosisabhängige Wirkung von InPx und seinen Komponenten auf die BM8-Ausprägung (% positive Zellen) nach zweitägiger Zellkultur, Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ (10^{-9} M $n = 2$)

* geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

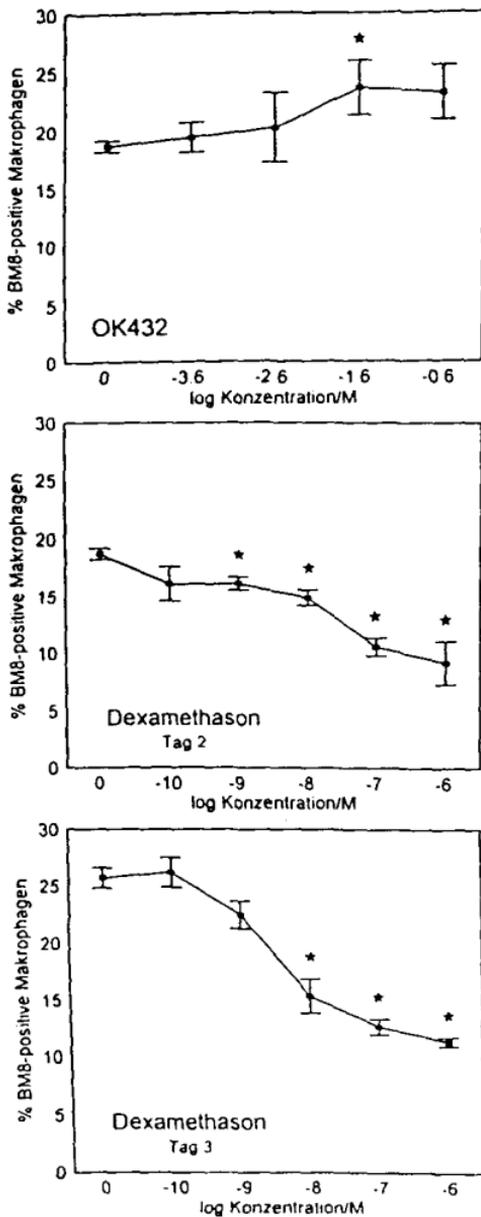


Abb. 6

Dosisabhängige Wirkung von OK432 und Dexamethason auf die BM8-Ausprägung (% positive Zellen) nach zwei- bzw. dreitägiger Zellkultur,

Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ ($10^{-3,6}$ M $n = 2$)

* geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

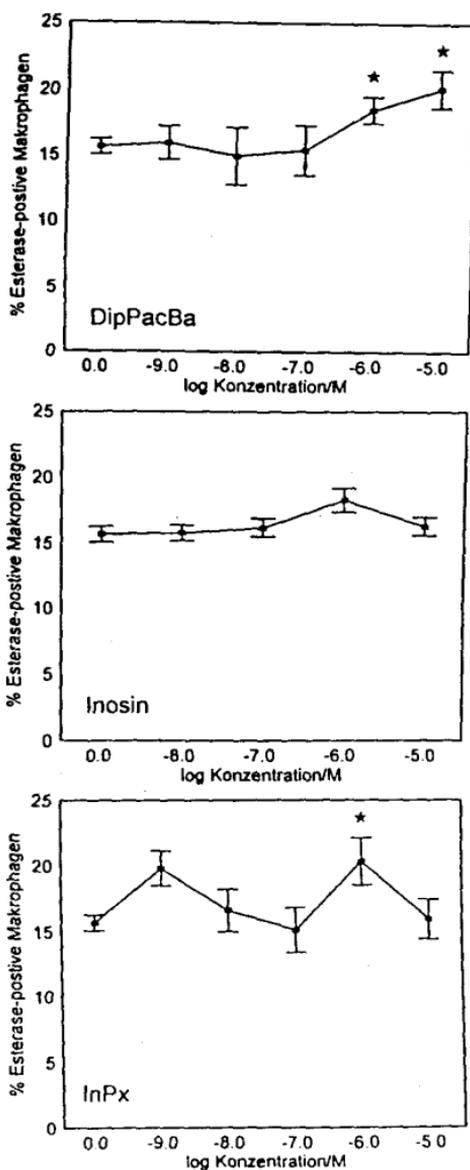


Abb. 7

Dosisabhängige Wirkung von InPx und seinen Komponenten auf die Produktion unspezifischer Esterase (% positive Zellen) nach zweitägiger Zellkultur,

Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ (10^{-9} M $n = 2$)

* geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

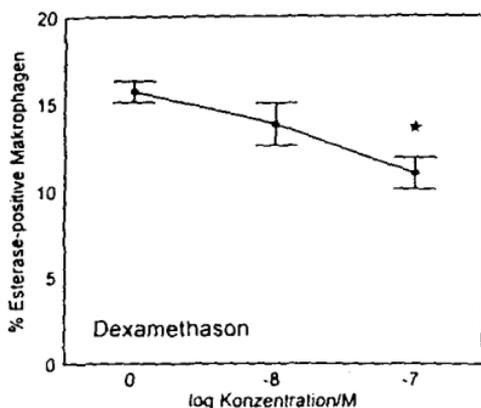
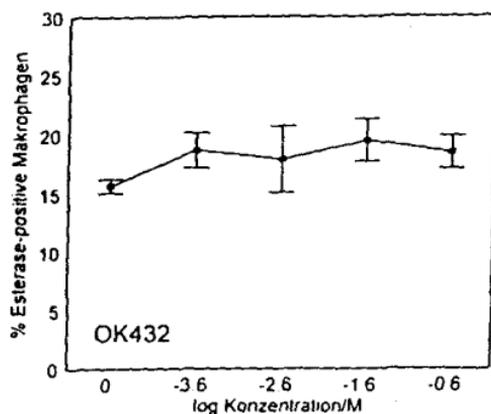


Abb. 8 Dosisabhängige Wirkung von OK432 und Dexamethason auf die Produktion unspezifischer Esterase (% positive Zellen) nach zweitägiger Zellkultur
 Mittelwert \pm SEM, $n > 4$ ($10^{-3,6}$ M $n = 2$)
 * geben signifikante Unterschiede zur Kontrolle ("0") an

4.4.3 Bestimmung der optimalen Wirkkonzentration der Immunmodulatoren

Anhand der Dosis-Wirkungsbeziehungen konnte für jede Substanz die Wirkkonzentration bestimmt werden, die sowohl den BM8-Typus als auch den Esterasetypus optimal stimulierte.

InPx und Inosin erreichten beide als 10^{-6} M Konzentration die besten Ergebnisse. Dies war auch für DipPacBa die optimale Konzentration, da es dann bei noch verträglicher Toxizität beide Makrophagen signifikant stimulierte. Zusätzlich wurde die toxischere, aber stärker stimulierend wirkende Konzentration von 10^{-5} M wegen der überdurchschnittlichen Wirkung weiter untersucht, die Einzelkomponenten Dip und PacBa in späteren Versuchen jedoch in der besser verträglichen Konzentration von 10^{-6} M verwendet. Die optimale Wirkkonzentration des OK432 lag bei $10^{-1,6}$ M. Obwohl 10^{-6} M Dexamethason den BM8-Makrophagen am stärksten supprimierte, wurden die weiteren Versuche mit der schwächeren Konzentration von 10^{-7} M durchgeführt, da auch damit sehr gute Ergebnisse erzielt wurden und so unphysiologisch hohe Konzentrationen vermieden wurden.

4.5 Einfluß der Inkubationsdauer der Pharmaka auf die Immunmodulation der Knochenmarksmakrophagen

Um Aussagen über die zeitliche Wirkung der Immunmodulatoren zu erhalten, wurden die Knochenmarkszellen über 1 bis 5 Tage mit dem Immunmodulator inkubiert.

Dabei wurden die Zellen für Inkubationszeiten bis zu 3 Tagen in Petri-Perm-Schalen kultiviert, für längere Inkubationszeiten von vier und fünf Tagen wurden Teflon-Säckchen verwendet. Für die längere Kulturzeit erwiesen sich die Petri-Perm-Schalen als ungeeignet, da die Zellausbeute ab Tag 4 in den Schalen zu gering wurde, um die erforderliche Anzahl Cytospinpräparate zu erhalten, während die Zellausbeute in den Teflon-Säckchen noch ausreichend war. Zellvitalität und Morphologie waren in beiden Kultursystemen gleich.

Alle Pharmaka wurden dabei in der Konzentration verwendet (OK432 $10^{-1,6}$ M, Dexamethason 10^{-7} M, InPx, Inosin, DipPacBa je 10^{-6} M, sowie zusätzlich DipPacBa 10^{-5} M), wie sie in den Titrationsversuchen als optimal erkannt worden waren.

Zur besseren Veranschaulichung wurde der Anteil positiver Zellen (BM8 bzw. Esterase) als absolute bzw. relative Abweichung von der Kontrollgruppe gegen die Inkubationsdauer in Tagen graphisch dargestellt (Abb. 9 und 10, Tabelle 12-15 mit Einzelwerten im Anhang). Die relative Abweichung entspricht dabei der prozentualen Stimulation [relative Abweichung = % Stimulation = $(\text{Pha-K})/K \cdot 100$], die absolute Abweichung (= Stimulation) gibt die Differenz zwischen Pharmakon und Kontrollgruppe an. Für alle stimulierend wirkenden Pharmaka ergaben sich dabei sehr ähnliche Kurvenverläufe. Dexamethason als Immunsuppressor zeigte jedoch einen deutlich anderen Verlauf.

Anhand der relativen Abweichung von der Kontrollgruppe ließ sich jetzt für jede Substanz der Zeitpunkt der optimalen, d.h. maximalen Wirkung im Reifungsprozeß der Zellkultur angeben. Gleichzeitig konnte aus der Beziehung der Graphen zueinander die Wirkpotenz der einzelnen Substanzen abgeschätzt werden.

4.5.1 Einfluß der Inkubationsdauer auf die Immunmodulation des BM8-Makrophagen

Wie aus Abb. 9 ersichtlich wird, konnten die Immunstimulantien InPx, Inosin, DipPacBa und OK432 den BM8-Makrophagen nur an den ersten drei Kulturtagen beeinflussen.

Die wirkungsvollste Substanz war dabei das Salz DipPacBa in der 10^{-5} M Konzentration. Bereits nach 24 Stunden Zellkultur wurde ein stimulierender Effekt auf den BM8-Makrophagen erkennbar, der nach 48 Stunden Zellkultur sein Maximum erreichte. Bei Verwendung der niedrigeren Konzentration von 10^{-6} M DipPacBa zeigten sich insgesamt etwas gemilderte Kurvenverläufe, wobei hier durch die weniger aggressive, niedrigere Konzentration ein etwas protrahierter Effekt sichtbar wurde mit nur geringfügig schwächerer Wirkung nach 72 Stunden als nach 48 Stunden. InPx war nur schwach wirksam mit einer maximalen Wirkung nach 72 Stunden. Inosin erzielte an keinem Versuchstag ein statistisch signifikantes Ergebnis und war damit zur Stimulation des BM8-Makrophagen unwirksam. OK432 erreichte wie DipPacBa sein Wirkmaximum bereits nach 48 Stunden Zellkultur. Die Wirkpotenz der Streptokokkenpräparation lag dabei zwischen den beiden DipPacBa-Konzentrationen.

Ab Tag 4 war kein Einfluß der genannten Substanzen auf den BM8-Makrophagen mehr nachweisbar. (siehe dazu Tabelle 12 und 13 im Anhang). Mit oder ohne Immunmodulator entstanden nach fünftägiger Zellkultur im Mittel 75 % Makrophagen.

Keine Substanz konnte den Anteil der BM8-Makrophagen also dauerhaft vermehren; gleichzeitig war damit aber auch ein schädlicher Einfluß der Substanz auf das Kultursystem ausgeschlossen. Die Wachstumskinetik des Dexamethasons zeigte im Vergleich zu den anderen Substanzen einige Unterschiede. Das Wirkmaximum war nach dreitägiger Zellkultur erreicht, aber schon nach 24 Stunden war ein supprimierender Effekt des Glucocorticoids deutlich. Die supprimierende Wirkung hielt auch noch an Tag 4 und 5 an, erkennbar am kontinuierlich fallenden Graphen der Abb. 9 (abs. Stimulation).

4.5.2 Einfluß der Inkubationsdauer auf die Immunmodulation des Esteraseproduzierenden Makrophagen

Die Wachstumskinetik der Esteraseproduzierenden Makrophagen verhielt sich ähnlich wie die der BM8-Makrophagen (s. Abb. 10, Tabellen 14 und 15 im Anhang). Eine immunmodulatorische Wirkung wurde aber im Unterschied zum BM8-Makrophagen frühestens an Tag 2 nachweisbar. Esterase als Enzym des reifen Makrophagen exprimierten an Tag 0 nur ca. 5 % aller Zellen. Auch nach 24 Stunden Inkubation fanden sich im Mittel in allen Kulturschalen (Immunmodulatoren und Kontrolle) nur ca. 7,5 % positive Zellen (Schwankungsbreite von 6,1 bis 8,9 %).

Nach zwei Tagen Zellkultur wurde der Einfluß der Immunmodulatoren sichtbar. Im Gegensatz zum BM8-Makrophagen wurde die maximal stimulierende Wirkung aller Pharmaka erst nach 72 Stunden Zellkultur erreicht. Ebenfalls deutliche Unterschiede zum BM8-Typus gab es hinsichtlich der Wirkpotenz der Pharmaka. So erwies sich die Gesamtsubstanz InPx als die stärkste Substanz, besser wirkend noch als DipPacBa 10^{-5} M. Das Salz hingegen hatte zwar eine etwas schwächere Wirkung, die aber bei beiden DipPacBa-Konzentrationen auch am 4. Tag noch anhielt, wenn auch wegen der geringen Versuchsanzahl ein statistisch signifikantes Ergebnis nicht erreicht wurde.

Inosin war, wie auch schon bei der Stimulation der BM8-Makrophagen, die schwächste Substanz. Das Wirkmaximum lag ebenfalls am 3. Kulturtag. Trotz scheinbar identischer Stimulationsraten an Tag 2 und 3 wurde ein statistisch signifikantes Ergebnis erst nach 72 Stunden erzielt.

Die Streptokokkenpräparation OK432 war ebenfalls stark wirksam, etwas schwächer als DipPacBa 10^{-5} M. Auch hier schien eine Wirkung über den 3. Tag hinaus (Wirkmaximum) möglich, wobei wie bei DipPacBa das Ergebnis nicht signifikant war.

Nach einer fünftägigen Kulturzeit war bei keiner stimulierenden Substanz ein Einfluß auf den Esterasemakrophagen mehr nachweisbar. Ca. 85 % aller Makrophagen produzierten dann die unspezifische Esterase, unabhängig vom verwendeten Immunstimulator.

Dexamethason konnte im Gegensatz zu allen anderen Pharmaka die Esteraseproduktion unterdrücken. Besonders deutlich wurde dies bei Darstellung der absoluten Stimulation.

Ein erstes Wirkmaximum trat nach 72 Stunden Zellkultur auf, nach 5 Tagen war bei einer nahezu identischen Suppressionsrate von 40 % ein zweites Wirkmaximum erreicht, aufgrund der geringen Versuchsanzahl aber noch nicht statistisch signifikant. Da jedoch sowohl die Ergebnisse von Tag 4 als auch von Tag 5 weit außerhalb des Standardfehlers des Mittelwertes der Kontrollgruppe lagen, war ein supprimierender Effekt des Dexamethasons auch an diesen Versuchstagen sehr wahrscheinlich. Verglichen mit dem BM8-Typus wirkte Dexamethason auf den Esterasetypus etwas schwächer, lediglich an Tag 5, an dem es möglicherweise ein zweites Wirkmaximum hat, war es stärker supprimierend.

