

Aus dem Institut/der Klinik für Dermatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# Der Respiratorische Burst bei Patienten mit systemischer Sklerodermie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annegret Storch  
aus Rodewisch

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Worm

2. Priv.-Doz. Dr. med. G. Riemekasten

3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Pfeiffer

Datum der Promotion: 18.09.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	I
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	III
<b>1 Theoretischer Hintergrund</b> .....	1
1.1 Progressive Systemische Sklerodermie (PSS).....	1
1.1.1 Vorkommen und Diagnose der Progressiven Systemischen Sklerodermie .....	1
1.1.2 Pathogenese der Progressiven Systemischen Sklerodermie.....	4
1.2 IRA-Therapie .....	8
1.3 Der respiratorische Burst (RB) .....	13
1.3.1 Ablauf und Reaktionen des respiratorischen Bursts.....	13
1.3.2 Stimulation des respiratorischen Bursts mit Zymosan und PMA.....	18
1.4 Zytokine.....	23
1.4.1 Die Bedeutung von Zytokinen für die Pathogenese der PSS und für .....	23
1.4.1.1 TNF $\alpha$ .....	23
1.4.1.2 IL-6.....	24
1.4.1.3 IL-10.....	25
1.4.1.4 GM-CSF .....	26
1.4.2 Induktion von Zytokinen durch Hyperthermie .....	28
<b>2 Aufgabenstellung</b> .....	30
<b>3 Material und Methodik</b> .....	31
3.1 Probanden.....	31
3.1.1 Patienten mit Progressiver systemischer Sklerodermie .....	31
3.1.2 Patienten mit Psoriasis vulgaris .....	34
3.1.3 Patienten mit Atopischer Dermatitis .....	35
3.1.4 Gesunde Kontrollgruppe .....	36
3.2 Infrarot-A-induzierte Hyperthermie .....	37
3.2.1 Studiendesign und verwendete Geräte .....	37
3.3 Messung des Zymosan-stimulierten respiratorischen Bursts .....	39
3.3.1 Prinzip der Flowzytometrie .....	39
3.3.2 Herstellung der Zymosan-Standartlösung.....	40
3.3.3 Herstellung des Dihydrorhodamin-Stocks .....	40
3.3.4 Stimulation mit Zymosan .....	40
3.3.5 Färbung mit Dihydrorhodamin 123.....	41
3.3.6 Durchflusszytometrische Analyse .....	42
3.4 Phagobursttest (nicht selbst durchgeführt).....	43
3.5 Prinzip des Enzyme linked Immuno Sorbent Assays (ELISA).....	44
3.6 IL-6-ELISA.....	44
3.7 TNF $\alpha$ -ELISA.....	45
3.8 GM-CSF-ELISA.....	46
3.9 IL-10-ELISA.....	46
3.10 Statistische Analyse .....	47
<b>4 Ergebnisse</b> .....	48
4.1 Der respiratorische Burst bei PSS-Patienten und Kontrollgruppen .....	48
4.1.1 Untersuchungsmodell .....	48
4.1.2 Vergleich des Respiratorischen Bursts bei Neutrophilen und .....	49
Monozyten.....	49
4.1.3 PMA-stimulierter respiratorischer Burst der neutrophilen .....	50
Granulozyten.....	50

---

4.1.4	Zymosan-stimulierter respiratorischer Burst der neutrophilen Granulozyten .....	51
4.1.5	PMA-stimulierter respiratorischer Burst der Monozyten .....	54
4.1.6	Zymosan-stimulierter respiratorischer Burst der Monozyten .....	56
4.2	Veränderung des respiratorischen Bursts durch milde Infrarot-A-induzierte Hyperthermie .....	60
4.2.1	Unmittelbarer Einfluss der IRA-Ganzkörperhyperthermie auf den Respiratorischen Burst .....	60
4.2.2	Einfluss der IRA-Therapie auf den Zymosan-stimulierten respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten.....	62
4.2.3	Einfluss der IRA-Therapie auf den PMA-stimulierten respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten .....	64
4.2.4	Einfluss der IRA-Therapie auf den Zymosan-stimulierten respiratorischen Burst der Monozyten .....	66
4.2.5	Einfluss der IRA-Therapie auf den PMA-stimulierten respiratorischen Burst der Monozyten .....	68
4.3	Zytokinproduktion .....	70
4.3.1	Untersuchungsmodell .....	70
4.3.2	TNF $\alpha$ .....	71
4.3.3	IL-6.....	72
4.3.4	GM-CSF .....	73
4.3.5	IL-10.....	74
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>88</b>
	<b>Abbildungen und Tabellen</b> .....	<b>VI</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
	<b>Materialliste</b> .....	<b>XVI</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACA	Anti-Centromer-Antikörper
ACE	Angiotensinconvertingenzym
ACR	American College of Rheumatology
AD	Atopische Dermatitis
APCs	Antigen-presenting-cells
araLAM	ara-Lipoarabinomannan
ATP	Adenosintriphosphat
BMNC	Blood mononuclear Cells
BSA	Bovine serum albumine
CENPs	Antikörper gegen Centromerproteine
CGD	Chronische Granulomatose
CR3	Complementrezeptor 3
DAG	Diacylglycerin
DHR	Dihydrorhodamin
DLCO	Lungendiffusionskapazität
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dSSc	Diffuse systemische Sklerodermie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fMLP	N-Formyl-Methionyl-Peptid
FSC	Forward Scatter
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Colony-stimulating-Factor
GTP	Guanosin-5-Triphosphat
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL	Interleukin
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
IRA	Infrarot-A
LPS	Lipspolysaccarid

ISSc	Limitierte Systemische Sklerodermie
MCP-1	Monocyte Chemotactant Protein-1
MDA	Malondialdehyd
MFI	Median Fluorescence Intensity
MRSS	Modified Rodnan Skin Score
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NBT	Nitroblautetrazolium
NF-kB	Nukleärer Faktor kB
Normalpers	Normalpersonen
NSAID	Nicht Steroidale Antiphlogistika
OMV	meningococcal outer membrane vesicles
PAF	Platelet-Activating Factor
PAMPs	Pathogen-associated-molecular-Patterns
PASI	Psoriasis and Severity Index
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PML	Polymorphkernige Leukozyten
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
Pso	Psoriasis vulgaris
PSS	Progressive Systemische Sklerodermie
PUVA	Psoralen-UVA-Strahlung
RB	Respiratorischer Burst
RNA	Ribonucleinsäure
RNAP III	RNA-Polymerase III
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCL70	Anti-DNS-Topoisomerase 1-Antikörper
SCORAD	Score of Atopic Dermatitis
SD	Standardabweichung
SSC	Side Scatter

TBS	Tris buffered saline solution
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
VC	Vitalkapazität
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# **1 Theoretischer Hintergrund**

## **1.1 Progressive Systemische Sklerodermie (PSS)**

### **1.1.1 Vorkommen und Diagnose der Progressiven Systemischen Sklerodermie**

Die progressive systemische Sklerodermie (PSS) ist eine chronisch-entzündliche Multiorganerkrankung, die durch eine Sklerose der Haut mit oder ohne Beteiligung der inneren Organe gekennzeichnet ist. Zugrunde liegt eine Überproduktion von Kollagen, deren Mechanismus ungeklärt, vermutlich aber sehr komplex ist (1, 2).

Jährlich treten etwa 2 bis 20 Neuerkrankungen pro einer Million Einwohner auf. Epidemiologische Untersuchungen in den USA zeigen eine Prävalenz von 4 - 290 Erkrankten pro einer Million Einwohner. Frauen sind 3 – 9 mal häufiger betroffen als Männer, wobei besonders im jungen Lebensalter die Erkrankung beim weiblichen Geschlecht überwiegt.

Die Mehrzahl der Patienten erkrankt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr (2).

Zur Diagnose der systemischen Sklerodermie werden die vom American College of Rheumatology (ACR) 1980 vorgeschlagenen Kriterien verwendet. Die Diagnose gilt als gesichert, wenn entweder das Major-Kriterium (sklerodermieartige Hautveränderungen proximal der Fingergrundgelenke) oder mindestens zwei Minorkriterien (1. Sklerodaktylie, 2. grübchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Finger- und/oder Zehenweichteile, 3. bilateral basale Lungenfibrose) erfüllt sind (3).

Die progressive systemische Sklerodermie stellt kein einheitliches Krankheitsbild dar, sondern beinhaltet unterschiedliche Manifestationsformen und klinische Verläufe, woraus unterschiedliche Prognosen resultieren. International hat sich die Einteilung gemäß der kutanen Ausbreitung von LeRoy et al (4) durchgesetzt. Hiernach wird zwischen Patienten mit limitierter systemischer Sklerodermie (lSSc) und diffuser systemischer Sklerodermie (dSSc) unterschieden.



Die limitierte Form weist eine günstigere Prognose auf, da der Befall innerer Organe nicht oder nur gering ausgeprägt ist. ISSc ist durch eine Sklerose der Haut an Händen und Unterarmen (begrenzt durch die Metacarpo- und Metatarsophalangealgelenke) und manchmal auch an den Füßen und im Gesicht gekennzeichnet. Auch kutane Kalzifikationen und Teleangiektasien sind häufig. Die Patienten leiden oft schon Jahre im Voraus an dem Raynaud-Phänomen. Bei vielen Betroffenen tritt im Verlauf der Krankheit eine milde Fibrose der Lunge auf. Typischerweise finden sich anti-Centromere-Antikörper (ACA) im Serum (5, 6). Eine Unterform der ISSc ist das CREST-Syndrom, das durch das Vorhandensein von Calzinosen, Raynaud-Phänomen, Ö(E)sophagusdysmotilität, Sklerodaktylie und Teleangiektasien bestimmt wird (7).

Bei Patienten mit dSSc tritt das Raynaud-Phänomen meist erst kurz (weniger als ein Jahr) vor Ausbruch der Krankheit auf. Sklerotische Hautveränderungen finden sich vor allem am Stamm und an den Extremitäten. Eine Beteiligung der inneren Organe tritt oftmals sehr früh auf, worauf die ungünstige Prognose zurückzuführen ist. Bei der diffusen Form der Sklerodermie sind Autoantikörper gegen die DNS-Topoisomerase 1 (SCL70) nachweisbar (5, 6).

Die häufigste klinische Manifestation der PSS ist das Raynaud-Phänomen, welches bei bis zu 90% der Patienten auftritt. Die Raynaud-Attacken sind durch das sequentielle Auftreten einer schmerzhaften Akroasphyxie mit Akrozyanose und anschließender arterieller Hyperämie gekennzeichnet (2). Kälte und emotionaler Stress sind Auslöser für diese Gefäßspasmen, die anfangs funktioneller Natur sind. Erst im späteren Verlauf treten organische Gefäßveränderungen auf. Die Messung der akralen Wiedererwärmung kann zur Diagnose des Raynaud-Phänomens eingesetzt werden. Diese Wiedererwärmung nach Kälteschock ist ein Maß für die Wärmeleitfähigkeit der Haut und der Durchblutungsänderung (8).

Die sklerodermietypischen Hautveränderungen beginnen an Händen, Füßen und im Gesicht und gehen später auf die Oberschenkel und Oberarme, sowie auf den Rumpf über. Durch den Elastizitätsverlust der Finger kommt es zur Sklerodaktylie. Die Patienten klagen über ein Spannungsgefühl der Haut. Das Gesicht wirkt maskenhaft

und die Mimik ist eingeschränkt. Häufig findet sich eine verkleinerte Mundöffnung mit vermehrter Mundfältelung („Tabaksbeutelmund“). Im weiteren Verlauf kommt es zu Nekrosen der Fingerspitzen auf Grund von Durchblutungsstörungen („Rattenbissnekrosen“) und es bilden sich dermatogene Kontrakturen („Madonnenfinger“). Radiologisch sind Akroosteolysen und gelenknahe Osteoporose nachweisbar (9).

Das am häufigsten (bis zu 85% der Fälle) betroffene innere Organsystem ist der Gastrointestinaltrakt (1). Hier kommt es zur Vermehrung von Kollagen und zum Abbau der Muskulatur. In den meisten Fällen sind Ösophagus (die beiden unteren Drittel) und das Ileum befallen. Als Folge daraus ergeben sich Dysphagie, Refluxösophagitis, Obstipation, Diarrhoe, bakterieller Überwuchs und in Extremfällen auch Malabsorptionssymptome (10).

Über 50% der Sklerodermiepatienten entwickeln im Verlauf ihrer Krankheit eine klinisch signifikante Beteiligung des respiratorischen Systems (11). Die fibrosierende Alveolitis und die pulmonale Hypertension, die häufiger bei Patienten mit ISSc zu finden ist, sind die in den meisten Fällen auftretenden Manifestationen.

Aktuelle Studienergebnisse weisen auf eine klinisch auffällige kardiale Beteiligung bei bis zu 10% der PSS-Patienten hin (10), autoptischen Befunden zufolge sind jedoch bis zu 30-80% der Patienten betroffen (1). Sowohl das Myokard, als auch das Perikard können befallen sein. Wahrscheinlich sind wiederholte Phasen von Ischämie und Reperfusion für die Gewebszerstörung und den sich anschließenden bindegewebigen Gewebsersatz verantwortlich. Überleitungsstörungen, Herzdilatation und Herzinsuffizienz, sowie Perikarditis und Perikardergüsse sind die wesentlichen Symptome (9, 10).

Renale Komplikationen werden bei 10-40% der Patienten klinisch manifest. Bei Befall der Niere kommt es zur Sklerose der Nierenarteriolen und zum progredienten Ausfall der Nierenfunktion. Meist schließt sich eine langsam fortschreitende Niereninsuffizienz mit Urämie an. In wenigen Fällen, vorrangig bei Patienten mit dSSc, kommt es jedoch zum plötzlichen Nierenversagen im Zuge einer exzessiven renalen Hypertension (2, 9).

Besonders in der Anfangsphase der PSS sind oft die Gelenke in Form einer Arthritis betroffen. Dies gilt für bis zu 66% der Patienten. Das Verteilungsmuster ist dem der rheumatoiden Arthritis sehr ähnlich (2).

Zusammenfassend ist die Klinik der PSS sehr heterogen und vom Subtyp der Erkrankung sowie vom Befall der inneren Organe abhängig.

### **1.1.2 Pathogenese der Progressiven Systemischen Sklerodermie**

Zur Pathogenese der systemischen Sklerodermie liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor. Das Zusammenspiel von Faktoren, die zur Entstehung der Krankheit beitragen, ist sehr komplex. Das Blutgefäßsystem, das Immunsystem und das Bindegewebsystem, sind parallel oder sequentiell an der Entwicklung der PSS beteiligt. Auf welche Art und Weise die Störungen dieser drei Systeme miteinander verknüpft sind, ist noch unklar.

Ein Schwerpunkt der PSS ist die Überproduktion von extrazellulärem Bindegewebe. Eine gestörte Interaktion zwischen Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten führt wahrscheinlich zu einer Überproduktion von Zytokinen. Diese wiederum fördern die Produktion von Kollagenen, Tenaskin, Proteoglykanen, Fibronectin, Laminin und Fibrillin-1. Eine Schlüsselrolle spielt der Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), der von Endothelzellen, perivaskulären Entzündungszellen und von Fibroblasten selbst produziert wird. Fibroblasten von PSS-Patienten produzieren weiterhin große Mengen von Interleukinen (IL), wie zum Beispiel IL-6 und IL-8, sowie Platelet-Derived Growth Factor (PDGF). Diese Zytokine können autokrin die Fibroblasten stimulieren und konsekutiv die Produktion von extrazellulärer Matrix steigern. PDGF stimuliert die Fibroblasten zur Synthese von Monocyte-Chemotactant-Protein-1 (MCP-1). Dieses fördert wiederum die Synthese von Kollagen 1 und führt zur vermehrten transendothelialen Migration der Monozyten. (12-15)

Neben verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen könnten auch Autoantikörper für die Aktivierung der Fibroblasten verantwortlich sein. Chizzolini et al zeigten erstmals das Vorhandensein von anti-Fibroblasten-Antikörpern der Klassen IgM und IgG bei der Hälfte der von ihnen untersuchten PSS-Patienten, wobei das

Vorhandensein der anti-Fibroblasten-Antikörper bei der dSSc-Gruppe gegenüber der ISSc-Gruppe überwog. Weiterhin gelang es der Gruppe, erstmals zu beweisen, dass die Inkubation von Fibroblasten mit anti-Fibroblasten-IgG von PSS-Patienten zu einer Steigerung der Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 führt (16).

Auch andere Autoantikörper spielen eine entscheidende Rolle, wobei nicht geklärt ist, ob sie eine primäre ätiopathogenetische Bedeutung haben oder nur eine Begleiterscheinung darstellen. Bei 50-90% der Patienten mit CREST-Syndrom sind Autoantikörper, die sich gegen eines oder mehrere Centromerproteine richten, nachweisbar (CENPs-A, -B und -C). Anti-SCL70-Antikörper können bei 75% der dSSc-Patienten gefunden werden. 5-10% der PSS-Patienten weisen Autoantikörper gegen die RNA-Polymerase III (RNAP III) auf (17). Je nach vorhandenem Autoantikörper tritt bevorzugt eine bestimmte klinische Symptomatik auf. So ist RNAP III assoziiert mit dSSc, einem hohen Skin Thickness Score, dem höchsten Risiko für eine renale Beteiligung und einer kürzeren Überlebensdauer. Patienten mit anti-SCL70 haben ein mittleres Risiko einen Nierenbefall und das höchste Risiko eine pulmonale Fibrose zu erleiden. Anti-SCL70 ist mit dSSc assoziiert. Andererseits haben die PSS-Patienten mit ACA die beste Prognose und das niedrigste Risiko einer renalen und/oder pulmonalen Beteiligung. Vornehmlich findet man hier die limitierte Form der Sklerodermie. Auch andere Autoantikörper treten entweder isoliert oder zusammen mit einer der drei Hauptgruppen auf (16, 17). Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung von Autoantikörpern nicht bekannt ist, ist die Aktivierung von T-Zellen durch die ihnen präsentierten kryptischen Epitope bedeutsam. So genannte „Minor“-Epitope werden seltener von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) präsentiert, als andere „Major“-Epitope. Werden die „Minor“-Epitope während der Ausbildung der Selbsttoleranz der T-Zellen vom Immunsystem „übersehen“, könnten die T-Zellen durch Präsentation eines solchen kryptischen Epitopes aktiviert werden (18).

Weitere Anhaltspunkte für die Beteiligung des Immunsystems bei der Entstehung der PSS bietet das histologische Bild betroffener Organe. Hier fallen, besonders in Haut und Lunge, gefäßnahe lymphozytäre Infiltrate auf. Diese bestehen zu einem großen Teil aus CD8-positiven T-Lymphozyten, die IL-4 produzieren. IL-4 kann wie TGB $\beta$  zu einer vermehrten Kollagensynthese beitragen (19).

Das Blutgefäßsystem stellt die dritte Säule der Pathogenese der PSS dar. Hinweise sind das fast immer bei der PSS auftretende Raynaud-Phänomen und die gleichzeitig vorhandene Mikroangiopathie, die sich u.a. durch Endothelzelldegeneration und Reduplikation der Basalmembran äußert (9). Unterschiedliche Faktoren können an der Umgestaltung des Endothels beteiligt sein. Ein wesentlicher Faktor sind freie Sauerstoffradikale, die im Zuge der lokalen Entzündungsreaktion und durch häufige Reperfusionsschäden (hervorgerufen durch wiederkehrende Raynaud-Attacken) freigesetzt werden. Als freie Radikale bezeichnet man Substanzen, die ungebunden mit einem oder mehreren freien Elektronen existieren können. Diese freien Elektronen sind hochreaktiv und in hohen Konzentrationen toxisch. Auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird oft in diesem Zusammenhang mit genannt, da es sehr schnell mit  $\text{O}_2^-$  reagiert und  $\text{OH}^-$  bildet. Verschiedenste Zellen sind an der Generation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt: kapilläre Endothelzellen produzieren bei akuter Ischämie, katalysiert durch die Xanthinoxidase, freie Sauerstoffradikale. Auch Fibroblasten sowie B-Lymphozyten sind zur ROS-Produktion in der Lage. Ein großer Teil der freien Sauerstoffradikalen wird auch von Makrophagen, eosinophilen Granulozyten und besonders von neutrophilen Granulozyten und Monozyten erzeugt. Sie produzieren ROS in einer NADPH-Oxidase-abhängigen Reaktion, die auch als respiratorischer Burst (RB) bezeichnet wird. Weiterhin führen UV-Strahlung und Nikotin zur Bildung von ROS.

Bei Patienten mit PSS wurde ein Defizit an Antioxidantien wie Ascorbinsäure, alpha-Tocopherol, Beta-Carotin und Selen festgestellt. Alle diese Substanzen werden mit der Nahrung aufgenommen. Die Nahrungszusammensetzung von PSS-Patienten unterscheidet sich jedoch nicht wesentlich von der bei Normalpersonen (20). Deshalb wird angenommen, dass die bei PSS-Patienten durch gastroenterale Mitbeteiligung häufig vorkommende Malabsorption eine Ursache dafür sein könnte. Auch eine veränderte renale Clearance der Antioxidantien wird diskutiert. Zusätzlich gibt es Studien, die zeigen, dass Endothelzellen von Patienten mit Sklerodermie weniger Katalase bilden als Endothelzellen von gesunden Personen. Katalase schützt die Zellen vor Schädigung durch ROS, indem sie die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Im Rahmen der PSS könnte es wegen dieses Defizits an Antioxidantien zu einer erhöhten Anfälligkeit für die von ROS verursachten Schäden kommen (20, 21):

Freie Radikale bewirken eine Zerstörung des Kapillarepithels durch Peroxidation der in der Zellmembran enthaltenen Lipide und Schädigung von Kollagenen und Hyaluronsäuren der Basalmembran. Eine gesteigerte Permeabilität des Endothels ist die Folge. Weiterhin kommt es zur kompensatorischen Neubildung von Basallamina-, Intima- und Fibroblastenzellen. Dies führt zur Einengung des Gefäßlumens und so zur Verstärkung der Ischämie. Durch eine gesteigerte Ischämie werden wiederum mehr freie Radikale produziert (22, 23). So ist ein *circulus virtiosus* entstanden. Es wird zudem angenommen, dass durch eine verdickte Basallamina und Intima die Diffusion von Nährstoffen aus dem Blut ins umliegende Gewebe behindert wird und es so langfristig zu Atrophien kommt (23).

Weiterhin können schon geringe Mengen von freien Sauerstoffradikalen zur Stimulation von Fibroblasten und so zur gesteigerten Produktion von Kollagen führen. Dies könnte einen wesentlichen Beitrag zur Fibrose bei PSS leisten (24).

Zahlreiche weitere Studien zeigen, dass ROS einen bedeutsamen Faktor bei der Pathogenese der PSS darstellen:

Lau et al untersuchten die Plasmakonzentration von Malondialdehyd (MDA). MDA ist ein Marker für die Aktivität von freien Radikalen. Die MDA-Plasmalevel waren bei PSS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht.

Stein et al konnten zeigen, dass die Konzentration von F2-Isoprostanen im Urin von Patienten mit PSS gegenüber von Kontrollpersonen erhöht ist. F2- Isoprostan entsteht bei der durch ROS katalysierten Peroxidation von Arachidonsäure und ist somit ein Marker für durch ROS ausgelösten oxidativen Stress.

Freie Sauerstoffradikale könnten nicht nur für die Veränderungen des Blutgefäßsystems, sondern, speziell bei der PSS, auch zur Produktion von Autoantikörpern (anti-SCL70) beitragen. Casciola-Rosen et al haben gezeigt, dass sklerodermietypische Autoantigene in einer metall- und ROS-abhängigen Reaktion entstehen. ROS führen anscheinend zur Abspaltung von kryptischen Epitopen von Topoisomerase I unter der Bedingung, dass Metall (Eisen oder Kupfer) zuvor an die

Topoisomerase I gebunden hat. Solche Kernantigene könnten aus den durch ROS beschädigten Endothelzellen freigesetzt werden.

Zusammenfassend kann die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale maßgeblich zur Entwicklung der systemischen Sklerodermie beitragen. Daher war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob der respiratorische Burst der o.g. Zellen bei Patienten mit PSS verändert ist.

## **1.2 IRA-Therapie**

Eine physikalische Therapiemaßnahme der systemischen Sklerodermie stellt die Ganzkörperhyperthermie dar. Zur Erhöhung der Körpertemperatur wurden früher vor allem Saunaaufenthalte und warme Bäder, zum Beispiel auch mit Moor, eingesetzt. Dabei erfolgt die Energiezufuhr ausschließlich konduktiv über die Haut, die daher thermisch belastet wird. Dies kann bei den Patienten zu Hautschädigungen oder Unverträglichkeiten führen (28).

Ein neueres Verfahren zur Erhöhung der Körpertemperatur ist die Infrarot-A-(IRA) induzierte Hyperthermie. Hierbei kann ein relativ schneller Anstieg der Körpertemperatur pro Zeiteinheit erreicht werden, ohne dass beim Nutzer Hautirritationen auftreten. Auch unerwünschte systemische Wirkungen sind bei der IRA-Behandlung unwahrscheinlich (29).

Das Prinzip der IRA-Strahlung beruht darauf, dass die Infrarotstrahlen in den tieferen Hautschichten des Koriums und der Subkutis in Wärme umgewandelt werden und es so zur Wärmeeinleitung in die im Korium befindlichen Gefäße kommt. Durch diese Erwärmung des Blutstromes erfolgt ein Anstieg der Körperkerntemperatur. Das Plateau des Kerntemperaturanstieges ist nach ca. 15 Minuten erreicht (30).

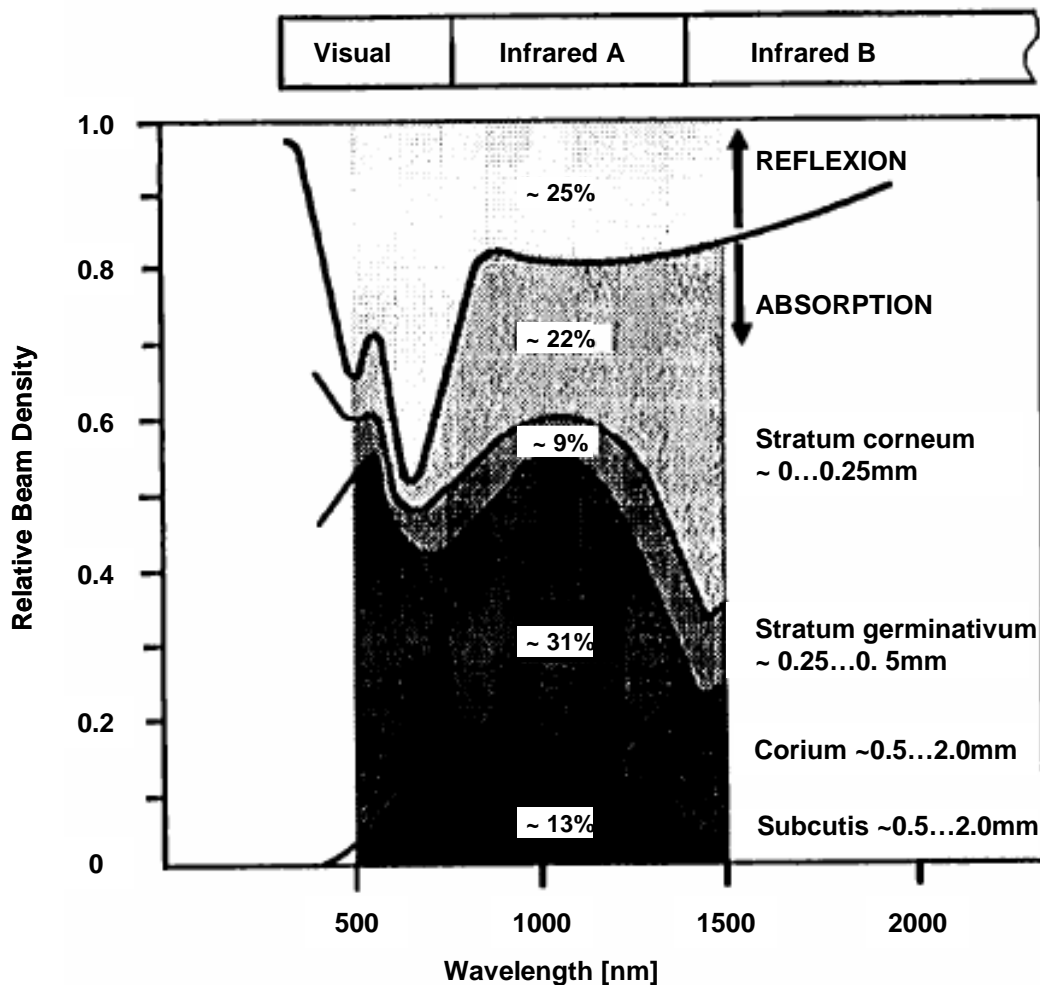
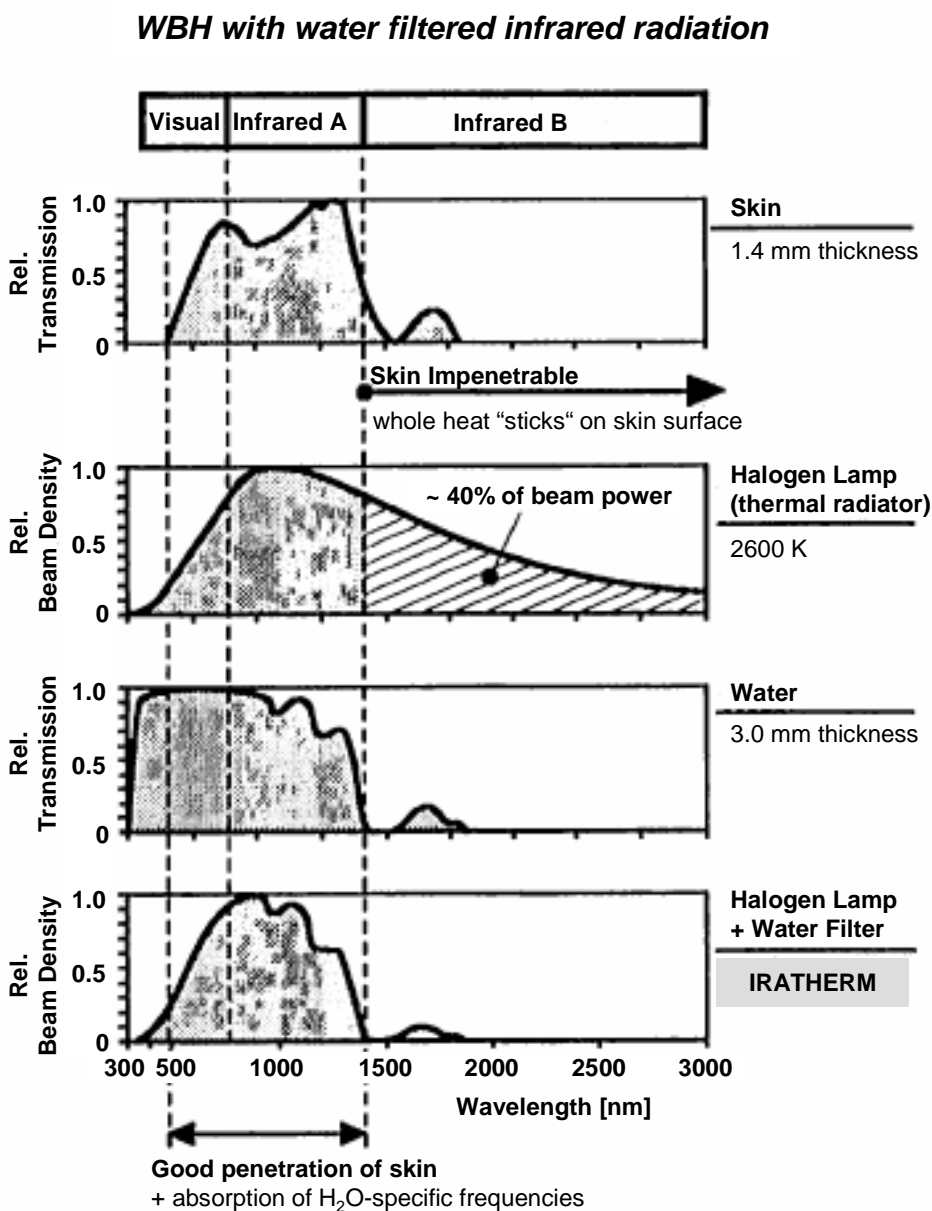


Abb. 1: Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung (Wehner et al. 30)

Die Wärmedurchlässigkeit der Haut beginnt im Bereich des langwelligen sichtbaren Lichts mit einer Wellenlänge von 600 nm und setzt sich in den angrenzenden Infrarot-A-Bereich bis hin zum Licht mit einer Wellenlänge von 1400 nm fort. Lichtstrahlen außerhalb dieses Bereiches (600 bis 1400 nm) können die Haut nicht penetrieren. Daher führt längerwelliges Licht des Infrarot-B- und Infrarot-C-Bereiches zur Erwärmung und Schädigung der obersten Hautschichten, nicht aber zu einem Anstieg der Körperkerntemperatur. Auch die Strahlung der bei der IRA-Therapie verwendeten Halogenlampen enthält noch 40% des schädigenden Infrarot-B- und -C-Lichtes. Um Hautirritationen zu vermeiden, ist es nötig, diese Strahlung zu eliminieren. Dazu verwendet man einen Wasserfilter. Die Haut besteht zu über 70% aus Wasser und weist somit eine ähnliche spektrale Durchlässigkeit wie das Wasser auf. Die schädlichen Infrarot-B- und -C-Strahlen können Wasser genau so wenig wie die Haut durchdringen und werden so durch den Wasserfilter aus dem Licht der Halogenlampe herausgefiltert. Genau wie die Haut ist der Wasserfilter gut durchlässig für Infrarot-A-



Strahlung. Aus dem Infrarot-A-Bereich werden nur schmale Banden (um 940, 1130 und 1380 nm) absorbiert.



**Abb. 2: Penetration der IRA-Strahlung in die Haut** (Wehner et al. 30)

Die in dieser Untersuchung verwendete Iratherm 1000 Infrarot-A-Bestrahlungsanlage des Ardenne Institutes in Dresden bedient sich genau dieser Technik der wassergefilterten IRA-Strahlung. Wegen der guten Hautverträglichkeit der Infrarot-A-Strahlung darf die Bestrahlungsstärke um ein vielfaches höher sein als bei der Verwendung von kommerziellen Infrarot- oder Halogenstrahlern. Ein weiterer Vorteil

der Iratherm 1000 ist ihr offener Bau. Klaustrophobische Zustände des Patienten während der Therapie können so verhindert werden.



**Abb. 3: Iratherm 1000**

Bisher gibt es nur wenige Daten über die therapeutische Anwendung der Infrarot-A-induzierten Hyperthermie.

In der Radioonkologie ist die Verwendung von Infrarot-A-Strahlung bereits verbreitet. Hier wird starke Infrarot-A-induzierte lokale- oder Ganzkörperhyperthermie ( $> 41^{\circ}\text{C}$ ) in Kombination mit Hyperglykämie und Hyperoxämie zur Tumortherapie eingesetzt und es konnte eine Tumorremission unter diesen Bedingungen gezeigt werden (31-34).

Milde Hyperthermie ist definiert als ein Anstieg der Körperkerntemperatur bis auf maximal  $38,5^{\circ}\text{C}$  (35).

Meffert et al zeigten bei Patienten mit arterieller Hypertonie eine signifikante Absenkung des peripheren Gefäßwiderstandes sowie des systolischen und diastolischen Blutdruckes nach einmaliger Behandlung mit IRA-induzierter Ganzkörperhyperthermie. Es kam zu einer Weitstellung der peripheren Gefäße und damit zu einer Verbesserung der peripheren Hämodynamik. Weiterhin wurde ein durch die IRA-Therapie induzierter Abfall der Plasmaviskosität festgestellt. Die Effekte waren 24 Stunden nach Ende der Bestrahlung immer noch nachweisbar (28). Die gleiche Arbeitsgruppe behandelte 13 männliche Patienten mit arterieller Hypertonie mit einer seriellen IRA-Therapie, bestehend aus insgesamt 12 Bestrahlungsterminen über sechs Wochen. Auch hier konnte eine Verbesserung der peripheren Hämodynamik und eine

Absenkung des Blutdruckes noch über die Behandlungsphase hinaus gezeigt werden (35-37).

Solche Effekte wären auch für die Behandlung der systemischen Sklerodermie sinnvoll, da bei PSS-Patienten der periphere Gefäßwiderstand erhöht ist. In einer 1990 in der Dermatologie der Charité durchgeführten Studie wurden 7 Patientinnen mit systemischer Sklerodermie 15 Behandlungen mit milder IRA-Hyperthermie unterzogen. Durch die IRA-Behandlung nahmen die Häufigkeit und die Dauer der Raynaud-Attacken der Patientinnen ab. Durch eine signifikante Verbesserung der akralen Wiedererwärmung (siehe 1.1.1.) wurden diese subjektiven Parameter bestätigt (35).

Wie bereits unter 1.1.2. beschrieben, ist der respiratorische Burst wahrscheinlich ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der PSS. Auch könnten freie Sauerstoffradikale mitverantwortlich für die Einengung der kleinsten Gefäße im Zuge der PSS sein. Es gibt nur wenige Daten zur Auswirkung der IRA-Therapie auf die ROS-Produktion von peripheren Phagozyten. Meffert et al untersuchten den Einfluss serieller milder IRA-Hyperthermie auf die Burst-Aktivität von polymorphkernigen Leukozyten. 11 gesunde Frauen wurden im Rahmen dieser Studie zweimal wöchentlich über sechs Wochen mit wassergefilterter Infrarot-A Strahlung behandelt. Die Blutabnahmen fanden vor der ersten und zweiten, sowie 21 Tage nach der letzten Bestrahlung statt. Nach Isolation der PMN wurden diese mit opsoniertem Zymosan und humanem Gammaglobulin stimuliert. Die intrazelluläre ROS-Konzentration wurde mittels INT-Test und der extrazelluläre ROS-Gehalt mittels Luminol-verstärkter Chemilumineszenz gemessen. Die extrazelluläre und intrazelluläre ROS-Konzentration der mit beiden Stimulantien stimulierten PMN war zwei Tage nach Therapieende signifikant niedriger im Vergleich zu den vor Therapiebeginn gemessenen Werten. Dieser Trend war auch 21 Tage nach Therapieende noch zu sehen. Die unstimulierten Zellen verhielten sich ähnlich. Hier war der Abfall der ROS-Produktion jedoch nicht signifikant (38).

Dieser den respiratorischen Burst der PMN hemmende Effekt der IRA-Therapie könnte auch bei PSS-Patienten vorhanden sein. Hierüber gibt es jedoch bisher noch keine bekannten Daten. Eine Reduktion des RB der PMN könnte eine Erklärung für die bereits beschriebenen Verbesserungen des klinischen Bildes bei mit milder IRA-Hyperthermie behandelten PSS-Patienten liefern.

### 1.3 Der respiratorische Burst (RB)

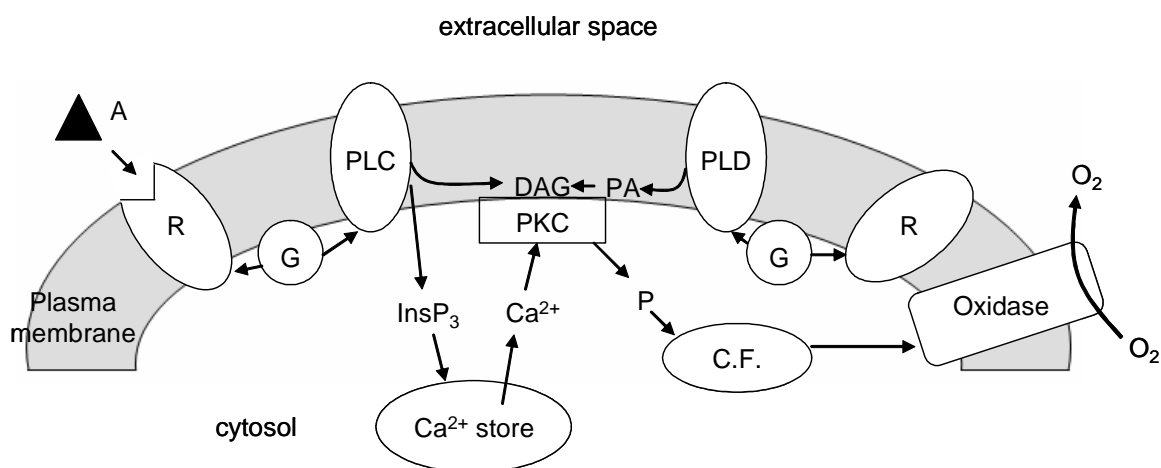
#### 1.3.1 Ablauf und Reaktionen des respiratorischen Bursts

Der respiratorische Burst wurde erstmals 1933 als plötzlicher Anstieg des Sauerstoffverbrauches der Phagozyten beschrieben. Damals wurde vermutet, dass so Energie für den Phagozytosevorgang gewonnen wird. Seine wichtige Rolle für die Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen wurde erst mit der Entdeckung der chronischen Granulomatose (CGD) deutlich. Patienten mit CGD leiden unter schweren Bakterien- und Pilzinfektionen, da ihre Phagozyten nicht zum RB befähigt sind (39).

Die Abtötung und Phagozytose von Mikroorganismen beruht auf zwei wesentlichen Prozessen. Der respiratorische Burst resultiert aus der Zusammensetzung der NADPH-Oxidase aus einem membranständigen Flavocytochrom und mehreren Plasmaproteinen. Bei der CGD liegt entweder ein genetischer Defekt der zytoplasmatischen Komponenten oder des Flavocytochroms vor. Somit kann die durch die NADPH-Oxidase katalysierte Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $O_2^-$  nicht stattfinden. Der zweite für die Phagozytose essentielle Vorgang ist die Degranulation. Hierbei wird der Inhalt der zytoplasmatischen Granula in die Phagolysosomen abgegeben. Zusammen führen diese beiden Ereignisse zur Abtötung und Verdauung der phagozytierten Mikroorganismen (40, 41).

Der RB wird durch die Bindung eines Agonisten an einen spezifischen Membranrezeptor ausgelöst. Beispiele für physiologische Agonisten sind Komplementfaktor C5a, N-Formyl-Methionyl-Peptid (fMLP), Platelet-Activating Factor (PAF) und Leukotrien B<sub>4</sub>. Andere Stimulantien wie 4b-Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) und Zymosan sind nicht physiologisch, können aber ebenfalls den RB auslösen. Die Stärke der durch einen bestimmten Agonisten ausgelösten Burstreaktion ist abhängig von der Zahl der besetzten Membranrezeptoren (40, 42). Der Rezeptor ist an ein GTP-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelt. Dieses aktiviert seinerseits die Phospholipase C, D und A. Die wichtige Rolle des G-Proteins zeigt sich, wenn es durch Bordetella pertussis Toxin außer Funktion gesetzt wird: der RB kann nicht

ablaufen. Die Phospholipase C spaltet das Phospholipid  $P_2$ -Phosphatidylinositol und es entstehen Diacylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ).  $IP_3$  bindet an die Membranrezeptoren intrazellulärer Kalziumspeicher und es folgt ein schneller Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol. Auch der Einstrom von extrazellulärem Kalzium wird durch die Öffnung spezieller Kalziumkanäle gesteigert. Dies ist aber nicht unbedingt für den Ablauf des RB notwendig. DAG, der zweite entstandene Second Messenger, führt zur Translokation der Proteinkinase C (PKC) aus dem Zytosol zur Zellmembran und induziert die von der PKC katalysierten kalziumabhängigen Phosphorylisationsreaktionen (siehe Abb. 4). Es ist allerdings nicht bekannt, welcher PKC-Isotyp hier entscheidend ist (39-43). Eine zweite Quelle für DAG ist die Phospholipase D (PLD). Sie katalysiert die Generation von Phosphorsäuren aus Membranphospholipiden, die im nächsten Schritt durch eine Phosphohydrolase zu Diacylglycerin umgewandelt werden. Weiterhin wurde eine direkte Stimulation der NADPH-Oxidase durch Phosphorsäure beschrieben (44). Die Rolle der Phospholipase A (PLA) bei der Aktivierung des RB ist noch nicht vollständig geklärt. Durch ihre Aktivierung kommt es zur Bildung von Arachidonsäure. Diese ist höchstwahrscheinlich, neben dem bereits erwähnten  $IP_3$ , DAG und  $Ca^{2+}$ , ein weiterer für den Burst wichtiger Second Messenger (42). Auch wird über eine unmittelbare Aktivierung der Oxidase durch Arachidonsäure spekuliert (45).

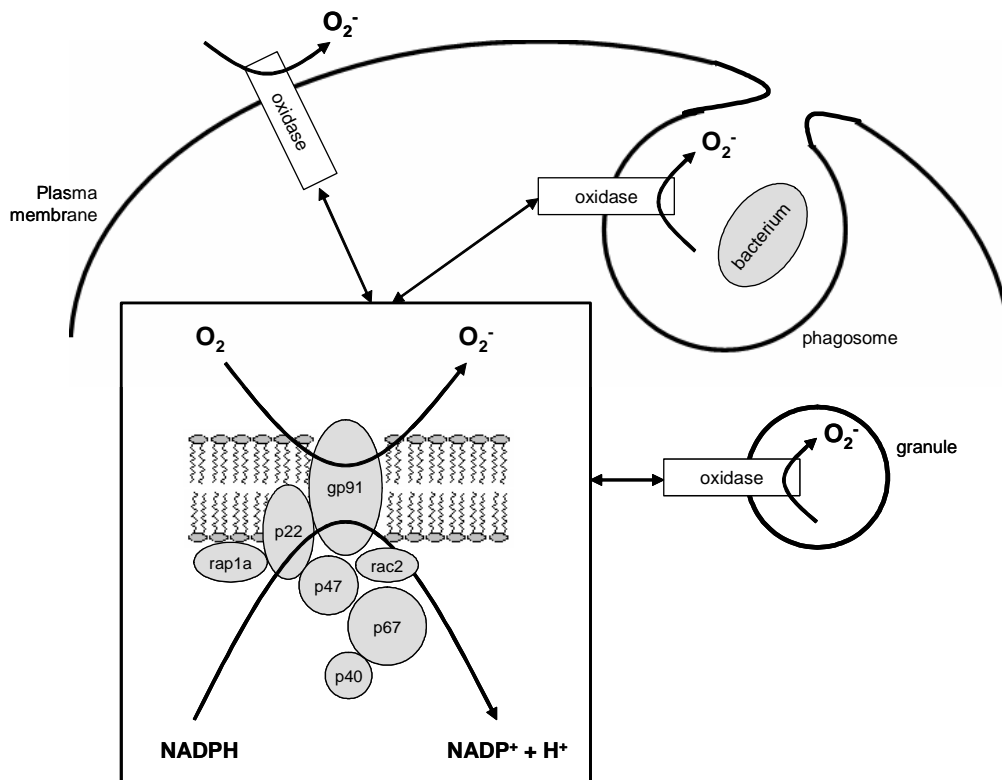


**Abb. 4: Der zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führende Signalweg** in neutrophilen Granulozyten; A: Antigen; R: Rezeptor; PLC: Phospholipase C; G: G-Protein; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; InsP<sub>3</sub>: Inositoltrisphosphat; PA: Phosphorsäure; C.F.: zytosolische Faktoren (angelehnt an Morel et al. 42)

Die beschriebenen Reaktionen sind zur Zusammensetzung der für den Burst verantwortlichen NADPH-Oxidase wichtig. Die funktionsfähige Oxidase besteht aus

mehreren Komponenten. Das Flavocytochrom  $b_{558}$  ist der membranständige Anteil. Es befindet sich in der Plasmamembran und in den Membranen der sekundären Granula der Phagozyten. Cytochrom  $b_{558}$  besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit (21 kDa bzw. 75-91 kDa), die wegen ihres Molekulargewichtes  $p21phox$  und  $gp91phox$  heißen.  $Gp91phox$  stellt den eigentlichen Elektronentransporter der aktiven Oxidase dar (46). Weitere Teile der NADPH-Oxidase befinden sich im Zytoplasma. Es handelt sich um die Proteine  $p47phox$  und  $p67phox$ . Um an das membranständige Flavocytochrom binden zu können, müssen  $p47phox$  und  $p67phox$  durch die aktivierte PKC phosphoryliert werden. Diese Reaktion ist kalziumabhängig (42, 47-49). Ein weiteres Protein, das zur Aktivierung der NADPH-Oxidase beitragen könnte, ist  $p40phox$ . Es bildet einen Komplex mit  $p67phox$  und transloziert ebenfalls zur Membran. Im zellfreien System ist es aber nicht zur Aktivierung der Oxidase nötig, weshalb seine genaue Rolle unklar ist (46-49). Es wird spekuliert, ob die drei zytosolischen Komponenten zu korrekten Konformation des Flavocytochroms beitragen sowie darüber, ob sie für die Bindung des Substrates NADPH und für den Elektronenfluss durch den Cytochromkomplex nötig sind (50).

Auch ist es wahrscheinlich, dass zusätzlich zwei kleine G-Proteine an der Bildung der NADPH-Oxidase beteiligt sind. Zum einen wird von einer Bindung von  $rap1A$  an das Flavocytochrom berichtet.  $rap1A$  könnte für die Positionierung des Cytochroms  $b_{558}$  an bestimmten Stellen der Membran verantwortlich sein. Zum anderen wurde gezeigt, dass nach der Stimulation von Neutrophilen das zytoplasmatische G-Protein  $p21rac$  gleichzeitig mit  $p47phox$  und  $p67phox$  zu Membran transloziert und wahrscheinlich an  $p67phox$  bindet.  $p21rac$  kommt in zwei Unterformen,  $rac1$  und  $rac2$ , vor. Ob es für den Burst essentiell ist, ist noch unklar (39, 41, 43). Durch Bindung der phosphorylierten Plasmaproteine an das Flavocytochrom kommt es letztendlich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase.

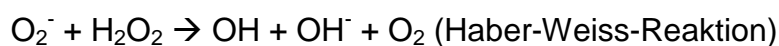
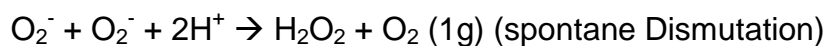
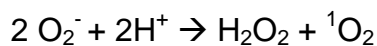


**Abb. 5: Zusammensetzung und Aktivierung der NADPH-Oxidase** in humanen neutrophilen Granulozyten (angelehnt an Dahlgren et al. 41)

Im aktiven Zustand übernimmt das Cytochrom  $b_{558}$  die Rolle eines Flavoproteins. Flavoproteine enthalten Flavinabkömmlinge, mit deren Hilfe sie Elektronen von einem Substrat auf einen Akzeptor übertragen können. In diesem Fall transferiert das Flavocytochrom  $b_{558}$  ein Elektron von NADPH im Zytosol zu einem extrazellulären oder intraphagolysosomalen Sauerstoffmolekül und es entsteht  $O_2^-$ . Der Vorgang lässt sich durch folgendes Reaktionsschema beschreiben (39, 42, 51):



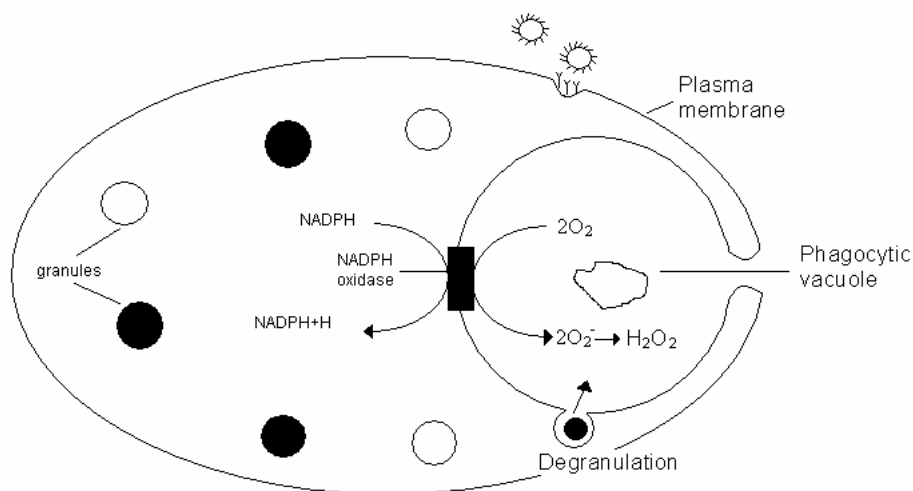
Durch weitere Reaktionen werden auch andere reaktive Sauerstoffspezies wie  $^1O_2$ ,  $OH^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$  und  $HOCl$  gebildet (52):



Die hypochlorige Säure entsteht unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Chloridionen. Diese Reaktion wird von der Myeloperoxidase, die speziell in den Phagolysosomen aktiv ist, katalysiert (51):



Die so entstandenen ROS sind zwar in hohen Konzentrationen zytotoxisch, jedoch sind sie nicht allein für die Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen verantwortlich.  $\text{O}_2^-$  und  $\text{OH}^-$  nehmen im Phagolysosomen Protonen auf. Dies führt zur Anhebung des pH-Wertes auf Werte bis 8,0. In den Granula der PMN herrscht ein saurer pH-Wert. Unter diesen Bedingungen sind die granulären Proteinasen inaktiv. Bei der Fusion von Granula mit dem Phagolysosomen kommt es dann zur Ausbildung eines normalen pH-Wertes, was die Voraussetzung für die Aktivierung der Enzyme darstellt (39). Also sind die im Rahmen des RBs gebildeten ROS auch für die Aktivierung der zur Spaltung von phagozytiertem Material wichtigen Enzyme nötig.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des Respiratorischen Bursts** im Zuge der Phagozytose eines Mikroorganismus (angelehnt an Wientjes et al. 39)

Der durch die aktivierte NADPH-Oxidase bewirkte Auswärtsstrom von Elektronen führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials. Die gleichzeitig entstehenden Protonen bleiben zunächst in der Zelle. Nach einer kurzen Zeit bleibt das Membranpotential jedoch stabil, obwohl weiterhin Superoxide gebildet werden. Die



Öffnung von mit der NADPH-Oxidase assoziierten Protonenkanälen und ein daraus resultierender Protonenausstrom ist dafür verantwortlich (50).

Das Ende der NADPH-Oxidaseaktivität könnte durch Dephosphorylierung von p47phox und p67phox oder durch Inaktivierung der G-Proteine bzw. Unterbrechung der Bindung des Stimulus an den Membranrezeptor ausgelöst werden (43).

Der RB dient nicht nur der Abtötung von Mikroorganismen, sondern kann auch körpereigenes Gewebe schädigen. Dieser Umstand könnte ein Grund für die oben beschriebene komplexe Reaktionskette, die zur Aktivierung des RB nötig ist, sein. Der Burst sollte nicht unnötig ausgelöst werden. Trotz der zahlreichen notwendigen Reaktionen dauert es nur ca. zwei Sekunden den RB bei unstimulierten Neutrophilen zu induzieren. Der Burst endet jedoch sofort, sobald der stimulierende Rezeptoragonist von seinem Rezeptor gelöst wird (40).

### **1.3.2 Stimulation des respiratorischen Bursts mit Zymosan und PMA**

Es gibt zahlreiche Substanzen zur Stimulation des RB bei Leukozyten (siehe 1.3.1).

Bei dem häufig verwendeten Zymosan handelt es sich um Zellwandpartikel von Hefezellbakterien, die hauptsächlich aus Polysacchariden bestehen.  $\beta$ -Glucan und Mannan stellen die Hauptbestandteile dar. Zymosan ist ein eher schwacher Stimulus des respiratorischen Bursts und führt daher nur zu einer suboptimalen Anregung der leukozytären ROS-Produktion. In vivo findet eine Opsonierung des Zymosans durch IgG und Komplementfaktoren statt. Dadurch wird die Bindung und Phagozytose der Zymosanpartikel erleichtert. Es ist wahrscheinlich, dass im Vollblutassay gleiche Opsonierungsprozesse ablaufen, da die hier herrschenden Bedingungen dem physiologischen Milieu sehr ähnlich sind. Nicht opsoniertes Zymosan, wie es in serumfreien in vitro Systemen vorkommt, bindet deutlich schlechter an Phagozyten und führt deshalb zu einem schwächeren Burst als opsoniertes Zymosan. Dies wird dadurch bewiesen, dass bei der Stimulation von isolierten Leukozyten mit nicht opsoniertem Zymosan eindeutig schwächere Chemilumineszenzsignale detektiert werden als mit opsoniertem Zymosan (53, 54). Lieberman et al (55) verglichen den RB von Neutrophilen stimuliert mit opsoniertem und nicht opsoniertem Zymosan im Vollblut. Der von der amerikanischen Arbeitsgruppe verwendete Assay entspricht in

weiten Teilen der in dieser Untersuchung eingesetzten Methode. Dihydrorhodamin wurde als Indikator für die Produktion von Wasserstoffperoxid eingesetzt. Die Messung des RB erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Die Gruppe konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen einem durch opsoniertes und einem durch nicht opsoniertes Zymosan stimulierten Burst feststellen. Durch Opsonierung von Zymosan wurde im Vollblutassay also keine höhere Effektivität in Bezug auf die Auslösung des RBs erreicht. Basierend auf diesen Ergebnissen und unter der Vorgabe, einen möglichst schwachen Stimulus im Vergleich zu einer sehr potenten Substanz einzusetzen, wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht opsoniertes Zymosan zur Anregung des RBs verwendet.

Eine weitere wichtige Frage ist, welcher Rezeptor für die Bindung von Zymosan und so für die Auslösung des RB verantwortlich ist. Hier wird vor allem die Bedeutung des Komplementrezeptors 3 (CR3) diskutiert. Ezekowitz et al (56) bewiesen schon sehr früh eine Bindung von Zymosan an den monozytären CR3. Es wurde gezeigt, dass die Aufnahme von Zymosan durch Monozyten unterdrückt wird, wenn die Zellen zuvor mit anti-CR3-Antikörpern inkubiert werden. Des Weiteren wurde belegt, dass Monozyten, um Zymosan im serumfreien System binden zu können, aktiv iC3b sezernieren. Dieser CR3-Ligand bindet an die Zymosanpartikel und macht eine CR3-vermittelte Phagozytose und einen Zymosan-stimulierten respiratorischen Burst möglich. Monozyten können also ohne Probleme auch nicht opsoniertes Zymosan binden. Anders verhält es sich bei Neutrophilen. Sie sind nicht in der Lage, Komplementproteine zu sezernieren. Neutrophile exprimieren zwar den Komplementrezeptor 3, können aber nicht opsoniertes Zymosan nur zu einem geringeren Prozentsatz binden. Trotzdem ist auch eine deutliche Zunahme der neutrophilen ROS-Produktion nach Inkubation mit nicht opsoniertem Zymosan sichtbar (57). Es ist anzunehmen, dass auch bei Neutrophilen der Komplementrezeptor 3 für die Bindung des Zymosans und so für die Auslösung des RB verantwortlich ist. Leino et al konnten nach Inkubation von isolierten Neutrophilen mit nicht opsoniertem Zymosan einen starken Anstieg der mittels Chemilumineszenz gemessenen ROS-Produktion dokumentieren. Dieser Effekt blieb unter der Verwendung von Neutrophilen von CR3-defizienten Kühen aus. Dies bestätigt die Bindung von Zymosan an CR3. Weiterhin war der Ablauf des RB vom Vorhandensein von Kalzium- und Magnesiumionen im Extrazellularraum abhängig. Dies wurde dadurch begründet, dass

CR3 vier extrazelluläre Bindungsstellen für Kationen aufweist, ohne deren Besetzung der Burst wahrscheinlich nicht möglich ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass Monozyten Neutrophile zur Reaktion mit nicht opsoniertem Zymosan befähigen können: Ekowitz et al inkubierten Monozyten mit nicht opsoniertem Zymosan. Danach erfolgte die Zugabe von Neutrophilen. Die Neutrophilen bildeten Cluster um die Monozyten und setzten große Mengen an  $O_2^-$  frei. Dies wurde im NBT-Test gemessen. Es ist also anzunehmen, dass Monozyten opsonierende Faktoren sezernieren, die dazu führen, dass auch Neutrophile mit einem RB auf nicht opsoniertes Zymosan reagieren.