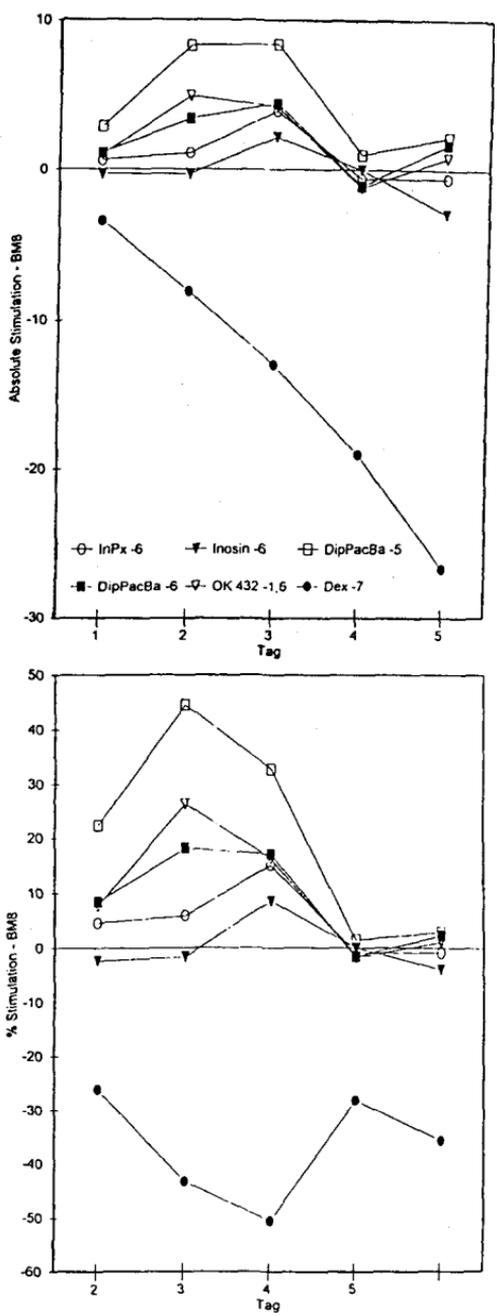


Abb. 9 Zeitlicher Verlauf der Immunmodulation des BM8-Makrophagen als absolute und prozentuale Stimulation, bezogen auf die Kontrollgruppe

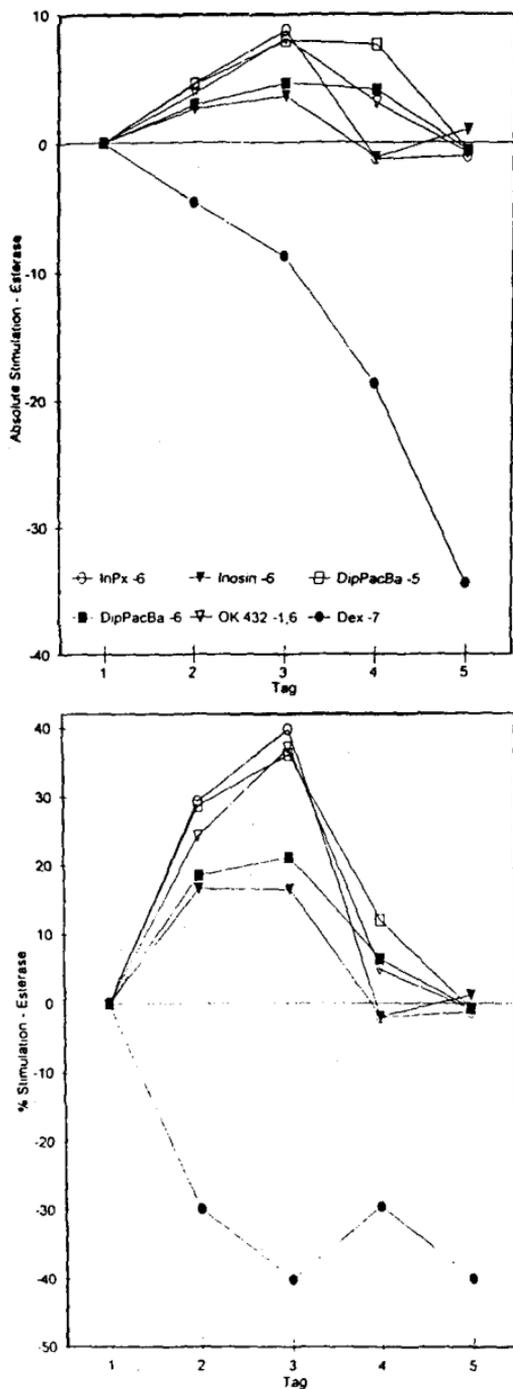


Abb. 10

Zeitlicher Verlauf der Immunmodulation des Esterase-produzierenden Makrophagen, dargestellt als absolute und prozentuale Stimulation, bezogen auf die Kontrollgruppe

4.6 Variationsbreite der Immunmodulation nach zwei und drei Tagen Zellkultur

Da sich die immunmodulierenden Effekte der gleichen Pharmaka fast ausschließlich an Tag 2 und 3 des Zellkultursystems ereigneten, wurden hier die meisten Versuche durchgeführt, um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten.

Bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehungen auf den BM8-Makrophagen hatte sich DipPacBa wirksamer als die Gesamtsubstanz InPx erwiesen. Um den Wirkmechanismus von DipPacBa weiter aufzuschlüsseln, wurden jetzt zusätzlich die beiden Einzelkomponenten Dip (1,1-Dimethylamino-2-propanol) und PacBa (4-Acetamidobenzoat) untersucht.

Graphisch wurden die Ergebnisse der beiden Versuchstage jeweils für BM8 und Esterase in Form eines "box und whisker plots" dargestellt (L.C. Hamilton, 1990). Dieses bot die Möglichkeit, die ermittelten Daten in ihrer gesamten Streubreite darzustellen. Die Länge der "box" spiegelte dabei den Bereich wider, in dem sich 50 % aller erhobenen Daten befanden; die "whiskers", d.h. die senkrechten Balken, markierten den minimalen und maximalen Wert.

Da bei der geringen Versuchsanzahl von im Durchschnitt $n=6$ sog.

"Ausreißerwerte" den statistischen Mittelwert erheblich verändern können, wurde bei dieser Form der graphischen Darstellung zusätzlich der für solche Untersuchungen mathematisch exaktere Median (Zentralwert) als waagerechter Balken in der Box angegeben. Das Kreuz "x" zeigt den arithmetischen Mittelwert der Meßwerte an.

(Werden die Meßwerte ihrem Betrag nach als Rangfolge angeordnet, so ist der Median als der Wert definiert, der diese Meßreihe halbiert (Ramm und Hofmann, 1982).)

4.6.1 Variationsbreite der Immunmodulation des BM8-Makrophagen nach zwei Tagen Zellkultur (Abbildung 11)

Bereits 48 Stunden nach Inkubation mit DipPacBa wurde die BM8-Ausprägung signifikant gesteigert, während die Gesamtsubstanz InPx sowie die Nukleinsäure Inosin keinen Einfluß hatten. Interessanterweise konnte auch PacBa allein den Anteil der BM8-Makrophagen signifikant erhöhen. Der PacBa-Effekt war dabei nur geringfügig schwächer als nach Stimulation mit DipPacBa 10^{-6} M. PacBa war offenbar an Tag 2 für die stimulierenden Eigenschaften des DipPacBa hauptverantwortlich. Die zweite Komponente Dip blieb wirkungslos.

Die Streptokokkenpräparation OK432 führte zwar zu einer deutlichen Vermehrung der BM8-Makrophagen, die Einzelergebnisse streuten jedoch beträchtlich (große "box", lange "whiskers" und eine deutliche Diskrepanz zwischen Median und Mittelwert.) Die immunstimulierende Wirkung war in ihrer Stärke also unterschiedlich ausgeprägt, war jedoch statistisch signifikant.

Dexamethason suppressierte bereits nach 48 Stunden sehr wirkungsvoll die BM8-Ausprägung.

Modulation BM8-positiver Zellen

Tag 2

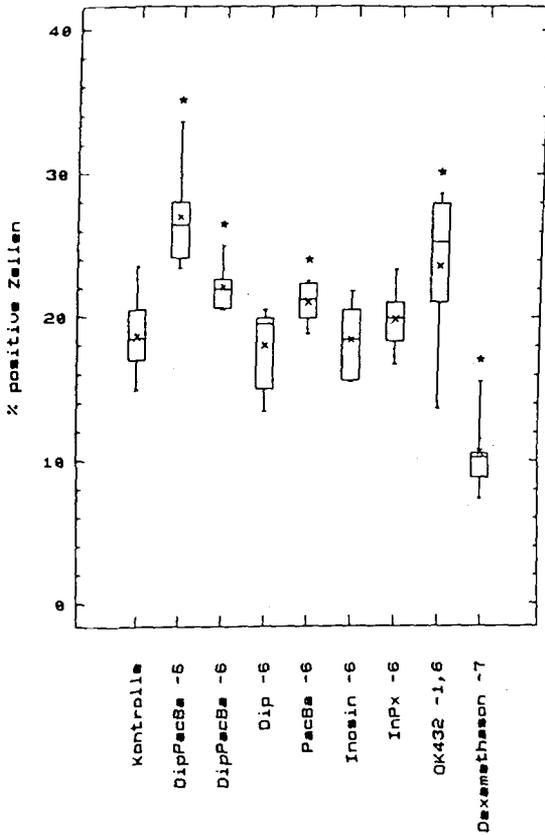


Abb. 11

Immunmodulation des BM8-Makrophagen, dargestellt als "box and whisker -plot" nach zweitägiger Knochenmark-Kultur der Zellen. "X" geben den Mittelwert aus $n \approx 6$ Versuchen an, die "whiskers" zeigen den minimalen und maximalen Meßwert an, die Größe der "box" gibt den Bereich an, in dem sich 50 % aller Meßwerte befinden, der waagerechte Balken in der Box markiert den Medianwert.

* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau an.

4.6.2 Variationsbreite der Immunmodulation des BM8-Makrophagen nach drei Tagen Zellkultur (Abbildung 12)

Nach 72 Stunden Zellkultur *stimulierte* auch InPx den BM8-Makrophagen. InPx, DipPacBa sowie PacBa (alle in der Konzentration von 10^{-6} M) führten jetzt alle in etwa zum gleichen Anteil an BM8-Makrophagen; bezogen auf die prozentuale Stimulationsrate (s. Tabelle 13 im Anhang) war jedoch PacBa die wirksamste Substanz, die offenbar an Tag 3 auch ihr Wirkmaximum hatte. Die Hauptwirkung des DipPacBa wurde offenbar wieder von PacBa ausgeübt. Inosin und Dip blieben weiterhin ohne Einfluß auf den BM8-Makrophagen. Dip fiel dabei durch eine große Streuung der Einzelwerte auf, sichtbar an der überdurchschnittlich langen Box, sowie der beträchtlichen Diskrepanz von Median und Mittelwert. DipPacBa in der höheren Konzentration von 10^{-5} M zeichnete sich durch eine hohe Konstanz der Einzelergebnisse bei weiterhin sehr starkem stimulierenden Effekt aus. Der Einfluß des OK432 entsprach in etwa dem des InPx, wobei die Meßergebnisse im Vergleich zum zweiten Kulturtag wesentlich konstanter waren. Dexamethason erreichte seine maximale Wirkung mit einer mehr als 50-prozentigen Reduktion des Anteils der BM8-Makrophagen.

Modulation BM8-positiver Zellen

Tag 3

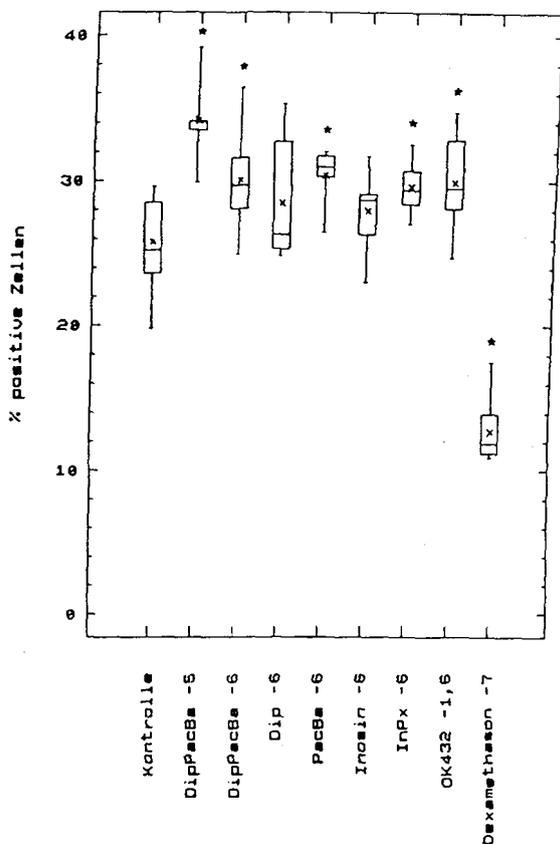


Abb. 12

Immunmodulation des BM8-Makrophagen, dargestellt als "box and whisker - plot" nach dreitägiger Knochenmark-Kultur der Zellen. "X" geben den Mittelwert aus n = 6 Versuchen an, die "whiskers" zeigen den minimalen und maximalen Meßwert an, die Größe der "box" gibt den Bereich an, in dem sich 50 % aller Meßwerte befinden, der waagerechte Balken in der Box markiert den Medianwert.

* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau an.

4.6.3 Variationsbreite der Immunmodulation des Esterase produzierenden Makrophagentyps nach zwei Tagen Zellkultur (Abbildung 13)

Bis auf Inosin und OK432 modulierten alle eingesetzten Substanzen den Esterase produzierenden Makrophagen. Nach 48 Stunden Kulturzeit waren InPx und DipPacBa 10^{-5} M gleich stark, DipPacBa 10^{-6} M deutlich schwächer wirksam. Beide Einzelkomponenten Dip und PacBa stimulierten die Esteraseproduktion gleichermaßen gut und waren, bezogen auf die prozentuale Stimulationsrate (s. Tabelle 15 im Anhang), einzeln sogar stärker wirksam als ihre zusammengesetzte Form DipPacBa gleicher Konzentration. OK432 blieb bei einer sehr großen Streuung der Einzelwerte wirkungslos. Dexamethason reduzierte den Anteil Esterase produzierender Makrophagen um fast 30 %.

4.6.4 Variationsbreite der Immunmodulation des Esterase produzierenden Makrophagentyps nach drei Tagen Zellkultur (Abbildung 14)

Alle eingesetzten Pharmaka modulierten nach 72 Stunden Zellkultur den Esterase-Makrophagen. Den stärksten stimulierenden Effekt aller Substanzen hatte dabei die Gesamtsubstanz InPx. PacBa und Dip waren beide wieder in etwa gleich wirksam, schwächer als InPx, aber interessanterweise einzeln jeweils stärker wirksam als DipPacBa gleicher Konzentration, so daß hier ein antagonistischer Effekt möglich wäre. Offenbar war, um die volle Wirkung zu entfalten, die Nukleinsäure Inosin notwendig. Diese stimulierte erstmalig auch allein eingesetzt den Esterase-Typus. Bei Vereinigung mit DipPacBa zum InPx zeigte sich dann nach drei Tagen Zellkultur die volle Wirkung. DipPacBa in der höheren Konzentration stimulierte ebenso wie OK432 deutlich die Esteraseproduktion. Dexamethason konnte dagegen die Esteraseproduktion wieder drastisch vermindern.

Modulation Esterase-positiver Zellen

Tag 2

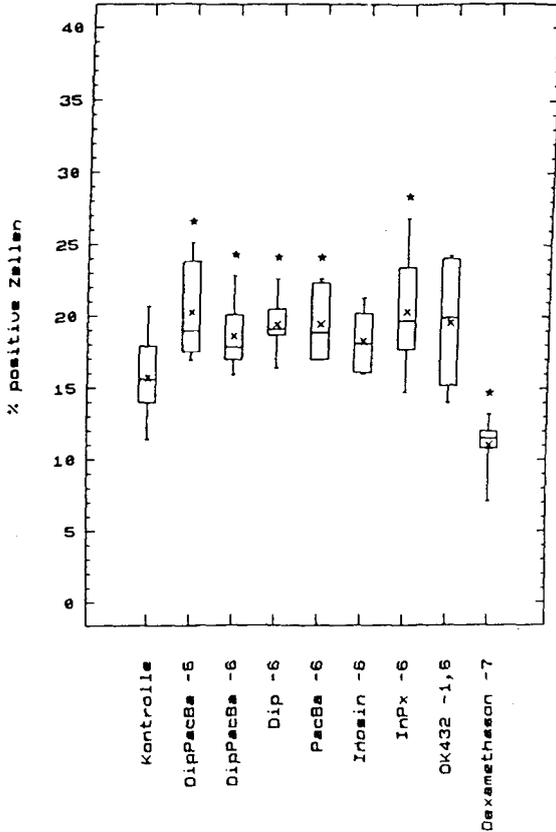


Abb. 13

Immunmodulation des Esterase-Makrophagen, dargestellt als "box and whisker - plot" nach zweitägiger Knochenmark-Kultur der Zellen.