Es ist wahrscheinlich, dass diese Prozesse neben der oben beschriebenen Opsonierung durch IgG und Komplement auch unter den Bedingungen eines in vitro Vollblutassays ablaufen.

Auch die Toll-like-Rezeptoren (TLR) werden als Vermittler des neutrophilären, durch Zymosan ausgelösten RB diskutiert. Ursprünglich wurden Toll-like-Rezeptoren als wichtige Komponenten der Embryogenese und des Immunsystems der Drosophila beschrieben. Jedoch auch bei der menschlichen Immunabwehr spielen sie eine große Rolle (58). Im Jahre 1997 wurden humane TLR entdeckt. Bis jetzt sind 11 verschiedene humane TLR beschrieben. Sie alle übernehmen wichtige Funktionen des menschlichen Immunsystems. TLR erkennen spezielle „Pathogen-associated-molecular-Patterns“ (PAMPs) und weisen daher eine hohe Spezifität bei der Erkennung von Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten auf. Der genaue Mechanismus, mit dem ein Ligand an den TLR bindet, ist jedoch noch unbekannt. Durch die Bindung eines Liganden an die TLR wird eine allen TLR gemeinsame Signalkette ausgelöst, an deren Ende die Aktivierung und Translokation des nukleären Faktors- $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) steht. Diese führt dann wiederum über mehrere Schritte zur Sekretion von  $TNF\alpha$  und anderen proinflammatorischen Zytokinen (58, 59). Seit längerem ist bekannt, dass TLR-2 Zymosan bindet und über eine NF- $\kappa B$ -Aktivierung zur Produktion von  $TNF\alpha$  führt (60). Weitere Liganden für TLR-2 sind Peptidoglycane, Bestandteile der Zellwand gram-positiver Bakterien, sowie ara-Lipoarabinomannan (araLAM), ein Bestandteil des Mycobakterium tuberculosis (61). TLR-2 wird besonders von Monozyten, aber auch von Neutrophilen, gebildet. Dies geht aus Experimenten von Kurt-Jones et al (61) hervor. Die Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass TLR-2 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des RB spielt: nach Präinkubation mit GM-CSF reagierten Neutrophile auf eine Stimulation mit den TLR-2-Liganden

Zymosan, Peptidoglycan und araLAM mit einem deutlichen Anstieg der ROS-Produktion. Die Tatsache, dass eine vermehrte ROS-Produktion auch nach Stimulation mit einem monoklonalen anti-TLR-2-Antikörper erfolgte, bestätigt, dass eine Bindung an TLR-2 zur Auslösung des RB führt. Auch diese Reaktion war jedoch GM-CSF-abhängig. Eine TLR-2-abhängige Aktivierung des RB wird auch von anderen Gruppen bestätigt (58, 62). Neueste Studien postulieren, dass Zymosan nicht nur von TLR-2 allein, sondern von einem Dimer aus TLR-2 und TLR-6 gebunden wird (59).

Auch weitere Toll-like-Rezeptoren sind an der Auslösung des phagozytären RB beteiligt. TLR-4 wird ebenfalls von Neutrophilen exprimiert. Dieser Rezeptor ist vor allem für die Erkennung von gram-negativen Bakterien zuständig. Es ist bekannt, dass eine LPS-Bindung an TLR-4 eine Steigerung der ROS-Produktion bei neutrophilen Granulozyten zur Folge hat (60, 63).

Zusammenfassend ist nicht opsoniertes Zymosan ein schwacher Stimulus des RB von Neutrophilen und Monozyten. Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, dass Zymosan an den von Neutrophilen und Monozyten exprimierten Komplementrezeptor 3 und/oder an ein Dimer aus TLR-2 und TLR-6 bindet und dadurch den respiratorischen Burst auslöst.

Im Gegensatz zu Zymosan ist Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) ein starker Stimulus der NADPH-Oxidase vermittelten ROS-Produktion. PMA ist ein Substituent für Diacylglycerin (DAG) und führt so zu einer direkten Aktivierung der intrazellulären Proteinkinase C. Die Stimulation durch PMA ist also unabhängig von Membranrezeptoren und extrazellulären Faktoren. Dies wird dadurch bestätigt, dass PMA-induzierte Reaktionen nicht durch chemische Veränderungen der äußeren Zellmembran beeinflusst werden. Außerdem ist die Stimulation durch PMA nicht mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration assoziiert, denn PMA führt zu einem starken Anstieg der Kalziumaffinität der PKC, so dass die natürlicherweise in der Zelle vorherrschende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Aktivierung der PKC ausreicht (42, 55, 64).

Lieberman et al (55) konnten zeigen, dass die PMA-Stimulation von Neutrophilen im Vollblut einem „Alles-oder-Nichts-Gesetz“ zu folgen scheint: bis zu einer bestimmten PMA-Konzentration (zwischen 20 und 50 ng/ml) zeigten sich, bezogen auf den RB, nur

wenige positive Zellen. Wurde PMA in höherer Konzentration zur Stimulation eingesetzt, dann erfolgte die Aktivierung des RB bei fast allen Zellen. Der MFI der positiven Zellen stieg abhängig von der PMA-Konzentration an bis ein Plateauwert erreicht wurde. Dies war bei einer PMA-Konzentration von 2 µg/ml der Fall.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch die rezeptorunabhängige Stimulation mit PMA eine sehr starke Burst-Reaktion ausgelöst wird, die unter physiologischen Bedingungen nicht auftritt.

## 1.4 Zytokine

### 1.4.1 Die Bedeutung von Zytokinen für die Pathogenese der PSS und für den respiratorischen Burst

Unter 1.1.2 wurden bereits die wichtigsten Faktoren der Pathogenese der PSS beschrieben. Es ist wahrscheinlich, dass, neben den bereits genannten Einflüssen, auch Zytokine einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung und Progression der Sklerodermie leisten. Nach einer initialen Phase, in der sich inflammatorische Zellen in den perivaskulären Gebieten der Haut und der inneren Organe sammeln, folgt die Fibrose. Diese wird, wie schon erwähnt, durch eine gesteigerte Produktion von Kollagenen, Proteoglykanen und Fibronectin durch aktivierte Fibroblasten ausgelöst. Der genaue Mechanismus der Fibroblastenaktivierung ist noch nicht vollständig geklärt. Proinflammatorische Zytokine könnten hier eine wichtige Rolle spielen.

Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass Zytokine den Burst durch „Priming“ der Phagozyten steigern. Der genaue Mechanismus dieses „Primings“ ist unbekannt. Durch Inkubation der Phagozyten mit einem primenden Stoff wird jedoch die ROS-Produktion dieser geprimten Zellen, nach Auslösung des RB, durch einen entsprechenden Stimulus gesteigert. Der respiratorische Burst präinkubierter Zellen ist dann stärker als der Burst unbehandelter Phagozyten (39).

#### 1.4.1.1 TNF $\alpha$

Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) ist ein sehr potenter proinflammatorischer Mediator mit einem weiten Funktionsspektrum. TNF $\alpha$  wird von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen produziert und bewirkt unter anderem eine verstärkte Adhäsion von Phagozyten und proinflammatorischen Zellen an die Endothelzellen durch gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen. Dies führt zu einer vermehrten Einwanderung dieser Zellen in die perivaskuläre Matrix (65).

Zusätzlich ist bekannt, dass  $\text{TNF}\alpha$  die ROS-Produktion steigern kann: durch Präinkubation mit  $\text{TNF}\alpha$  wird nach Gallová et al (66) die spontane ROS-Produktion und die durch PMA und opsoniertes Zymosan stimulierte ROS-Produktion von Neutrophilen und Monozyten gesteigert. Die Arbeitsgruppe von Niwa et al (67) kommt zu dem gleichen Ergebnis. Auch eine Zunahme des fMLP-stimulierten Burst von humanen Neutrophilen durch  $\text{TNF}\alpha$  wurde beschrieben (68, 69).

Weiterhin scheint eine gemeinsame Inkubation der Phagozyten mit  $\text{TNF}\alpha$  und GM-CSF zu einem gesteigerten Priming-Effekt, im Vergleich zur Inkubation mit nur einem der beiden Zytokine, zu führen (siehe 1.4.1.4). Es wird vermutet, dass ein durch  $\text{TNF}\alpha$  hervorgerufenes Priming die Phosphorylierung eines Majorpeptides von *p47phox* auslöst (70). Dadurch könnten weitere Phosphorylierungen von *p47phox*, die zur Aktivierung der NADPH-Oxidase nötig sind, begünstigt werden (siehe 1.4.1.4). Zusätzlich zu seiner Rolle für den RB ist es wahrscheinlich, dass  $\text{TNF}\alpha$  auch zur Ausprägung der klinischen Symptomatik der PSS beiträgt. Hasegawa et al (71) und Scala et al (72) verglichen  $\text{TNF}\alpha$ -Serumwerte zwischen PSS-Patienten und Normalpersonen und stellten höhere  $\text{TNF}\alpha$ -Serumkonzentrationen bei Patienten mit systemischer Sklerodermie fest. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Serum der Patienten und einer vorhandenen pulmonalen Fibrose sowie einer verminderten Vitalkapazität beschrieben.

#### 1.4.1.2 IL-6

Auch das von Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen, Endothelzellen und Fibroblasten produzierte IL-6 ist ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und Progression der PSS. Die Hauptaufgabe von IL-6 ist die Förderung der B-Zell-Differenzierung zur antikörperproduzierenden Zelle. Die Höhe der IL-6-Konzentration im Serum scheint mit dem Schweregrad der PSS zu korrelieren. So fanden Sato et al (73) signifikant höhere IL-6-Serumwerte bei Patienten mit dSSc als bei Patienten mit ISSc. Des Weiteren stellte die Arbeitsgruppe eine Korrelation zwischen erhöhten IL-6-Serumwerten und der Höhe des Modified Rodnan Skin Scores (MRSS) sowie dem Vorhandensein einer entzündlichen Myositis fest. Auch wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen den IL-6-Serumwerten und dem Vorkommen der pulmonalen Fibrose beschrieben.

(73). Sato et al konnten jedoch keinen Unterschied zwischen den IL-6-Serumwerten bei PSS-Patienten insgesamt und Normalpersonen feststellen. Scala et al gelang es, hier eine signifikante Abweichung zu zeigen.

Auch für IL-6 wird eine steigernde Wirkung auf die ROS-Produktion beschrieben. Gallová et al konnten nachweisen, dass Neutrophile, die mit IL-6 inkubiert wurden, unstimuliert und stimuliert mit opsoniertem Zymosan mehr ROS produzierten als Neutrophile, die nicht mit IL-6 behandelt wurden. Auch die PMA-stimulierte monozytäre ROS-Produktion wurde durch IL6 gesteigert. Es gibt jedoch auch gegensätzliche Resultate: Elbim et al (74) konstatieren einen nicht vorhandenen Einfluss des Zytokins auf den respiratorischen Burst der Neutrophilen. Die Inkubation von Vollblut mit IL-6 löste bei den neutrophilen Granulozyten keinen RB aus und eine anschließende Stimulation mit fMLP führte zu keinem stärkeren Burst als bei nicht mit IL-6 behandelten Zellen. Somit ist der Einfluss von IL-6 auf die phagozytäre ROS-Produktion umstritten.

Des Weiteren konnten Duncan et al (75) einen direkten Einfluss von IL-6 auf die Produktion von extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten nachweisen: dermale Fibroblasten, die mit IL-6 inkubiert wurden, wiesen eine gesteigerte Kollagen- und Glykosaminoglykanproduktion auf. Die Synthese von Fibronectin blieb durch IL-6 unbeeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-6 für die verstärkte Aktivierung der Fibroblasten im Rahmen der PSS mitverantwortlich sein könnte.

#### 1.4.1.3 IL-10

Im Gegensatz zu  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 ist Interleukin 10 (IL-10) ein eher antiinflammatorisch wirksames Zytokin. Es wird von T- und B-Zellen, Makrophagen und Monozyten gebildet. IL-10 verhindert die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten und vermindert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, besonders die der Th1-Zellen (65). Auch die IL-10-Serumwerte scheinen mit dem Schweregrad der PSS assoziiert zu sein. IL-10-Serumwerte von dSSc-Patienten wurden gegenüber denen von ISSc-Patienten als erhöht beschrieben (73). Auch konnte für die IL-10-Serumwerte ein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten einer pulmonalen Fibrose, einer



entzündlichen Myositis und der Höhe des MRSS gezeigt werden. Jedoch gelang es weder Scala et al noch Sato et al, Unterschiede zwischen den IL-10-Werten im Serum von PSS-Patienten (ISSc und dSSc zusammen) und von Normalpersonen zu finden. Lediglich die IL-10-Produktion von stimulierten T-Zelllinien war bei Patienten mit Sklerodermie im Vergleich zu Normalpersonen verstärkt (72, 73). Auch die Mitbeteiligung von Ösophagus und Nieren im Rahmen der PSS scheint im Zusammenhang mit der Höhe der IL-10-Produktion von T-Zellen zu stehen (72). Weiterhin wurde für IL-10 eine Herunterregulation der phagozytären ROS-Produktion beschrieben: Makrophagen, die mit IL-10 präinkubiert wurden, produzierten signifikant weniger  $H_2O_2$  und  $TNF\alpha$  als unbehandelte Makrophagen (66, 76). Im Gegensatz dazu konnten Gallová et al keinen Einfluss von IL-10 auf den respiratorischen Burst von Neutrophilen und Monozyten nachweisen: Präinkubation mit IL-10 führte zu keiner Veränderung der unstimulierten und mit PMA und opsoniertem Zymosan stimulierten ROS-Produktion. Diese Ergebnisse wurden von weiteren Arbeitsgruppen bestätigt (77). Ein Einfluss von IL-10 auf die Produktion von ROS ist also nicht sicher.

#### 1.4.1.4 GM-CSF

Der Granulozyten-Monozyten-Colony-stimulating-Factor (GM-CSF) wird ebenfalls als bedeutend für den phagozytären respiratorischen Burst angesehen. GM-CSF wird vorrangig von T-Zellen und Makrophagen, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Die wichtigste Aufgabe dieses Zytokins ist die Proliferationsanregung der Granulozyten- und Makrophagenvorgängerzellen sowie die Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen (65).

GM-CSF könnte für die Pathogenese der Sklerodermie insofern bedeutsam sein, dass durch Priming der Phagozyten eine Steigerung des respiratorischen Bursts erreicht wird. GM-CSF bewirkt keine direkte Aktivierung der ROS-Produktion, jedoch die anfängliche Inkubation von Neutrophilen oder Vollblut mit GM-CSF führt zu einer Steigerung der fMLP-induzierten  $H_2O_2$ -Produktion (68, 69, 74). Die gleichzeitige Inkubation der Neutrophilen mit GM-CSF und  $TNF\alpha$  führt sogar zu einem stärkeren Priming-Effekt des Bursts als die Inkubation mit nur einem der beiden Zytokine allein (69). Dewas et al (70) konnten zeigen, dass die Inkubation von humanen Neutrophilen

mit GM-CSF zu einer partiellen Phosphorylierung von p47 $phox$  führt. GM-CSF bewirkte die Phosphorylierung eines Majorpeptides des p47 $phox$ . Dieses Majorpeptid war das Gleiche, welches auch durch Inkubation der Neutrophilen mit TNF $\alpha$  verstärkt phosphoryliert wurde (siehe 1.4.1.1). GM-CSF allein war stärker wirksam als TNF $\alpha$ . Wurde jedoch mit beiden Zytokinen gleichzeitig inkubiert, zeigte sich ein additiver Effekt. Nach Inkubation der Zellen mit den Zytokinen wurden sie mit fMLP stimuliert. fMLP führt zur Phosphorylierung von mehreren Minorpeptiden des p47 $phox$ . GM-CSF und TNF $\alpha$  vereinfachten wahrscheinlich diese Reaktionen. Dewas et al spekulierten, dass sich darauf der durch die Zytokine hervorgerufene Priming-Effekt des RB begründen lassen könnte.

Ahmad et al (78) untersuchten den Einfluss von GM-CSF auf den respiratorischen Burst bei Neugeborenen mit einem Geburtsgewicht von unter 1200g. Die Neugeborenen wurden mit rekombinantem humanem GM-CSF behandelt. Nach Abschluss der Therapie sah man einen signifikant angestiegenen Burst der neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zu den vor der Behandlung gemessenen Werten. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass eine systemisch erhöhte GM-CSF-Konzentration zur Steigerung des RB führen könnte.

Ein genauer Zusammenhang zwischen der systemischen Sklerodermie und den Wirkungen des GM-CSF ist nicht klar. Jedoch liegt es nahe, dass GM-CSF eine Steigerung des RBs der Phagozyten durch Priming induzieren kann.

Zusammenfassend deutet die vorliegende Literatur darauf hin, dass die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 und GM-CSF eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sklerodermie zu spielen scheinen. Weiterhin können TNF $\alpha$ , GM-CSF und IL-6 eine steigernde Wirkung auf den respiratorischen Burst der Phagozyten ausüben. Ob dieser Effekt eine Rolle im Zusammenhang mit der systemischen Sklerodermie spielt ist unklar.

### 1.4.2 Induktion von Zytokinen durch Hyperthermie

Ein Effekt von Hyperthermie auf die Zytokinproduktion ist noch nicht bewiesen. Es ist jedoch gesichert, dass es Wirkungsunterschiede zwischen starker und milder Hyperthermie gibt. Starke Hyperthermie ( $> 39^{\circ}\text{C}$ ) scheint eher zu einem Anstieg der Zytokinproduktion zu führen.

Ein gutes Beispiel hierfür liefern die Untersuchungen von Robins et al (81). Die Gruppe zeigte, dass eine Ganzkörperhyperthermie von einer Stunde mit einer Spitzentemperatur von  $41,8^{\circ}\text{C}$  zur Steigerung der Serumkonzentration von IL-6 und IL-10 führt. Beide Zytokine erreichten direkt nach Ende der einstündigen Hyperthermie einen Höchstwert und fielen dann wieder ab. Auch ein Anstieg der  $\text{TNF}\alpha$ -Serumkonzentration war deutlich. Hier wurde der Peak-Wert jedoch erst drei Stunden nach Behandlungsende erreicht. Allerdings gelang es nicht, einen Einfluss der Hyperthermie auf die GM-CSF-Serumkonzentration nachzuweisen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass starke Ganzkörperhyperthermie Zytokine zu induzieren vermag (81, 82). Diese Ergebnisse wurden von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Bouchama et al (83) untersuchten den Einfluss von systemischer Hyperthermie auf die IL-10-Serumkonzentration. Seren von Hitzschlagpatienten mit einer Körpertemperatur von  $42,4 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$  und einer normothermen Kontrollgruppe wurden mittels ELISA analysiert. Alle Hitzschlagpatienten wiesen erhöhte IL-10-Werte auf.

Eine milde Ganzkörperhyperthermie scheint jedoch anders auf die Serumzytokinkonzentrationen zu wirken.

Kappel et al (84) isolierten Blutzellen von gesunden Spendern und inkubierten sie bei  $37$  und  $39^{\circ}\text{C}$ . Nach LPS-Stimulation wurden die Zytokine im Überstand bestimmt. Ein signifikanter Abfall der IL-6-Produktion wurde bei  $39^{\circ}\text{C}$  festgestellt. Allerdings hatte die erhöhte Temperatur keinen Einfluss auf die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion der Monozyten. Diese Ergebnisse wurden durch in vivo Untersuchungen von Basili et al (85) bestätigt. Hier wurden 12 gesunde Probanden einer zwanzigminütigen Anwendung mit Thermalschlamm ( $47^{\circ}\text{C}$ ), woran sich ein zehn- bis fünfzehnminütiges Thermalbad ( $37$ - $38^{\circ}\text{C}$ ) anschloss, unterzogen. Die Körpertemperatur stieg dabei um durchschnittlich  $0,7^{\circ}\text{C}$  an. Im Einklang mit den o.g. Ergebnissen von Kappel et al wurde keine

Veränderung der  $\text{TNF}\alpha$ -Serumwerte durch die Therapie erreicht. Die IL-6-Konzentration fiel jedoch nach der ersten Anwendung signifikant ab und blieb bis zum Ende der insgesamt 12 Behandlungen gesenkt. Jedoch sind auch Untersuchungen bekannt, bei denen durch mit Paraffin角度packungen induzierter milder Hyperthermie ein signifikanter IL-6-Anstieg im Serum erreicht wurde (86).

In einer Studie von Cozzi et al (87) wurde mittels Heilschlammanwendungen bei Ratten eine milde Hyperthermie induziert. Nach der Behandlung wurde ein Abfall von  $\text{TNF}\alpha$  im Serum beschrieben. Im Gegensatz dazu konnten andere Arbeitsgruppen eine Steigerung der monozytären  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion zeigen: zum Beispiel wurde die Körpertemperatur von gesunden Probanden im Wasserbad im Rahmen einer Studie von Zellner et al (88) auf  $39^\circ\text{C}$  erhöht. Blut wurde vor und nach der hyperthermischen Behandlung entnommen und mit LPS stimuliert. Die  $\text{TNF}\alpha$ -Plasmakonzentration des LPS-stimulierten Blutes lag nach der Behandlung deutlich höher als die Werte, die bei einer normothermen Kontrollgruppe gemessen wurden. Weiterhin konnte ein Anstieg der Monozyten- und Neutrophilenzahl mit Spitzenwerten 6 bzw. 3 Stunden nach Ende der Hyperthermie festgestellt werden. Diese Erkenntnisse weisen auf eine eventuelle Aktivierung der Phagozyten durch Hyperthermie hin.

Insgesamt betrachtet ist der Einfluss einer milden Ganzkörperhyperthermie auf die Konzentration von Zytokinen im Serum noch nicht abschließend geklärt. Es gibt zwar Hinweise auf eine eventuelle Steigerung der Zytokinwerte durch Aktivierung der zytokinproduzierenden Zellen, jedoch wurden auch gegenteilige Effekte beschrieben.

## 2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie zu bestimmen. Dazu wurde zunächst untersucht, ob es einen Unterschied in der Burstaktivität der genannten Zellen zwischen Sklerodermiepatienten und gesunden Normalpersonen gibt. Zum weiteren Vergleich wurde der respiratorische Burst von Patienten mit Psoriasis vulgaris und atopischer Dermatitis untersucht.

Schließlich wurde der Einfluss der IRA-Therapie auf den respiratorischen Burst der teilnehmenden Patienten überprüft. Dazu wurde die Burstaktivität der Neutrophilen und Monozyten vor Behandlungsbeginn, im Verlauf der Behandlung und nach Behandlungsende untersucht.

Um einen Einfluss der IRA-Hyperthermie auf die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zu überprüfen, wurden die Zytokine  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-10 und GM-CSF im Serum der behandelten Patienten vor und nach der Therapie bestimmt.

Folgende Versuche wurden durchgeführt, um die o.g. Aufgabenstellungen zu erfüllen:

**Messung des respiratorischen Bursts:** Neutrophile und Monozyten wurden im Vollblut mit Zymosan und PMA stimuliert und ihr respiratorischer Burst wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

**Zytokine:** Die Bestimmung von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-10 und GM-CSF im Patientenserum vor und nach der IRA-Therapie erfolgte mittels ELISA.

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Probanden**

##### **3.1.1 Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie**

Im Rahmen dieser im Zeitraum von Juni 2004 bis Juni 2005 durchgeführten Untersuchung wurden insgesamt 57 Patienten mit PSS einer milden Infrarot-A-Hyperthermie unterzogen. Der PMA-stimulierte RB wurde bei allen 57 in Tabelle 1 charakterisierten Patienten untersucht. Der Zymosan-stimulierte RB wurde bei 21 der insgesamt 57 eingeschlossenen Patienten gemessen. In Tabelle 2 sind diese 21 Patienten nochmals gesondert beschrieben. Alle eingeschlossenen Patienten wurden durch die Klinik für Dermatologie und Rheumatologie der Charité Berlin Mitte rekrutiert und gaben Ihr schriftliches Einverständnis zur Aufnahme in die Untersuchung. Alle eingeschlossenen Patienten erfüllen die Kriterien des American College of Rheumatology zur Klassifikation der systemischen Sklerodermie.

Einschlusskriterien waren eine diagnostisch gesicherte systemische Sklerodermie sowie ein Alter der Patienten über 18 Jahre. Ein weiteres Kriterium war das Vorhandensein des Raynaud-Phänomens. Die letzte Raynaud-Attacke der Patienten durfte nicht länger als einen Monat zurückliegen.

Als Ausschlusskriterien galten eine Veränderung der systemischen Therapie innerhalb von 12 Wochen vor Beginn der Untersuchung, weiterhin eine instabile Angina pectoris oder ein Myokardinfarkt innerhalb von 6 Monaten vor Untersuchungsbeginn. Auch Patienten mit arterieller Hypotension wurden wegen des unter 1.2 beschriebenen blutdrucksenkenden Effektes der IRA-Therapie nicht eingeschlossen.

Genauere Angaben über Anzahl, Geschlecht, Alter und Therapie der Patienten sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Zusätzlich werden auch Medikamente aufgeführt, die möglicherweise den respiratorischen Burst beeinflussen könnten.

Klinische Merkmale	Anzahl (%)
Geschlecht	weiblich: 51 (90); männlich: 6 (10); gesamt: 57 (100)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	52 $\pm$ 13,0
Krankheitsdauer in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	8,0 $\pm$ 6,7
ISSc	31 (54)
dSSc	26 (46)
Anti-Centromer positiv	25 (44)
Anti-SCL70 positiv	7 (12)
Anti-Centromer und -SCL70 negativ	25 (44)
Prednisolon	25 (44)
Methotrexat	4 (7)
Mycophenolatmofetil	3 (5)
Cyclophosphamid	2 (4)
Azathioprin	7 (12)
NSAID	16 (28)

**Tabelle 1: Charakterisierung des Untersuchungskollektivs**

<b>Klinische Merkmale</b>	<b>Anzahl (%)</b>
Geschlecht	weiblich: 18 (89); männlich: 3 (11); gesamt: 21 (100)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	61,7 $\pm$ 9,1
Krankheitsdauer in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	10 $\pm$ 4,0
ISSc	11 (52)
dSSc	10 (48)
Anti-Centromer positiv	14 (64)
Anti-SCL70 positiv	1 (5)
Anit-Centromer-und SCL70 negativ	7 (32)
Prednisolon	10 (46)
Methotrexat	2 (9)
Cyclophosphamid	1 (5)
Azathioprin	1 (5)
NSAID	7 (32)

**Tabelle 2: Charakterisierung der Untergruppe für den Zymosan-Assay**



### 3.1.2 Patienten mit Psoriasis vulgaris

Als Einschlusskriterium für diese zweite Patientengruppe (n=20) galt ein „Psoriasis and Severity Index“ (PASI) von über 12 Punkten. Ein PASI in dieser Höhe steht für einen moderaten bis schweren Krankheitsverlauf. Weitere Angaben zu dieser Patientengruppe sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

<b>Klinische Merkmale</b>	<b>Anzahl (%)</b>
Geschlecht	weiblich: 11 (55); männlich: 9 (45); gesamt: 20 (100)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	50,1 $\pm$ 15,5
Krankheitsdauer in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	20,0 $\pm$ 13,9
Psoriasis Area and Severity Index (PASI) (Mittel $\pm$ SD)	22,4 $\pm$ 8,1
NSAID (%)	3 (15)

**Tabelle 3: Charakterisierung der Psoriasispatienten**

### 3.1.3 Patienten mit atopischer Dermatitis

Sieben Patienten mit einer klinisch gesicherten atopischen Dermatitis wurden in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen. Diese Gruppe der AD-Patienten wird in Tabelle 4 genauer charakterisiert.

<b>Klinische Merkmale</b>	<b>Anzahl (%)</b>
Geschlecht	weiblich: 5 (71); männlich: 2 (29); gesamt: 7 (100)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	8,8 $\pm$ 11,5
Krankheitsdauer in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	25,3 $\pm$ 12,7
Score of Atopic Dermatitis (SCORAD) (Mittel $\pm$ SD)	48,0 $\pm$ 6,1
Fexofenadin	2 (29)

**Tabelle 4: Charakterisierung der Patienten mit atopischer Dermatitis**

### 3.1.4 Gesunde Kontrollgruppe

Die vierte Gruppe besteht aus 20 gesunden alters- und geschlechtsspezifischen Probanden aus dem Laborpersonal der Charité. Keiner der Kontrollpersonen nahm zum Zeitpunkt der Untersuchung immunmodulatorische Medikamente oder NASID ein. Tabelle 4 enthält genaue Angaben über Alter und Geschlecht der Kontrollpersonen.

<b>Klinische Merkmale</b>	<b>Anzahl (%)</b>
Geschlecht	weiblich: 15 (75); männlich: 5 (25); gesamt: 20 (100)
Alter bei Studienbeginn in Jahren (Mittel $\pm$ SD)	53,5 $\pm$ 11,9

**Tabelle 5: Charakterisierung der gesunden Kontrollpersonen**

## 3.2 Infrarot-A-induzierte Hyperthermie

### 3.2.1 Studiendesign und verwendete Geräte

57 Patienten mit systemischer Sklerodermie wurden zehnmal mit milder Infrarot-A-induzierter Ganzkörperhyperthermie behandelt.

Die Behandlungen erfolgten in einem Rhythmus von zwei Terminen pro Woche, woraus sich eine Gesamtbehandlungsdauer von ca. fünf Wochen ergab. Zusätzlich gab es einen Untersuchungstermin 2 Wochen vor der ersten Bestrahlung und drei Nachbeobachtungstermine, sieben, 21 und 42 Tage nach der zehnten Bestrahlung.

Milde Hyperthermie ist als Anstieg der Körpertemperatur auf maximal 38,5°C definiert (35). Zur Erzeugung dieses Temperaturanstieges wurde die Iratherm 1000 Infrarot-A-Bank von Ardenne, Dresden (Deutschland) verwendet.

Die Patienten wurden entsprechend der Herstelleranweisungen auf einem über den Halogenröhren der Bank ausgespannten Nylonnetz platziert und, um eine Auskühlung durch einen eventuellen Luftzug zu vermeiden, mit einem Laken zugedeckt. Die Bestrahlung erfolgte über 30 Minuten bei 80% der maximalen Strahlungsleistung (entspricht 1000 W / m<sup>2</sup>). Blutdruck und axilläre Temperatur wurden vor Beginn, nach 15 Minuten und direkt nach Ende der Bestrahlung ermittelt. Die Sauerstoffsättigung des Blutes wurde während der gesamten Bestrahlung mittels Fingerspitzenpulsoxymetrie gemessen.

Die axilläre Temperatur der Patienten stieg während der 30 Minuten um  $1,3 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$  an. Wie vorgesehen, wurde eine maximale Temperatur von 38,5°C erreicht.

Nach der dreißigminütigen Behandlungsphase folgte eine ebensolange Ruhephase, die die Patienten im Bett liegend verbrachten.

An diese Ruhephase schloss sich die Blutentnahme an. Den Patienten wurden 2 ml mit EDTA antikoaguliertes Blut und 2 ml Lithiumheparin-Blut für die Messung des respiratorischen Bursts, sowie 8 ml Blut für die Zytokinmessungen entnommen. Dazu wurden Lithiumheparin- und EDTA-Monuvetten (Sarstedt) verwendet. Das Serum

wurde innerhalb von einer Stunde separiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingelagert. Bis zur Messung des respiratorischen Bursts wurden die Heparin- und EDTA-Monuvetten maximal zwei Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Insgesamt wurden bei jedem Patienten fünf Blutentnahmen durchgeführt: zwei Wochen vor Behandlungsbeginn, nach der fünften und zehnten Bestrahlung sowie sieben und 42 Tage nach Behandlungsende.

Die Ethik-Kommission der Charité hat der Durchführung der Untersuchung zugestimmt.

### **3.3 Messung des Zymosan-stimulierten respiratorischen Bursts**

#### **3.3.1 Prinzip der Flowzytometrie**

Das hier verwendete fließzytometrische Messverfahren des respiratorischen Bursts entspricht zum größten Teil dem von Richardson et al (89) empfohlenen Protokoll. Es wurden jedoch leichte Modifikationen vorgenommen.

Die durchflusszytometrische Analyse ist eine neue Methode zur Messung des respiratorischen Bursts. Bei diesem Verfahren wird der Median der Fluoreszenzintensität (MFI), der ein Maß für die Menge an oxidativen Substanzen pro einzeltem Leukozyt ist, ermittelt.

Frühere Verfahren wie der Nitroblautetrazolium-Test (NBT-Test) oder die Luminol-verstärkte Chemilumineszenz erwiesen sich als weit weniger sensitiv und verlässlich (90). Die Durchflusszytometrie basiert auf der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes mit Laserlicht des entsprechenden Absorptionsspektrums. Daraufhin emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszenzlicht, dessen Spektrum sich vom Absorptionsspektrum unterscheidet. Das emittierte Fluoreszenzsignal ist proportional zur gebundenen oder intrazellulären Fluorochrommenge und wird von Photonenverstärkern empfangen und als ein „Event“ auf dem Monitor dargestellt.

Auch ungefärbte Zellen lassen sich darstellen. Beim Durchtritt durch den Laserstrahl bestimmt das Volumen der Zelle das Maß der Vorwärtsstreuung („forward scatter“, FSC) und die Granularität der Zelle das Maß der Seitwärtsstreuung („side scatter“, SSC) (91). So hat bei der Auswertung im Dot-Plot, dessen zwei Achsen das FSC und das SSC repräsentieren, jede Zelle eine für sie charakteristische Position, über die sie identifiziert werden kann.

### **3.3.2 Herstellung der Zymosan-Standardlösung**

20 mg Zymosan (Molecular Probes BioParticles) wurden in 1 ml PBS gelöst. Die Mischung wurde 3-15 Sekunden auf höchster Stufe geschüttelt. Die so entstandene homogene Suspension wurde aliquotiert und bei -20°C weggefroren. Diese Vorgehensweise entspricht den Herstellerangaben zur Rekonstitution des Zymosans.

### **3.3.3 Herstellung des Dihydrorhodamin-Stocks**

Dihydrorhodamin 123 (Molecular Probes) wurde zu 10 mg in 289 µl DMSO gelöst. Dies entspricht einer DHR-Stockkonzentration von 34600 µg/ml. Die entstandene homogene Lösung wurde aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

### **3.3.4 Stimulation mit Zymosan**

Je 100 µl EDTA-Vollblut wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert und im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Nach der zehnmütigen Erwärmungsphase wurden pro Röhrchen 20 µl der Zymosan-Standardlösung und 80 µl PBS bzw. 10 µl Zymosan-Standardlösung und 90 µl PBS oder 5 µl der Standardlösung und 95 µl PBS hinzugegeben. So erhielt man in den Röhrchen eine Zymosankonzentration von 2 mg Zymosan, 1 mg Zymosan bzw. 0,5 mg Zymosan/ml. Diese eingesetzten Zymosankonzentrationen wurden durch vorher durchgeführte Stimulationsversuche mit Zymosankonzentrationen von 10 bis 0,1 mg/ml bestimmt. Die Werte orientieren sich an den von O’Gorman et al (53) angegebenen Werten für eine Stimulation mit Zymosan, liegen jedoch leicht darüber. Die Stimulation mit 20 µl des Zymosan-Standards wurde in Vierfachbestimmung vorgenommen, die Stimulation mit 5 µl der Standardlösung in Doppelbestimmung. Zusätzlich wurde ein Röhrchen als unstimulierter Basiswert mitgeführt. Diesem Röhrchen wurden lediglich 100 µl PBS hinzugesetzt. Ein weiteres Röhrchen diente als unstimulierter ungefärbter Blank. In diesem Blank-Röhrchen befanden sich 100 µl Vollblut sowie 122 µl PBS. Pro Patient und Messung wurden also insgesamt neun Proben benötigt.

Die stimulierten Proben, der Basiswert und der Blank wurden für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Färbung mit DHR 123.

### **3.3.5 Färbung mit Dihydrorhodamin 123**

Dihydrorhodamin 123 (DHR) gilt als der sensitivste und effektivste Farbstoff zur Messung des respiratorischen Bursts, insbesondere bei der Verwendung von schwachen Stimulantien (90, 92, 93).

Nach der in vitro Stimulation der Granulozyten und Monozyten mittels PMA bzw. Zymosan folgte nun die Fluoreszenzfärbung.

Zur Herstellung einer DHR-Arbeitslösung wurde die DHR-Stocklösung nochmals 10:69 in DMSO verdünnt. Eine weitere 1:100-Verdünnung in PBS schloss sich an. Die endgültige DHR-Konzentration der Arbeitslösung betrug 50 µg/ml.

Nach Abschluss der 30minütigen Inkubationszeit des Zymosans wurden je Probe 22 µl der DHR-Arbeitslösung hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend über 5 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Dihydrorhodamin ist frei zellwandpermeabel und wird von dem intrazellulären  $H_2O_2$  und  $O_2^-$  zu Rhodamin 123 oxidiert. Rhodamin 123 reichert sich vor allem in den Mitochondrien der Zellen an (92).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Lysing-Solution (Becton Dickinson) je Probe abgestoppt. Die Lysing-Solution wurde lichtgeschützt bei Raumtemperatur über 20 Minuten inkubiert und danach abzentrifugiert (2500 U/min, 4°C, 5 min).

Die Überstände wurden dekantiert und das Pellet aufgeklopft. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen mit PBS aufgefüllt und nochmals bei 2500 U/min und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut dekantiert und das aufgeklopfte Pellet in 400 µl PBS mit 1% PFA resuspendiert.

Bis zur durchflusszytometrischen Analyse, die stets binnen 30 Minuten erfolgte, wurden die Proben lichtgeschützt und auf Eis aufbewahrt.



### 3.3.6 Durchflusszytometrische Analyse

Rhodamin 123 emittiert nach Anregung mit blauem Licht der Wellenlänge 488 nm ein grünes Fluoreszenzlicht mit einem Spektrum von 500-540 nm (90) und kann so im Kanal eins des verwendeten FACSCalibur® (Becton Dickinson) detektiert werden.

Vor der eigentlichen Messung wurde im „Set up“-Modus unter Zuhilfenahme des Blanks das Gate in der FSC/SSC Darstellung an die Neutrophilenpopulation angepasst. Danach wurden je Probe 50.000 Events in diesem Gate gemessen. Alle gemessenen Events wurden gespeichert.

Die Analyse erfolgte mittels CellQuest® Software (Becton Dickinson). Zunächst erfolgte eine genaue Anpassung des Gates um die Neutrophilen- und Monozytenpopulation in der FSC/SSC Darstellung. Die Fluoreszenz der gegateten Populationen wurde anschließend im Histogramm analysiert.

Zur Untersuchung der Monozyten wurde zunächst im Histogramm der nicht stimulierten Probe ein Marker so gesetzt, dass weniger als 1% der Zellen positiv waren und innerhalb dieses Markers lagen. Für die stimulierten Proben wurde diese Markerposition beibehalten und es wurde die mittlere Fluoreszenzintensität der positiven, innerhalb des Markers liegenden Zellpopulation bestimmt. Zusätzlich wurde die Anzahl dieser für den Burst positiven und somit innerhalb des Markers liegenden Zellen in % angegeben. Für die Untersuchung der Neutrophilen erwies sich dieses Verfahren als unpraktikabel, da die positive Zellfraktion im stimulierten Zustand nicht von der negativen abgrenzbar war. Ein Marker zur Abgrenzung einer für den RB positiven und negativen Zellpopulation konnte deshalb nicht klar gesetzt werden. Deshalb wurde hier die mittlere Fluoreszenzintensität aller in der FSC/SSC Darstellung gegateten Zellen ermittelt und auf die Setzung des Markers verzichtet. Aufgrund dieser Zellverteilung ließ sich der prozentuale Anteil der für den Burst positiven Neutrophilen nicht bestimmen. Für die Population der Neutrophilen wurden jedoch zusätzlich die basalen Werte angegeben. Für die Population der Monozyten wurde bei den Zymosanmessungen auf die Basalwerte verzichtet, da sich ohne Stimulation nur weniger als 1% der Zellen im Bereich des Markers M1 befanden und die Messergebnisse daher extrem schwankten.

Vor Beginn der Untersuchung wurden Reihenmessungen des RB zur Ermittlung der zweckmäßigsten Messmethodik durchgeführt. Dabei erwies sich die Einbeziehung der gesamten Neutrophilenpopulation bzw. nur der für den Burst positiven Monozytensubpopulation in die Auswertung als besonders reproduzierbar (siehe auch 4.2.1).

Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) entspricht der Menge an oxidativen Substanzen pro individuellem Leukozyt. In den Abbildungen 9 und 14 des Ergebnisteils sind typische bei der Durchführung dieses Assays entstandene FACS-Diagramme dargestellt. Mit dem hier beschriebenen Verfahren kann ausschließlich die intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden.

### **3.4 Phagobursttest (nicht selbst durchgeführt)**

Der Phagobursttest, der ebenfalls die Aktivität des respiratorischen Bursts der phagozytierenden Zellen misst, wurde im Durchflusszytometrie-Labor des Institutes für medizinische Immunologie der Charité durchgeführt. Verwendet wurde hierzu der Bursttest (Phagoburst®) der Firma Orpegen Pharma. Bei der Ausführung des Bursttests wurde sich an die Angaben im Herstellerprotokoll gehalten.

Bei der Auswertung erfolgte zunächst der Ausschluss der vorhandenen Zellaggregate. Dafür wurde in der Fluoreszenz/SSC-Darstellung ein Gate um die Zellen gesetzt, die den DNA-Gehalt einer humanen diploiden Zelle besaßen. Die gegateten Zellen wurden im FSC/SSC dargestellt und ein Gate um die Neutrophilen- und Monozytenpopulation gesetzt. Die Fluoreszenz aller so gegateten Zellen wurde anschließend im Histogramm analysiert.

### **3.5 Prinzip des Enzyme linked Immuno Sorbent Assays (ELISA)**

Bei diesem Verfahren wird zunächst ein Primärantikörper (Capture Antibody) an eine proteinbindende 96-Well Mikrotiterplatte gekoppelt. In den zwei darauf folgenden Arbeitsschritten werden die zytokinhaltigen Proben und Standards sowie ein spezieller biotylisierter Antigenantikörper (Detection Antibody) einer anderen Spezies aufgetragen. Der zweite Antikörper bindet an das bereits an den Capture Antibody gebundene Zytokin, so dass ein sogenannter Sandwich-Komplex entsteht. Der biotylisierte Detection Antibody ist an eine Peroxidase gebunden. Sein Gehalt wird über den enzymalen Umsatz eines peroxidase-spezifischen Substrates bestimmt. Das Substrat ist meist an eine Substanz gekoppelt, dessen Farbe sich proportional zu der Reaktion zwischen Enzym und Substrat verändert. Die Farbentwicklung entspricht also der Zytokinkonzentration in den Proben und Standards. Die Standardreihe ist eine Verdünnungsreihe von bekannten Mengen des zu messenden Zytokins, mit deren Hilfe eine Kalibrierungskurve zur Zytokinbestimmung in den Serumproben erstellt wird. Zwischen den einzelnen Kopplungsschritten wird die Mikrotiterplatte mehrfach gewaschen, um nicht gebundene Substanzen zu entfernen.

### **3.6 IL-6-ELISA**

Dieser ELISA wurde nach Anleitung des Herstellers (Biosource) durchgeführt. Zuerst wurden 100µl Probe und Standard pro Well zur dreistündigen Inkubation bei 37°C im Brutschrank aufgetragen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach sechsmaligem Waschen mit dem im ELISA-Kit enthaltenen Waschpuffer folgte das Auftragen von 100 µl Biotin-Conjugat pro Well und eine Inkubation über 45 min. Ein weiterer Waschvorgang und das Auftragen der mitgelieferten Streptavidin-HRP-Arbeitslösung, welche über 45 Minuten inkubiert wurde, schlossen sich an. Nach nochmaligem Waschen wurde eine Chromogenlösung aufgetragen und die Reaktion

nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln abgestoppt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Eine Eichkurve aus acht Werten wurde anhand des Standards (10/ 5/ 2,5/ 1,25/ 0,62/ 0,31/ 0,16/ 0 pg rekombiniertes IL-6/ml) gemessen in Doppelbestimmung erstellt. Die Sensitivitätsgrenze dieses hochsensitiven ELISAs beträgt < 104 fg/ml.

### 3.7 TNF $\alpha$ -ELISA

Zur Bestimmung von TNF $\alpha$  wurden ELISA-Kits der Firma R&D Systems (DuoSet® ELISA Development System für human TNF- $\alpha$ ) verwendet und die Angaben des Herstellers gering modifiziert.

Zunächst wurde eine Nunc-Immuno™ Platte mit MaxiSorp™ Surface (NUNC Products) über Nacht mit 100  $\mu$ l Maus-anti-human TNF $\alpha$  beschichtet (Konzentration 2  $\mu$ g/ml in PBS). Dieser und alle anderen Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurden alle Wells mehrmals mit 0,05% Tween20 in PBS gewaschen und anschließend mit 300  $\mu$ l 1% BSA in PBS über eine Stunde geblockt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100  $\mu$ l Standard (1000/ 500/ 250/ 125/ 62,5/ 31,25/ 15,63/ 7,81 pg rekombiniertes TNF $\alpha$ /ml) und 200  $\mu$ l Serumprobe pro Well aufgetragen und über zwei Stunden inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang und danach das Auftragen von 100  $\mu$ l biotylisiertem Ziegen-anti-human TNF $\alpha$ -Antikörper pro Well (verdünnt auf 300 ng/ml in TBS mit 0,1% BSA und 0,05% Tween20). Nach zweistündiger Inkubation und erneutem Waschen wurden 100  $\mu$ l des an Meerrettichperoxidase gekoppelten Streptavidins pro Well aufgetragen (vorverdünnt in TBS mit 0,1% BSA und 0,05% Tween20, wie vom Hersteller beschrieben). Ein nochmaliger Waschschrift schloss sich nach 20 Minuten Inkubation an. Zuletzt wurden 100  $\mu$ l der im Kit enthaltenen TMB-Substratlösung dazugegeben und die Reaktion nach 20minütiger Inkubationszeit mit 50  $\mu$ l 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Extinktionen wurden im ELISA-Reader bei 450 nm und 560 nm gemessen. Die Sensitivitätsgrenze liegt gemäß den Herstellerangaben bei < 7,81 pg/ml.

### **3.8 GM-CSF-ELISA**

Zur Messung von GM-CSF wurde der Quantikine® HS human GM-CSF ELISA der Firma R&D Systems mit einer Sensitivitätsgrenze von < 0,26 pg/ml verwendet. Die Durchführung richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers. Zur photometrischen Messung wurde eine Eichkurve aus sieben Werten (64/ 32/ 16/ 8/ 4/ 2/ 1 pg/ml) gemessen in Doppelbestimmung erstellt. Als Standard wurde in diesem Assay rekombinierter GM-CSF eingesetzt.

### **3.9 IL-10-ELISA**

Zur Bestimmung von IL-10 im Serum wurde der human IL-10 ELISA der Firma Bender MedSystems™ verwendet. Die Durchführung richtete sich nach dem Herstellerprotokoll.

Die Standardkurve bestand aus acht Konzentrationen (200/ 100/ 50/ 25/ 12,5/ 6,3/ 3,1/ 1,55 pg/ml), die in Doppelbestimmung gemessen wurden. Die Sensitivitätsgrenze dieses IL-10-ELISAs liegt bei < 0,99 pg/ml.

### **3.10 Statistische Analyse**

Zum Vergleich der Höhe des respiratorischen Bursts von Monozyten und Neutrophilen in den verschiedenen Probandengruppen kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Die Entwicklung des respiratorischen Bursts bei PSS-Patienten im Verlauf der IRA-Therapie wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests auf Signifikanz geprüft. Eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Die statistische Datenauswertung erfolgte gemäß den Hinweisen des Biomathematischen Instituts der Charité.

## **4 Ergebnisse**

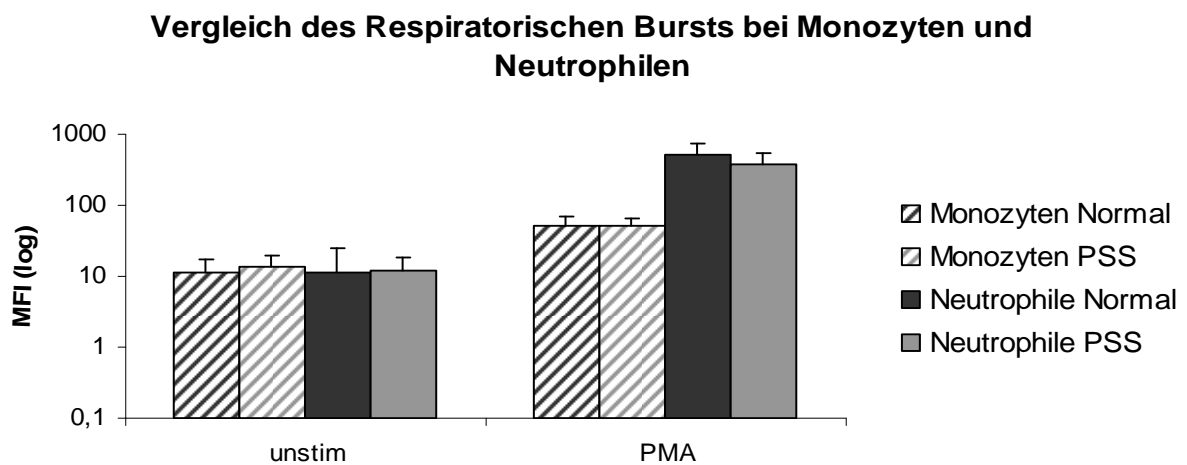
### **4.1 Der respiratorische Burst bei PSS-Patienten und Kontrollgruppen**

#### **4.1.1 Untersuchungsmodell**

Derzeitig publizierte Daten weisen auf einen verstärkten respiratorischen Burst (RB) bei Patienten mit PSS gegenüber Normalpersonen hin. Um die Veränderungen des phagozytären RB bei Patienten mit progressiver systemischer Sklerodermie (PSS) genau zu untersuchen, wurden neutrophile Granulozyten und Monozyten von PSS-Patienten, gesunden Normalpersonen und Patienten mit Psoriasis vulgaris sowie von Patienten mit atopischer Dermatitis mit PMA und Zymosan stimuliert. Anschließend wurde der respiratorische Burst dieser Zellen im Vollblut mittels Dihydrorhodaminfärbung und durchflusszytometrischer Analyse gemessen. Die Kontrollgruppen waren in Bezug auf Geschlechterverteilung und Alter mit den PSS-Patienten vergleichbar. Die Gruppen der Psoriasispatienten und der Patienten mit atopischer Dermatitis wurden zusätzlich zu den gesunden Probanden als Kontrollgruppen ausgewählt, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Burstaktivität der Phagozyten und einem systemischen Entzündungsprozess aufzuzeigen sowie um PSS-charakteristische Unterschiede der Burstaktivität der o.g. Zellen zu identifizieren. Der respiratorische Burst wurde bei Patienten mit atopischer Dermatitis nur mit Zymosan als Stimulanz untersucht. Als Maß für den respiratorischen Burst wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) und die Standardabweichung (Median  $\pm$  SD) bzw. bei den Monozyten zusätzlich der prozentuale Anteil der für den Burst positiven Zellen angegeben. Nähere Informationen hierzu befinden sich im Abschnitt 3.3.6 des Methodikteils.

#### 4.1.2 Vergleich des Respiratorischen Bursts bei Neutrophilen und Monozyten

Als Parameter für den RB wurde der MFI, ein Maß für die pro Zelle produzierte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, eingesetzt (Median  $\pm$  SD). Basal war kein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen feststellbar. Dies gilt für Zellen von Normalpersonen (Neutrophile  $11,4 \pm 12,9$ ; Monozyten  $11,4 \pm 6,2$ ) und PSS-Patienten (Neutrophile  $12,3 \pm 5,8$ ; Monozyten  $13,6 \pm 5,5$ ). Nach Stimulation mit PMA war jedoch ein deutlich stärkerer RB der neutrophilen Granulozyten bei Normalpersonen (Neutrophile  $524,1 \pm 203,9$ ; Monozyten  $50,5 \pm 20,7$ ) und PSS-Patienten (Neutrophile  $371,8 \pm 171,2$ ; Monozyten  $50,9 \pm 16,4$ ) messbar. Auf einen Vergleich der Werte nach Zymosanstimulation wurde auf Grund der verschiedenen Auswerteverfahren für Neutrophile und Monozyten bei den Zymosanversuchen verzichtet.

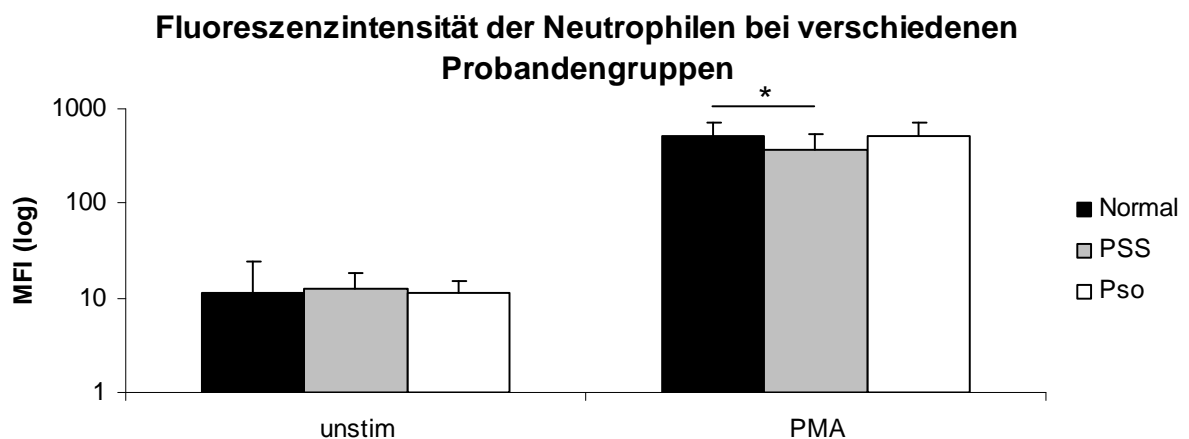


**Abb. 7: Vergleich des Respiratorischen Bursts bei Monozyten und Neutrophilen** unstimuliert und nach Stimulation mit PMA ( $1,4 \mu\text{M}$ ). Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung (logarithmische Skalierung). PSS: PSS-Patienten ( $n=53$ ); Normal: Normalpersonen ( $n=20$ )



### 4.1.3 PMA-stimulierter respiratorischer Burst der neutrophilen Granulozyten

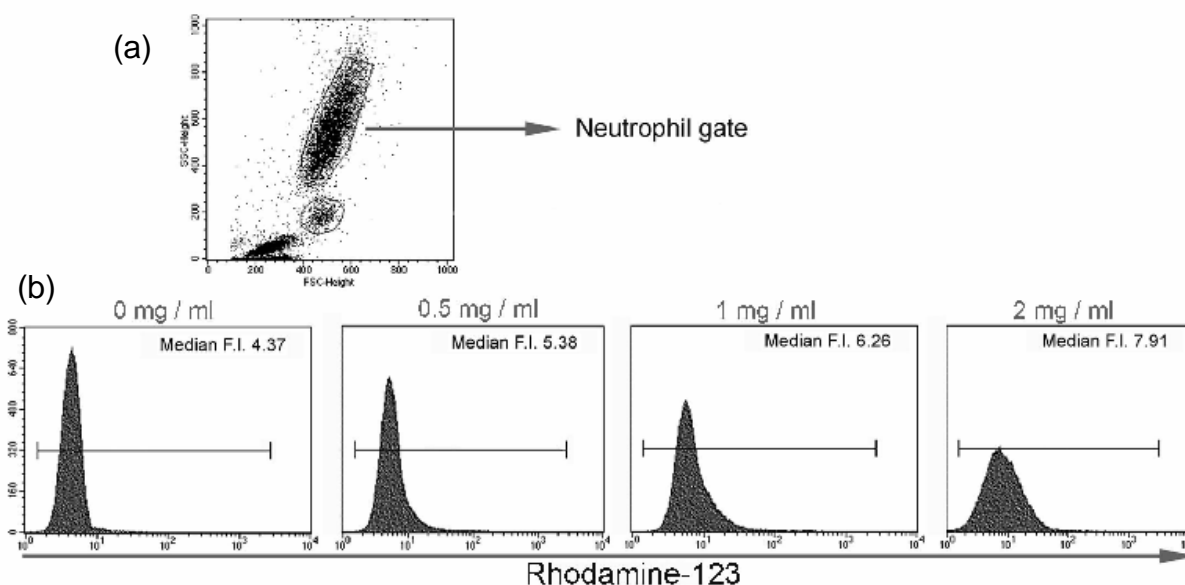
Gemessen wurde der MFI der neutrophilen Granulozyten basal und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M), wie unter Material und Methodik beschrieben. Angegeben ist der Median des MFI-Wertes und die Standardabweichung (Median  $\pm$  SD). Im unstimulierten Zustand war kein wesentlicher Unterschied zwischen der Burstaktivität der neutrophilen Granulozyten von PSS-Patienten (12,3  $\pm$  5,8) und Normalpersonen (11,4  $\pm$  12,9) sowie Patienten mit Psoriasis vulgaris (11,4  $\pm$  3,8) erkennbar. PMA, ein sehr potenter Stimulus des RB, führte zu einem deutlichen Shift des MFI gegenüber dem unstimulierten Wert. Nach Stimulation war trotz der großen individuellen Schwankungen ein signifikant erniedrigter respiratorischer Burst bei PSS-Patienten (371,8  $\pm$  171,2) im Vergleich zu Normalpersonen (524,1  $\pm$  203,9) messbar (p=0,021). Auch im stimulierten Zustand gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem RB der Patienten mit Psoriasis vulgaris (514,0  $\pm$  203,3) und dem der gesunden Kontrollprobanden.



**Abb. 8: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung (logarithmische Skalierung). PSS: PSS-Patienten (n=53); Normal: Normalpersonen (n=20); Pso: Psoriasispatienten (n=17); \*: p<0,05

#### 4.1.4 Zymosan-stimulierter respiratorischer Burst der neutrophilen Granulozyten

Wegen der großen individuellen Schwankungsbreite, die bei der Stimulation des RB mit PMA auftrat, wurde zusätzlich nicht opsoniertes Zymosan als Stimulanz für den RB eingesetzt. Zymosan ist ein sehr schwacher Stimulus für den RB. Der MFI wurde auch hier unstimuliert und nach Stimulation mit drei unterschiedlichen Zymosankonzentrationen (0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml) gemessen. Typische FACS-Histogramme der durchgeführten Messungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Da sich keine burstpositive Zellpopulation abgrenzen ließ, konnte, im Gegensatz zu den Monozyten, der prozentuale Anteil der für den Burst positiven Zellen nicht ermittelt werden. Stattdessen wurden die MFI-Werte aller im Gate befindlichen Neutrophilen basal und nach Stimulation gemessen (siehe auch Abschnitt 3.3.6).

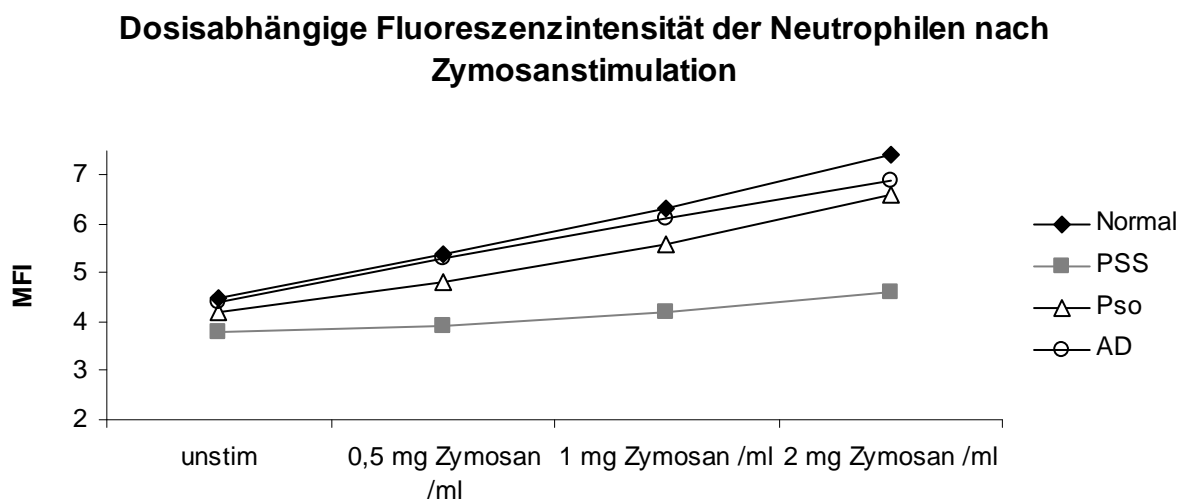


**Abb. 9: FACS-Messung des respiratorischen Bursts nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan.** (a) FSC/SSC Darstellung mit einem Gate um die Neutrophilenpopulation; (b) Darstellung der in (a) gegateten Neutrophilenpopulation im Histogramm zur Analyse des MFI aller im Gate befindlichen Zellen basal und nach Stimulation mit verschiedenen Zymosankonzentrationen (0,5; 1 und 2 mg/ml). Angegeben sind die MFI-Werte der dargestellten Einzelmessungen.