"X" geben den Mittelwert aus $n = 6$ Versuchen an, die "whiskers" zeigen den minimalen und maximalen Meßwert an, die Größe der "box" gibt den Bereich an, in dem sich 50 % aller Meßwerte befinden, der waagerechte Balken in der Box markiert den Medianwert.

* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau

Modulation Esterase-positiver Zellen

Tag 3

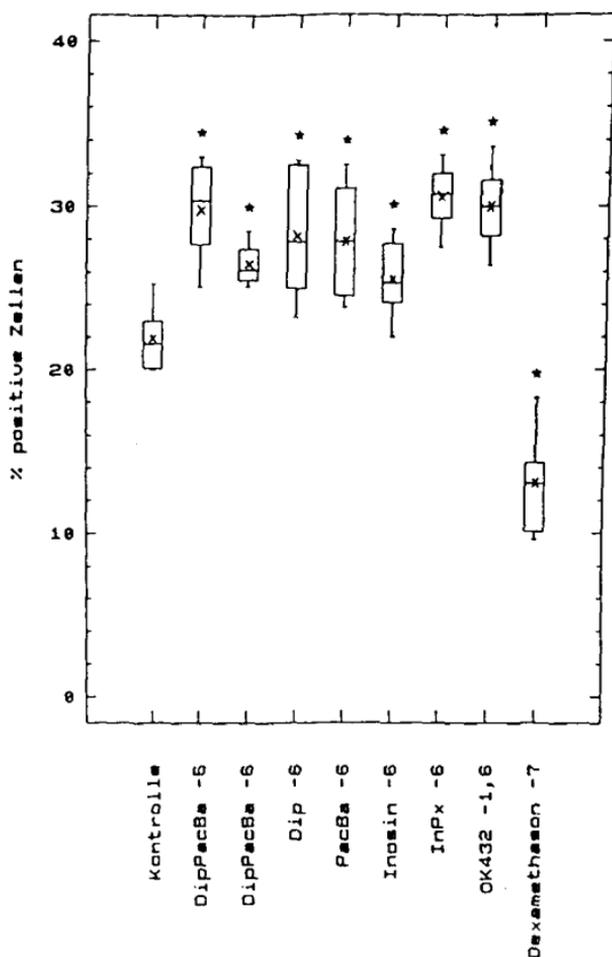


Abb. 14

Immunmodulation des Esterase-Makrophagen, dargestellt als "box and whisker - plot" nach dreitägiger Knochenmark-Kultur der Zellen.

"X" geben den Mittelwert aus $n = 6$ Versuchen an, die "whiskers" zeigen den minimalen und maximalen Meßwert an, die Größe der "box" gibt den Bereich an, in dem sich 50 % aller Meßwerte befinden, der waagerechte Balken in der Box markiert den Medianwert.

* zeigen signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau

5. Diskussion

Pharmaka, die eine stimulierende oder supprimierende Wirkung auf das Immunsystem ausüben, sind bereits seit langem bekannt und werden mit wechselndem Erfolg in der Klinik angewandt (Wybran, 1988; Werner et al, 1986). Bisher ist die klinische Nutzung jedoch schwierig und wird meist rein empirisch gehandhabt, da der genaue Wirkmechanismus und Zielort einschließlich aller Zellsubpopulationen meist nicht genau bekannt sind (Spreafico, 1985). Makrophagen nehmen aufgrund ihrer Effektor- und Regulatorfunktionen eine zentrale Position im Immunsystem ein. Eine gezielte Beeinflussung ihrer einzelnen Unterpopulationen würde deshalb einen erheblichen Fortschritt in der Immuntherapie bedeuten.

Bei in vivo-Untersuchungen spielen Verteilung und Metabolisierung der Pharmaka sowie die Zell-Zell-Interaktionen von Immunzellen, Epithelien und Endothelien eine große Rolle bei der Beurteilung von Pharmakonwirkungen.

Durch diese Arbeit konnte nun unter Umgehung vieler dieser Faktoren, indem wir als Untersuchungssystem ein in vitro-Modell verwendeten, eine direkte stimulierende oder supprimierende Wirkung von immunmodulierenden Substanzen auf den Makrophagen allein, ohne Berücksichtigung von Wechselwirkungen mit anderen Teilen des Immunsystems, nachgewiesen werden.

Dazu wurde je ein Vertreter eines synthetischen Immunmodulators (Inosin Pranobex), eines biologischen (OK432) und eines hormonell aktiven Stoffes (Dexamethason) ausgewählt und ihr Einfluß auf drei Makrophagensubtypen, die anhand ihrer Oberflächenmarker BM8 oder I_A bzw. aufgrund der Produktion unspezifischer Esterase differenziert wurden, überprüft.

5.1 Das Knochenmark-Kultursystem als in vitro-Modell für Untersuchungen an Makrophagenmonokulturen

Für die Anzucht der Makrophagen wurde ein Suspensions-Kultur-System gewählt, wie es von Summer und Goud beschrieben wurde (Summer et al, 1972; Goud et al, 1975). Als Kulturgefäße wurden bei dieser Untersuchung Petri-Permschalen mit Teflon-Boden, bzw. Säckchen aus Teflonfolie verwendet. Dadurch ließ sich die Adhärenz der Zellen am Gefäßboden vermeiden. Die Zellen haften nur locker an der Folie und können, ohne Schaden zu nehmen, "geerntet" werden, ihre Oberflächenstrukturen und ihre Zellfunktionen bleiben erhalten (von der Meer et al, 1978; Malorny et al, 1981). Es findet keine Aktivierung der Makrophagen statt (Dinarelo 1988; Haskill et al, 1988) Ein Vorteil der Petri-Perm-Schalen besteht in

der leichteren Handhabung der Kulturschalen bei gleicher Vitalität und Zellmorphologie der Makrophagen im Vergleich zum Teflonsäckchen. Da die Zellausbeute in den Schalen wie von Malorny et al (1988) beschrieben deutlich geringer ist als in den Teflon-Säckchen, wurden die Versuche ab dem 4. Kulturtag in Säckchen durchgeführt. In Bezug auf die Zellausbeute entspricht die vorliegende Arbeit auch sehr gut den Ergebnissen von Neumann und Sorg (1980). Hinsichtlich der Esterase-produzierenden Makrophagen ergaben sich jedoch Unterschiede (nach 5 Tagen Zellkultur 30 % bei Neumann und Sorg, 86 % in der vorliegenden Arbeit), die mit unterschiedlichen Konzentrationen an M-CSF des jeweils zugesetzten L-Zell-Mediums sowie einem genetisch anderen Zellmaterial (BALB/c-Inzucht-Mäuse gegenüber den hier verwendeten NMRI-Auszucht-Mäusen) erklärt werden können.

Die Entwicklung der BM8-Makrophagen ist dagegen sehr gut mit den Ergebnissen von Malorny et al (1986) und Zwadlo-Klarwasser et al (1994) vergleichbar. Sowohl bei Malorny et al (1986) als auch in der vorliegenden Arbeit finden sich in den frühen Kulturstadien (Tag 1-3) immer weniger Esterase- als BM8-Makrophagen, nicht jeder BM8-Makrophage kann also gleichzeitig Esterase produzieren. Es lassen sich so deutlich zwei Subpopulationen abgrenzen.

Die Ausprägung des I_A-Antigens des Makrophagen bei Knochenmark-Kultur der Zellen wird in der Literatur sehr unterschiedlich beschrieben und soll daher gesondert diskutiert werden.

Die Struktur des in vitro-Systems bietet die Möglichkeit, durch Beschränkung auf eine Zellpopulation diese gezielt zu beeinflussen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen sich jedoch nicht unmittelbar auf die Situation im Gesamtorganismus übertragen. Das Immunsystem als Ganzes ist ein derart komplexes System mehrerer Regelkreise mit positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen, daß Wirkungen auf die Einzelzelle durch Zell-Zell-Interaktionen gesteigert, aufgehoben oder sogar antagonisiert werden können. So bestehen doch erhebliche Unterschiede dieser in vitro-Untersuchung gegenüber den Ergebnissen in vivo (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a). Dennoch lassen sich gerade anhand solcher Differenzen weitere Wirkungsvoraussetzungen der Substanzen wie Anwesenheit bestimmter Cytokine oder Wirkungsvermittlungen über direkten Zellkontakt abschätzen, wie sowohl für die Immunglobulinproduktion von B-Zellen nach Glucocorticoidgabe (Orson und Auzenne, 1988) als auch für die Makrophagen vermittelte Suppression der Lymphozyten (Zwadlo-Klarwasser et al, 1994) beschrieben wurde.

Bezogen auf die Immunmodulation der Oberflächenmarker oder der Enzymproduktion als Stoffwechsellistung des Makrophagen bietet das Knochenmark-Kul-

tursystem optimale Voraussetzungen. Im Gegensatz zur Zellkultur von z. B. reifen Peritonealmakrophagen handelt es sich hier um omnipotente Stammzellen, die, bedingt durch ihre Unreife, auf Änderungen der Kulturbedingungen, z. B. durch Immunmodulatorzusatz, mit einer Änderung ihres Phänotypen reagieren können und so eine beschleunigte oder verzögerte Entwicklung erfahren können (Neumann und Sorg, 1980).

Wie aus den Kinetikversuchen mit einer Inkubationszeit über 1-5 Tage deutlich wird, läßt sich das System mit Immunstimulantien wie InPx, Inosin, DipPacBa und OK432 in der vorliegenden Arbeit nur an den ersten drei Kulturtagen beeinflussen. Zielzelle ist also der möglichst junge Makrophage, der durch das Immunstimulanz schneller zum BM8- oder Esterasemakrophagen ausreift. Ob sich durch die toxischen Eigenschaften der Substanzen auf die Stammzelle weniger Makrophagen bilden, läßt sich durch diese Untersuchung nicht klären, da lediglich die Gesamtzellzahl, nicht aber der Anteil Makrophagen am Gesamtzellaufkommen bestimmt wurde. Schädliche Einflüsse auf den Differenzierungsprozess der Makrophagen sind jedoch nicht nachweisbar. Die Immunstimulantien ändern nur den zeitlichen Verlauf des Differenzierungsprozesses im Sinne einer schnelleren Reifung; die Anzahl BM8- oder Esterase produzierender Makrophagen ist nach fünfägiger Zellkultur in Kontroll- und Stimulanzgruppe gleich.

5.2 Auswirkung der Immunmodulatoren auf die Gesamtzellzahl nach Knochenmarkkultur

Bei der vorliegenden Arbeit wurde für jeden zur Zellkultur zugesetzten Immunmodulator nach zwei und drei Tagen Knochenmarkkultur die Gesamtzellzahl pro Kulturschale mit der Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Dabei konnte bei der geringen Vergrößerung nicht zwischen Makrophagen und anderen Knochenmarkzellen unterschieden werden.

Alle Immunmodulatoren verhielten sich dabei weitgehend gleich; keine Substanz, auch Dexamethason nicht, konnte die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle erhöhen oder erniedrigen.

Dies entspricht den Ergebnissen von van der Meer et al (1986). Auch hier bleibt nach Gabe von Dexamethason oder Hydrocortison zu Knochenmarkstammzellen der Maus die Gesamtzellzahl gleich, aber der Anteil an Makrophagenkolonien wird dosisabhängig stark reduziert. Dabei verringert sich vor allem der Anteil an Vorläuferzellen wie Monoblasten und Promonozyten. Durch Zugabe des Glucocorticoids wird demnach die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung unterdrückt, erkennbar auch an der verminderten DNA-Syntheserate. Auch Ishii et al (1983) konnten eine glucocorticoidbedingte Abnahme der Makrophagenkolonien

bei zunächst gleichbleibender Gesamtzellzahl nachweisen, nach siebentägiger Knochenmark-Kultur war jedoch auch die Gesamtzellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Interessanterweise war das körpereigene Cortisol dem Dexamethason hinsichtlich der Wirkung auf die Zahl der Makrophagenkolonien überlegen. Bei der vorliegenden Arbeit wurde pro Cytospinpräparat jeweils das Verhältnis der Subpopulationen (I_A , BM8, Esterase) zur Gesamtmakrophagenmenge für jeweils drei Gesichtsfelder ermittelt, nicht jedoch der Anteil an Makrophagen am Gesamtzellaufkommen pro Gesichtsfeld.

Da die nicht angefärbten Makrophagen (d.h. die I_A -negativen bzw. BM8- oder Esterase-negativen Makrophagen) anhand ihrer typischen Zellmorphologie differenziert wurden, konnten Makrophagenvorstufen, die bei einer zahlenmäßigen Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf eine verzögerte Reifung hinweisen würden, nicht erfaßt werden.

Ob durch Glucocorticoide wie das Dexamethason tatsächlich die Makrophagenproliferation sowie die Entwicklung zum "Endprodukt" Makrophage verzögert ist, kann deshalb anhand dieser Untersuchungsmethode nicht geklärt werden.

Aus Untersuchungen an humanen Fibroblasten weiß man jedoch, daß Dexamethason die Genexpression des Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierenden Faktors unterdrücken kann, was die nach Glucocorticoidgebe bekannte Leukopenie (Granulo- und Monozytopenie) erklären kann, da auf Stammzellenebene die Proliferation nicht mehr stimuliert wird; die M-CSF-Produktion wird durch Dexamethason jedoch nicht gestört. (Tobler et al 1992)

5.3. Der I_A -Makrophage im Knochenmark-Kultursystem

Der I_A -Makrophage nimmt aufgrund seiner Fähigkeit, Antigen an T-Helfer-Zellen zu präsentieren und damit sowohl die zelluläre wie die humorale Immunantwort zu induzieren, eine herausragende Position im Immunsystem ein. So ist zum Beispiel die Wirkung eines Immunogens als Impfung zur Steigerung der zellvermittelten Immunität unmittelbar abhängig von der Fähigkeit des Immunogens, die Anzahl I_A -Makrophagen zu erhöhen (Matsui und Arai, 1992).

Der Anteil spontan im Knochenmark entstehender I_A -Makrophagen wird in der Literatur sehr kontrovers beurteilt. In der vorliegenden Arbeit waren nach 4 Tagen Zellkultur lediglich maximal 3,6 % aller Makrophagen I_A -positiv. Dies stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von Calamai et al (1982) überein, demzufolge maximal 2,5 % aller Makrophagen das I_A -Antigen tragen, unabhängig von der Kulturdauer. Demgegenüber berichteten andere Autoren über einen wesentlich höheren Anteil

an I_A-Makrophagen von 30 - 90 % bei einer Knochenmark-Kulturdauer von 7 - 13 Tagen, ohne daß die Zellen zusätzlich stimuliert oder aktiviert wurden (Hauschildt et al, 1990; Nibbering et al, 1987; Malorny et al, 1986).

Die Ausprägung des I_A-Antigens ist offenbar unmittelbar vom Zellzyklus abhängig. Solange sich das System noch in der Proliferationsphase (Tag 0 - 4) (Neumann und Sorg, 1980) befindet, lassen sich kaum I_A-Makrophagen finden. Auch bei der vorliegenden Arbeit ließ sich der I_A-Anteil erstmals an Tag 4 prozentual angeben. Er lag vorher bei unter 1 % im o/oo-Bereich.