Wie erwartet, führte Zymosan in allen drei eingesetzten Konzentrationsstärken zu einer schwachen, aber dosisabhängigen Steigerung des MFI der Neutrophilen, was in allen der vier untersuchten Probandengruppen nachgewiesen wurde (siehe Abb.10).

Dies liefert Hinweise für eine hohe Empfindlichkeit und Beeinflussbarkeit der neutrophilen Burstreaktion.

Bemerkenswert ist jedoch, dass die Steigerung des RB durch den Einsatz von höheren Zymosandosen bei PSS-Patienten weitaus schwächer ausfiel als bei Normalpersonen.



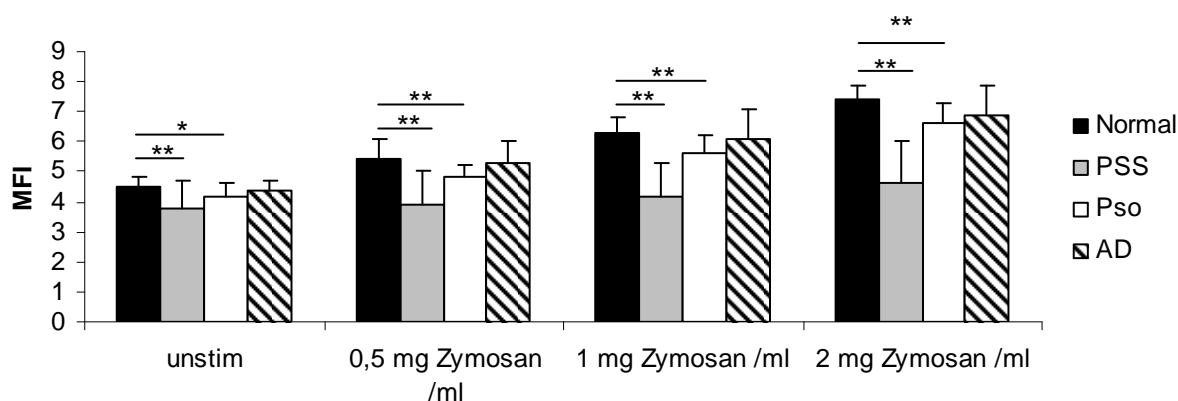
**Abb. 10: Dosisabhängige Fluoreszenzintensität der Neutrophilen** bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und stimuliert mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml). Dargestellt ist der Median der MFI-Werte. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7)

Die Ergebnisse des Zymosan-Assays bestätigen die Daten der PMA-Messungen. Bereits im unstimulierten Zustand war eine signifikant erniedrigte Burstaktivität der neutrophilen Granulozyten von PSS-Patienten (Median  $3,8 \pm 0,9$ ) im Vergleich zu Normalpersonen (Median  $4,5 \pm 0,3$ ) messbar ( $p = 0,003$ ). Nach Stimulation mit Zymosan wurde dieser Unterschied noch deutlicher: beim Einsatz der niedrigsten Zymosankonzentration ergaben sich Werte von  $3,9 \pm 1,1$  für PSS-Patienten im Gegensatz zu  $5,4 \pm 0,7$  für Normalpersonen ( $p < 0,001$ ). Beim Einsatz von 1 mg Zymosan/ml wurden  $4,2 \pm 1,1$  vs.  $6,3 \pm 0,5$  gemessen ( $p < 0,001$ ) und bei der höchsten Zymosankonzentration betrug der MFI der Granulozyten  $4,6 \pm 1,4$  bei Sklerodermiepatienten und  $7,4 \pm 0,5$  bei Normalpersonen ( $p < 0,001$ ).

Die Burstaktivität der neutrophilen Granulozyten von Patienten mit Psoriasis vulgaris war zwar im Vergleich zu den Werten der PSS-Patienten weniger stark erniedrigt, jedoch im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe immer noch signifikant reduziert.

Dies trifft auf alle drei eingesetzten Zymosankonzentrationen zu. Der MFI der Neutrophilen von Psoriasispatienten betrug  $4,2 \pm 0,4$  unstimuliert ( $p = 0,03$ ) und  $4,8 \pm 0,4$  ( $p = 0,003$ ) bzw.  $5,6 \pm 0,6$  ( $p = 0,001$ ) und  $6,6 \pm 0,7$  ( $p < 0,001$ ) nach Stimulation mit 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml. Keine signifikante jedoch eine tendenzielle Reduktion des RB ergab sich beim Vergleich des MFI der AD-Patienten (unstimuliert  $4,4 \pm 0,3$ ; stimuliert  $5,3 \pm 0,7$  bzw.  $6,1 \pm 1,0$  bzw.  $6,9 \pm 1,0$  mit 0,5, 1 und 2 mg Zymosan/ml) mit dem der gesunden Kontrollgruppe.

### Fluoreszenzintensität der Neutrophilen bei verschiedenen Probandengruppen

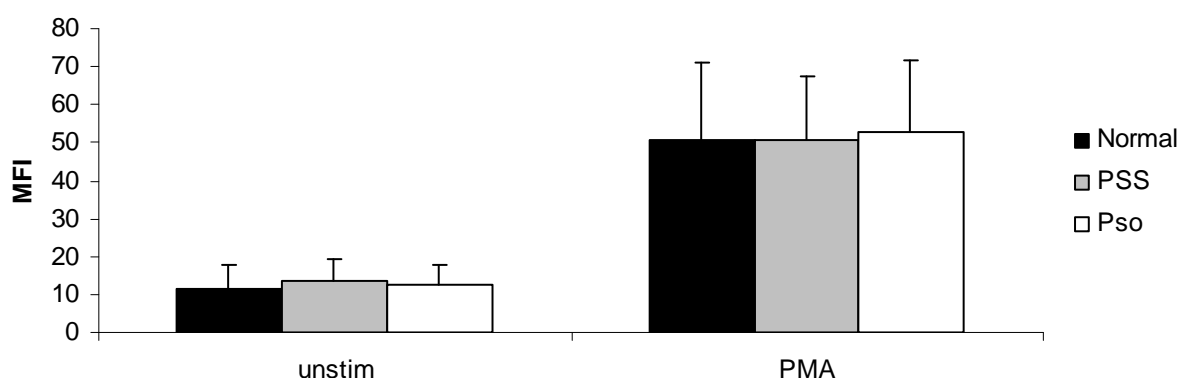


**Abb. 11: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$

#### 4.1.5 PMA-stimulierter respiratorischer Burst der Monozyten

Gemessen wurde hier der MFI sowie der prozentuale Anteil der für den Burst positiven Zellen (Median  $\pm$  SD) basal und nach Stimulation mit 1,4  $\mu$ M PMA. Im Bezug auf den MFI ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Normalpersonen (unstimuliert  $11,4 \pm 6,2$ ; stimuliert  $50,5 \pm 20,7$ ), der PSS-Patienten (unstimuliert  $13,6 \pm 5,5$ ; stimuliert  $50,9 \pm 16,4$ ) und der Patienten mit Psoriasis vulgaris (unstimuliert  $12,4 \pm 5,3$ ; stimuliert  $52,8 \pm 18,6$ ).

**Fluoreszenzintensität der Monozyten bei verschiedenen Probandengruppen**

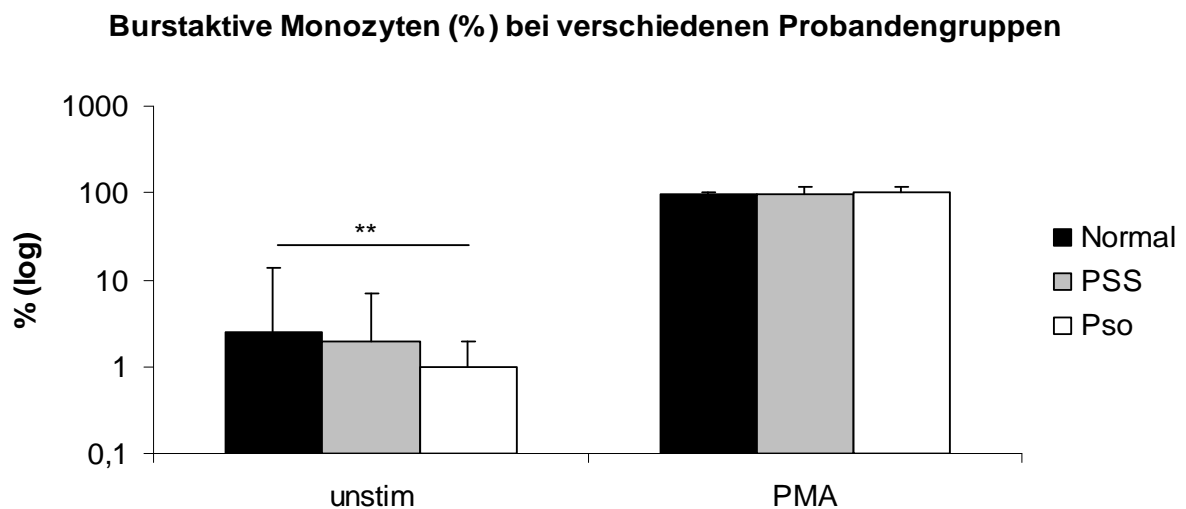


**Abb. 12: Fluoreszenzintensität der Monozyten bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=53); Pso: Psoriasispatienten (n=17)

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Gruppen in Hinsicht auf den prozentualen Anteil der für den Burst positiven Zellen. Bei den Psoriasis-Patienten (unstimuliert  $1,0\% \pm 1,0\%$ ) zeigten signifikant ( $p = 0,005$ ) weniger Monozyten eine basale Burst-Aktivität als bei den Normalpersonen (unstimuliert  $2,5\% \pm 10,9\%$ ).

Auch die Menge der basal aktiven Monozyten der PSS-Patienten (unstimuliert  $2,0\% \pm 5,1\%$ ) war im Vergleich zur Gruppe der Normalpersonen tendenziell erniedrigt, die Unterschiede waren hier jedoch nicht signifikant. Im stimulierten Zustand gab es beim Vergleich der drei Gruppen keinen wesentlichen Unterschied im Bezug auf den prozentualen Anteil der burstaktiven Zellen. Für die Normalpersonen wurden Werte von  $98,6\% \pm 5,1\%$ ; für die PSS-Patienten  $97,3\% \pm 17,1\%$  und für die Psoriasis-Patienten  $99,3\% \pm 16,1\%$  gemessen.

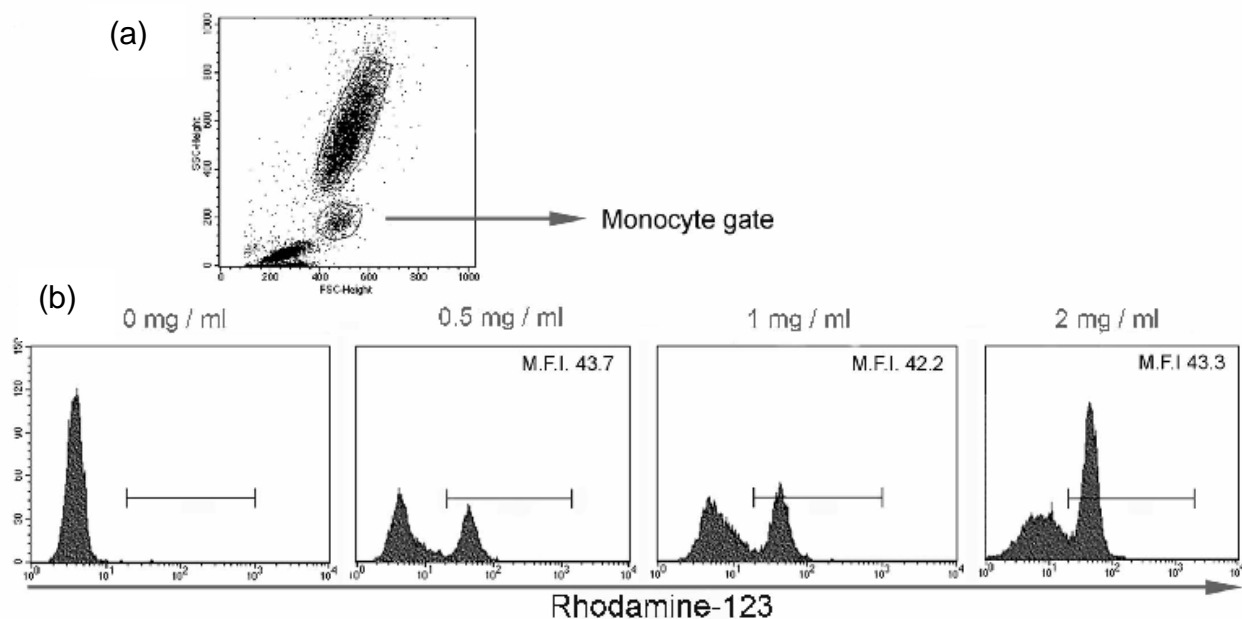
Es bleibt daher festzuhalten, dass Normalpersonen, im Vergleich zu Patienten mit PSS oder Psoriasis, mehr Zellen mit einer basalen Burstaktivität besitzen.



**Abb. 13: Burstaktive Monozyten in % bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA ( $1,4 \mu\text{M}$ ).** Dargestellt sind der Median der prozentualen Anteile sowie die Standardabweichung (logarithmische Skalierung). Normal: Normalpersonen ( $n=20$ ); PSS: PSS-Patienten ( $n=53$ ); Pso: Psoriasispatienten ( $n=17$ ); \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,005$

#### 4.1.6 Zymosan-stimulierter respiratorischer Burst der Monozyten

Nur eine Untergruppe der Monozyten reagierte auf die Zymosanstimulation mit einem starken Anstieg des RB. Da lediglich diese auf Zymosanstimulation mit einem respiratorischen Burst reagierende Untergruppe untersucht werden sollte, wurde ein Gate (M1) so gesetzt, dass nur diese im stimulierten Zustand abzugrenzende Subpopulation erfasst wurde (wie in Abbildung 14 b dargestellt). Nur die Werte dieser burstpositiven Zellen innerhalb von M1 wurden im Rahmen der Zymosanismessungen ausgewertet. Im unstimulierten Zustand befanden sich weniger als 1% der Monozyten im Gate M1. Auf die Erfassung der Basalwerte wurde deshalb verzichtet, da diese auf Grund der geringen Zellzahlen sehr schwankten.

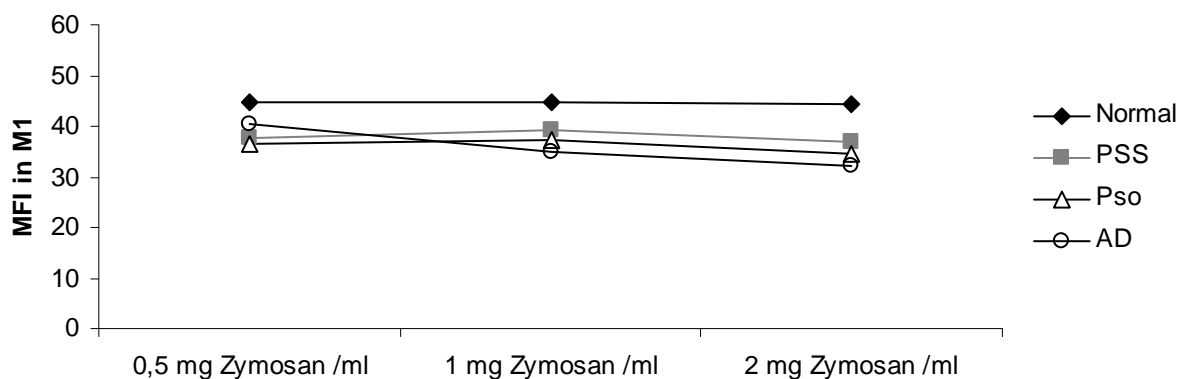


**Abb. 14: FACS-Messung des respiratorischen Bursts nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan.** (a) FSC/SSC Darstellung mit einem Gate um die Monozytenpopulation; (b) Darstellung der in (a) gegateten Monozytenpopulation im Histogramm. Es wurde der MFI der für den Burst positiven Monozytenpopulation im Gate M1 bzw. die % der sich im Gate M1 befindlichen Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen Zymosankonzentrationen (0,5; 1 und 2 mg/ml) gemessen. Angegeben sind die MFI-Werte der dargestellten Einzelmessung.

Der respiratorische Burst der Monozyten war nicht dosisabhängig, sondern blieb auch bei steigender Zymosankonzentration in allen vier untersuchten Probandengruppen konstant (siehe Abb. 15). Dies deutet auf eine gegenüber den Neutrophilen weniger stark beeinflussbare Burstreaktion der Monozyten hin. Gemessen wurde wiederum der MFI, der ein Maß für die im Zuge der Burstreaktion produzierten reaktiven

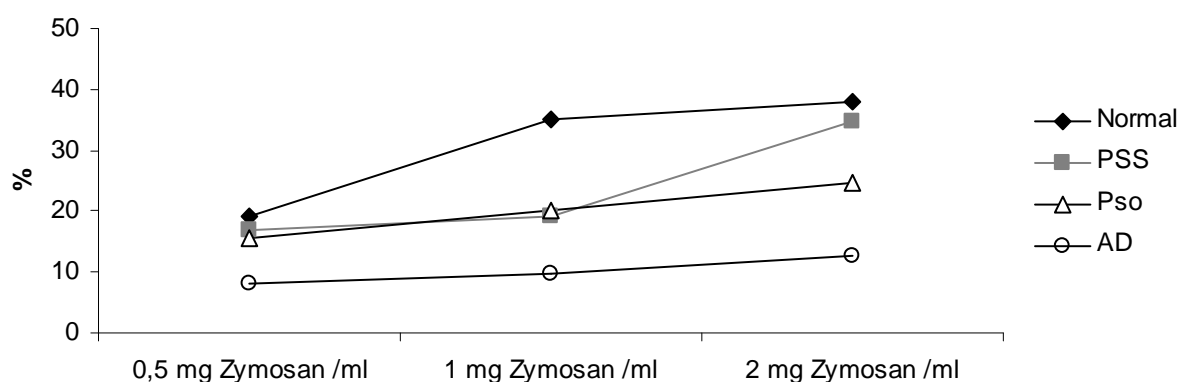
Sauerstoffspezies pro Zelle darstellt. Jedoch war in allen vier Probandengruppen bei Stimulation mit ansteigender Zymosankonzentration eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl der burstaktiven Zellen zu verzeichnen (siehe Abb. 16).

### Dosisabhängige Fluoreszenzintensität der Monozyten nach Zymosanstimulation



**Abb. 15: Dosisabhängige Fluoreszenzintensität der Monozyten** im Gate M1 bei verschiedenen Probandengruppen stimuliert mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml). Dargestellt ist der Median der MFI-Werte. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7)

### Dosisabhängigkeit der Anzahl der burstaktiven Monozyten (%) nach Zymosanstimulation



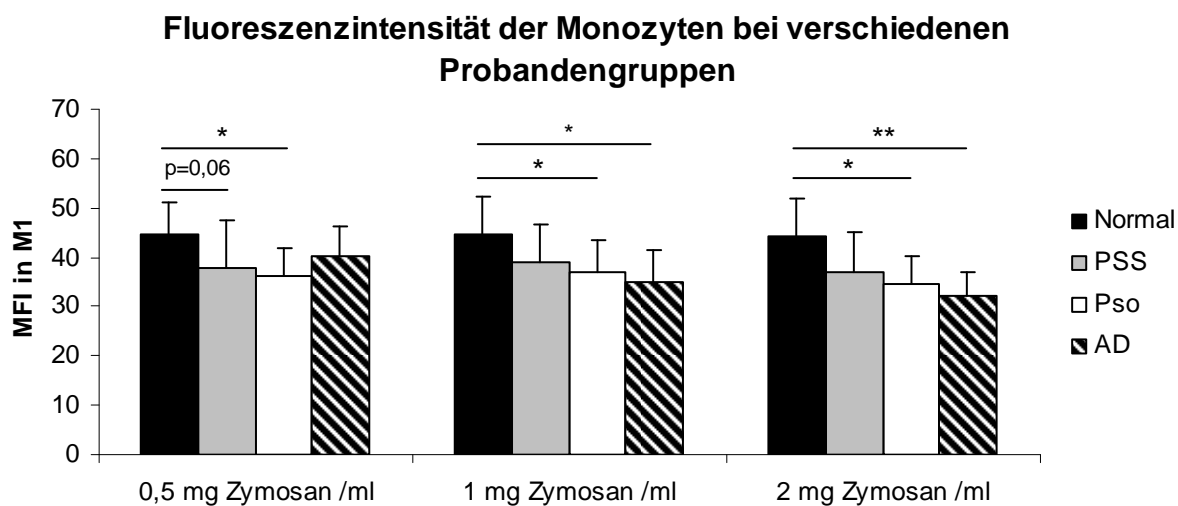
**Abb. 16: Dosisabhängigkeit der Anzahl der burstaktiven Monozyten** im Gate M1 in % bei verschiedenen Probandengruppen stimuliert mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml). Dargestellt ist der Median der MFI-Werte. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7)



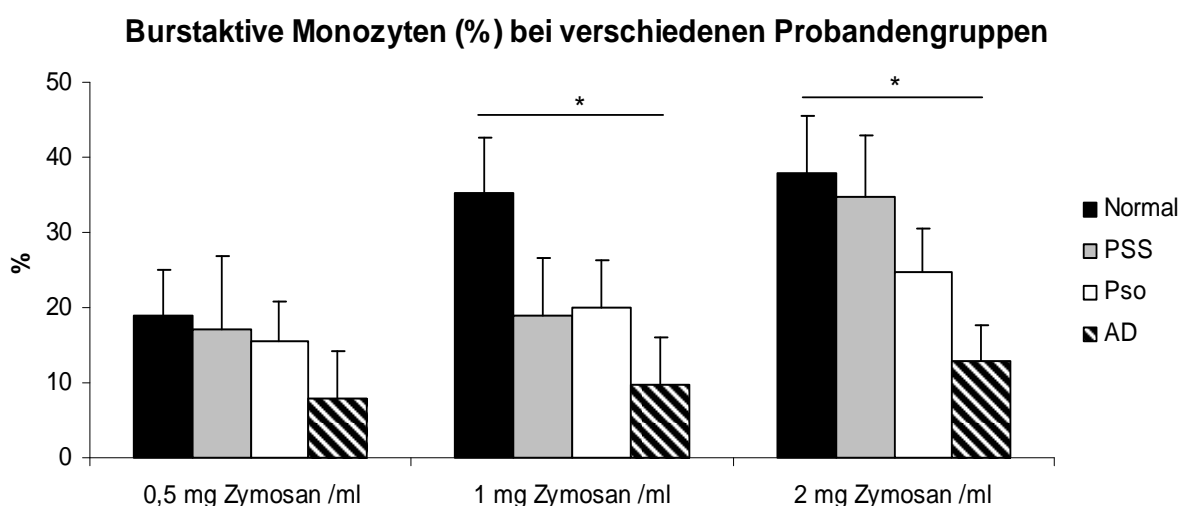
Der MFI der ausgewählten Monozytensubpopulation war vergleichbar mit den bei PMA-Stimulation erreichten Werten (für PSS-Patienten  $40,5 \pm 8,1$  bei Stimulation mit 2 mg Zymosan im Vergleich zu  $50,9 \pm 16,4$  bei Stimulation mit PMA). Für die Gruppe der PSS-Patienten ergaben sich tendenziell niedrigere MFI-Werte ( $37,7 \pm 9,8$ ;  $39,2 \pm 7,6$  und  $36,9 \pm 8,1$  beim Einsatz von 0,5, 1 und 2 mg Zymosan/ml) als für die Gruppe der gesunden Kontrollprobanden ( $44,8 \pm 6,1$ ;  $44,8 \pm 7,5$  und  $44,2 \pm 7,6$  beim Einsatz von 0,5, 1 und 2 mg Zymosan/ml). Die prozentualen Ergebnisse der für den RB positiven Zellen verliefen parallel zu den MFI-Werten. Auch hier waren die Werte der PSS-Patienten tendenziell gegenüber denen der Normalpersonen erniedrigt ( $17,0\% \pm 19,0\%$  vs.  $19,0\% \pm 10,1\%$ ;  $19,0\% \pm 23,0\%$  vs.  $35,2\% \pm 16,5\%$  und  $34,8\% \pm 23,4\%$  vs.  $37,9\% \pm 18,1\%$  bei Einsatz von 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml). Wegen der hohen individuellen Schwankung waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Bei den zusätzlich untersuchten Patientengruppen werden stärkere Unterschiede im Vergleich zu den Normalpersonen deutlich. Bei allen drei eingesetzten Zymosankonzentrationen ergaben sich für die Patienten mit Psoriasis vulgaris signifikant erniedrigte MFI-Werte ( $36,4 \pm 5,3$  bei 5 mg/ml,  $p = 0,012$ ;  $37,2 \pm 6,2$  bei 1 mg/ml,  $p = 0,038$  und  $34,4 \pm 5,8$  bei 2 mg/ml,  $p = 0,005$ ). Auch war die Anzahl der burstaktiven Zellen tendenziell erniedrigt ( $15,6\% \pm 13,6\%$ ;  $20,1\% \pm 17,2\%$  und  $24,8\% \pm 21,1\%$  bei 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml), obwohl sich hier kein signifikanter Unterschied zu den Normalpersonen nachweisen ließ.

Noch deutlicher war die Erniedrigung der Werte der AD-Patienten im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Wie man aus Abbildung 17 entnehmen kann, ergab der Einsatz von 1 und 2 mg Zymosan eine signifikante Herabsetzung ( $p = 0,013$  bzw.  $p = 0,002$ ) des MFI ( $40,2 \pm 6,1$ ;  $34,9 \pm 6,4$  und  $32,1 \pm 4,9$  bei 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml).

Auch der prozentuale Anteil der burstaktiven Zellen war bei AD-Patienten nach Stimulation mit 1 und 2 mg Zymosan signifikant ( $p = 0,026$  bzw.  $p = 0,009$ ) gegenüber dem bei gesunden Kontrollprobanden reduziert ( $8,0\% \pm 23,7\%$ ;  $9,7\% \pm 9,3\%$  und  $12,8\% \pm 17,4\%$  bei 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml).



**Abb. 17: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Gate M1 bei verschiedenen Probandengruppen nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. Normal: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$



**Abb. 18: Burstaktive Monozyten im Gate M1 in % bei verschiedenen Probandengruppen nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. Normalpers: Normalpersonen (n=20); PSS: PSS-Patienten (n=21); Pso: Psoriasispatienten (n=20); AD: Patienten mit atopischer Dermatitis (n=7); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$

## **4.2 Veränderung des respiratorischen Bursts durch milde Infrarot-A-induzierte Hyperthermie**

### **4.2.1 Unmittelbarer Einfluss der IRA-Ganzkörperhyperthermie auf den respiratorischen Burst**

Um zu untersuchen, ob die während der IRA-Bestrahlung erreichte Erhöhung der Körpertemperatur um  $1,3 \pm 0,4$  °C einen direkten „Primingeffekt“ auf den respiratorischen Burst hat, wurden Blutproben von PSS-Patienten (n = 6) direkt vor Beginn der Behandlung, sofort nach Ende der Bestrahlung und eine Stunde nach Bestrahlungsende entnommen. Der RB wurde in diesen Proben, wie im Methodikteil beschrieben, gemessen. Ein unmittelbarer Effekt der IRA-Hyperthermie konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die gewonnenen Daten deuten vielmehr auf die hohe Reproduzierbarkeit des Zymosan-Assays sowie auf eine niedrige interindividuelle Variabilität des respiratorischen Burstes hin (siehe Tabelle 6). Dies gilt besonders für die MFI-Werte der Monozyten und Neutrophilen. Der prozentuale Anteil der burstpositiven Monozyten scheint größeren individuellen Schwankungen zu unterliegen und deshalb nicht so stark reproduzierbar zu sein.

Respiratorischer Burst der Neutrophilen (MFI)				
Zymosankonzentration	unstimuliert	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
vor IRA	3,5 ± 1,0	4,0 ± 1,1	4,5 ± 1,3	5,3 ± 1,3
direkt nach IRA	3,4 ± 0,6	3,7 ± 0,7	4,2 ± 0,8	5,1 ± 0,9
1 h nach IRA	3,5 ± 0,6	3,9 ± 0,6	4,5 ± 0,9	5,0 ± 0,9
Respiratorischer Burst der Monozyten im Gate M1 (MFI)				
vor IRA	--	26,8 ± 10,0	26,3 ± 10,4	26,8 ± 10,4
direkt nach IRA	--	28,9 ± 11,2	30,7 ± 10,0	31,4 ± 8,0
1 h nach IRA	--	28,7 ± 10,0	29,2 ± 13,1	29,9 ± 11,1
Anzahl der burstpositiven Monozyten im Gate M1 (%)				
vor IRA	--	8,8 ± 8,6	13,6 ± 10,2	22,4 ± 8,9
direkt nach IRA	--	4,6 ± 4,3	11,9 ± 5,4	19,8 ± 10,3
1 h nach IRA	--	5,5 ± 4,0	18,0 ± 15,7	16,2 ± 5,3

**Tabelle 6: Respiratorischer Burst (Mittelwert ± SD) der Neutrophilen und Monozyten von PSS-Patienten (n=6) unstimuliert und stimuliert mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml), gemessen vor Beginn der IRA-Bestrahlung, direkt nach Ende der Bestrahlung und eine Stunde nach Bestrahlungsende.**

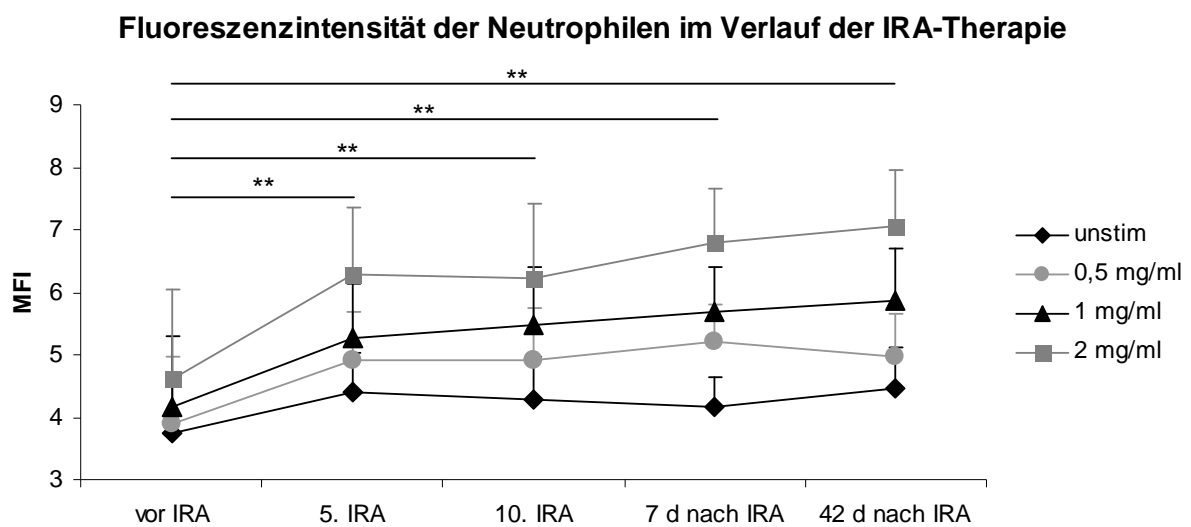
#### **4.2.2 Einfluss der IRA-Therapie auf den Zymosan-stimulierten respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten**

Vor Beginn der Therapie war der Zymosan-stimulierte neutrophiliäre RB bei PSS-Patienten signifikant niedriger als bei Normalpersonen (siehe 4.1.4). Schon nach der fünften IRA-Behandlung war ein signifikanter Anstieg der Burstaktivität der neutrophilen Granulozyten zu erkennen. Dies gilt für den unstimulierten Wert (Median  $4,4 \pm 0,6$ ;  $p = 0,01$ ) sowie auch für die MFI-Werte nach Zymosan-Stimulation mit  $0,5\text{mg/ml}$  (Median  $4,9 \pm 0,8$ ;  $p = 0,014$ ),  $1\text{ mg/ml}$  (Median  $5,3 \pm 0,9$ ;  $p = 0,002$ ) und  $2\text{ mg/ml}$  (Median  $6,3 \pm 1,1$ ;  $p = 0,004$ ). Dieser Anstieg setzte sich am zehnten Bestrahlungstermin fort (Median unstimuliert  $4,3 \pm 0,7$ ;  $p = 0,05$ ; stimuliert  $4,9 \pm 0,9$ ;  $p = 0,014$  bzw.  $5,5 \pm 0,9$ ;  $p = 0,011$  bzw.  $6,2 \pm 1,2$ ;  $p = 0,006$  mit  $0,5$ ;  $1$  und  $2\text{ mg}$  Zymosan/ml). Der höchste Wert wurde am Tag sieben nach Therapieende erreicht (Median unstimuliert  $4,2 \pm 0,5$ ;  $p = 0,03$ ; stimuliert  $5,2 \pm 0,6$ ;  $p = 0,001$  bzw.  $5,7 \pm 0,7$ ;  $p = 0,001$  bzw.  $6,8 \pm 0,9$ ;  $p < 0,001$  mit  $0,5$ ;  $1$  und  $2\text{ mg}$  Zymosan/ml). Bis zum letzten Nachbeobachtungstermin (42 Tage nach Therapieende) blieben die Burstwerte weitestgehend stabil und waren damit immer noch signifikant erhöht gegenüber den vor der Therapie ermittelten Werten (Median unstimuliert  $4,5 \pm 0,7$ ;  $p = 0,002$ ; stimuliert  $5,0 \pm 0,7$ ;  $p < 0,001$  bzw.  $5,9 \pm 0,8$ ;  $p < 0,001$  bzw.  $7,1 \pm 0,9$ ;  $p < 0,001$  mit  $0,5$ ;  $1$  und  $2\text{ mg}$  Zymosan/ml).

Am Ende der Untersuchung lagen die MFI-Werte der mit milder IRA- Hyperthermie behandelten Patienten im Wertebereich der Normalpersonen.

Dieser burststeigernde Effekt der IRA-Hyperthermie ist zellspezifisch, denn er konnte nur bei den Neutrophilen, nicht aber bei den Monozyten beobachtet werden (siehe 4.2.4).

Weiterhin blieb auch im Verlauf der IRA-Therapie die Dosisabhängigkeit der neutrophilen Burstreaktion auf unterschiedliche Zymosankonzentrationen erhalten.

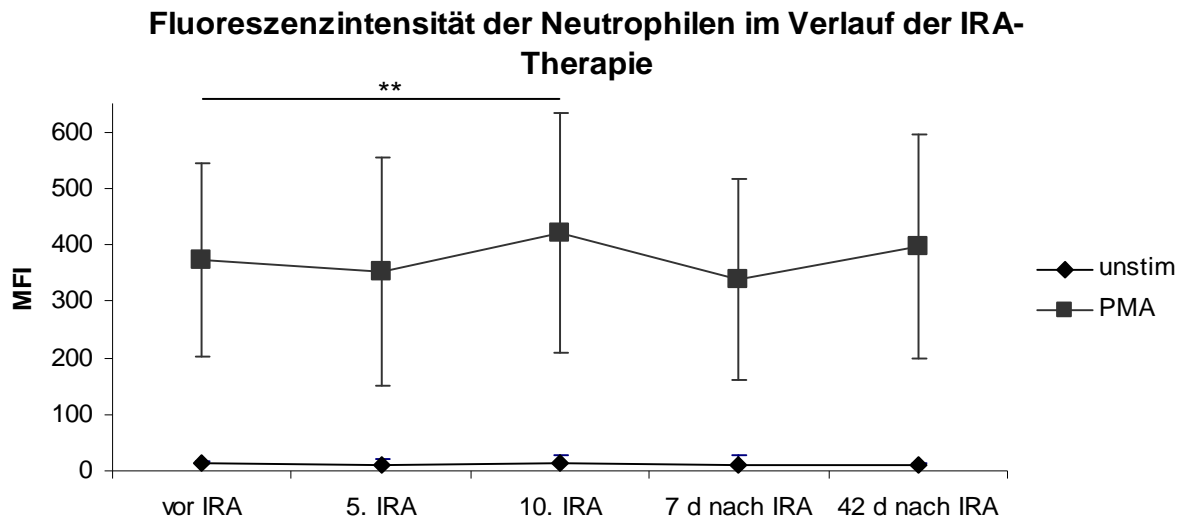


**Abb. 19: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$

#### **4.2.3 Einfluss der IRA-Therapie auf den PMA-stimulierten respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten**

Die Ergebnisse der PMA-Stimulationen unterstützen die Daten des Zymosan-Assays. Zwar war hier kein Einfluss der Therapie auf die basale Burstaktivität zu erkennen, jedoch gab es einen signifikanten Anstieg der MFI-Werte, die bei Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M) gemessen wurden: der unstimulierte MFI-Wert vor der Therapie (Median 12,3  $\pm$  5,8) änderte sich kaum nach der fünften (Median 11,9  $\pm$  9,5) oder nach der zehnten Behandlung (Median 13,0  $\pm$  13,4) und blieb auch sieben (Median 11,9  $\pm$  15,9) und 42 Tage nach Therapieende (Median 11,4  $\pm$  3,4) unbeeinflusst. Der stimulierte Wert vor Beginn der Behandlung (Median 371,8  $\pm$  171,2) veränderte sich bis nach der fünften Bestrahlung nur unwesentlich (Median 352,3  $\pm$  203,2), stieg aber bis zum Ende der zehnten IRA-Sitzung signifikant ( $p = 0,014$ ) im Vergleich zum Ausgangswert an (Median 421,7  $\pm$  212,0). Am siebenten Tag nach Behandlungsende war ein erneuter Abfall der Burstaktivität auf das Ausgangsniveau zu verzeichnen (Median 338,3  $\pm$  177,4). Am 42. Nachbeobachtungstag gab es keinen wesentlichen Unterschied gegenüber dem Ausgangswert mehr (Median 396,0  $\pm$  198,3).

Auch die durch PMA-Stimulation dargestellte Steigerung der Burstaktivität ist zellspezifisch, da die Werte der Monozyten von der IRA-Therapie unbeeinflusst blieben (siehe 4.2.5).

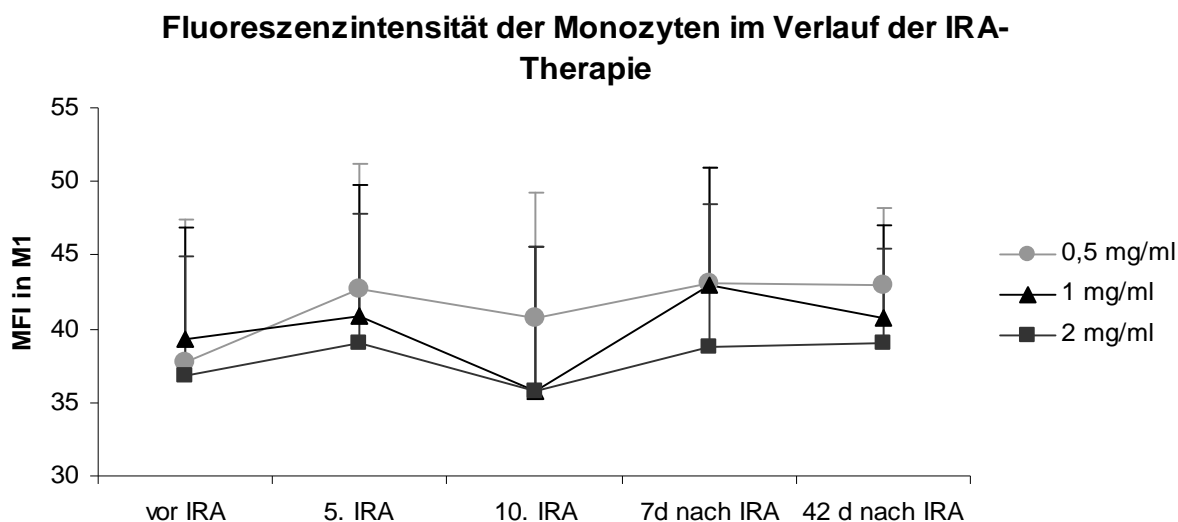


**Abb. 20: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA; ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$



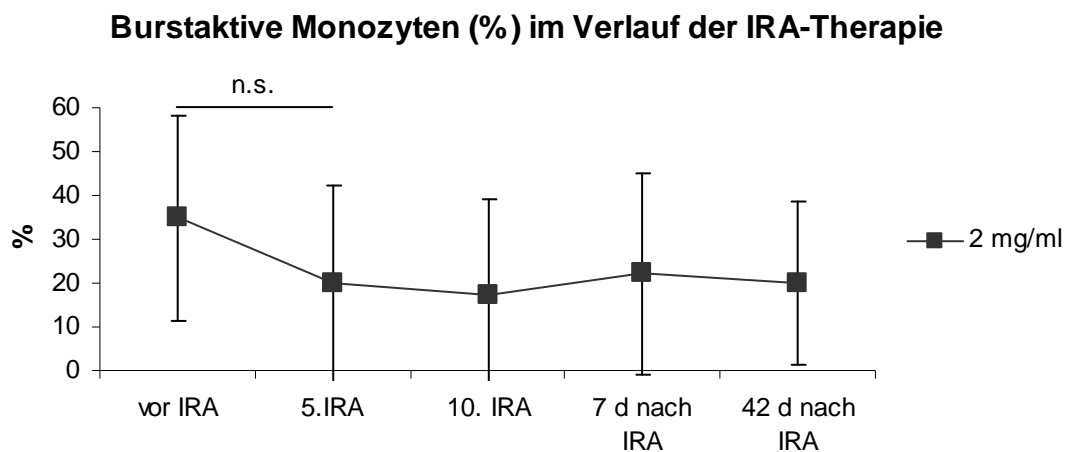
#### 4.2.4 Einfluss der IRA-Therapie auf den Zymosan-stimulierten respiratorischen Burst der Monozyten

Die IRA-Therapie hatte keinen Einfluss auf die Intensität des respiratorischen Bursts der Monozyten. Die MFI-Werte nach der fünften Bestrahlung (Median  $42,6 \pm 8,6$  bzw.  $40,9 \pm 8,9$  bzw.  $39,1 \pm 8,7$  stimuliert mit 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml) unterschieden sich nur unwesentlich von den vor Behandlungsbeginn erreichten Werten. Auch nach der zehnten Bestrahlung war kein signifikanter Unterschied feststellbar (Median  $40,7 \pm 8,6$  bzw.  $35,7 \pm 9,9$  bzw.  $35,7 \pm 9,9$  stimuliert mit 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml). Ebenso waren die MFI-Werte in der Nachbeobachtungsphase sieben Tage (Median  $43,1 \pm 7,9$  bzw.  $42,9 \pm 8,0$  bzw.  $38,8 \pm 9,6$  stimuliert mit 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml) sowie 42 Tage nach Behandlungsende (Median  $43,0 \pm 5,2$  bzw.  $40,7 \pm 6,3$  bzw.  $39,1 \pm 6,4$  stimuliert mit 0,5; 1 und 2 mg Zymosan/ml) gegenüber den Ausgangswerten nicht wesentlich verändert. Bemerkenswert ist, dass sich im Verlauf der IRA-Bestrahlung beim Einsatz hoher Zymosankonzentrationen eher niedrigere MFI-Werte ergaben als bei Stimulation mit weniger Zymosan. Eine konzentrationsabhängige Steigerung des monozytären MFI gab es also auch im Verlauf der Therapie nicht.



**Abb. 21: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Gate M1 im Verlauf der IRA-Therapie nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA

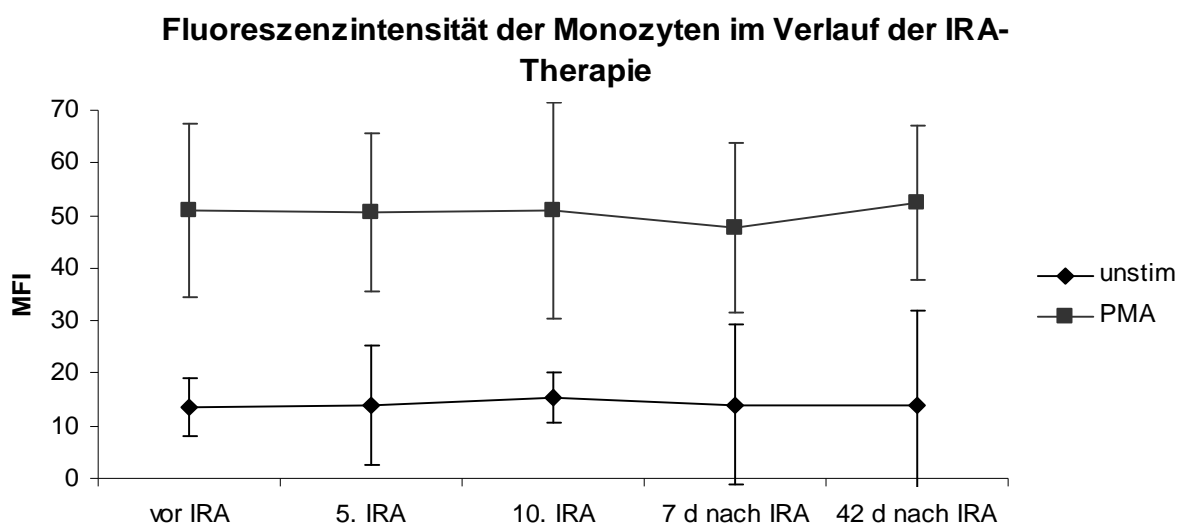
Bei der Auswertung des prozentualen Anteils der für den Burst positiven Monozyten sollen wegen der relativ großen Schwankung dieser Werte nur die Ergebnisse aus den Stimulationsversuchen mit der höchsten Zymosankonzentration herangezogen werden, da diese in Vierfachbestimmung vorliegen. Betrachtet man den prozentualen Anteil der positiven Zellen nach Stimulation mit 2 mg Zymosan/ml, ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor der Therapie (Median 34,8%  $\pm$  23,4%) und den Werten nach der fünften (Median 19,8%  $\pm$  22,4%) und nach der zehnten (Median 17,2%  $\pm$  22,0%) Behandlung festzustellen. Auch sieben (Median 22,2%  $\pm$  22,9%) bzw. 42 Tage nach Therapieende (Median 20,0%  $\pm$  18,6%) gab es keine erhebliche Veränderung. Daraus wird deutlich, dass die IRA-Behandlung keinen wesentlichen Einfluss auf den RB der Monozyten hatte.



**Abb. 22: Burstaktive Monozyten im Gate M1 in % im Verlauf der IRA-Therapie nach Stimulation mit 2 mg Zymosan/ml.** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA, n.s: nicht signifikant

#### 4.2.5 Einfluss der IRA-Therapie auf den PMA-stimulierten respiratorischen Burst der Monozyten

Die Ergebnisse nach PMA-Stimulation stimmen mit denen aus den Zymosan-Versuchen überein. Im Bezug auf die MFI-Werte gab es zwischen den Ausgangswerten (Median unstimuliert  $13,6 \pm 5,5$ ; stimuliert  $50,9 \pm 16,4$ ) und den Werten nach der fünften Behandlung (Median unstimuliert  $14,0 \pm 11,5$ ; stimuliert  $50,5 \pm 15,1$ ), nach der zehnten Bestrahlung (Median unstimuliert  $15,3 \pm 4,7$ ; stimuliert  $50,9 \pm 20,5$ ) sowie auch am siebenten Tag (Median unstimuliert  $14,0 \pm 15,2$ ; stimuliert  $47,8 \pm 16,1$ ) und am 42. Tag nach Therapieende (Median unstimuliert  $14,0 \pm 17,8$ ; stimuliert  $52,4 \pm 14,5$ ) keine wesentliche Differenz.



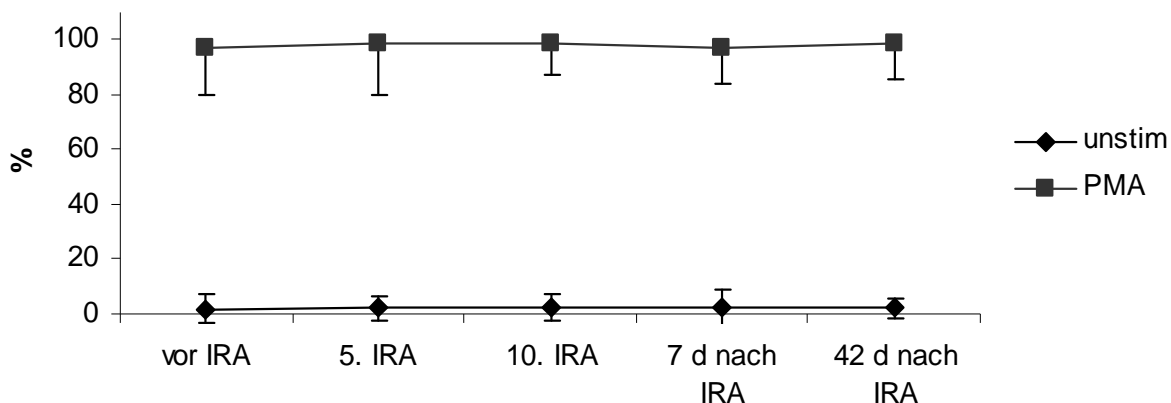
**Abb. 23: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA

Das Gleiche gilt für den prozentualen Anteil der für den Burst positiven Zellen. Der Ausgangswert (Median unstimuliert  $2,0\% \pm 5,1\%$ ; stimuliert  $97,3\% \pm 17,1\%$ ), der Wert nach der fünften (Median unstimuliert  $2,2\% \pm 4,5\%$ ; stimuliert  $98,4\% \pm 18,2\%$ ) und nach der zehnten Behandlung (Median unstimuliert  $2,4\% \pm 4,9\%$ ; stimuliert  $99,0\% \pm 12,0\%$ ) und auch die Ergebnisse sieben (Median unstimuliert  $2,3\% \pm 6,3\%$ ; stimuliert  $96,6\% \pm 12,3\%$ ) bzw. 42 Tage nach Therapieende (Median unstimuliert  $2,1\% \pm 3,3\%$ ;

stimuliert  $98,8\% \pm 13,5\%$ ) unterschieden sich nur unwesentlich. Insgesamt ist damit kein Einfluss der IRA-Bestrahlung auf den monozytären RB zu erkennen.

Die IRA-Behandlung bewirkte jedoch eine eindeutige Steigerung des neutrophiliären respiratorischen Bursts, der sechs Wochen nach Therapieende immer noch anhielt.

### Burstaktive Monozyten (%) im Verlauf der IRA-Therapie



**Abb. 24: Burstaktive Monozyten in % im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA (1,4  $\mu$ M).** Dargestellt sind der Median der MFI-Werte sowie die Standardabweichung. vor IRA: vor Beginn der Behandlung; 5. IRA: nach der 5. IRA-Behandlung; 10. IRA: nach der 10. IRA-Behandlung; 7 d nach IRA: 7 Tage nach der letzten IRA; 42 d nach IRA: 42 Tage nach der letzten IRA

## 4.3 Zytokinproduktion

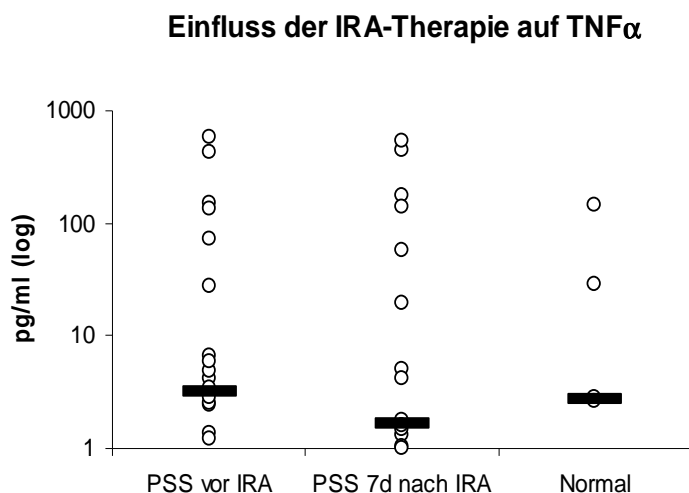
### 4.3.1 Untersuchungsmodell

Zytokine gelten als Primingfaktoren für den phagozytären respiratorischen Burst (siehe 1.4.1). Eine Erklärung für die durch die IRA-Bestrahlung gesteigerte Burstaktivität könnte eine ebenfalls durch die Behandlung erhöhte Zytokinkonzentration im Serum liefern. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen wurden  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, GM-CSF und IL-10 mittels ELISA im Serum jeweils vor Beginn der Therapie und sieben Tage nach Therapieende bestimmt. Angegeben ist stets der Median sowie die Standardabweichung in pg/ml.

Es konnte jedoch kein Einfluss der IRA-Therapie auf die Serumkonzentrationen der gemessenen Zytokine festgestellt werden.

### 4.3.2 TNF $\alpha$

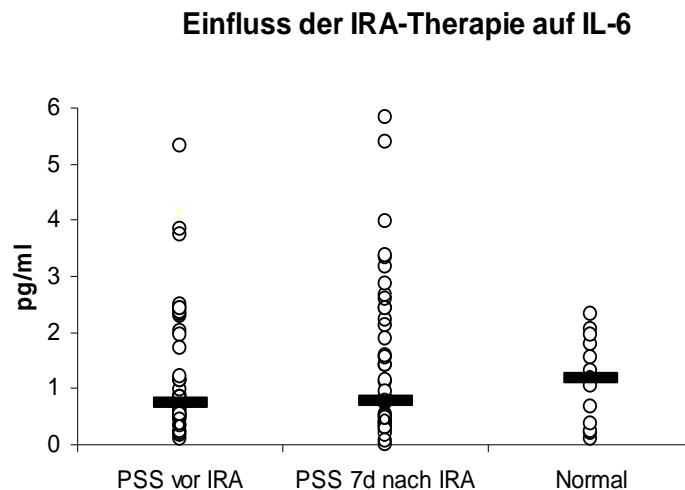
TNF $\alpha$  wurde im Serum bei 22 PSS-Patienten und sechs Normalpersonen bestimmt (Median  $\pm$  SD). Ein großer Teil der gemessenen Werte lag unter der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA ( $< 7,81$  pg/ml). Es war kein signifikanter Unterschied zwischen der TNF $\alpha$ -Konzentration, gemessen vor Behandlungsbeginn ( $3,16 \pm 149,81$ ) und sieben Tage nach Behandlungsende ( $1,67 \pm 157,35$ ) feststellbar. Die TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum von Normalpersonen ( $n=6$ ) ( $2,73 \pm 57,77$ ) unterschied sich nicht wesentlich von den bei PSS-Patienten gemessenen Werten. Die hohen Standardabweichungen kamen dadurch zu Stande, dass einzelne Probanden sehr hohe Zytokinwerte aufwiesen: bei sechs der 22 untersuchten Patientenserum lagen die TNF $\alpha$ -Konzentrationen weit über 70 pg/ml. Dies traf weiterhin auf zwei der sechs Normalpersonen zu. Bei den restlichen untersuchten Seren lagen die Werte im Bereich von 0,2 bis 10 pg/ml. Durch die Therapie trat jedoch keine Änderung der individuell hohen oder individuell sehr niedrigen TNF $\alpha$ -Werte auf. Ein Einfluss der IRA-Therapie auf die TNF $\alpha$ -Serumwerte ist daher unwahrscheinlich.



**Abb. 25: TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum** von Normalpersonen ( $n=6$ ) und PSS-Patienten ( $n=22$ ) vor und nach der IRA-Therapie (logarithmische Skalierung); Normal: Normalpersonen; PSS vor IRA: PSS-Patienten vor Beginn der IRA-Therapie; PSS 7 d nach IRA: PSS-Patienten 7 Tage nach der letzten IRA

### 4.3.3 IL-6

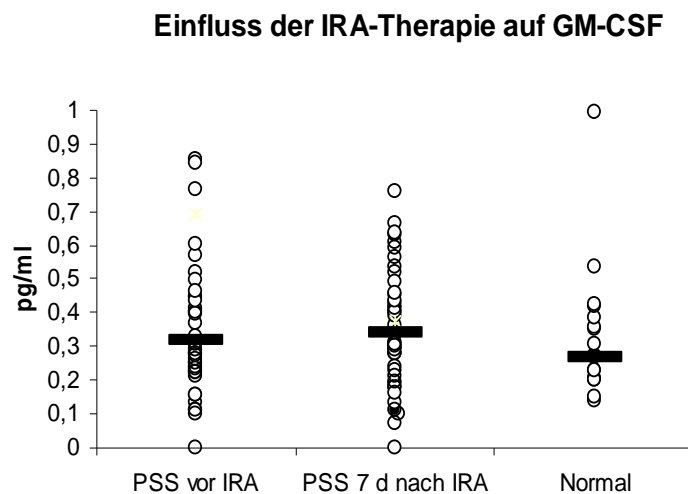
Es konnte keine Veränderung der IL-6-Konzentration im Serum (Median  $\pm$  SD) durch eine IRA-induzierte milde Hyperthermie nachgewiesen werden. Die IL-6-Konzentration im Serum der PSS-Patienten vor ( $0,73 \pm 1,28$ ) und nach der IRA-Therapie ( $0,76 \pm 1,53$ ) war unverändert. Allerdings fand sich eine tendenziell niedrigere IL-6-Konzentration im Serum von PSS-Patienten (n=55) im Vergleich zu Normalpersonen (n=22) ( $1,17 \pm 0,70$ ). Zur Messung von IL-6 wurde ein ultrasensitiver ELISA der Firma Biosource verwendet. Damit war auch die Messung von sehr niedrigen Zytokinkonzentrationen möglich (Nachweisgrenze  $< 0,104$  pg/ml).



**Abb. 26: IL-6-Konzentration im Serum** von Normalpersonen (n=22) und PSS-Patienten (n=55) vor und nach der IRA-Therapie; Normal: Normalpersonen; PSS vor IRA: PSS-Patienten vor Beginn der IRA-Therapie; PSS 7 d nach IRA: PSS-Patienten 7 Tage nach der letzten IRA

#### 4.3.4 GM-CSF

Auch die Konzentration von GM-CSF in den Seren von 54 PSS-Patienten blieb unbeeinflusst durch die IRA-Therapie. Die Werte vor ( $0,32 \pm 0,31$ ) und nach der Bestrahlung ( $0,34 \pm 0,35$ ) sind vergleichbar. Durch die hohen individuellen Schwankungen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ( $n=20$ ) nachgewiesen werden ( $0,27 \pm 0,19$ ). Die Nachweisgrenze des zur Messung verwendeten hochsensitiven ELISA der Firma R&D Systems lag bei  $< 0,26$  pg/ml. Einige der gemessenen Werte lagen jedoch darunter.