Wird der Makrophagenkoloniestimulierende Faktor aus der Makrophagenkultur entfernt, so steigt der Anteil an I_A-Makrophagen kurzfristig an. Diese spontante I_A-Ausbildung ist jedoch nur vorübergehend; durch geeignete Stimuli in der Knochenmark-Kultur, wie Zusatz von Lymphokinen und Gabe von Adjuvantien wie Listerien bei gleichzeitigem Entfernen des M-CSF kann prinzipiell jeder Makrophage zur Ausprägung des I_A-Antigens angeregt werden (Calamai et al, 1982). M-CSF scheint jedoch die Ausprägung von I_A zu inhibieren, während der GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Koloniestimulierender Faktor) die I_A-Entwicklung eher fördert (Falk et al, 1988).

Ein wesentlicher Faktor, der die Synthese und Ausprägung des I_A in den Makrophagen induzieren kann, scheint Interferon-Gamma aus Lymphozyten oder den Makrophagen selbst zu sein (Steege et al, 1982; Falk et al, 1988). Dies trifft auch auf humane Blutmonozyten zu. Ist Interferon-Gamma abwesend, so verlieren die Monozyten ihr dem I_A entsprechendes DR-Antigen; ist es jedoch in der Kultur vorhanden, so bleiben sie DR-positiv (Sztejn et al, 1984). Alle Untersuchungen zeigen deutlich, daß zur Ausbildung des I_A-Antigens offenbar zunächst eine Aktivierung der Makrophagen, z. B. mittels Interferon-Gamma, erfolgen muß. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit keine Substanz den I_A-Subtyp der Makrophagen zu stimulieren vermochte.

Obwohl sich in in vivo-Studien (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a; Sasaoki et al, 1992) OK432 als hochwirksam zur Induktion des I_A-Antigens erwiesen hat, beeinflusst es in vitro, wie diese Arbeit zeigt, diese Makrophagen-Subpopulation nicht in signifikantem Ausmaß. Vom OK432 ist bekannt, daß es auf Blutmonozyten Interferon-Alpha und -Gamma liberierend wirkt (Noda et al, 1986). Auch T-Zellen werden in Gegenwart von OK432 zur Interferon-Gamma-Ausschüttung angeregt (Colotta et al, 1985).

Möglicherweise steigert OK432 in vivo also erst über eine Interferon-Freisetzung aus T-Zellen die I_A-Ausprägung der Makrophagen. Dies entspricht auch einer weiteren Studie (Kawaguchi et al, 1983), bei der in vitro nur dann ein gesteigerter Anteil I_A-positiver Peritonealmakrophagen gefunden wurde, wenn die Tiere vor

der Zellkultur mit OK432 intraperitoneal immunisiert wurden, nicht jedoch, wenn Peritonealmakrophagen unbehandelter Mäuse erst *in vitro* mit OK432 zusammen kultiviert wurden.

Entsprechendes wie für das OK432 läßt sich auch für das InPx mit seinen Komponenten postulieren. InPx und DipPacBa steigern *in vivo* beide die I_A -Ausprägung und damit den Anteil antigen-präsentierender Zellen (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992; Tsang et al, 1987); *in vitro* bleiben sie hingegen ebenso wirkungslos wie OK432.

Es ist also offenbar für die Stimulation des I_A -Makrophagen ein Zusammenspiel mehrerer Immunzellen bzw. ihrer Produkte in Form von Cytokinen notwendig; eine direkte Beeinflussung des I_A -Makrophagen ist durch diese beiden Substanzen (InPx und OK432) anscheinend nicht möglich.

5.4 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der untersuchten Pharmaka auf die Makrophagen-Subpopulationen BM8- und Esterase produzierenden Makrophagen

Einige der auf die beiden Subpopulationen stimulierend wirkenden Pharmaka zeigten bei Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen ein im weitesten Sinne glockenkurvenartiges Profil. Die angedeutete Form der Glockenkurve ist aus den Graphiken für InPx, Inosin (Esterase) und OK432 ersichtlich und ist aus *in vivo*-Untersuchungen für Immunmodulatoren bereits bekannt (Dräger et al, 1988; Spreafico, 1985).

Mit ansteigender Dosis kann der gewünschte Effekt so lange gesteigert werden, bis er schließlich maximal wird, eventuell nach einer Art Plateauphase bei weiterer Dosiserhöhung auf diesem Niveau bleibt und schließlich mit noch höherer Dosis wieder vermindert wird. Erklären läßt sich dieser Kurvenverlauf u.a. durch die einsetzenden Gegenregulationsmechanismen der betroffenen Zellen auf die Stimulation, durch toxische Wirkungen der Substanzen in hohen Konzentrationen; aber auch antagonistische Wirkungen der Pharmaka auf die Einzelzelle spielen eine Rolle. So können die Organellen der Einzelzelle unterschiedlich sensibel auf die Pharmakondosierungen reagieren, wodurch gegenteilige Effekte der Substanz ausgelöst werden.

In vivo können mit ansteigender Dosierung mehrere Zellpopulationen gleichzeitig beeinflußt werden. Am Scheitelpunkt der Kurve ist das Zusammenspiel der einzelnen Zellsysteme optimal für den gewünschten Effekt; weitere Dosiserhöhungen

können eine Hemmung, aber auch Inhibition der Zielzellen bewirken (Spreafico, 1985).

Auch bei den eher hyperbolisch verlaufenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen des DipPacBa oder des Dexamethason ist wahrscheinlich durch den hier gewählten Dosisbereich nur der ansteigende Schenkel der Glockenkurve gemessen worden. Noch höhere Pharmakonkonzentrationen hätten wahrscheinlich bei beiden Substanzen ebenfalls zu einem Maximaleffekt und nachfolgender Wirkungsabschwächung geführt. Da jedoch für das DipPacBa bereits in der Konzentration von 10^{-5} M eine starke Toxizität der Substanz nach 48stündiger Zellkultur erkennbar wurde (20 % tote Zellen), und diese durch Inkubation in noch höherer Konzentration von 10^{-4} M weiter anstieg (30 % tote Zellen), wurde auf eine weitere Konzentrationserhöhung verzichtet.

5.5 Inosin Pranobex

Für Inosin Pranobex wurden in der Literatur bisher hauptsächlich einige Wirkungen auf die T-Zell-Subpopulation beschrieben (De Simone et al, 1982; Hadden und Giner-Sorolla, 1980; Ginsberg, 1988). Ein Teil dieser Veränderungen scheint jedoch durch Makrophagen vermittelt zu werden, so die gesteigerte Aktivität der T_H -Zellen (Tsang P. et al, 1987) durch Erhöhung des Anteils der I_A -Makrophagen als Vertreter der antigen-präsentierenden Zellen. Andere Autoren konnten eine Steigerung der chemotaktischen Aktivität (Tsang K. et al, 1983) und eine vermehrte Phagozytosefähigkeit der Makrophagen nachweisen (Hadden und Giner-Sorolla, 1980; Wybran et al, 1978).

Nach Gabe von Inosin Pranobex wird außerdem die Interferonproduktion gesteigert und vermehrt Interleukin-1 aus den Makrophagen freigesetzt (Bunta und Peris, 1981; Dräger et al, 1988). In anderen Arbeiten, so Vecchi et al (1978) und Binderup (1985), ist ein Inosin Pranobex -Effekt auf Makrophagen jedoch nicht nachzuweisen.

Die vorliegende Arbeit läßt hingegen auf einen direkten Einfluß der Substanz und ihrer Einzelkomponenten auf den BM8-Subtyp und den Esterase-produzierenden Makrophagen schließen, während der I_A -Typus von Inosin Pranobex nicht beeinflußt wird.

5.5.1 Wirkung auf den BM8-Makrophagen

In vitro ist 72 Stunden nach Gabe von Inosin Pranobex ein signifikanter Anstieg der Zahl der BM8-Makrophagen zu beobachten. Dies steht im Gegensatz zur in-vivo-Untersuchung von Zwadlo-Klarwaser et al (1992 a). Hierbei wurden Mäusen täglich immunmodulierende Substanzen wie InPx intraperitoneal verabreicht und Peritonealmakrophagen nach 1, 3 und 5 Tagen auf BM8, I_A und unspezifische Esterase untersucht.

Peritonealmakrophagen sind allerdings nur bedingt mit den gezüchteten Knochenmarkmakrophagen vergleichbar, da es sich um bereits ausdifferenzierte, residente Makrophagen handelt im Gegensatz zu den Knochenmarksmakrophagen, die während ihrer Reifungsphase verschiedene Differenzierungsstadien mit unterschiedlichen Phänotypen durchlaufen (Neumann und Sorg 1980). Für Inosin Pranobex zeigen sich dabei an allen drei Tagen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Salzkomponente DipPacBa übt hingegen in vitro wie in vivo einen starken Einfluß auf den BM8-Subtypen aus. Die stärkere Wirkung des Salzes steht auch im Gleichklang zur Untersuchung von Dräger et al (1988), in der, ebenfalls in vivo, die Wirkung von Inosin Pranobex auf die humorale und zelluläre Immunantwort untersucht wurde. Dabei zeigte sich eine Stimulierung von B- und T-Helfer-Zellen sowie eine vermehrte Il-1-Freisetzung aus Makrophagen, wobei die DipPacBa-Wirkung auf die B-Zellen stärker ausgeprägt war als nach Gabe von Inosin Pranobex und darüber hinaus früher auftrat (Tag 4 gegenüber Tag 5 nach Inosin Pranobex).

Dip und PacBa beeinflussen den BM8-Makrophagen in vivo anders als in vitro. Dip ist in vitro unwirksam zur Stimulation des BM8-Makrophagen, PacBa bewirkt eine deutliche Steigerung dieses Subtyps. In vivo zeigen sich dagegen für PacBa eher inhibitorische Einflüsse auf den Peritonealmakrophagen, während Dip zu einer deutlichen BM8-Stimulation führt.

Inosin wird von einigen Autoren als die einzig entscheidende Komponente im Wirkmechanismus des Inosin Pranobex angesehen (Hadden und Giner-Sorolla, 1980; Drews, 1985). Zumindest beim Lymphozyten, der nur über geringe Purinreserven verfügt, können Purine wie Inosin von außen in die Zelle transportiert werden und stehen dann über den "salvage pathway" zur Nucleosidbiosynthese zur Verfügung und führen damit letztendlich über eine gesteigerte Transkription und Translation zur vermehrten Proteinbiosynthese von Oberflächenmarkern der Zelle (Hadden und Giner-Sorolla, 1980). DipPacBa würde dieser Hypothese nach lediglich als Transportvehikel in die Zelle dienen (Drews, 1986).

Im Knochenmark-Kultursystem bleibt Inosin als Einzelsubstanz unwirksam. Nach 72 Stunden finden sich zwar geringfügig mehr BM8-Makrophagen als in der Kontrollgruppe; der Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant. Auch wenn es mit dem sog. "Transportvehikel" DipPacBa zu Inosin Pranobex vereinigt ist, ist der Anteil der BM8-positiven Zellen immer noch kleiner als nach DipPacBa-Gabe in gleicher Konzentration allein.

Zur Exprimierung des BM8-Antigens scheint also der Purinanteil Inosin nicht notwendig zu sein, er schwächt möglicherweise sogar die DipPacBa-Wirkung ab, da DipPacBa allein sogar als 10^{-7} M Konzentration den BM8-Makrophagen stimulieren kann.

Die Hypothese, daß Inosin Pranobex über eine vermehrte Bereitstellung von mRNA durch Vergrößerung des Nucleinsäurepools immunmodulierend wirkt, kann damit zumindest für den BM8-Makrophagen nicht untermauert werden.

5.5.2 Wirkungen auf den Esterase produzierenden Makrophagen

Hinsichtlich der Esteraseproduktion erweist sich die Stimulierung mit der Gesamtsubstanz Inosin Pranobex als stärker wirksam als die Stimulierung mit den Einzelsubstanzen DipPacBa, Dip, PacBa oder Inosin. In vivo ist Inosin Pranobex verglichen mit DipPacBa und Dip schwächer wirksam, aber stärker als PacBa (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a). Dip und PacBa üben auf den Knochenmarkmakrophagen bezüglich der Esteraseproduktion einen starken Einfluß aus. Die prozentuale Stimulation ist größer als nach Gabe von DipPacBa gleicher Konzentration.

Die unspezifische Esterase gilt als Marker des reifen Makrophagen (Neumann und Sorg, 1980). Durch Inosin Pranobex wird also die Ausreifung der Zellen beschleunigt. Hierbei scheint der Purinanteil Inosin hilfreich zu sein. In Kombination von Inosin mit DipPacBa wird der Esterase-Subtyp wesentlich stärker beeinflusst als bei Zugabe von Inosin, Dip, PacBa oder DipPacBa allein. Dieses entspräche der Interpretation des Inosins als Wirksubstanz und DipPacBa als Transportsubstanz in die Zelle, wie von Drews (1986) und Hadden und Giner-Sorolla (1980) beschrieben. Die Enzymsynthese würde demnach durch Inosin verstärkt angeregt. Wenn die Vermehrung des Anteils der Esterase-Makrophagen auf eine gesteigerte Proteinbiosynthese aufgrund des mittels Inosin vermehrten Purin-Pools zurückzuführen ist, müßte über den selben Mechanismus auch die Ausprägung des BM8-Antigens vermehrt werden. Inosin allein, das auf den BM8-Makrophagen unwirksam ist, kann den Esterase-Typus deutlich stimulieren, obwohl es nach der Hypothese von Drews (1986) auf DipPacBa als Transportsubstanz angewiesen ist.

DipPacBa in der höheren Konzentration übt für sich allein schon einen starken Reiz auf den Esterase-produzierenden Makrophagen aus. Außerdem ist es die einzige Substanz, die auch nach 4 Tagen Zellkultur einen geringen, wenn auch, durch die geringe Versuchszahl bedingt, einen statistisch nicht signifikanten Effekt auf den Makrophagen ausübt. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen also eher gegen die Hypothese von Drews (1986) und Hadden und Giner-Sorolla (1980). Möglicherweise kann Inosin jedoch als Stoffwechselprodukt oder Enzymsubstrat dazu beitragen, die Ausreifung zum Esterasemakrophagen zu beschleunigen.

5.6 OK432

Im Gegensatz zum InPx werden für einen großen Teil der immunmodulierenden Wirkungen der Streptokokkenpräparation OK432 Makrophagen verantwortlich gemacht. So steigt zum Beispiel nach intraperitonealer Gabe die Tumorzidie der Makrophagen; die Zellen exprimieren vermehrt das I_A-Antigen auf ihrer Oberfläche, der Anteil antigen-präsentierender Zellen steigt von 30 % auf über 80 % an (Colotta et al, 1985, Ujii, 1987). Die intraperitoneale Gabe induziert dabei die Entstehung von zwei Makrophagensubtypen, einen I_A-negativen, zytotoxischen Makrophagen und einen I_A-positiven, Interleukin-1 sezernierenden Makrophagen (Kawaguchi et al, 1983). Lebermakrophagen exprimieren nach intravenöser OK432-Applikation ebenfalls vermehrt das I_A-Antigen und schütten vermehrt den Tumornekrosefaktor -Alpha (TNF- α) sowie das zytotoxische Superoxidation O₂-aus (Sasaoki et al, 1992).

OK432 bewirkt eine generelle Makrophagenaktivierung, zu erkennen an der gesteigerten Ausschüttung von Interleukin-1 (IL-1), IL-8 und TNF- α (Komada et al, 1992; Nakashima et al, 1992; Uchida und Klein, 1985). Yang et al (1992) konnten zeigen, daß die tumorizide Wirkung der OK432 durch Freisetzung dieser Monokine aus den Makrophagen und der daraus folgenden Granulozytenaktivierung entsteht.

Nach intraperitonealer Gabe werden auch mikroskopisch erkennbare Veränderungen sichtbar. Die sogenannten Milchflecken des Omentum majus wandeln sich durch die gesteigerte Makrophagenmigration in die Peritonealhöhle fibrotisch um (Shimotsuna et al, 1992).

Die meisten dieser Ergebnisse wurden mittels in-vivo-Studien an Mäuseperitonealmakrophagen gewonnen.

Bei dieser Untersuchung ist durch die Wahl des in vitro-Systems mit Knochenmarkstammzellen der Maus eine Interaktion des OK432 mit anderen Immunzellen

ausgeschlossen, so daß die direkte Wirkung der Substanz auf die einzelnen Subpopulationen I_A-, BM8- und Esterase produzierende Makrophagen beurteilt werden kann. Es zeigt sich dabei, daß zwar eine starke Wirkung auf den inflammatorischen Makrophagen BM8 ausgeübt und auch die Enzymsynthese der Zelle angeregt wird, der Anteil an I_A-Makrophagen bleibt nach OK432-Gabe jedoch unverändert niedrig.

5.6.1 Wirkung auf den BM8-Makrophagen

Diese Untersuchung zeigte, daß eine Inkubation mit OK432 *in vitro* zu einer Vermehrung der BM8-Makrophagen führt. Im frühen Kulturstadium nach 24 Stunden mit mehr als 85 % BM8-negativen Makrophagen ist die Streptokokkenpräparation noch ohne Einfluß. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wirkt OK432 maximal, und auch nach 72 Stunden ist die Wirkung noch ausgeprägt.

In vivo steigt nach intraperitonealer Gabe der Anteil der BM8-Makrophagen signifikant an, auch die Makrophagen der Milz reagieren deutlich auf OK432 mit einer Steigerung der Rate des inflammatorischen Makrophagen BM8 (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a).

Bei *in-vivo*-Untersuchungen trifft die Substanz im Gegensatz zum *in vitro*-System auf bereits ausgereifte Zellen, die aus dem Knochenmark in ihre Endorgane ausgewandert sind. Durch die intraperitoneale Gabe löst die bakterielle Substanz eine Entzündungsreaktion aus, die zu einer Migration von Makrophagen in die Peritonealhöhle führt (Umesaki et al, 1992) und den BM8-Makrophagensubtyp stimuliert. Durch die *in-vitro*-Effekte des OK432 auf den isolierten Makrophagen ist eine direkte Wirkung der Substanz auf den Makrophagen nachweisbar, da Zell-Zell-Kontakte mit anderen Immunzellen durch das System ausgeschlossen sind.

5.6.2 Wirkung auf den Esterase-Makrophagen

Durch OK432 wird *in vitro* auch die Esterase-Produktion der Makrophagen angeregt, was wieder auf eine raschere Ausreifung der Zelle hindeutet (Neumann und Sorg, 1980). Allerdings wirkt die Substanz erst nach 3 Tagen maximal. Ob die Streptokokkenpräparation eine etwas ältere Zielzelle benötigt oder einfach eine längere Einwirkzeit auf die Kulturzellen braucht, läßt sich durch die vorliegenden Ergebnisse nicht entscheiden.

Interessanterweise zeigt sich die stimulierende Wirkung nur im *in-vitro*-Modell der Knochenmarkmakrophagen. Bei der *in-vivo*-Untersuchung der Peritonealmakro-

phagen (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a) bleibt die Substanz nach intraperitonealer Gabe wirkungslos. Obwohl offenbar eine direkte Beeinflussung des Makrophagen mit OK432 möglich ist, wie diese Untersuchung zeigt, scheinen im Organismus doch andere Faktoren die Wirkung abzuschwächen oder zu modifizieren.

Auffallend bei dieser Substanz biologischen Ursprungs war eine im Vergleich zu allen anderen Substanzen große statistische Streubreite der Ergebnisse, d.h., an manchen Tagen wurden überdurchschnittlich viele Makrophagen zur Esterase- oder auch BM8-Produktion angeregt, während an anderen Tagen kaum eine Wirkung nachweisbar war.

Eine nicht exakt reproduzierbare Wirkung ist auch von anderen ähnlich dem OK432 hergestellten biologischen Präparationen wie BCG oder *Corynebacterium parvum* bekannt (Renoux, 1988).

Beim OK432 entstehen, bedingt durch den Herstellungsprozeß des Lyophilisierens getrockneter Streptokokken, keine chemisch definierbaren Stoffe, sondern verschiedenartige Bruchstücke der Bakterien mit einer möglicherweise unterschiedlichen immunogenen Potenz, was die deutliche Schwankungsbreite der Ergebnisse erklären könnte.

5.7 Dexamethason

Dexamethason besitzt u. a. starke immunsuppressive Wirkungen, die in der Klinik häufig in ganz unterschiedlichen Bereichen Anwendung finden, so z. B. in der Onkologie oder der Therapie von Autoimmunerkrankungen.

Ein Teil der immunsuppressiven Wirkungen wird dabei durch eine Änderung im Funktionsstatus des mononukleären phagozytären Systems erreicht. So wird z. B. die Interleukin-I-Ausschüttung durch Glucocorticoide in vivo wie in vitro gehemmt (Hag, 1988; Arend und Massoni, 1986; Cunha und Ferreira, 1986; Cunha et al, 1985; Snyder und Unanue, 1982), sowohl bei humanen wie bei tierischen (Maus, Ratte, Schwein) Makrophagen.

Glucocorticoide führen dabei rezeptorvermittelt nach Transport in den Zellkern zu einer Änderung der Proteinbiosynthese mit einer verringerten Transcription der mRNA für Interleukin-1 (Lew et al, 1988).

Andere Autoren verneinen hingegen eine Sekretionshemmung von Il-1, schreiben dem Hydrocortison jedoch eine Il-1-antagonistische Wirkung zu (Rhodes et al, 1986).

Die antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkungen beruhen im wesentlichen auf zwei unterschiedlichen Mechanismen.

Zum einen kann durch eine Hemmung des Arachidonsäurestoffwechsels mittels einer Inhibition der Genexpression der Phosphorylase A₂ die Produktion von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen gedrosselt werden (Flower, 1985). Zusätzlich können Glucocorticoide eine von aktivierten inflammatorischen Makrophagen induzierte Form der Cyclooxygenase hemmen und so eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern bzw. regulieren (Masferrer et al, 1992).

Zum anderen wird die Transkription bestimmter Gen-Sequenzen moduliert, so daß je nach Differenzierungs- und Aktivierungsgrad die Genexpression z.B. für Cytokin- oder Entzündungsmediatorenproduktion gefördert oder reprimiert wird (Russo-Marie, 1992; Barnes und Adcock, 1993)

Dexamethason kann so z. B. die Produktion von Komplementfaktoren wie C3, Faktor B und Faktor H, die zur alternativen Komplementaktivierung notwendig sind, verhindern und damit die Entzündungsreaktion mindern (Lemerrier et al, 1992). Das second messenger Protein der Glucocorticoide, Lipcortin-1 (Annexin 1), scheint dabei als Regulatorprotein das Ausmaß einer Entzündung zu steuern, z.B. über eine Veränderung der Mediatorenausschüttung aus den Makrophagen, gleichzeitig aber auch durch Verminderung der Phagozytosefähigkeit die immunologisch wichtigen Makrophagenfunktionen zu beeinflussen (Goulding und Guyre, 1993).

Mit der vorliegenden Arbeit kann mit Hilfe des Knochenmark-Kultursystems gezeigt werden, daß Dexamethason auf der Ebene der Stammzellen in die Differenzierung zu bestimmten Subpopulationen eingreift und so z. B. durch Verminderung des BM8-Makrophagen antiinflammatorisch wirkt, oder durch Verringerung des Anteils von I_A-positiven Makrophagen die Antigenpräsentation an die T-Helfer-Zelle unterdrückt, also eine Immunsuppression bewirkt.

Zusätzlich kann beim Menschen sowie bei bestimmten Primaten durch Glucocorticoide sogar ein spezieller antiinflammatorischer Makrophagensubtyp RM 3/1 induziert werden (Zwadlo-Klarwasser et al, 1990 und 1992 b).

5.7.1 Dexamethasonwirkung auf den BM8-Makrophagen

Dexamethasonzusatz zur Knochenmark-Kultur führt, wie die vorliegende Arbeit zeigt, zu einer drastischen Verminderung des Anteils an BM8-Makrophagen. Gleichzeitig wird nach van der Meer (1986) die Gesamtmenge an Makrophagen

vermindert (s. 5.2), so daß damit der Anteil der BM8-Makrophagen noch weiter zurückgeht.

Der BM8-Makrophage gilt als typischer Vertreter eines inflammatorischen Makrophagentyps (Malorny et al, 1986). Verringerung dieser Zellpopulation durch das Glucocorticoid Dexamethason bewirkt also eine Entzündungshemmung.

Funktionell gesehen gehören die BM8-Makrophagen zu den Phagozytosezellen (Malorny et al, 1986, 1988). Eine Abnahme dieser Subpopulation in der Zellkultur setzt demnach die Phagozytosekapazität herab, ein Effekt, der auch von Grasso et al (1982) für Peritonealmakrophagen nach Dexamethasongabe im in-vitro-Versuch beschrieben wurde. Glucocorticoidbehandelte Makrophagen sezernieren zudem Faktoren, die die Randmigration neutrophiler Granulozyten fördern (Frank und Roth, 1986), so daß es zur weiteren Abwanderung unspezifischer Phagozytosezellen aus dem Entzündungsgebiet kommt.

Der BM8-Makrophage ist außerdem in der Lage, den Migration-inhibierenden Faktor (MIF) zu sezernieren (Malorny et al, 1988), ein Cytokin, das die Makrophagen im Entzündungsgebiet festhält. Eine Verminderung dieser Zellpopulation durch Dexamethason führt so im Gegenzug zu einer vermehrten Abdriftung der Makrophagen.

Die Dexamethasonwirkung auf den BM8-Makrophagen ist sehr stark dosisabhängig. Bereits in einer Dosierung von 10^{-9} M werden signifikant weniger BM8-Makrophagen gebildet; dabei hält die supprimierende Wirkung im Gegensatz zu allen anderen Immunmodulatoren so lange an, wie sich das Dexamethason in der Zellkultur befindet. Die Wirkung ist schon nach 24 Stunden Zellkultur nachweisbar und ist nach 72 Stunden maximal ausgeprägt.

Für humane Blutmonozyten können bei in-vitro-Versuchen supprimierende Effekte auf die antimikrobielle und antifungale Aktivität der Makrophagen ebenfalls nach 24 Stunden, besser 36 Stunden nach Inkubation mit Dexamethason in Konzentrationen von 10^{-7} und 10^{-8} M beobachtet werden; Dosierungen also, die im normalen therapeutischen Bereich liegen (Schaffner, 1985).

5.7.2 Dexamethasonwirkung auf den I_A-Makrophagen

Spontan finden sich im Knochenmark-Kultursystem nur wenige Makrophagen, die das I_A-Antigen tragen (siehe auch 5.1.1 - Der I_A-Makrophage im Knochenmark-Kultursystem). Dennoch ist, wie diese Arbeit zeigt, nach viertägiger Zellkultur unter Dexamethasonzusatz eine weitere Verminderung dieses Anteils von im Mittel 3,6 % auf 0,6 % der Makrophagen möglich. Der I_A-Makrophage mit seiner herausragenden Fähigkeit, Antigen anderen Immunzellen zu präsentieren und damit

die Immunreaktion zu starten, wird durch die Glucocorticoidgabe also nahezu vollständig aus dem System eliminiert.

Hinsichtlich der Wirkung von Glucocorticoiden auf diesen Makrophagentyp kommt die wissenschaftliche Literatur zu recht unterschiedlichen Ergebnissen. So führt *in vitro* die Exposition von humanen Blutmonozyten mit *Candida albicans* als Antigen unter Glucocorticoidgabe zu einer Vermehrung des MHC II - Antigens der Monozyten (Rhodes et al, 1986).

Mäusemakrophagen reagieren hingegen auf Hydrocortison- oder Dexamethasongabe mit einer drastischen Verminderung des I_A-Antigens (Vespa et al, 1987; Snyder und Unanue, 1982). Glucocorticoide unterdrücken dabei dosisabhängig ein nur transitorisch auf Antigenreiz gebildetes I_A-Antigen. Auf Makrophagen, die kontinuierlich I_A exprimieren, sind sie jedoch wirkungslos (Vespa et al, 1987). Auch die durch Interferon-Gamma gesteigerte I_A-Ausprägung wird durch Dexamethason dosisabhängig stark supprimiert (Salkowski und Vogel, 1992).

Das von murinen Peritonealmakrophagen nach einer Listerieninfektion gebildete I_A-Antigen wird schon durch geringe Dosen Hydrocortison oder Prednisolon stark reduziert und gleichzeitig die Interleukin-1-Sezernierung stark vermindert. Die Fähigkeit des Makrophagen, Antigen zu präsentieren, wird durch die Glucocorticoidgabe drastisch eingeschränkt. Dieser starke immunsuppressive Effekt tritt schon bei einer Dosis von 10^{-8} M auf (*in vivo* und *in vitro*), d.h., im therapeutischen Dosisbereich bei klinischer Anwendung (Snyder und Unanue, 1982).

Auch in der vorliegenden Arbeit liegt die zur Reduktion des I_A-Subtyps im Knochenmark-Kultursystem verwendete Dosierung mit 10^{-8} M Dexamethason im therapeutischen Bereich der Substanz.

Schon geringe Mengen Dexamethason sind zumindest im Tierexperiment in der Lage, die Immunantwort des Körpers empfindlich zu stören, sowohl hinsichtlich der Antigenpräsentation (I_A) als auch in der Effektorphase der Immunantwort durch Verringerung der inflammatorischen Makrophagen (BM8).

Da Glucocorticoide im klinischen Alltag sehr verbreitet sind und häufig unter anderem als antiödematöse, abschwellende Substanzen eingesetzt werden, sollte die bereits in diesem Dosisbereich von 10^{-8} - 10^{-7} M auftretende, in diesen Fällen unerwünschte Immunsuppression bedacht werden, gerade bei hospitalisierten, z. B. frisch operierten und damit abwehrgeschwächten Patienten mit ihrer erhöhten Anfälligkeit für Hospitalinfektionen.

Vom Wirkmechanismus her wird die Produktion des I_A-Antigens offenbar mittels Blockade einer bestimmten Gen-Sequenz der DNA durch den Glucocorticoid-Re-

zeptor-Komplex verhindert, so daß die Transcription der I_A -Information unmöglich wird (Celada et al, 1993).

5.7.3 Dexamethasonwirkung auf den Esterase-produzierenden Makrophagen

So wie Dexamethasonzusatz zur Zellkultur die Expression des BM8-Antigens wirkungsvoll unterdrückt, wird durch das Glucocorticoid, wie die vorliegende Arbeit deutlich macht, auch die Produktion der unspezifischen Esterase stark reduziert. Nach fünftägiger Zellkultur produzieren mehr als 85 % der unbehandelten Makrophagen einer Knochenmark-Kultur unspezifische Esterase, aber nur ca. 50 %, wenn der Kultur Dexamethason zugesetzt wurde; dabei weisen die ungefärbten Makrophagen alle morphologischen Charakteristika eines ausgereiften Makrophagen auf. Die Esteraseproduktion des Makrophagen ist eine Syntheseleistung der Zelle, die erst in einem späteren Reifungsstadium der Zelle auftritt. Es ist ein Enzym des älteren Makrophagen (Neumann und Sorg, 1980). Zur Blockade der Enzymproduktion ist dabei im Vergleich zum BM8-Makrophagen eine höhere Dosisierung von 10^{-7} M Dexamethason notwendig. Dexamethason verzögert also die Ausreifung zum Makrophagen kontinuierlich.

Da offenbar alle durch diese Untersuchung getesteten Makrophagen-Subpopulationen wie I_A , BM8 und die Esteraseproduktion durch Dexamethason supprimiert werden, stellt sich die Frage, welche Funktion und welche Oberflächentypisierung dieser ungefärbte Makrophagentyp aufweist. Möglicherweise kann Dexamethasonzusatz zur Kultur, wie es bereits von humanen Blutmonozyten unter Glucocorticoidgabe bekannt ist (Zwadlo-Klarwasser et al, 1990; 1992 b) auch bei murinen Makrophagen einen dem RM 3/1- Typus entsprechenden suppressorischen Makrophagentyp induzieren.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarkmakrophagen der Maus, die anhand ihrer Oberflächenantigenstrukturen wie I_A und BM8 mittels monoklonaler Antikörper und der Produktion unspezifischer Esterase differenziert wurden, in vitro über 1 - 5 Tage mit Immunmodulatoren: Inosin Pranobex (InPx), seine Einzelkomponenten 1,1-Dimethylaminopropanol-4-Acetamidobenzoesäure (DipPacBa), 1,1 Dimethylaminopropanol (Dip), 4-Acetamidobenzoesäure (PacBa), Inosin, Picibanil (OK432) und Dexamethason beeinflusst.