**Abb. 27: GM-CSF-Konzentration im Serum** von Normalpersonen ( $n=20$ ) und PSS-Patienten ( $n=54$ ) vor und nach der IRA-Therapie; Normal: Normalpersonen; PSS vor IRA: PSS-Patienten vor Beginn der IRA-Therapie; PSS 7 d nach IRA: PSS-Patienten 7 Tage nach der letzten IRA



### 4.3.5 IL-10

Die überwiegende Zahl der Messungen lag unter der Nachweisgrenze des eingesetzten ELISA (<0,99 pg/ml). Nur bei drei von 57 Patienten konnte ein Wert vor und nach der Therapie ermittelt werden (siehe Tabelle 7).

	vor IRA	7 d nach IRA
Patient 1	10,7	10,4
Patient 2	27,1	19,3
Patient 3	25	15,8

**Tabelle 7: IL-10-Werte im Serum** von drei PSS-Patienten in pg/ml; vor IRA: PSS-Patienten vor Beginn der IRA-Therapie; 7 d nach IRA: PSS-Patienten 7 Tage nach der letzten IRA

## 5 Diskussion

Als respiratorischen Burst (RB) bezeichnet man die Bildung und Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) in einer NADPH-Oxidase-abhängigen Reaktion. Bisherige Studien weisen auf eine Rolle des RB in der Pathogenese der PSS hin. Es wurde gezeigt, dass freie Sauerstoffradikale zur Zerstörung und so zur Permeabilitätssteigerung des Gefäßendothels beitragen. Dies führt wiederum zu einer kompensatorischen Regeneration von Basallamina-, Intima- und Fibroblastenzellen. Die so hervorgerufene Einengung des Gefäßlumens erhöht die Ischämie des umliegenden Gewebes. Die im Verlauf der PSS vorkommenden Raynaud-Attacken verstärken diesen Prozess (22, 23).

Studien von Lau et al (25) und Stein et al (26) legen einen erhöhten durch ROS ausgelösten oxidativen Stress bei PSS-Patienten nahe. Die genaue Bedeutung des respiratorischen Bursts bei der Entwicklung der progressiven systemischen Sklerodermie ist jedoch unklar. Weiterhin ist nicht abschließend gesichert, durch welche Zellen die erhöhte Menge von freien Sauerstoffradikalen produziert wird und durch welche Faktoren der respiratorische Burst beeinflusst werden kann.

1993 untersuchten Meffert et al (38) erstmals die Wirkung der Infrarot-A-Hyperthermie auf den respiratorischen Burst von isolierten peripheren polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Im Rahmen dieser Studie wurden 11 gesunde Probandinnen im Alter zwischen 47 und 57 Jahren 12 mal innerhalb von zwei Wochen einer milden Infrarot-A-Ganzkörperhyperthermie unterzogen. Einen Tag vor der ersten und zwei bzw. 22 Tage nach der letzten Bestrahlung wurde allen Teilnehmerinnen Blut entnommen und der RB der daraus isolierten PMN mittels INT-Test und luminol-verstärkter Chemilumineszenz gemessen. Als Stimulantien für den RB wurden in dieser Studie opsoniertes Zymosan und humanes Gammaglobulin verwendet. Mit beiden Messverfahren konnte ein signifikanter Abfall des stimulierten RB zwei Tage nach Therapieende im Vergleich zu vor Therapiebeginn festgestellt werden. Die Minderung des RB war auch 22 Tage nach Therapieende noch sichtbar.

Basierend auf diesen Ergebnissen und mit der Fragestellung nach der Rolle des RB im Verlauf der Sklerodermie prüften wir in der vorliegenden Untersuchung den

respiratorischen Burst bei Sklerodermiepatienten im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgruppen sowie den Einfluss der IRA-Ganzkörperhyperthermie auf den Burst bei Patienten mit PSS.

Zur genaueren Beschreibung des Bursts wurde ein sehr schwacher Stimulus (nicht opsoniertes Zymosan) im Vergleich zu einem starken Stimulus (PMA) verwendet. Im Gegensatz zu dem von Meffert et al verwendeten Stimulationsverfahren wurde in der hier vorliegenden Untersuchung nicht opsoniertes Zymosan verwendet. Jang et al (94) konnten eine deutliche dosisabhängige Steigerung des RB auch nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan nachweisen. Die höchste von dieser Arbeitsgruppe eingesetzte Zymosankonzentration lag mit 0,3 mg/ml ebenfalls im Bereich der hier eingesetzten Stimulationskonzentrationen. Lieberman et al (55) gebrauchten in ihrer Untersuchung zum Vergleich der Burststimulation mit opsoniertem und nicht opsoniertem Zymosan ein Assay, das dem hier angewandten in weiten Teilen gleicht. Diese Arbeitsgruppe konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen einer Stimulation mit opsoniertem und nicht opsoniertem Zymosan in Bezug auf den respiratorischen Burst nachweisen. Es liegt daher nahe, dass nicht opsoniertes Zymosan ebenfalls einen geeigneten Stimulus für den RB darstellt.

Zur Messung des unstimulierten und stimulierten RB kam in der vorliegenden Arbeit die durchflusszytometrische Analyse nach Färbung mit Dihydrorhodamin 123 zum Einsatz. Dieses Verfahren gilt derzeit als sensitiver gegenüber dem von anderen Arbeitsgruppen verwendeten INT-Test oder der Messung mittels Chemilumineszenz (90).

Unsere Daten zeigen einen gering aber signifikant reduzierten respiratorischen Burst der neutrophilen Granulozyten von PSS-Patienten im Gegensatz zu Normalpersonen basal und nach Stimulation mit Zymosan und PMA. Des Weiteren weisen die vorliegenden Ergebnisse auf eine schwächere Reaktion der Neutrophilen von PSS-Patienten auf Zymosanstimulation hin.

Die Ergebnisse einer Untersuchung von Czirjak et al (95) bestätigen unsere Ergebnisse: hier wurde der neutrophile respiratorische Burst mittels Chemilumineszenz im Vollblutassay gemessen. Als Stimulanz wurde nicht opsoniertes Zymosan verwendet. Im Bezug auf die stimulierte Burstaktivität der PMN ergab sich

kein Unterschied zwischen der Gruppe aus 20 PSS-Patienten und der Gruppe aus 15 gesunden Kontrollpersonen. Zusätzlich zeigte sich jedoch eine bei der PSS-Gruppe erniedrigte Chemotaxis der Neutrophilen gegen zymosanaktiviertes Serum.

Im Gegensatz dazu zeigten Luczynska et al (96) eine gesteigerte Burstaktivität der Phagozyten aus dem Blut von PSS-Patienten: Im Rahmen dieser Untersuchung wurde die basale und die fMLP-stimulierte phagozytäre ROS-Produktion mit Hilfe der luminolverstärkten Chemilumineszenz im Vollblut gemessen. Im unstimulierten und stimulierten Zustand ergab sich scheinbar für die Gruppe der 30 PSS-Patienten eine im Vergleich zu den 30 Kontrollpersonen erhöhte ROS-Produktion. Wenn man jedoch die stark variierenden Medianwerte der Messergebnisse dieser Studie betrachtet, dann sprechen die von Luczynska et al dargestellten Ergebnisse eher gegen eine starke Veränderung des basalen und des fMLP-stimulierten neutrophilen RB im Zuge der Sklerodermie.

Ein zusätzlicher Grund für die kontroversen Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe und der hier vorliegenden Untersuchung könnte die Verwendung von zwei unterschiedlichen Messmethoden sein. Die luminolverstärkte Chemilumineszenz misst andere Produkte der Burstreaktion als mittels der hier verwendeten FACS-Analyse detektiert werden (87) (siehe weiter unten).

Eine autonome Überproduktion von ROS durch neutrophile Granulozyten von Patienten mit PSS ist somit gemäß der hier erhobenen Daten und den Resultaten anderer Studien unwahrscheinlich.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen weiterhin, dass der monozytäre respiratorische Burst bei PSS-Patienten basal und nach Stimulation mit PMA sich kaum vom Burst der Monozyten von Normalprobanden unterscheidet. Nach Stimulation mit allen drei eingesetzten Zymosandosen weisen die Monozyten von PSS-Patienten jedoch eine tendenziell reduzierte Burstaktivität auf. Zusätzlich ist die der prozentuale Anteil der burstpositiven Monozyten bei Sklerodermiepatienten deutlich gegenüber den bei Normalpersonen ermittelten Werten reduziert. Derzeit existieren keine weiteren Daten zum respiratorischen Burst bei Monozyten von Patienten mit PSS.

Jedoch konnte für Patienten mit schlecht eingestelltem nicht-insulinabhängigem Diabetes von Chang und Shaio (97) ein erniedrigter respiratorischer Burst der Monozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gezeigt werden. Dies gilt für den mit PMA als auch für den mit opsoniertem Zymosan stimulierten monozytären RB.

Weiterhin deuten die vorliegenden Daten auf die Existenz von zwei Subpopulationen innerhalb der Monozyten hin: bei der Analyse des Zymosan-stimulierten RB war eine burstpositive Monozytengruppe deutlich von einer negativen Zellpopulation abgrenzbar. Auch Basso et al (98) konnten die Existenz von zwei Monozytensubpopulationen zeigen: Die Gruppe stimulierte Monozyten mit OMV (meningococcal outer membrane vesicles) bedeckten fluoreszenten Beads und analysierte die Phagozytosefähigkeit und den RB der Zellen. In der fließzytometrischen Analyse war eine Population mit starkem RB klar von einer nur schwach reagierenden Zellgruppe abgrenzbar. Bei der im Rahmen der vorliegenden Untersuchung durchgeführten rezeptorunabhängigen Stimulation des RB mit PMA war dies nicht der Fall. Daher wäre eine unterschiedliche Rezeptorverteilung beispielsweise von TLR-2 innerhalb der Monozyten als Ursache zu vermuten.

In der vorliegenden Untersuchung wurde außerdem der neutrophile und monozytäre RB bei Patienten mit Psoriasis vulgaris und Atopischer Dermatitis untersucht.

Sowohl unstimuliert als auch nach Stimulation mit Zymosan konnte ein signifikant reduzierter Burst der neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit Psoriasis im Gegensatz zu gesunden Normalpersonen festgestellt werden. Parallel dazu zeigten auch die Monozyten der Psoriasispatienten eine reduzierte Burstaktivität im unstimulierten Zustand und nach Stimulation mit allen drei eingesetzten Zymosankonzentrationen.

Ebenfalls war der neutrophile respiratorische Burst der Patienten mit AD tendenziell gegenüber den bei Normalpersonen ermittelten Werten erniedrigt. Auch die monozytäre Burstaktivität der Gruppe mit atopischer Dermatitis war im Vergleich zu Normalpersonen signifikant reduziert.

In diesem Zusammenhang sind die Daten der Arbeitsgruppe Pitrak et al. (99) zu erwähnen: die Gruppe untersuchte die Zymosan-stimulierte Chemilumineszenz der neutrophilen Granulozyten von HIV-Patienten. Im Vergleich zu Normalpersonen wurden in der Patientengruppe signifikant erniedrigte Werte festgestellt.

So wird durch die Daten dieser hier vorliegenden und der o.g. Studien deutlich, dass eine Reduktion des respiratorischen Bursts nicht spezifisch für die progressive systemische Sklerodermie ist, sondern auch bei anderen systemischen Erkrankungen auftritt.

Ebenso legen die Ergebnisse dieser Untersuchung nahe, dass die monozytäre Burstaktivität bei Patienten mit PSS sowie bei Psoriasispatienten und bei Patienten mit atopischer Dermatitis zwar signifikant gegenüber den Werten von Normalpersonen erniedrigt, der Unterschied jedoch gering ist. Daher ist eine klinische Bedeutung dieser reduzierten Burstaktivität der Monozyten unwahrscheinlich.

Weiterhin unterstützen unsere Daten die Ergebnisse von Sambo et al (100): sie wiesen nach, dass unstimulierte Fibroblasten aus der Haut von Sklerodermiepatienten in vitro in einer NADPH-Oxidase-vermittelten Reaktion signifikant mehr  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  freisetzen als Fibroblasten aus der Haut gesunder Kontrollpersonen. Diese und die hier dargestellten Daten legen nahe, dass ein erhöhter oxidativer Stress im Rahmen der PSS nicht auf einen erhöhten respiratorischen Burst der Neutrophilen oder Monozyten zurückzuführen ist, sondern eher durch eine vermehrte ROS-Produktion der Fibroblasten bedingt wird.

Ein anderer Grund für eine erhöhte Konzentration von freien Sauerstoffradikalen bei Patienten mit PSS könnte eine durch Ischämie gesteigerte Aktivität der Xanthinoxidase sein. Xanthinoxidase kommt in den Endothelzellen kleiner Blutgefäße vor und liegt dort gewöhnlich als Xanthindehydrogenase (ein Isotop der Xanthinoxidase) vor. Unter besonderen Bedingungen, wie z.B. im Zustand einer Ischämie, wird Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase umgeformt. Weiterhin findet unter ischämischen Bedingungen die Umwandlung von Adenosintri-phosphat (ATP) zu Hypoxanthin und Xanthin statt. Durch die Xanthinoxidase werden dann Hypoxanthin und Xanthin in Harnsäure umgewandelt. Dabei werden  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{OH}^\cdot$  gebildet (23). Neben der Xanthinoxidase existieren weitere Enzyme wie NO-Synthase, Cyclooxygenase und Lipooxygenase, die in Endothelzellen vorkommen und ebenfalls an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sind (101). Somit wird deutlich, dass der phagozytäre respiratorische Burst nicht die einzige Quelle für die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen darstellt und das neben der Burstreaktion

von Neutrophilen und Monozyten auch andere Mechanismen für einen vermehrten oxidativen Stress bei der Entwicklung der PSS verantwortlich sein könnten.

Im Verlauf der hier angewandten Therapie mit milder Infrarot-A-induzierter Hyperthermie kommt es zu einem signifikanten Anstieg des respiratorischen Bursts der neutrophilen Granulozyten der PSS-Patienten. Dies gilt für den unstimulierten RB, für den Burst nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan und, wenn auch in geringerem Ausmaß, für den PMA-stimulierten RB. Nach Therapieende hatte sich der neutrophile RB der PSS-Patienten an die Werte der gesunden Kontrollgruppe angeglichen.

Dieser burststeigernde Effekt der IRA-Therapie ist zellspezifisch, denn der RB der Monozyten bleibt unstimuliert und auch nach Stimulation mit den beiden verwendeten Stimulanzen unbeeinflusst. Der Burst der Neutrophilen ist auch sechs Wochen nach Therapieende noch gesteigert.

Die genauen Faktoren, die zur Unwirksamkeit der mehrfach applizierten Ganzkörperhyperthermie auf den RB der Monozyten führen, sind unklar.

Aus dem in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Vergleich der PMA-stimulierten Burstreaktion der Neutrophilen und Monozyten wird jedoch deutlich, dass die monozytäre Burstreaktion generell schwächer ausfällt als die Reaktion der Neutrophilen. Die Arbeitsgruppe von Yagisawa et al (102) bestätigt diese Ergebnisse. Hier wurde der fMLP- und PMA-stimulierte RB von Monozyten und Neutrophilen mittels Cytochrom-C-Test bestimmt. Beim Einsatz von beiden Stimulanzen war der RB der Monozyten deutlich schwächer. Mittels Immunoblot wurde ein verminderter Gehalt der Cytochrom  $b_{558}$ -Bestandteile, gp91 $phox$ , p47 $phox$  und p67 $phox$  im Cytosol der Monozyten im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten festgestellt. Der Plasmfaktor p22 $phox$  war ebenfalls erniedrigt. Die schwächere Burstreaktion der Monozyten ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen.

Der RB der Monozyten scheint nicht nur schwächer ausgeprägt, sondern zusätzlich auch weniger sensitiv als der neutrophile RB zu sein: Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten erwiesen sich die Monozyten bezüglich der Burstreaktion als unempfindlich gegenüber einer Erhöhung der Zymosandosis. Eine generelle Stabilität des RBs der Monozyten gegenüber äußeren Faktoren wie z.B. auch der IRA-Hyperthermie ist anzunehmen.

Interessante Ergebnisse hierzu liefert die Studie von Barry et al (103). Hier wurde der Einfluss einer Ischämie durch Aortenabklemmung und einer anschließenden Reperfusion auf den fMLP-stimulierten RB von Monozyten und Neutrophilen untersucht. Der neutrophile RB stieg signifikant nach Wiederherstellung des Aortenflusses an und hatte 40 Minuten nach Klammerlösung einen Höchstwert erreicht. Auch die Monozyten zeigten eine tendenziell gesteigerte Burstaktivität, die Werte waren aber nicht so deutlich erhöht wie bei den Neutrophilen. Episoden von Ischämie und Reperfusion, verursacht durch Gefäßspasmen, existieren auch im Rahmen der Sklerodermie. Eine dadurch verursachte stärkere Aktivierung der Neutrophilen im Gegensatz zu den Monozyten ist denkbar. Zusammen mit einer möglichen geringeren Sensibilität der monozytären Burstreaktion könnte dies eine Begründung für ein isoliertes Ansprechen der Neutrophilen auf die IRA-Therapie sein. Es ist jedoch auch möglich, dass Monozyten auf eine andere Art als Neutrophile durch eine Ischämie und Reperfusion angeregt werden: Metinko et al (104) konnten eine durch Sauerstoffmangel gesteigerte IL-8-Produktion von Monozyten nachweisen. Monozytenkulturen wurden in luftdichten Inkubationskammern platziert und einem Wechsel von Hypoxämie und Hyperoxämie ausgesetzt. Die IL-8-Konzentration im Überstand der so behandelten Kulturen war deutlich erhöht. Als Kontrolle wurden Monozytenkulturen, die normaler Raumluft ausgesetzt waren, benutzt. Es ist somit denkbar, dass die im Zuge der Sklerodermie herrschenden Bedingungen ebenfalls zu einer gesteigerten IL-8-Produktion der Monozyten führen. IL-8 wirkt aktivierend und chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Zusätzlich führt die Präinkubation von Neutrophilen mit IL-8 zu einem signifikant stärkeren fMLP-stimulierten RB als ohne eine solche Vorbehandlung erreicht wird (74). Somit könnte eine bei Sklerodermie erhöhte IL-8-Produktion der Monozyten zu einem Priming der Neutrophilen führen. Dies würde eine Erklärung für die starke Dosisinsensibilität der neutrophilen Burstreaktion und für das gute Ansprechen der Neutrophilen auf die IRA-Therapie liefern.

Ein direkter „Primingeffekt“ der IRA-Bestrahlung auf den respiratorischen Burst war nicht nachweisbar. Die Werte für den MFI als Maß der Burstaktivität der Neutrophilen und Monozyten, gemessen bei sechs PSS-Patienten vor Beginn und direkt nach Beendigung der 30-minütigen Bestrahlung sowie eine Stunde nach Bestrahlungsende, unterscheiden sich kaum.



Diese Resultate decken sich mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe von Löer et al (105). Hier wurden acht gesunde Probanden ebenfalls einer 60minütigen Ganzkörper-Infrarot-A-Hyperthermie nach Ardenne unterzogen. Unmittelbar nach Bestrahlungsende, sowie eine, vier und achteinhalb Stunden später wurde ihnen Blut entnommen. Der fMLP- und PMA-stimulierte respiratorische Burst der Neutrophilen wurde mittels Lucigenin-abhängiger Chemilumineszenz gemessen. Die Burstwerte direkt nach Bestrahlungsende und nach einer Stunde Wartezeit unterschieden sich, wie auch bei der hier vorliegenden Untersuchung, nicht. Jedoch nach vier Stunden Wartezeit gab es einen deutlichen Anstieg des neutrophilen RB, der sich bis zum Abnahmezeitpunkt 8,5 Stunden nach Bestrahlungsende fortsetzte.

Auch Kappel et al (106) konnten zeigen, dass sich der RB der Neutrophilen und Monozyten im Verlauf oder kurze Zeit nach der Ganzkörperhyperthermie nicht verändert. Im Rahmen der Studie dieser dänischen Arbeitsgruppe wurden acht gesunde männliche Probanden einem zweistündigen heißen Wasserbad unterzogen. Die Körpertemperatur wurde währenddessen kontinuierlich gemessen. Blutentnahmen fanden vor Beginn der Behandlung, beim Erreichen einer Körpertemperatur von 38°C, 39°C und 39,5°C sowie nach einer zweistündigen Wartezeit nach Ende des Wasserbades statt. Die isolierten Zellen wurden danach mit opsoniertem Zymosan stimuliert und ihre Burstaktivität mittels Chemilumineszenz gemessen. Es ergaben sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede zu den Werten vor Beginn des Wasserbades. Diese Ergebnisse lassen einen direkten Primingeffekt einer milden in vivo Hyperthermie unwahrscheinlich erscheinen. Eher ist eine indirekte Steigerung des Bursts durch IRA-Hyperthermie anzunehmen.

Damit stehen die hier dargestellten Ergebnisse im Gegensatz zu den vormals von Meffert et al publizierten Daten. Die Tatsache, dass verschiedene Verfahren zur Messung des respiratorischen Bursts benutzt wurden, könnte ein Grund dafür sein. Der damals von Meffert et al verwendete INT-Test basiert auf der Reduktion von Cytochrom c durch Superoxidionen, die zuerst im Zuge der NADPH-Oxidase-abhängigen Burstreaktion gebildet werden. Der in der vorliegenden Untersuchung eingesetzte Farbstoff Dihydrorhodamin 123 wird durch das später gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Rhodamin oxidiert. Bei der ebenfalls von Meffert et al verwendeten luminolverstärkten

Chemilumineszenz wird Luminol durch HOCl, das ganz am Ende der Burstreaktion entsteht, und zusätzlich durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> angeregt (siehe auch 1.3.1) (87).

Weiterhin unterscheiden sich diese drei Messverfahren im Bezug auf ihren Reaktionsort: die Oxidation von Dihydrorhodamin 123 findet streng intrazellulär und die Reduktion von Cytochrom c streng extrazellulär statt. Dahingegen läuft die Stimulation von Luminol wahrscheinlich im Intra- und Extrazellularraum ab (93).

Die unterschiedlichen Zellpräparationstechniken, die in der vorliegenden und in der Studie von Meffert et al verwendet wurden, könnten ebenfalls zum Nichtübereinstimmen der Ergebnisse beitragen: bei den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurde die Stimulation des RB mit PMA bzw. Zymosan sowie die anschließende Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dihydrorhodamin 123 im Vollblut durchgeführt. Dadurch wurde eine möglichst geringe Veränderung der natürlichen Umgebung der reagierenden Zellen sichergestellt. In der Studie von Meffert et al wurden die neutrophilen Granulozyten zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugierung und einer anschließenden Erythrolyse isoliert. Erst danach wurden humanes Gammaglobulin und opsoniertes Zymosan als Stimulanzen für den RB hinzugefügt. Es ist wahrscheinlich, dass Zellen, die aus ihrem natürlichen Milieu, das burstbeeinflussende Faktoren wie Immunglobuline und Komplement enthält, isoliert werden, anders reagieren als Zellen, die im Vollblut belassen werden (107). Durch die von der Arbeitsgruppe Meffert durchgeführte Zellpräparation könnte es also zu einer Beeinträchtigung der Burstaktivität der neutrophilen Granulozyten gekommen sein.

Zur näheren Erforschung des molekularen Mechanismus des burststeigernden Effektes der IRA-Therapie wurde der Einfluss der IRA-Bestrahlung auf die Serumkonzentrationen von TNF $\alpha$ , IL-6, GM-CSF und IL-10 untersucht. Vorherige Studien haben gezeigt, dass diese Zytokine einen Einfluss auf den RB haben könnten. Gallová et al (66) konnten durch vorherige Inkubation von Monozyten und Neutrophilen mit TNF $\alpha$  bzw. IL-6 eine gesteigerte ROS-Produktion dieser Zellen nach Stimulation mit PMA und opsoniertem Zymosan nachweisen. Auch eine Inkubation von humanen Neutrophilen mit GM-CSF führt laut einer Untersuchung von Elbim et al (68, 74) zur Steigerung des stimulierten respiratorischen Bursts dieser Zellen. Es wird vermutet, dass eine Inkubation der Phagozyten mit TNF $\alpha$  bzw. GM-CSF zur Phosphorylierung eines Majorpeptides des p47 $phox$ , einem Bestandteil der NADPH-

Oxidase, führt. Das durch diese Zytokine verursachte Priming des respiratorischen Bursts könnte laut Dewas et al (70) auf diesen Effekt zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu diesen drei proinflammatorischen Zytokinen könnte das antiinflammatorische IL-10 eher für eine Herunterregulation des respiratorischen Bursts verantwortlich sein. Bogdan et al (76) konnten einen solchen Effekt nach Inkubation von Makrophagen mit IL-10 aufzeigen. Ein Einfluss des IL-10 auf den neutrophilen und monozytären RB konnte jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Serumkonzentrationen von  $\text{TNF}\alpha$ , GM-CSF, IL-6 und IL-10 bei PSS-Patienten vor und nach der IRA-Therapie sowie im Vergleich zu gesunden Normalpersonen bestimmt. Für keines der Zytokine konnte jedoch ein Unterschied zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Auch blieben die Serumkonzentrationen der vier Zytokine durch die IRA-Ganzkörperhyperthermie unbeeinflusst. Es ist hinzuzufügen, dass einige der gemessenen Werte unter der Sensitivitätsgrenze der verwendeten ELISA-Kits lagen. Dies macht eine relevante Veränderung der gemessenen Zytokinwerte bei PSS und durch die IRA-Therapie unwahrscheinlich.

Gegensätzliche Ergebnisse werden von Schmidt (86) dargestellt. Er beschreibt eine Studie, in deren Rahmen ein Anstieg der IL-6-Konzentration im Serum durch milde Ganzkörperhyperthermie, induziert durch heiße Parafin角度packungen, nachgewiesen wird. Weiterhin wird eine Erhöhung von  $\text{TNF}\alpha$  im Serum, hervorgerufen durch milde thermalbadinduzierte Hyperthermie, beschrieben.

Basili et al (85) bestätigen jedoch die hier dargestellten Daten. Die Arbeitsgruppe unterzog 12 gesunde Probanden einer Folge aus 12 Thermalschlampackungen an 12 aufeinanderfolgenden Tagen. Dabei wurde ein mittlerer Anstieg der Körpertemperatur um  $0,7^\circ\text{C}$  erreicht. Vor Behandlungsbeginn sowie direkt nach der ersten und der 12. Thermalschlammbehandlung wurde den Probanden Blut entnommen und  $\text{TNF}\alpha$  sowie IL-6 mittels ELISA gemessen. Die Gruppe konnte keine Änderung der  $\text{TNF}\alpha$ -Serumkonzentration feststellen. Es wurde jedoch ein signifikanter Anstieg der IL-6-Serumwerte nach der 1. Anwendung beobachtet. Auch nach der 12. Behandlung war IL-6 im Serum noch erhöht. Dies steht jedoch nicht im Widerspruch

zu den Daten dieser Untersuchung, da hier die Zytokinkonzentration im Serum nicht direkt nach Ende der IRA-Therapie, sondern erst eine Woche nach der letzten Behandlung bestimmt wurde.

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird jedoch deutlich, dass keines der vier gemessenen Zytokine für den indirekten Primingeffekt der IRA-Hyperthermie auf den RB der Neutrophilen verantwortlich ist. Der Mechanismus der beobachteten Burststeigerung bleibt somit unklar.

Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Di et al (108) weisen im Gegensatz zu den hier getroffenen Annahmen dennoch auf ein direktes Priming des respiratorischen Bursts der Leukozyten durch milde Ganzkörperhyperthermie hin. In ihrer Studie wurde die Körperkerntemperatur von Mäusen im Brutschrank auf 39,5° C erhöht und über sechs Stunden auf diesem Level gehalten. Direkt nach Beendigung der Hyperthermie wurden Lymphozyten aus der Milz der Tiere entnommen. Die Aktivität der Proteinkinase C, die essenziell für die Aktivierung der NADPH-Oxidase ist, wurde mittels eines in vitro Assays basierend auf der Phosphorylierung eines künstlichen Substrates gemessen. Es wurde eine deutlich gesteigerte Proteinkinase C-Aktivität im Vergleich zu den vor der Behandlung ermittelten Werten festgestellt. Der Höhepunkt der Proteinkinase C-Aktivität wurde fünf Stunden nach Ende der Hyperthermie ermittelt. Di et al vermuten, dass durch den von ihnen beschriebenen Effekt auch eine gesteigerte Produktion von freien Sauerstoffradikalen möglich wäre. Ob eine gleichartige Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C auch bei Neutrophilen erreicht werden kann, müsste, um die hier dargestellten Ergebnisse zu erklären, weiter untersucht werden.

Zuletzt bleibt zu erwähnen, dass die in dieser Untersuchung gezeigte Steigerung des respiratorischen Bursts der Neutrophilen parallel zu einer signifikanten Verbesserung der klinischen Symptomatik der an der IRA-Therapie teilnehmenden 57 Patienten verlief. Foerster et al (109) untersuchten bei den 57 Studienteilnehmern die akrale Wiedererwärmung, das Raynaud-Phänomen, den Modified Rodnan Skinscore (MRSS) als Maß für die Hautdicke, die Arthralgiestärke gemessen anhand des DAS28 Arthralgiescores, die Lungendiffusionskapazität sowie die generelle Krankheitsaktivität mit Hilfe des Health Assessment Questionnaire (HAQ-DI). Für alle sechs Parameter

konnte eine signifikante Verbesserung der Werte nach der fünften oder zehnten Behandlung im Vergleich zu vor Therapiebeginn gezeigt werden. Bis auf die Werte für den DAS28 Arthralgie-Score war diese Verbesserung der Ergebnisse, genau wie die Steigerung des respiratorischen Bursts, auch sechs Wochen nach Therapieende noch nachweisbar.

Demnach kann man vermuten, dass der durch die IRA-Bestrahlung gesteigerte respiratorische Burst der Neutrophilen nicht zu einem vermehrten oxidativen Stress im Gewebe der Patienten führt.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls die Blutsenkungsgeschwindigkeit, der MRSS und der Sklerodermie-Activity Score der PSS-Patienten sowie der PASI der Psoriasispatienten mit dem RB korreliert. Es konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Eine Erklärung für die zu der Burststeigerung parallel laufende Verbesserung der klinischen Symptomatik könnten die Ergebnisse der Arbeitsgruppen Distler et al (110) und Cho et al (111) liefern. In beiden Studien wurde der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) untersucht, welcher einer der wichtigsten Parameter zur Regulation der Angiogenese ist. VEGF induziert die Migration der Endothelzellen, regelt die Gefäßpermeabilität und steuert die Lumenbildung zum Abschluss der Angiogenese. Bei Gesunden wird VEGF vorrangig von Keratinozyten der Haut gebildet. Bei Sklerodermiepatienten sind zusätzlich Endothelzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen an der VEGF-Bildung beteiligt, was zu höheren VEGF-Konzentrationen im Serum der PSS-Patienten führt. Sklerodermiepatienten ohne Fingerulcera haben allerdings nochmals deutlich erhöhte VEGF-Spiegel gegenüber der Patientengruppe mit Fingerulcerationen. Dies zeigt, dass der VEGF-Spiegel erst einen bestimmten Schwellenwert übersteigen muss, um die klinischen Manifestationen einer Ischämie zu verhindern (110).