Keine Substanz hatte dabei einen proliferativen oder proliferationshemmenden Effekt auf das Knochenmark-Kultursystem.

Der Anteil spontan im Knochenmark entstehender I_A-Makrophagen war sehr gering (3 %) und konnte durch keine Substanz gesteigert werden. Dexamethason führte dagegen zu einer fast vollständigen Eliminierung dieser Makrophagenpopulation.

Der BM8- und Esterase-Makrophage wurde von allen Substanzen dosisabhängig beeinflusst; dabei nahm mit steigender Dosis aber auch die toxische Wirkung auf die Zellen zu.

OK432 führte zu einer deutlichen Stimulation beider Makrophagentypen.

Auch InPx hatte einen stimulierenden Effekt auf den BM8- und Esterase-Typus, der vor allem auf die Salzkomponente DipPacBa zurückzuführen war.

DipPacBa stimulierte den BM8-Makrophagen stärker als InPx; die Hauptwirkung ging dabei von PacBa aus, das allein genauso stark wie in seiner zusammengesetzten Form war. Inosin und Dip wirkten auf den BM8-Makrophagen nicht.

Bei der Stimulation des Esterase-Makrophagen war dagegen eine synergistische Wirkung von Inosin und DipPacBa zu beobachten. Die Gesamtsubstanz InPx war stärker als die Einzelkomponenten, Inosin hatte nur eine schwache Wirkung auf den Esterase-Makrophagen, Dip und PacBa waren einzeln genauso stark wie kombiniert.

Dexamethason reduzierte den Anteil BM8- und Esterase-Makrophagen am Gesamtmakrophagenaufkommen deutlich.

Im Unterschied zu den stimulierend wirkenden Pharmaka hielt der supprimierende Effekt des Dexamethason über die gesamte Kulturdauer, d.h. mindestens fünf Tage, an. Ob sich durch Dexamethason auch die Gesamtmakrophagenmenge verringerte, wurde durch diese Arbeit nicht geklärt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die aus in-vivo-Studien bekannten immunmodulierenden Effekte (Zwadlo-Klarwasser et al, 1992 a) tatsächlich auf eine direkte Wirkung der Substanzen auf den Makrophagen zurückzuführen sind. Durch Immunmodulatoren lassen sich also Makrophagensubpopulationen gezielt beeinflussen.

7. Tabellenanhang

Tabelle 3: Einfluß der Immunmodulatoren auf die Zellvitalität pro Kulturansatz nach 48 Stunden Inkubation, unmittelbar nach der Zellernte.

Angaben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts SEM aus n Versuchen. Mit * gekennzeichnete Daten geben statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle an für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

| Pharmakon [M] | n | tote Zellen % | SEM |
|------------------------|----|---------------|-----|
| Kontrolle | 19 | 9,5 | 0,8 |
| InPx 10^{-5} | 4 | *19,2 | 4,7 |
| InPx 10^{-6} | 6 | 15,5 | 3,6 |
| InPx 10^{-7} | 4 | 14,5 | 4,8 |
| InPx 10^{-8} | 4 | 14,7 | 3,1 |
| InPx 10^{-9} | 2 | 9,3 | 0,5 |
| Inosin 10^{-5} | 4 | 14,4 | 2,7 |
| Inosin 10^{-6} | 6 | 12,5 | 0,6 |
| Inosin 10^{-7} | 4 | 10,8 | 2,0 |
| Inosin 10^{-8} | 4 | 9,4 | 0,5 |
| DipPacBa 10^{-5} | 6 | *20,0 | 4,0 |
| DipPacBa 10^{-6} | 6 | *14,1 | 2,0 |
| DipPacBa 10^{-7} | 4 | 9,2 | 0,8 |
| DipPacBa 10^{-8} | 4 | 13,4 | 3,3 |
| DipPacBa 10^{-9} | 2 | 7,8 | 1,6 |
| Dip 10^{-6} | 6 | 8,2 | 0,8 |
| PacBa 10^{-6} | 6 | 6,5 | 0,8 |
| OK432 $10^{-0,6}$ | 4 | *21,9 | 1,9 |
| OK432 $10^{-1,6}$ | 6 | 13,8 | 2,2 |
| OK432 $10^{-2,6}$ | 4 | 13,5 | 2,9 |
| OK432 $10^{-3,6}$ | 2 | 8,0 | 1,8 |
| Dexamethason 10^{-7} | 7 | *13,0 | 1,7 |
| Dexamethason 10^{-8} | 5 | 10,8 | 1,7 |

Tabelle 4: Vergleich der Zellvitalität pro Kulturansatz nach 72 Stunden Inkubation in Abhängigkeit des eingesetzten Immunmodulators.

Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts SEM aus n = 6 (n = 7 für Kontrolle) Versuchen. Mit * gekennzeichnete Daten geben statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle an für ein Signifikanzniveau von p < 0,05.

| Pharmakon [M] | tote Zellen [%] | SEM |
|-------------------------------|-----------------|-----|
| Kontrolle | 2,9 | 0,6 |
| InPx 10 ⁻⁶ | *5,8 | 0,9 |
| Inosin 10 ⁻⁶ | 5,4 | 1,1 |
| DipPacBa 10 ⁻⁵ | *5,4 | 0,7 |
| DipPacBa 10 ⁻⁶ | 4,8 | 0,6 |
| Dip 10 ⁻⁶ | 4,8 | 1,2 |
| PacBa 10 ⁻⁶ | 3,6 | 0,9 |
| OK432 10 ^{-1.6} | 4,7 | 0,7 |
| Dexamethason 10 ⁻⁷ | 4,7 | 1,0 |

Tabelle 6: Vergleich der BM8-Ausprägung, angegeben als % positiver Makrophagen nach 48 Stunden Zellkultur mit InPx und seinen Komponenten in Abhängigkeit der Pharmakon-Konzentration.

Angegeben sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts aus n Versuchen; * zeigen signifikante Änderungen zur Kontrolle an für p < 0,05 als Signifikanzniveau

| Konzentration [M] | InPx | | | Inosin | | | DipPacBa | | |
|-------------------|------|-----|----|--------|-----|----|----------|-----|----|
| | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n |
| 0 | 18,7 | 0,5 | 22 | 18,7 | 0,5 | 22 | 18,7 | 0,5 | 22 |
| 10 ⁻⁹ | 17,1 | 1,1 | 2 | - | - | - | 18,6 | 3,0 | 2 |
| 10 ⁻⁸ | 19,1 | 1,9 | 4 | 16,7 | 0,2 | 4 | 19,5 | 1,2 | 4 |
| 10 ⁻⁷ | 18,9 | 1,2 | 4 | 17,9 | 0,7 | 4 | *21,5 | 1,1 | 4 |
| 10 ⁻⁶ | 19,8 | 0,9 | 6 | 18,4 | 1,0 | 6 | *22,1 | 0,7 | 6 |
| 10 ⁻⁵ | 19,1 | 1,2 | 4 | 19,3 | 2,3 | 4 | *27,0 | 1,5 | 6 |

Tabelle 7: Vergleich der BM8-Ausprägung, angegeben als % positiver Makrophagen nach 48 Stunden Inkubation mit OK432 in Abhängigkeit der Pharmakon-Konzentration.

Angegeben sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwerts aus n Versuchen; * zeigen signifikante Änderungen zur Kontrolle an für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau

| Konzentration [M] | OK432 | | |
|----------------------|-------|-----|----|
| | % | SEM | n |
| 0 | 18,7 | 0,5 | 22 |
| $10^{-3.6}$ | 19,4 | 1,3 | 2 |
| $10^{-2.6}$ | 20,2 | 3,0 | 4 |
| $10^{-1.6}$ | *23,6 | 2,3 | 6 |
| $10^{-0.6}$ | 23,2 | 2,3 | 4 |

Tabelle 8: Vergleich der BM8-Exprimierung unter Dexamethasongabe in Abhängigkeit von der Glucocorticoidkonzentration, gemessen nach 48 Stunden und 72 Stunden Zellkultur.

Angegeben als % positiver Makrophagen sind jeweils der Mittelwert und sein Standardfehler des Mittelwerts aus n Versuchen; * kennzeichnen signifikante Änderungen zur Kontrolle auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$

| Konzentration [M] | Tag 2 | | | Tag 3 | | |
|----------------------|--------------|-----|----|--------------|-----|----|
| | Dexamethason | | | Dexamethason | | |
| | % | SEM | n | % | SEM | n |
| 0 | 18,7 | 0,5 | 22 | 25,7 | 0,9 | 11 |
| 10^{-10} | 16,1 | 1,5 | 4 | 26,2 | 1,3 | 4 |
| 10^{-9} | *16,1 | 0,6 | 4 | 22,5 | 1,2 | 4 |
| 10^{-8} | *14,9 | 0,7 | 8 | *15,4 | 1,5 | 4 |
| 10^{-7} | *10,6 | 0,8 | 10 | *12,7 | 0,7 | 10 |
| 10^{-6} | * 9,2 | 1,9 | 4 | *11,4 | 0,4 | 4 |

Tabelle 9: Vergleich der Esterase-Aktivität (in % positiver Makrophagen) nach 48 Stunden Zellkultur mit InPx und seinen Komponenten in Abhängigkeit der Pharmakon-Konzentration.

Angegeben sind jeweils der Mittelwert aus n Versuchen und der Standardfehler des Mittelwerts SEM; * zeigen signifikante Änderungen zur Kontrolle an für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau

| Konzentration [M] | InPx | | | Inosin | | | DipPacBa | | |
|----------------------|-------|-----|----|--------|-----|----|----------|-----|----|
| | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n |
| 0 | 15,7 | 0,6 | 18 | 15,7 | 0,6 | 18 | 15,7 | 0,6 | 18 |
| 10^{-9} | 19,8 | 1,3 | 2 | - | - | - | 16,0 | 1,3 | 2 |
| 10^{-8} | 16,6 | 1,6 | 4 | 15,8 | 0,6 | 4 | 15,0 | 2,2 | 4 |
| 10^{-7} | 15,1 | 1,7 | 4 | 16,2 | 0,7 | 4 | 15,5 | 1,9 | 4 |
| 10^{-6} | *20,3 | 1,8 | 6 | 18,3 | 0,9 | 6 | *18,6 | 1,0 | 6 |
| 10^{-5} | 15,9 | 1,5 | 4 | 16,3 | 0,7 | 4 | *20,2 | 1,4 | 6 |

Tabelle 10: Vergleich der Esterase-Aktivität, angegeben als % positiver Makrophagen nach 48 Stunden Inkubation mit OK432 in steigender Konzentration.

Angegeben sind Mittelwert und SEM aus n Versuchen

| Konzentration [M] | OK432 | | |
|----------------------|-------|-----|----|
| | % | SEM | n |
| 0 | 15,7 | 0,6 | 18 |
| $10^{-3.6}$ | 18,7 | 1,5 | 2 |
| $10^{-2.6}$ | 17,9 | 2,8 | 4 |
| $10^{-1.6}$ | 19,5 | 1,8 | 6 |
| $10^{-0.6}$ | 18,5 | 1,4 | 4 |

Tabelle 11: Vergleich der Esterase-Aktivität nach 48 Stunden Inkubation mit Dexamethason in zwei Dosierungen, angegeben in % positiver Makrophagen als Mittelwert und SEM aus n Versuchen

* stellen signifikante Unterschiede zur Kontrolle dar, für $p < 0,05$ als Signifikanzniveau

| Konzentration [M] | Dexamethason | | |
|----------------------|--------------|-----|----|
| | % | SEM | n |
| 0 | 15,7 | 0,6 | 18 |
| 10^{-8} | 13,8 | 1,2 | 4 |
| 10^{-7} | *11,0 | 0,9 | 6 |

Tabelle 12: Wachstumskinetik der BM8-Makrophagen nach Stimulation von Tag 1 - 5 mit Immunmodulatoren

Angabe ist jeweils der Mittelwert \bar{x} aus n Versuchen sowie der Standardfehler des Mittelwertes SEM in % positiver Zellen. Mit * gekennzeichnete Daten geben statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle an für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$

| Pharmakon [M] | Tag 1 | | | Tag 2 | | | Tag 3 | | | Tag 4 | | | Tag 5 | | |
|--------------------|-------|-----|---|-------|-----|----|-------|-----|----|-------|-----|---|-------|-----|---|
| | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n |
| Kontrolle | 13,0 | 1,8 | 2 | 18,7 | 0,5 | 22 | 25,7 | 0,9 | 11 | 67,3 | 2,5 | 4 | 75 | 1,9 | 5 |
| InPx 10^{-6} | 13,6 | 0,5 | 2 | 19,8 | 0,9 | 6 | *29,6 | 0,8 | 6 | 66,7 | 1,7 | 4 | 74,4 | 1,0 | 3 |
| Inosin 10^{-6} | 12,7 | 0,4 | 2 | 18,4 | 1,0 | 6 | 27,9 | 1,2 | 6 | 67,3 | 1,8 | 4 | 72,1 | 2,7 | 2 |
| DipPacBa 10^{-5} | 15,9 | 1,6 | 2 | *27,0 | 1,5 | 6 | *34,1 | 1,2 | 6 | 68,3 | 2,6 | 4 | 77,2 | 0,9 | 2 |
| DipPacBa 10^{-6} | 14,1 | 1,9 | 2 | *22,1 | 0,7 | 6 | *30,1 | 1,6 | 6 | 66,2 | 1,6 | 4 | 76,7 | 2,5 | 5 |
| Dip 10^{-6} | - | - | - | 18,0 | 1,2 | 6 | 28,5 | 1,8 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| PacBa 10^{-6} | - | - | - | *21,0 | 0,6 | 6 | *30,4 | 0,8 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| OK 432 10^{-16} | 14 | 0,0 | 2 | *23,6 | 2,3 | 6 | *29,9 | 1,4 | 6 | 66,1 | 2,8 | 3 | 75,8 | 2,1 | 2 |
| Dex 10^{-7} | 9,6 | 0,7 | 2 | *10,6 | 0,8 | 10 | *12,7 | 0,7 | 10 | *48,3 | 1,6 | 4 | *48,3 | 1,9 | 4 |

Tabelle 13: Vergleich der Stimulationsraten auf den BM8-positiven Makrophagen-Subtypen, berechnet aus der Differenz der Mittelwerte von Pharmakon und Kontrollgruppe, bezogen auf die Kontrollgruppe $\times 100$ bei Zellkulturen von 1 - 5 Tagen Dauer unter Immunmodulatorzusatz

| Pharmakon [M] | Tag 1 | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| InPx 10^{-6} | +4,6 | +5,9 | +15,2 | -0,9 | -0,8 |
| Inosin 10^{-6} | -2,3 | -1,6 | +8,6 | +0,0 | -3,9 |
| DipPacBa 10^{-5} | +22,3 | +44,4 | +32,7 | +1,5 | +2,9 |
| DipPacBa 10^{-6} | +8,5 | +18,2 | +17,1 | -1,6 | +2,3 |
| Dip 10^{-6} | | -3,7 | +10,9 | | |
| PacBa 10^{-6} | | +12,3 | +18,3 | | |
| OK432 $10^{-1.6}$ | +7,7 | +26,2 | +16,3 | -1,8 | +1,1 |
| Dex 10^{-7} | -26,2 | -43,3 | -50,6 | -28,2 | -35,6 |

$$\% \text{ Stimulation} = \frac{\text{Mittelwert des Pharmakons} - \text{Mittelwert Kontrolle}}{\text{Mittelwert Kontrolle}} \cdot 100$$

Tabelle 14: Wachstumskinetik der Esterase produzierenden Makrophagen bei Stimulation von Tag 1 - 5 mit Immunmodulatoren

Angabe ist jeweils der Mittelwert aus n Versuchen sowie der Standardfehler des Mittelwertes SEM in % positiver Zellen

Tag 0 = alle Kulturansätze schwach positiv, ca. 5 %

Tag 1 = alle Kulturansätze im Mittel ca. 7,5 % positiv (Minimum 6,1 % bis Maximum 8,9 %)

Mit * gekennzeichnete Daten geben statistisch signifikante Abweichungen zur Kontrolle an für ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$

| Pharmakon [M] | Tag 2 | | | Tag 3 | | | Tag 4 | | | Tag 5 | | |
|--------------------|-------|-----|----|-------|-----|----|-------|-----|---|-------|-----|---|
| | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n | % | SEM | n |
| Kontrolle | 15,7 | 0,6 | 18 | 21,9 | 0,7 | 9 | 63,4 | 3,6 | 2 | 86,1 | 2,5 | 2 |
| InPx 10^{-6} | *20,3 | 1,8 | 6 | *30,6 | 0,9 | 6 | 62,1 | 3,1 | 2 | 85,0 | 2,0 | 2 |
| Inosin 10^{-6} | 18,3 | 0,9 | 6 | *25,5 | 1,0 | 6 | 62,2 | 3,7 | 2 | 87,1 | 3,5 | 2 |
| DipPacBa 10^{-5} | *20,2 | 1,4 | 6 | *29,8 | 1,2 | 6 | 71,0 | 1,2 | 2 | 85,5 | 0,3 | 2 |
| DipPacBa 10^{-6} | *18,6 | 1,0 | 6 | *26,5 | 0,5 | 6 | 67,5 | 0,8 | 2 | 85,5 | 1,4 | 2 |
| Dip 10^{-6} | *19,4 | 0,8 | 6 | *28,2 | 1,7 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| PacBa 10^{-6} | *19,4 | 1,0 | 6 | *27,9 | 1,4 | 6 | - | - | - | - | - | - |
| OK432 10^{-16} | 19,5 | 1,8 | 6 | *30,0 | 1,1 | 6 | 66,5 | 3,5 | 2 | 85,3 | 2,0 | 2 |
| Dex 10^{-7} | *11,0 | 0,9 | 6 | *13,1 | 1,3 | 10 | 44,7 | 1,2 | 2 | 51,7 | 3,0 | 2 |

Tabelle 15: Vergleich der Stimulationsraten auf den Esterase-produzierenden Makrophagen-Subtypen, ausgedrückt als prozentuale Abweichung vom Mittelwert der Kontrollgruppe, bei Zellkulturen von 2 - 5 Tagen Dauer unter Immunmodulatorzusatz

| Pharmakon [M] | Tag 2 | Tag 3 | Tag 4 | Tag 5 |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| InPx 10 ⁻⁶ | 29,3 | 39,7 | -2,1 | -1,3 |
| Inosin 10 ⁻⁶ | 16,6 | 16,4 | -1,9 | 1,2 |
| DipPacBa 10 ⁻⁵ | 28,7 | 36,1 | 12,0 | -0,7 |
| DipPacBa 10 ⁻⁶ | 18,5 | 21,0 | 6,5 | -0,7 |
| Dip 10 ⁻⁶ | 23,6 | 28,8 | | |
| PacBa 10 ⁻⁶ | 23,6 | 27,4 | | |
| OK432 10 ^{-1.6} | 24,2 | 37,0 | 4,9 | -0,9 |
| Dex 10 ⁻⁷ | -29,9 | -40,2 | -29,5 | -40,0 |

$$\% \text{ Stimulation} = \frac{\text{Mittelwert des Pharmakons} - \text{Mittelwert Kontrolle}}{\text{Mittelwert Kontrolle}} \cdot 100$$

8. Literaturverzeichnis

Amery W.K., Butterworth B.S.,

The dosage regimen of levamisole in Cancer: is it related to efficacy and safety?

Int. J. Immunopharmacol 5: 1 - 9 (1983)

Arend W.P., Massoni R.J.,

Characteristics of bacterial lipopolysaccharide induction of interleukin 1 synthesis and secretion by human monocytes
Clin. Exp. Immunol 64: 656 - 664 (1986)

Arinaga S., Karimine W., Tagamuku K., Naribora S., Inoue H., Abe R., Watanabe D., Matsuoka H., Ueo H., Akigoshi T.,
A trial of adjuvant chemoimmunotherapy with mitomycin C and OK432 for stage III gastric carcinoma.

J. Surg Oncol 50, 3: 187 - 189 (1992)

Austin P.E., McCulloch E.A., Till J.E.,

Characterization of the factor in L-cell conditioned medium capable of stimulating colony formation by mouse marrow cells in culture

J Cell Physiol 77: 121 - 134 (1970)

Barnes, P.J., Adcock I.,

Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms
TIPS 14: 436 - 441 (1993)

Beller D., Kiely J.M., Unanue E.,

Regulation of macrophage populations:

I. Preferential induction of Ia-rich peritoneal exudates by immunologic stimuli

J Immunol 124, 3: 1426 - 1432 (1980)

Beller D.I., Unanue E.R.,

Regulation of macrophage populations:

II. Synthesis and expression of I_A antigens by peritoneal exudate macrophages is a transient event

J Immunol 126,1: 263 - 269 (1981)

Binderup L.,

Effects of Isoprinosine in animal models of depressed T-cell function

Int J Immunopharmacol 7,1: 93 - 101 (1985)

Boraschi D., Niederhuber J.E.,

Regulation of macrophage suppression and cytotoxicity by interferon: role of I_A-bearing macrophages.

J Immunol 129,5: 1854 - 1858 (1982)

Bunta S., Peris Z.,
Immunstimulantien in der Therapie der Virusinfektionen
*XIII. Nationaler Kongress der ungarischen dermatologischen
Gesellschaft, Budapest 30. März -1. April 1981*

Calamai E.G., Beller D.I., Unanue E.R.,
Regulation of macrophage populations:
IV. Modulation of I_A expression in bone marrow derived macrophages
J Immunol 128,4: 1692 - 1694 (1982)

Celada A., McKercher S., Maki R.,
Repression of major histocompatibility complex I_A expression
by glucocorticoids: the glucocorticoid receptor inhibits the
DNA-binding of the X box DNA binding protein
J Exp Med 177,3: 691 - 698 (1993)

Chirigos, M.A., Schlick E., Budzynski W.,
Immune Response by biological response modifiers
Cancer Detection and Prevention Supplement 1: 385 - 397 (1987)

Colotta F., Bersani L., Polentanetti N., Peri C., Mantovani A.,
Effects of inactivated streptococci (OK-432) on macrophage
functions in mice
J Immunopharmacol 7:4: 437 - 449 (1985)

Cowing C., Schwartz B.D., Dickler H.B.,
Macrophage I_A Antigens:
I. Macrophage populations differ in their expression of I_A antigens,
J Immunol 120,2: 378 - 384 (1978)

Cunha F.Q., Cacini A.T., Ferreira S.H.,
Inhibition of the release of a neutrophil chemotactic factor
from macrophages partially explains the anti-inflammatory action
of glucocorticoids
Agents Actions, 17: 314 - 317 (1985)

Cunha F.Q., Ferreira S.H.,
The release of a neutrophil chemotactic factor from peritoneal
macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids
Eur J Pharmacol 129: 65 - 76 (1986)

Darlat W.; O'Neill B.,
"Inosin pranobex: aktueller therapeutischer Stellenwert bei
persistierender generalisierter Lymphadenopathie (Lymphadenop-
athiesyndrom), rezidivierendem Herpes genitalis und condylomata acuminata"
in Schmutzler W., Darlat W., Knop J., *Immunstimulation* S. 127 - 136, Düstri-
Verlag Dr. Karl Feistle, München 1988

De Simone C., Meli D., Storicoli M., Rebuzzi E., Koverech A.,
In vitro effect of Inosiplex on T-lymphocytes
J Immunopharmacol 4: 139 - 152 (1982)

De Simone C., Famularo G., Tzantzoglou S., Moretti S., Jirillo E.,
Inosine pranobex in the treatment of HIV infection: a review
Int J Immunopharmacol 13 Suppl. 1: 19 -27 (1991)

Dinarello C.A.,
Biology of interleukin 1
FASEB J. 2: 108 (1988)

Doe R.P., Goldman P.M., Severson S.P., Hruby H.M.,
Circadian variation of cytosol glucocorticoid receptors in human
polymorphonuclear leukocytes (PMN) and mononuclear cells (MN) in a normal
population
J Steroid Biochem 25: 483 -487 (1986)

Dräger A., Malm J., Pfäffle A., Ziehe K., Schmutzler W.,
"Pharmakologische Methoden zur Erfassung von Immunstimulanzien"
in Schmutzler W., Darlath W., Knop J., *Immunstimulation*
S. 39 - 46, Duster-Verlag Dr. Karl Feistle, München 1988

Drews J.,
The experimental and clinical use of immune-modulating drugs in the prophylaxis
and treatment of infections
Infection 13 supplement 2: 241 - 250 (1985)

Drews J.,
"Immunopharmakologie: Grundlagen und Perspektiven"
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo 1986,
S. 185-187

Falk L.A., Wahl L.M., Vogel S.N.,
Analysis of I_A antigen expression in macrophages derived from bone marrow cells
cultured in granulocyte-macrophage-colony-stimulating
factor or macrophage-colony-stimulating factor
J Immunol 140, 8: 2652 - 2660 (1988)

Fair A.G., Nakane P.K.,
Immunohistochemistry with enzyme labelled antibodies: A brief review
J Immunol Methods 47: 129 - 144 (1981)

Flower R.J.:
Background and discovery of Lipocortins
Agents Actions 17: 255 - 262 (1985)

Frank D.E., Roth J.A.,
Factors secreted by untreated and hydrocortisone-treated monocytes
that modulate neutrophil function
J Leucoc Biol 40: 693 - 707 (1986)

Ginsberg T.,
"Neuere Ergebnisse zur Immunpharmakologie von Inosine pranobex"
in Schmutzler W., Darlath W., Knop J., *Immunstimulation*
S. 119 - 125, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle, München 1988

Goetz O.,
Die Behandlung der subakuten sklerosierenden Panencephalitis mit Isoprinosin
Monatsschrift Kinderheilkunde 129: 1 - 4 (1981)

Gordon S., Hirsch S., Starkey P.
Differentiation antigens of mouse macrophages and polymorpho-nuclear
leukocytes
in van Furth (Ed) *Mononuclear phagocytes*, Martinus Nijhoff
Publisher Dordrecht, Boston, Lancaster 3 - 8 (1985)

Goud T.J.L.M., Schotte C., van Furth R.,
Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte
colonies grown in vitro
J Exp Med 142: 1180 - 1199 (1975)

Goulding W.J., Guyre P.M.,
Glucocorticoids, lipocortins and the immune response
Current opinion in Immunologie 5: 108 - 113 (1993)

Grasso R.J., West L.A., Guay R.C., Klein T.W.,
Inhibition of yeast phagozytosis by Dexamethasone in macrophage cultures:
reversibility of the effect and enhanced suppression in cultures of stimulated
macrophages
J Immunopharmacol 4, 4: 265 - 278 (1982)

Hadden J.W., Giner-Sorolla A.
Isoprinosine, modulator of lymphocyte and macrophage development and function
National Cancer Institute (NCI) Conference on Biological Response Modifiers
14.3.1980, Bethesda/USA

Hag A.U.,
Failure of Hydrocortisone to suppress the Interferon-Gamma-induced
augmentation of Interleukin-1 secretion of aged human monocytes
Immunobiology 177: 245 - 253 (1988)

Hamilton, L.C.
"Modern Data Analysis, A first course in Applied Statistics"
Brooks/Cole Publishing Company, Belmont, Kalifornien (1990)

Handa T., Mitsuyama M., Serushago B.A., Muramori K., Nomoto K.,
A low degree of requirement for I_A-positive macrophages and Il-2 in the induction
phase of *Listeria monocytogenes*-specific T cells in vitro
Immunobiology 179, 2 - 3: 244 - 258 (1989)

Haskill S., Johnson C., Eiermann D., Becker S., Warren K.,
Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes
J Immunol 140, 1690 - 1694 (1988)

**Hauschildt S., Hoffmann P., Beuscher H.U., Dufhues G.,
Heinrich P., Wiesmüller K.H., Jung G., Bessler W.,**
Activation of bone marrow-derived mouse macrophages by bacterial lipopeptides: cytokine production, phagocytosis and Ia expression
Eur J Immunol 20: 63 - 63 (1990)

Hume D.A., Gordon S.,
The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F 4/80
in van Furth (Ed) *Mononuclear phagocytes*, Martinus Nijhoff Publisher Dordrecht, Boston, Lancaster, 9 - 17 (1985)

Ishii Y., Shinoda M., Shikita M.
Specificity of the suppressive action of Glucocorticoids on the proliferation of monocyte/macrophages in the CSF-stimulated cultures of mouse bone marrow
Exp Hematol 11: 178 - 186 (1983)

Johnston R.B.,
Medical intelligence current concepts: Immunology -Monocytes and Macrophages
N Engl J Med 318,2: 747 - 752 (1988)

Kai, S., Tanaka J., Nomota K. Torisu M.,
Studies of the immunopotentiating effects of a streptococcal preparation OK432
I. Enhancement of T-cell mediated immune responses of mice
Clin Exp Immunol 37: 98 - 105 (1979)

Kaltreider H.B., Byrd P.K., Curtis J.L.,
Expression of I_A by murine alveolar macrophages is upregulated during the evolution of a specific immune response in pulmonary parenchyma
Am Rev Respir Dis 137,6: 1411 - 1416 (1988)

Katz P., Zaytoun A.M., Lee J.H.,
Characterization of corticosteroid receptors in natural killer-cells: comparison with circulating lymphoid and myeloid cells
Cell Immunol 94: 347 - 352 (1985)

Kawaguchi T., Suematsu M., Koizumo H.M., Mitsui H., Suzuki S., Matsuni T., Ogawa H., Nomoto K.,
Activation of macrophage function by intraperitoneal administration of the streptococcal antitumor agent OK432
Immunopharmacology 6: 177 - 189 (1983)

Komada Y., Zhang S.L., Zhou Y.W., Hanada M., Shibata T., Azuma E., Sakurai M.,
Cellular immunosuppression in children with acute lymphoblastic leukemia: effect of consolidation chemotherapy
Cancer Immunol Immunother 35, 4: 271 - 276 (1992)

Lemercier J., Julien N., Couplier M., Dauchel H., Ozanne D., Fontaine M., Ripoche J.,
Differential modulation by glucocorticoids of alternativ complement protein secretion in cells of the monocyte/macrophage lineage
Eur J Immunol 22, 4: 909 - 915 (1992)

Lew W., Oppenheim J.J., Matsushima K.
Analysis of the suppression of IL-1 α and IL-1 β production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone
J Immunol 140: 1895 - 1902 (1988)

Löffler G., Petrides P.,
"Physiologische Chemie", 4. Auflage, S. 696 - 709,
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1988

Lutz K.T., Yang P.C.,
Desmoplasia and regression of lung adenocarcinoma after intratumor injection of OK432: report of a case
J Formos Med Assoc 91, 6: 639 - 642 (1992)

Malorny U., Neumann C., Sorg C.,
Influence of various detachment procedures on the functional state of cultured murine macrophages
Immunobiology 159: 327 - 336 (1981)

Malorny U., Michels E., Sorg C.,
A monoclonal antibody against an antigen present on mouse macrophages and absent from monocytes
Cell and Tissue Research 243: 421 - 428 (1986)

Malorny U., Knop J., Burmeister G., Sorg C.
Immunohistochemical demonstration of migration inhibitory factor (MIF) in experimental allergic contact dermatitis
Clin Exp Immunol 71: 164 - 170 (1988)

Masferrer J.L., Seibert K., Zweifel B., Needleman P.,
Endogenous glucocorticoids regulate an inducible cyclooxygenase enzyme
Proc Natl Acad Sci USA 89, 9: 3917 - 3921 (1992)