Cho et al (111) konnten nachweisen, dass die VEGF-Freisetzung kultivierter humaner Makrophagen durch Inkubation mit  $H_2O_2$  gesteigert wird. Die VEGF-Konzentration wurde mittels ELISA im Überstand bestimmt. Auch die Inkubation humaner Makrophagen mit zum respiratorischen Burst stimulierten Neutrophilen führte zu einer verstärkten VEGF-Freisetzung der Makrophagen. Mittels Northernblot konnte gezeigt werden, dass es bei den Makrophagen zum Anstieg der VEGF-mRNA kommt. Diese

Ergebnisse lassen vermuten, dass es durch einen im Rahmen der IRA-Therapie gesteigerten Burst zu einer vermehrten VEGF-Freisetzung kommen könnte. Die Verbesserung der klinischen Symptomatik könnte damit im Zusammenhang stehen. Um dies zu belegen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass in der vorliegenden Untersuchung ein erniedrigter respiratorischer Burst der neutrophilen Granulozyten und Monozyten bei Sklerodermiepatienten im Vergleich zu gesunden Normalpersonen erstmals dargestellt wird. Es wird außerdem gezeigt, dass die neutrophile Burstaktivität durch eine Behandlung mit milder Infrarot-A-Hyperthermie auf das Normalniveau angehoben werden kann.

## 6 Zusammenfassung

Die progressive systemische Sklerodermie (PSS) ist eine Autoimmunerkrankung mit Veränderungen sowohl des Blutgefäßsystems als auch des Immunsystems.

Der Krankheitsprozess ist durch eine chronische Entzündungsreaktion, die vornehmlich auf das kollagene Bindegewebe konzentriert ist, charakterisiert.

Als respiratorischen Burst (RB) bezeichnet man die Fähigkeit von Phagozyten, freie Sauerstoffradikale (ROS) in einer NADPH-Oxidase-abhängigen Reaktion zu produzieren und auszuschütten. Es wird angenommen, dass dieser Prozess zur Zerstörung der kapillären Endothelzellschicht sowie zur Gefäßlumeneinengung durch kompensatorische Zellregeneration und damit zur klinischen Symptomverschlechterung beiträgt.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob es eine Dysregulation des RB bei Patienten mit PSS gibt und ob die Neutrophilen- oder Monozyten-abhängige Burstaktivität dieser Patienten durch milde Infrarot-A-induzierte Hyperthermie beeinflusst werden kann.

Insgesamt wurden 57 Patienten einer Infrarot-A-induzierten Hyperthermie (IRA-Hyperthermie) unterzogen. Ihre Körpertemperatur stieg dabei durchschnittlich um  $1,3 \pm 0,4^\circ \text{C}$  an. Den Teilnehmern wurde vor Behandlungsbeginn, während der Bestrahlungsserie und nach Behandlungsende Blut entnommen und der RB der Monozyten und Neutrophilen wurde basal und nach Stimulation mit Zymosan (0,5; 1 und 2 mg/ml,  $n = 21$ ) und PMA ( $1,4 \mu\text{M}$ ,  $n = 53$ ) mittels FACS-Analyse gemessen. Zusätzlich wurde der RB von 20 alters- und geschlechtsspezifischen Kontrollpersonen sowie von 20 Patienten mit Psoriasis vulgaris und sieben Patienten mit atopischer Dermatitis bestimmt. Der Median der Fluoreszenzintensität (MFI) wurde als Maß für die Burstaktivität der Neutrophilen und Monozyten verwendet (Median  $\pm$  SD). Die ROS-Produktion der Phagozyten von PSS-Patienten war im Vergleich zu den Normalpersonen signifikant erniedrigt (MFI der Neutrophilen  $4,6 \pm 1,4$  vs.  $7,4 \pm 0,5$ ; MFI der Monozyten  $36,9 \pm 8,1$  vs.  $44,2 \pm 7,6$  stimuliert mit 2 mg/ml Zymosan). Die Ergebnisse nach PMA-Stimulation bestätigten diese Beobachtungen. Auch der neutrophile und monozytäre RB der Psoriasispatienten war nach Stimulation mit Zymosan signifikant herabgesetzt. Gleiches gilt für den Burst der Monozyten von Patienten mit atopischer Dermatitis. Die Behandlung der PSS-Patienten mit milder IRA-induzierter Hyperthermie führte zu einem signifikanten Anstieg des RB der

Neutrophilen bis in den Bereich der in der Kontrollgruppe ermittelten Burstwerte (MFI  $6,8 \pm 0,9$  stimuliert mit 2 mg/ml Zymosan). Dieser burststeigernde Effekt der IRA-Hyperthermie blieb parallel zu den im Vorfeld gezeigten klinischen Veränderungen auch sechs Wochen nach Therapieende noch bestehen. Der RB der Monozyten wurde durch die Therapie nicht beeinflusst. Weiterhin hatte die IRA-Behandlung keinen Einfluss auf die Serumwerte von  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, IL-10 und GM-CSF, die vor und nach Ende der Bestrahlungsserie mittels ELISA bestimmt wurden.

Die hier dargestellten Ergebnisse widerlegen eine zellautonome ROS-Überproduktion der Neutrophilen und Monozyten bei Sklerodermie. Es wird im Gegenteil eine erniedrigte Burstaktivität dieser Zellen gezeigt. Dies ist jedoch nicht spezifisch für die PSS, sondern tritt auch bei anderen systemischen entzündlichen Erkrankungen auf. Weiterhin wird ein für die Neutrophilen spezifischer burststeigernder Effekt der IRA-Therapie nachgewiesen. Um die molekularen Mechanismen dieser IRA-bedingten Burststeigerung zu untersuchen, sind weiterführende Experimente erforderlich.



## Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Wassergefilterte Infrarot-A-Strahlung .....	9
Abb. 2: Penetration der IRA-Strahlung in die Haut .....	10
Abb. 3: Iratherm 1000 .....	11
Abb. 4: Der zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führende Signalweg .....	14
Abb. 5: Zusammensetzung und Aktivierung der NADPH-Oxidase .....	16
Abb. 6: Schematische Darstellung des Respiratorischen Bursts .....	17
Abb. 7: Vergleich des Respiratorischen Bursts bei Monozyten und Neutrophilen .....	49
Abb. 8: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	50
Abb. 9: FACS-Messung des respiratorischen Bursts nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan .....	51
Abb. 10: Dosisabhängige Fluoreszenzintensität der Neutrophilen .....	52
Abb. 11: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit Zymosan .....	53
Abb. 12: Fluoreszenzintensität der Monozyten bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	54
Abb. 13: Burstaktive Monozyten in % bei verschiedenen Probandengruppen unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	55
Abb. 14: FACS-Messung des respiratorischen Bursts nach Stimulation mit nicht opsoniertem Zymosan .....	56
Abb. 15: Dosisabhängige Fluoreszenzintensität der Monozyten .....	57
Abb. 16: Dosisabhängigkeit der Anzahl der burstaktiven Monozyten .....	57
Abb. 17: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Gate M1 bei verschiedenen Probandengruppen nach Stimulation mit Zymosan .....	59
Abb. 18: Burstaktive Monozyten im Gate M1 in % bei verschiedenen Probandengruppen nach Stimulation mit Zymosan .....	59
Abb. 19: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit Zymosan .....	63
Abb. 20: Fluoreszenzintensität der Neutrophilen im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	65
Abb. 21: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Gate M1 im Verlauf der IRA-Therapie nach Stimulation mit Zymosan .....	66
Abb. 22: Burstaktive Monozyten im Gate M1 in % im Verlauf der IRA-Therapie nach Stimulation mit 2 mg Zymosan/ml .....	67
Abb. 23: Fluoreszenzintensität der Monozyten im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	68
Abb. 24: Burstaktive Monozyten in % im Verlauf der IRA-Therapie unstimuliert und nach Stimulation mit PMA .....	69
Abb. 25: TNF $\alpha$ -Konzentration im Serum .....	71
Abb. 26: IL-6-Konzentration im Serum .....	72
Abb. 27: GM-CSF-Konzentration im Serum .....	73
Tabelle 1: Charakterisierung des Untersuchungskollektivs .....	32
Tabelle 2: Charakterisierung der Untergruppe für den Zymosan-Assay .....	33
Tabelle 3: Charakterisierung der Psoriasispatienten .....	34
Tabelle 4: Charakterisierung der Patienten mit atopischer Dermatitis .....	35
Tabelle 5: Charakterisierung der gesunden Kontrollpersonen .....	36
Tabelle 6: Respiratorischer Burst (Mittelwert + SD) der Neutrophilen und Monozyten .....	61
Tabelle 7: IL-10-Werte im Serum .....	74

---

## Literaturverzeichnis

1. Mittag M, Haustein UF. Die progressive systemische Sklerodermie – prognosebestimmender Befall innerer Organsysteme Hautarzt 1998; 49:545-551.
2. Sollberg S, Krieg T. Systemische Sklerodermie. Hautarzt 1995; 46:587-601.
3. American College of Rheumatology. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Arthritis Rheum 1980; 23:581-590.
4. LeRoy et al. Scleroderma (Systemic Sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15:202-205.
5. Valentini G. The assessment of the patient with systemic sclerosis. Autoimmun Rev 2003; 2:370-376.
6. Jacobsen S, Halberg P, Ullman S, et al. Clinical features and serum antinuclear antibodies in 230 danish patients with systemic sclerosis. Br J Rheumatol 1988; 37:39-45.
7. Dick T, Mierau R, Bartz-Bazzanella P, et al. Coexistence of antitopoisomerase I and anticentromere antibodies in patients with systemic sclerosis. Ann Rheum Dis 2002; 61:121-127.
8. Meffert H, Lemke U, Meffert B, Sönnichsen N. Wiedererwärmung, Wärmeleitfähigkeit und Durchblutung der Haut bei Gesunden und Sklerodermiekranken. Dermatol Monschr 1974; 160:282-290.
9. Fritsch P, Lehrbuch für Dermatologie und Venerologie. 2004, Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
10. Denton CP, Black CM. Scleroderma – clinical and phatological advances. Best Pract Res Clin Rheumatol 2004; 18:271-290.
11. Latsi PI, Wells AU. Evaluation and management of alveolitis and interstitial lung disease in scleroderma. Curr Opin Rheumatol 2003; 15:748-755.
12. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis. Autoimmun Rev 2003; 2: 152-157.
13. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. Int Rev Immunol 1995; 12:187-199.
14. Jimenez SA, Hitraya E, Varga J. Pathogenesis of scleroderma. Collagen. Rheum Dis Clin North Am 1996; 22:647-674.

15. Chizzolini C, Raschi E, Rezzonico R, et al. Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1002-1013.
16. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:778-784.
17. Heffernan MP, Do JH, Mehta J. Antinuclear Antibodies in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg* 2001; 20:2-13.
18. Harvey GR, McHugh NJ. Serologic abnormalities in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11:495-508.
19. Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, Tamby MC, Boissier MC, Guillevin L. Pathogenesis of systemic sclerosis : immunological aspects. *Ann Med Interne (Paris)* 2002; 153:167-178.
20. Herrick AL, Rieley F, Schofield D, Hollis S, Barganza JM, Jayson MI. Micronutrient antioxidant status in patients with primary Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1994; 21:1477-1483.
21. Simonini G, Pignone A, Generini S, Falcini F, Cerinic MM. Emergin potential for an antioxidant therapy as a new approach to the treatment of systemic sclerosis. *Toxicology* 2000; 155:1-15.
22. Simonini G, Cerinic MM, Generini S, et al. Oxidative stress in systemic sclerosis. *Mol Cell Biochem* 1999; 196:85-91.
23. Murrell DF. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *Acad Dermatol* 1993; 28:78-85.
24. Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of Fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990; 265:259-265.
25. Lau CS, Bridges AB, Muir A, Scott N, Bancroft A, Belch JJ. Further evidence of increased polymorphonuclear cell activity in patients with Raynaud's phenomenon. *Br J Rheumatol* 1992; 31:375-380.
26. Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ 2<sup>nd</sup>, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1146-1150.
27. Casciola-Rosen L, Wigley F, Rosen A. Scleroderma Autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis. *J Exp Med* 1997; 185:71-79.
28. Scherf HP, Meffert H, Bäuml H, et al. Wirkung einer einmaligen milden Infrarot-A-Hyperthermie auf Körpertemperatur, Herzfrequenz, Blutdruck und

- 
- Blutviskosität bei Gesunden und Patienten mit arterieller Hypertonie der Stadien I und II. *Dermatol Monschr* 1989; 175:733-740.
29. Meffert H, Scherf HP, Bäuml H, et al. Systemische Effekte der Ultraviolet-, sichtbaren bzw. Infrarotstrahlung bei seriellen Ganzkörperbestrahlungen. *Dermatol Monschr* 1989; 175:609-622.
  30. Wehner H, von Ardenne A, Kaltofen. Whole-body hyperthermia with water-filtered infrared radiation: technical-physical aspects and clinical experiences. *Int J Hyperthermia* 2001; 17:19-30.
  31. Zywiets F. Simultaneous treatment of an experimental tumour with fractionated radiation and infrared-a-hyperthermia. *Indian J Exp Biol* 1996; 34:833-837.
  32. Seegenschmiedt MH, Klautke G, Walther E, et al. Wassergefilterte Infrarot-A-Hyperthermie, kombiniert mit Radiotherapie bei fortgeschrittenen und rezidivierenden Tumoren. *Strahlenther Onkol* 1996; 172:475-484.
  33. Steinhausen D, Mayer WK, von Ardenne M. Evaluation of systemic tolerance of 42.0°C infrared-A whole-body hyperthermia in combination with hyperglycemia and hyperoxemia. *Strahlenther Onkol* 1994; 170:322-334.
  34. Thews O, Li Y, Kelleher DK, Chance B, Vaupel P. Microcirculatory function, tissue oxygenation, microregional redox status and ATP distribution in tumours upon localized infrared-A-hyperthermia at 42°C. *Adv Exp Med Biol* 2003; 530:237-247.
  35. Meffert H, Buchholz I, Brenke A. Milde Infrarot-A-Hyperthermie zur Behandlung der systemischen Sklerodermie. *Dermatol Monschr* 1990; 176:683-686.
  36. Meffert B, Hochmuth O, Steiner M, Scherf HP, Meffert H. Effects of a multiple mild infra-red-A induced hyperthermia on central and peripheral pulse waves in hypertensive patients. *Med Biol Eng Comput* 1991; 29:45-48.
  37. Meffert H. Nochmals zur therapeutischen Wirkung von Hyperthermie bei Psoriasis. *Dermatol Monschr* 1990; 176:795-796.
  38. Meffert H, Müller GM, Scherf HP. Milde Infrarot-A-Hyperthermie zur Behandlung von Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. *Intern Sauna-Arch* 1993; 10:125-129.
  39. Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 1995; 6:357-365.
  40. Baggiolini M, Wyman MP. Turning on the respiratory burst. *Trends biochem Sci* 1990; 15:69-72.
  41. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999; 232:3-14.

42. Morel F, Doussiere J, v. Vignais P. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells, physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991; 201:523-546.
43. Baggiolini M, Boulay F, Badway JA, Curnutte JT. Activation of neutrophil leukocytes. Chemoattractant receptors and respiratory burst. *FASEB J* 1993; 7:1004-1010.
44. Gomez-Cambronero J, Keire P. Phospholipase D: a novel major player in signal transduction. *Cell Signal* 1998; 10:387-397.
45. Meyer JW, Schmitt ME. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS Letters* 2000; 472:1-4.
46. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; 397:342-344.
47. Clark RA, Leidal KG, Pearson DW, Nauseef WM. NADPH oxidase of human neutrophils. *J Biol Chem* 1987; 262: 4065-4074.
48. Babior BM, Kuver R, Curnutte JT. Kinetics of activation of the respiratory burst oxidase in a fully soluble system from human neutrophils. *J Biol Chem* 1988; 263:1713-1718.
49. Rotrosen D, Kleinberg ME, Nunoi H, Leto T, Gallin JI, Malech HL. Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b<sub>558</sub>. *J Biol Chem* 1990; 265:8745-8750.
50. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:416-424.
51. Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ. Intercellular singlet oxygen generation by phagozytosing neutrophils in response to particles coated with chemical trap. *J Biol Chem* 1992; 267:13425-13433.
52. Hosker HSR, Kelly C, Corris PA. Assessment of phagocytic function using chemiluminescence. *Blood Rev* 1989; 3:88-93.
53. O'Gorman MR, Corrochano V. Rapid whole-blood flow cytometry assay for diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2:227-232.
54. Leino L, Huritta HM, Sorvajuärvi K, Sewon LA. Increased respiratory burst activity is associated with normal expression of IgG-Fc-receptors and complement receptors in peripheral neutrophils from patients with juvenile periodontitis. *J Periodontal Res* 1994; 29:179-184.
55. Lieberman MM, Sachanadani DM, Pinney CA. Comparative study of neutrophil activation by chemiluminescence and flow cytometry. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3:654-662.

56. Ezekowitz RAB, Sim RB, MacPherson GG, Gordon S. Interaction of human monocytes, macrophages, and polymorphonuclear leukocytes with zymosan in vitro. *J Clin Invest* 1985; 76:2368-2376.
57. Leino L, Paape MJ. Comparison of the chemiluminescence response of bovine neutrophils to differently opsonized zymosan particles. *Am J Vet Res* 1993; 54:1055-1059.
58. Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol* 2001; 1:625-635.
59. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neil LAJ. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 2005; 5: 446-457.
60. Sato M, Sano H, Iwaki D, et al. Direct binding of toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  secretion are down-regulated by lung collectin surface protein a. *J Immunol* 2003; 171:417-425.
61. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* 2001; 100:1860-1868.
62. Aliprantis AO, Weiss DS, Zychlinsky A. Toll-like receptor 2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res* 2001; 7:287-291.
63. Remer K, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunol Lett* 2003; 85:75-80.
64. Cox JA, Jeng AY, Sharkey NA, Blumberg PM, Tauber AI. Activation of the human neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase by protein kinase C. *J Clin Invest* 1985; 76:1932-1938.
65. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, *Immunobiology – the immune system in health and disease*. 6<sup>th</sup> Edition 2005, New York, London: Garland Science / Taylor & Francis Group.
66. Gallová L, Kubala L, Číž M, Lojek A. IL-10 does not affect oxidative burst and expression of selected surface antigen on human blood phagocytes in vitro. *Physiol Res* 2004; 53:199-204.
67. Niwa Y, Ozaki Y, Kanoh T, Akamatsu H, Kurisaka M. Role of cytokines, tyrosin kinase, and protein kinase C on production of superoxide and induction of scavenging enzymes in human leukocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 79:303-313.
68. Elbim C, Gougerot-Pocidalo MA. Priming study of human phagocytes oxidative burst by using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 1997; 38:527-535.

69. Saeki K, Kitagawa S, Okuma E, Hagiwara S, Yagisawa M, You A. Cooperative stimulatory effects of tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the particular respiratory burst activity in human neutrophils: synergistic priming effect on concanavalin A-induced response, no interactive priming effect on the chemotactic peptide-induced response and additive triggering effect. *Int J Hematol* 1998; 68:269-278.
70. Dewas C, Dang P M-C, Gougerot-Pocidallo M-A, El-Benna J. TNF- $\alpha$  induced phosphorylation of p47<sup>phox</sup> in human neutrophils: partial phosphorylation of p47<sup>phox</sup> is a common event of priming of human neutrophils by TNF- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 2003; 171:4392-4398.
71. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor- $\alpha$  levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 1996; 24:663-665.
72. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol* 2004; 138:540-546.
73. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001; 27:140-146.
74. Elbim C, Bailly S, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA. Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst response to bacterial n-formyl peptides. *Infect Immun* 1994; 62:2195-2201.
75. Duncan MR, Berman B. Stimulation of collagen and glycosaminoglycan production in cultured human adult dermal fibroblasts by recombinant human interleukin 6. *J Invest Dermatol* 1991; 97:686-691.
76. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174:1549-1555.
77. Reglier-Poupet H, Hakim J, Gougerot-Pocidallo MA, Elbim C. Absence of regulation of human polymorphonuclear oxidative burst by interleukin-10, interleukin-4, interleukin-13 and transforming growth factor-beta in whole blood. *EUR Cytokine Netw* 1998; 9:633-638.
78. Ahmad M, Fleit HB, Golightly MG, La Gamma EF. In vivo effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on phagocytic function and oxidative burst activity in septic neutropenic neonates. *Biol Neonate* 2004; 86:48-54.
79. Postiglione L, Montagnani S, Riccio A, Montuori N, Sciorio S, Ladogana P, Spigna GD, Castaldo C, Rossi G. Enhanced expression of the receptor for granulocyte macrophage colony stimulating factor on dermal fibroblasts from scleroderma patients. *J Rheumatol* 2002; 29:94-101.

80. Postiglione L, Ladogana P, Montagnani S, et al. Effect of granulocyte macrophage-colony stimulating factor on extracellular matrix deposition by dermal fibroblasts from patients with scleroderma. *J Rheumatol* 2005; 32:656-664.
81. Robins HI, Kutz M, Wiedemann GJ, et al. Cytokine induction by 41,8°C whole body hyperthermia. *Cancer Lett* 1995; 97:295-201.
82. Katschinski DM, Wiedemann GJ, Longo W, D'Oleire FR, Spriggs D, Robins HI. Whole body hyperthermia cytokine induction: a review, and unifying hypothesis for myeloprotection in the setting of cytotoxic therapie. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; 10:93-97.
83. Bouchama A, Hammami MM, Al Shail E, De Vol E. Differential effects of in vitro and in vivo hyperthermia on the production of interleukin-10. *J Rheumatol* 1999; 26:2513-2516.
84. Kappel M, Diamant M, Hansen MB, Klokke M, Pedersen BK. Effects of in vitro hyperthermia on the proliferative response of blood mononuclear cell subsets, and detection of interleukins 1 and 6, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology* 1991; 73:304-308.
85. Basili S, Martini F, Ferroni P, et al. Effects of mud-pack treatment on plasma cytokine soluble adhesion molecule levels in healthy volunteers. *Clin Chim Acta* 2001; 314:209-214.
86. Schmidt KL. Effects of whole body hyperthermia on inflammations and immune reactions: experimental aspects. *Phys Med Rehab Kuror* 2004; 14:227-235.
87. Cozzi F, Carrara M, Sfriso P, Todesco S, Cima L. Anti-inflammatory effect of mud-bath applications on adjuvant arthritis in rats. *Clin Exp Rheumatol* 2004; 22:763-766.
88. Zellner M, Hergovics N, Roth E, Jilma B, Spittler A, Oehler R. Human monocyte stimulation by experimental whole body hyperthermia. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114:102-107.
89. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometric assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods* 1998; 219:187-193.
90. Rothe G, Emmendörffer A, Oser A, Roesler J, Valet G. Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 1991; 138:133-135.
91. Bauer R, Böhm I. Flowzytometrie in der Dermatologie. *Hautarzt* 1996; 47:561-578.



92. Vowells SJ, Sekhsaria S, Malech HL, Shalit M, Fleisher TA. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 1995; 178:89-97.
93. Smith A, Weidemann MJ. Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993; 162:261-268.
94. Jang D-S, Kang B-S, Ryu SY, Chang I-M, Min KR, Kim Y. Inhibitory effects of Resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:705-712.
95. Czirjak L, Danko K, Sipka S, Zeher M, Szegedi G. Polymorphonuclear neutrophil function in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 1987; 46:302-306.
96. Luczynska M, Szkudlarek U, Dziankowska-Bartkowiak B, et al. Elevated whole blood chemiluminescence in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23:173-179.
97. Chang FY, Shaio MF. Respiratory burst activity of monocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29:121-127.
98. Bassoe C-F, Smith I, Sornes S, Halstensen A, Lehmann AK. Concurrent Measurement of antigen- and antibody-dependent oxidative burst and phagocytosis in monocytes and neutrophils. *Methods* 2000; 21:203-220.
99. Pitrak DL, Sutton SH, Tsai HC, Mullane KM, Pau AK. Reversal of accelerated neutrophil apoptosis and restoration of respiratory burst activity with r-metHuG-CSF (Filgrastim) therapy in patients with AIDS. *Aids* 1999; 13:427-429.
100. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, et al. Oxidative stress in Scleroderma. *Arthritis Rheum* 2001; 44:2653-2664.
101. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, et al. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome p450 2c9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 2001; 88:44-51.
102. Yagisawa M, You A, Yonemaru M, Imajoh-Ohmi S, Kanegasaki S, Yazaki Y, Takaku F. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: correlation between functional capacity and amount of functional proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228:510-516.
103. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Sur* 1997; 84:513-519.
104. Metinko AP, Kunkel SL, Standiford TJ, Strieter RM. Anoxia-Hyperoxia induces monocyte-derived interleukin-8. *J Clin Invest* 1992; 90:791-798.

105. Løer D, Elsner J, Michalsen A, Melchart D, Völker K, Dobos G. Hyperthermie-induzierter Priming-Effekt bei neutrophilen Granulozyten. *Forsch Komplementärmed* 1999; 6:86-88.
106. Kappel M, Kharazmi A, Nielsen H, Gyhrs A, Klarlund Pedersen B. Modulation of the counts and functions of neutrophils and monocytes under in vivo hyperthermia conditions. *Int J Hyperthermia* 1993; 10:165-173.
107. Zhao J, Juettner B, Scheinichen D, Jaeger K, Heine J, Piepenbrock S. Respiratory burst activity of polymorphonuclear cells is dependent on the cell preparation technique. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47:702-706.
108. Di Y-P, Repasky EA, Subjeck JR. Distribution of hsp70, protein kinase c, and spectrin is altered in lymphocytes during a fever-like hyperthermia exposure. *J Cell Physiol* 1997; 172:44-54.
109. Foerster J, Fleischanderl S, Wittstock S, et al. Near-infrared mediated mild hyperthermia is effective in the treatment of scleroderma-associated raynaud's phenomenon. *J Invest Dermatol* 2005; 125:1313-1316.
110. Distler JHW, Kalden JR, Gray S, Distler O. Vaskuläre Veränderungen in der Pathogenese der systemischen Sklerose. *Z Rheumatol* 2004; 63:446-450.
111. Cho M, Hunt TK, Hussain MZ. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:2357-2363.

## Materialliste

### Verwendete Geräte:

<i><b>Verwendete Geräte:</b></i>	<i><b>Firma</b></i>	<i><b>Ort</b></i>
Infrarot-A-Bank Iratherm 1000	Von Ardenne Institut	Dresden, D
Brutschrank (Mini Hybridization Oven OV3)	Biometra	Canton, MA, USA
Vortex (REAX 2000)	Heidolph	Kelheim, D
Zentrifuge (Heraeus Multifuge 4KR)	DJB Labcare	Buckinghamshire, UK
Durchflusszytometer FACSCalibur®	Becton Dickenson	Franklin Lakes, NJ, USA
CellQuest® Software	Becton Dickenson	Franklin Lakes, NJ, USA
Photometer (MRX)	Dynatech Laboratories	Chantilly, VA, USA

### Verwendetes Material:

Sarsted EDTA-Monuvetten	Sarstedt	Nümbrecht, D
Sarsted Lithiumheparin-Monuvetten	Sarstedt	Nümbrecht, D
FACS-Röhrchen	Sarstedt	Nümbrecht, D
96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno™ Platte mit MaxiSorp™ Surface)	Nunc Products	Wiesbaden, D

### Verwendete Substanzen:

Zymosan (Molecular ProbesBio Particles)	Molecular Probes	Eugene, OR, USA
Dihydrorhodamin 123	Molecular Probes	Eugene, OR, USA
Lysing Solution	Becton Dickenson	Franklin Lakes, NJ, USA
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories	Pasching, AU
DMSO	Sigma – Aldrich	Deisenhofen, D

PFA (Paraformaldehyd)	Merck	Darmstadt, D
Tween20	Merck - Schuchardt	Hohenbrunn, D
BSA (Bovine serum albumine) Fraktion V pH 7,0	Serva Elektrophoresis	Heidelberg, D
TBS aus: TRIS – hydrochlorid	Roth	Karlsruhe, D
TRIZMA Base	Sigma – Aldrich	Deisenhofen, D

**Zytokin-ELISA:**

IL6-ELISA (Human IL-6 US)	Biosource	Caramillo, CA, USA
TNF $\alpha$ -ELISA (DuoSet® ELISA Development System für human TNF- $\alpha$ )	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt, D
GM-CSF-ELISA (Quantikine® HS human GM-CSF)	R&D Systems	Wiesbaden-Nordenstadt, D
IL10-ELISA ( Human IL-10 ELISA)	Bender MedSystems™	Wien, AU

**Bursttest:**

Phagoburst®	Orpegen Pharma	Heidelberg, D
-------------	----------------	---------------

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Annegret Storch

## Danksagung

Meiner Doktormutter, Frau Prof. Worm, danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und ihre inhaltlichen Anregungen. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle ihre intensive Betreuung und die Schaffung exzellenter Rahmenbedingungen. Ohne ihre Unterstützung und ihre stetige Offenheit für Fragen zu jedem Zeitpunkt der Versuche wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Auch möchte ich für die Möglichkeit der Teilnahme an zwei Konferenzen, die beide eine lohnende Erfahrung für mich waren, danken.

Die Arbeit in den dermatologischen Laboren der Charité wurde für mich durch das hilfsbereite und freundschaftliche Klima innerhalb der AG-Worm zu einer wertvollen und interessanten Erfahrung. Ich möchte an dieser Stelle allen Mitarbeitern danken, besonders Dennis Ernst und Christin Koch für das Anlernen meiner Person und die beständige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Weiterhin danke ich Dr. Elke Luger und Anja Dahten für die vielen hilfreichen Hinweise zu meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. John Förster für seine Ratschläge zur Durchführung der Arbeit bedanken.

Schließlich danke ich meinen Eltern Wilfried und Jutta Storch, die mich immer und in allem unterstützt haben sowie Markus Schröder für seinen Beistand.

## Erklärung an Eides Statt

„Ich, Annegret Storch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Der respiratorische Burst bei Patienten mit systemischer Sklerodermie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 12.11.2007

Annegret Storch