Matsui K., Arai T.,
The comparison of cell mediated immunity induced by immunization with porin, viable cells and killed cells of salmonella typhimurium
Microbiol Immunol 36: 3: 269 - 278 (1992)

van der Meer J., Bulterman D., van Zwet T., Elzenga-Claassen J., van Furth R.,
Culture of mononuclear phagocytes on a teflon surface to prevent adherence
J Exp Med 147: 271 - 276 (1978)

van der Meer J.W.M., van de Gevel J.S., Westgeest A.A.,
van Furth R.
The effect of Glucocorticosteroids on bone marrow mononuclear phagocytes in culture
Immunobiology 172: 143 - 150 (1986)

Nakashima J., Tachibana M., Baba S., Deguchi N., Jitsukawa S., Hata M.,
Tazaki H.
Studies on the production of endogenous cytokines in patients with renal cell carcinoma
Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi 83: 7: 1110 - 1117 (1992)

Nathan C.F.,
Secretory products of macrophages
J Clin Invest 79: 319 - 326 (1987)

Neumann C., Sorg C.,
Sequential expression of functions during macrophage differentiation in murine bone marrow liquid cultures
Eur J Immunol 10: 834 - 840 (1980)

Neumann F., Schenck B.,
"Endokinpharmakologie" in Forth W., Henschler D., Rummel W.:
Allgemeine u. spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6. Aufl.,
S. 556 - 566 B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich 1992

Nibbering P.H., Leijh P.C.J., van Furth R.,
Quantitative Immunocytochemical Characterization of mononuclear Phagozytes
I. Monoblasts, Promonozytes, Monocytes and Peritoneal and Alveolar Macrophages
Cell Immunol 105: 374 - 385 (1987)

Nielsen P., Beckett A.H.,
The metabolism and excretion in man of NN-dimethylamino-isopropanol and p-acetamida-benzoic acid after administration of isoprinosine
J Pharm Pharmacol 33: 549 - 550 (1981)

Noda T., Asano M., Yosie O., Suzuki R., Ebina T., Ishida N.,
Interferon-Gamma-Induction in human peripheral blood mononuclear cells by OK432, a killed preparation of *Streptococcus pyogenes*
Microbiology and Immunology 30: 1: 81 - 88 (1986)

Ohtsuki T., Suzu S., Nagata N., Matoyoshi K.,
A human osteoblastic cell line, MG -63, produces two molecular types of macrophage-colony-stimulating factor
Biochim Biophys Acta 1136, 3: 297 - 301 (1992)

Ornstein L., Ansley H., Saunders A.,
Improving manual differential white cell counts with cytochemistry
Blood Cells 2: 557 -585 (1976)

Orson F.M., Auzenne C.A.,
Glucocorticosteroid-induced immunoglobulin production requires intimate contact
between B-cells and Monocytes
Cell Immunol 112: 147 - 155 (1988)

**Pepinsky R.B., Tizart R., Mattalino R.J., Sinclair L.K.,
Miller G.T., Browning J.L., Ping Chang Chow E., Burne C.,
Huang K.S., Pratt D., Wachter L., Hession C., Frey A.Z.,
Wallner D.P.,**
Five distinct calcium and phospholipase binding proteins share homology with
lipocortin 1
J Biol Chem 263: 10799 -10811 (1989)

Power R.F., Conneely O.M., O'Malley B.W.,
New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily
TIPS 13: 318 - 333 (1992)

Ramm B., Hofmann G.
"Biomathematik" 2. Auflage S. 63, Ferdinand Enke Verlag
Stuttgart 1982

Raynal P., Pollard H.B.,
Annexins: the problem of assessing the biological role of a gene family of
multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins
Biochim Biophys Acta 1197: 63 - 93 (1994)

Renoux G.,
"Pharmakologische und immunpharmakologische Ansätze zur Immun-therapie"
in Schmutzler W., Darlath W., Knop J. *Immunstimulation* S. 25 - 36, Duster
Verlag Dr. Karl Feistle, München 1988

Rhodes J., Ivangi J., Cozins P.,
Antigen presentation by human monocytes: effects of modifying major
histocompatibility complex class II antigen expression and Interleukin 1 production
by using recombinant interferons and corticosteroids
Eur J Immunol 16: 370 - 375 (1986)

Roitt I.H., Brostoff J., Male D.K.,
"Kurzes Lehrbuch der Immunologie", 2. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1991

Rook G.A.W., Steele J., Ainsworth M., Leveton C.,
A direct effect of glucocorticoid hormones on the ability of human and murine
macrophages to control the growth of *M. tuberculosis*
Eur J Respir Dis 71: 286 - 291 (1987)

Rosa L.F., Cury Y., Curi R.,
Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in rat macrophages
J Endocrinol 135: 2: 213 - 219 (1992)

Russo-Marie, F.,
Macrophages and the glucocorticoids
J Neuroimmunol 40, 2-3: 281 - 286 (1992)

Salkowski C., Vogel S.,
IFN-gamma mediates increased glucocorticoid receptor expression in murine macrophages
J Immunol 148; 9 : 2770 - 2777 (1992) a.

Salkowski C., Vogel S.,
Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity
J Immunol 149; 12: 4041 - 4047 (1992) b.

Sasaoki T., Arai S., Monden K., Itai S., Adachi Y., Funaki N., Higashituyi H., Tobe T.
Enhancement of rat hepatic macrophages by treatment with interleukin-2 and streptococcal preparation OK432, with reference to antitumor activity, soluble factor production and I_A expression
Cancer Immunol Immunother 35,2 : 75 - 82 (1992)

Schaffner, A.,
Therapeutic concentrations of Glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to Gamma Interferon
J Clin Invest 76: 1755 - 1764 (1985)

Schmalzl, F., Braunsteiner H.,
Cytochemische Darstellung von Esteraseaktivitäten in Blut und Knochenmarkszellen
Klinische Wochenschrift 12: 642 - 650 (1968)

Schwartz R.H., Dickler H.B., Sachs D.H., Schwartz B.D.,
Studies of I_A antigens on murine peritoneal macrophages
Scand J Immunol 5: 731 (1976)

Seljelid R., Busund L.T.A.,
The biology of macrophages: II Inflammation and tumors
Eur J Haematol 52: 1 - 12 (1994)

Shimizu M., Onoda M., Shinoda M., Shikita M.,
Effect of various immunomodulators on the production of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in mouse spleen cell cultures
J Pharm Dyn 6: 415 - 422 (1983)

Shimotsuma M., Simpson-Morgan M.W., Takahashi T., Hagiwara A.,
Activation of omental milky spots and milky spot macrophages by intraperitoneal administration of a streptococcal preparation OK432
Cancer Res 52: 19: 5400 - 5402 (1992)

Shoham J.,
Specific safety problems of inappropriate immune response to immunostimulating agents
TIPS 178 - 182 (1985), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam

Snyder D., Unanue E.R.,
Communications: Corticosteroids inhibit murine macrophage I_A Expression and Interleukin-1-Production
J Immunol 129, 5: 1803 - 1805 (1982)

Sorg C.,
Heterogeneity of macrophages in response to lymphokines and other signals
Mol Immunol 19, 10: 1275 - 1278 (1982)

Sorg C.,
Modulation of macrophage functions by lymphokines
Immunobiology 161: 352 - 360 (1982)

Sorg C., Michels E., Malorny U., Neumann C.,
Migration Inhibitory factors and macrophage differentiation
Springer Seminars in Immunopathology 7: 311 - 320 (1984)

Spreafico F.,
Problems and challenges in the use of immunomodulatory agents, a general introduction
Int Arch Allergy Appl Immunol 76: suppl. 1: 108 - 118 (1985)

Stanley E.A., Heard P.M.,
Factors regulating macrophage production and growth
J Biol Chem 252, 12: 4305 - 4312 (1977)

Steege P.S., Moore R.N., Johnson H.M., Oppenheim J.J.,
Regulation of murine Macrophage I_A-Antigen Expression by a lymphokine with Immune Interferone Activity
J Exp Med 156: 1780 - 1793 (1982)

Summer M.A., Bradley T.R., Hodgson G.S., Cline M.J., Fry P.A., Sutherland L.

The growth of bone marrow cells in liquid culture
Br J Haematol 23: 221 - 234 (1972)

Suzu S., Ohtsuki T., Makishima M., Yanai N., Kawashima T., Nagata N., Motoyoshi K.,

Biological activity of a proteoglycan form of macrophage colony-stimulating-factor and its binding to type V collagen
J Biol Chem 267, 24: 16812 - 16815 (1992)

Sztejn M.B., Steeg P.S., Johnson H.M., Oppenheim J.J.,

Regulation of Human Peripheral Blood Monocyte DR Antigen Expression in Vitro by Lymphokines and Recombinant Interferons
J Clin Invest 73: 556 - 565 (1984)

Tobler A., Meier R., Seitz M., Dewald B., Baggiolini M., Fey M.,

Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts
Blood 79, 1: 45 - 51 (1992)

Toge T., Yamada H., Aratani K., Yamaguchi M., Fujita T.,

Yanagawa E., Hatton T.,
Reduction of suppressor cell activities of human peripheral blood lymphocytes by a streptococcal preparation OK432
Int J Immunopharmacol 9, 8: 875 - 879 (1987)

Tsang K.Y., Fudenborgh H., Gnagy M.J.

Restoration of immune response of aging hamsters by treatment with Isoprinosine
J Clin Invest 71: 1750 - 1755 (1983)

Tsang P.H., Sei Y., Behesi J.G.,

Isoprinosine-induced Modulation of T-Helper-cell-subjects and antigen-presenting monocytes (Leu M₃⁺Ia⁺) resulted in improvement of T- and B-lymphocyte functions, in vitro in ARC and AIDS patients
Clin Immunol Immunopathol 45: 166 - 176 (1987)

Uchida A., Klein E.,

Activation of human blood lymphocytes and monocytes by the streptococcal preparation OK432: enhanced generation of soluble cytotoxic factors
Immunology Letters: 10: 177 - 181 (1985)

Ujii T.,

OK432 mediated augmentation of antitumor immunity and generation of cytotoxic T-lymphocytes
Jpn J Exp Med 57, 2: 103 - 115 (1987)

Umesaki N., Uda S., Kawabata M., Ogita S.,

Significance of peritoneal macrophages on fertility in mice
Am J Obstet Gynecol 167, 1: 261 - 264 (1992)

Unanue E., Allen P.M.,
The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells
Science 236: 551 - 557 (1987)

Vecchi A., Sironi M., Spreafico F.,
Preliminary characterization in mice of the affect of Isoprosinosine on the immune system
Cancer Treat Rep 62, 11: 1975 - 1979 (1978)

Vespa L., Johnson S.C., Aldrich W.A., Zwilling B.S.,
Modulation of macrophage I_A-Expression: Lack of effect of Prostaglandins and Glucocorticoids on Macrophages that continuously express I_A
Journal of Leucocyte Biology 41: 47 - 54 (1987)

Waage A, Bakke O.,
Glucocorticoids suppress the production of tumor necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes
Immunology 63: 299 - 302 (1988)

Wakasugi H., Oshimi K., Miyata M., Morioka Y.,
Augmentation of natural killer (NK) cell activity by a streptococcal preperation, OK-432, in patients with malignant tumors
J Clin Immunol 1, 3: 154 - 162 (1981)

Werner G.H., Floc'h F., Migliore-Samour D., Jollès P.,
Immunomodulating peptides
Experientia 42: 521 - 531 (1986)

Wickett W.H., Bradshaw L.J., Wilson J., Glasky A.J.,
Clinical effectiveness of the immunopotentiating agent Inosiplex in Herpes Virus infections
76th Annual Meeting, American Society for Micobiology, Atlantic City, USA (1976)

Wybran J.,
"Immunstimulanzien in der Behandlung verschiedener Autoimmunerkrankungen am Beispiel immunologischer und klinischer Ergebnisse mit Inosine pranobex"
in Schmutzler W., Darlath W., Knop J., *Immunstimulation*
S. 137 - 143, Düstri-Verlag Dr. Karl Feistle, München 1988

Wybran J., Govaerts A., Appelboom T.,
Inosiplex a stimulating agent for normal human T cells and human leukocytes
J Immunol 121: 3: 1184 - 1187 (1978)

Yam L.T., Li C.Y., Crosby H.,
Cytochemical identification of monocytes and granulocytes
Am J Clin Pathol 55: 283 - 290 (1971)

Yang K.D., Stone R.M., Lee C.S., Chao T.Y., Cheng S.N., Shaio M.F.,
Effect of picibanil (OK432) on neutrophil-mediated antitumor activity: implication
of monocyte derived neutrophil-activating factors
Cancer Immunol Immunother 35, 4: 277 - 282 (1992)

Zimecki M., Wieczorek Z., Kapp J.A., Pierce C.W.,
Secretion of interleukin 1 (Il-1) by peritoneal macrophages upon contact with
syngeneic T cells is I_A-restricted and antigen-independent process
Arch Immunol Ther Exp Warsz 36,6 : 661 - 671 (1988)

**Zwadlo-Klarwasser G., Bent S., Haubeck H.D., Sorg C.,
Schmutzler W.,**
Glucocorticoid-induced appearance of the macrophage subtype RM 3/1 in
peripheral blood of man
Int Arch Allergy Appl Immunol 91: 175 - 180 (1990)

Zwadlo-Klarwasser G., Drube S., Schmutzler W.,
In vivo effects of OK-432, Inosine pranobex and its salt components on
macrophage subpopulations in spleen and peritoneum during the primary humoral
immune response
Invest Allerg Clin Immunol 2,2: 73 - 77 (1992) a

Zwadlo-Klarwasser G., Neubert R., Stahlmann R., Schmutzler W.,
Influence of Dexamethasone on the RM 3/1-positive macrophages in the peripheral
blood and tissues of a New World monkey (the marmoset callithrix jacchus)
Int Arch Allergy Appl Immunol 97, 2: 178 - 180 (1992) b

Zwadlo-Klarwasser G., Platen S., Schmutzler W.,
Inhibition of spontaneous and mitogen-induced lymphocyte proliferation by murine
bone marrow-derived macrophages: Role of prostaglandins, nitric oxides and cell-
to-cell contact
Scand J Immunol 40, 10 - 15 (1994)

Danksagung

Bei Frau Privatdozentin Dr. rer. nat. G. Zwadlo-Klarwasser und Herrn Prof. Dr. med. W. Schmutzler möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die hilfreichen Diskussionen auch lange nach dem experimentellen Teil der Arbeit bedanken.

Herrn Privatdozent Dr. med. K. Schweizer danke ich für die Übernahme des Ko-referats.

Claudia Fliegner und Petra Mühl sei ganz herzlich für die technische Hilfestellung und Unterstützung bei den Versuchen gedankt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Horst Stenzel für seine unermüdliche Hilfe bei der Erstellung der Graphiken und Tabellen.

Frau Leone-Eckhardt danke ich ganz herzlich für die Überführung meines Manuskriptes in eine leserliche Fassung.

Meiner Schwester Ina möchte ich schließlich sehr herzlich für ihre kritischen Ratschläge nach Lesen des Manuskriptes danken, die entscheidend zu einer besseren Verständlichkeit der Arbeit beitragen, sowie natürlich für die hilfreiche Unterstützung bei der Textverarbeitung.

Lebenslauf

Gunda Karin Elisabeth Lepel

- Geburtstag und -ort** 11.05.1965 in Wilhelmshaven
- Vater** Rolf-Günter Lepel, Verbandsgeschäftsführer
- Mutter** Karin Lepel, geb. Engel, Hausfrau
- Schulbildung** 1971 - 1975 Grundschule in Essen
1975 - 1984 Marienschule Essen-Werden
Abitur Juni 1984
- Studium** Okt. 1984 - Nov. 1990
Medizinstudium an der RWTH-Aachen
08/1986 ärztliche Vorprüfung
08/1987 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/1989 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/1990 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- Ärztin im Praktikum** 01.01.1991 - 30.06.1992
Abteilung Anästhesie und Intensivmedizin
Franziskus-Hospital, Bielefeld
- Assistenzärztin** seit dem 01.07.1992 an der Klinik für
Anästhesiologie und spezielle Intensivmedizin der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

