

***In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum Einfluß einer Enzym-
bzw. Vitamin-A-Therapie auf das periphere Immunsystem bei
Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
BIOLOGIE
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in
Frankfurt am Main

von
Dirk Henrich
aus Waltrop in Westfalen

Frankfurt am Main 2001

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen

Dekan: Prof. Dr. K.D. Entian

Gutachter: Prof. Dr. M. Brendel, Prof. Dr. L. Träger

Datum der Disputation:

Fachbereich BIOLOGIE

der

Johann Wolfgang Goethe - Universität

Der Bewerber Dirk Henrich
hat heute das Promotionsverfahren im Fach

BIOLOGIE

mit der Gesamtnote
abgeschlossen.

Die einzelnen Prüfungsleistungen wurden wie folgt bewertet:

Dissertation:

Disputation:

Das Recht zur Führung des Dokortitels wird nicht durch diese Bescheinigung, sondern erst durch die Aushändigung der Urkunde erworben.

Frankfurt am Main, den

Der Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Plattenepitheltumore im Kopf-/Halsbereich	1
1.1.1 Anatomie des Kopf-/Halsbereichs	1
1.1.2 Plattenepitheltumoren und präkanzeröse Läsionen im Kopf-/Halsbereich	2
1.1.3 Zelluläre Veränderungen bei Plattenepithelkarzinomen	3
1.1.4 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.1.5 Diagnose und Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich	5
1.1.6 Vitamin-A	6
1.1.6.1 Vitamin-A: Metabolisierung und Wirkmechanismen	7
1.1.6.2 Vitamin-A und Vitamin-A-Derivate in Therapie und Chemoprävention von Tumoren des Aerodigestivtraktes	8
1.1.7 Proteolytische Enzyme	9
1.1.7.1 Grundlagen der systemischen Immuntherapie mit proteolytischen Enzymen, Anwendungen proteolytischer Enzyme in der Medizin	10
1.1.7.2 Resorption der Enzyme	10
1.2 Die zellulären Bestandteile des Immunsystems	12
1.2.1 Die angeborene Immunabwehr	12
1.2.1.1 Natürliche Killerzellen	12
1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten	13
1.2.1.3 Monozyten	13
1.2.2 Die adaptive Immunantwort	15
1.2.2.1 T-Zellen: Entwicklung und Funktionen bei einer spezifischen Immunantwort, MHC-Restriktion	15
1.2.2.2 B-Zellen: Entwicklung und Funktionen bei einer spezifischen Immunantwort	17
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Materialien und Chemikalien	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3 Chemikalien	18

2.2	Zelllinien und Zellkultur	20
2.2.1	<i>K562</i> und <i>Raji</i>	20
2.2.2	<i>A431</i>	20
2.2.3	Nährmedium für die Zelllinien und Lymphozytenkultivierung	20
2.2.4	Kryokonservierung	21
2.2.5	Kultivierung kryokonservierter Zellen	21
2.2.6	Vitalitätstest und Zellzählung	21
2.2.7	Mykoplasmentest	21
2.3	Isolierung peripherer Lymphozyten aus Vollblut bzw. Buffy-Coat und Isolierung polymorphkerniger Granulozyten aus Vollblut	21
2.3.1	Isolierung von PBL	21
2.3.2	Isolierung von polymorphkernigen Granulozyten	22
2.3.3	Lösungen für die Leukozytenisolierung und –Kultivierung	22
2.4	Europiumrelease-Assay (Funktionsanalyse)	22
2.4.1	Durchführung des Europiumrelease-Assay	23
2.4.2	Lösungen für den Europiumrelease-Assay	23
2.5	Immunfluoreszenzanalysen	24
2.5.1	Grundlagen der Durchflußzytometrie	24
2.6	Phänotypisierung peripherer Lymphozyten mittels monoklonaler Antikörper	26
2.6.1	Durchführung der Antikörperfärbung	26
2.6.2	Auswertung	27
2.7	Funktionsanalyse am Durchflußzytometer (<i>FACSCAN</i>)	28
2.7.1	Präparation der Targetzellen	28
2.7.2	Durchführung der durchflußzytometrischen Funktionsanalyse	29
2.7.3	Messung	29
2.7.4	Auswertung	29
2.7.5	Ermittlung der DIO-Konzentrationen	30
2.7.6	Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit	31
2.7.7	Effektorzellfärbung durch DIO-Diffusion aus zerstörten Targetzellen	31
2.7.8	Lösungen für die Funktionsanalyse am Durchflußzytometer	31
2.8	Bestimmung der ADCC am Durchflußzytometer	31
2.8.1	Durchführung der durchflußzytometrischen ADCC-Messung	32
2.8.2	Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration	32
2.8.3	Ermittlung der Effektor-Target-Inkubationszeit	32

2.8.4	Spezifität des Assays für ADCC durch NK-Zellen	33
2.9	Bestimmung der Phagozytoseleistung peripherer Granulozyten und Monozyten am Durchflußzytometer	33
2.9.1	Opsonierung und Färbung der Bakterien	33
2.9.2	Durchführung des Phagozytoseassay	33
2.9.3	Messung	34
2.9.4	Auswertung	34
2.9.5	Bestimmung der DIO-Konzentration	35
2.9.6	Optimierung des Verhältnis Leukozyten : <i>E.coli</i>	35
2.9.7	Optimierung der Phagozytosedauer	35
2.9.8	Lösungen für die Bestimmung der Phagozytoseleistung peripherer Granulozyten und Monozyten	35
2.10	Durchflußzytometrische Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion durch Granulozyten und Monozyten	36
2.10.1	Präparation der Bakterien	36
2.10.2	Durchführung	36
2.10.3	Auswertung	37
2.10.4	Lösungen für die Bestimmung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion	38
2.11	Enzymaktivitäten	38
2.11.1	Herkunft der Enzyme	38
2.11.2	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Chymotrypsin	38
2.11.3	Lösungen für die Chymotrypsinbestimmung	39
2.11.4	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Trypsin	39
2.11.5	Lösungen für die Trypsinbestimmung	40
2.11.6	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Papain	40
2.11.7	Lösungen für die Papainbestimmung	40
2.12	Versuchsanordnungen	41
2.12.1	Einfluß von Enzymen auf Funktion und Phänotyp von PBL, PMNL und Monozyten <i>in vitro</i>	41
2.12.2	Messung der Enzymaktivitäten	41
2.12.3	Einfluß von Retinol und <i>all-trans</i> Retinsäure auf Funktion und Phänotyp von PBL <i>in vitro</i>	41

2.13	Klinische Pilotstudie „Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Enzym- oder Vitamin-A-Therapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich	42
2.13.1	Einschlußkriterien für die Patientenstudie	42
2.13.2	Ausschlußkriterien für die Patientenstudie	42
2.13.3	Medikation	42
2.13.4	Gruppeneinteilung	44
2.13.5	Kontrollkollektiv	44
2.13.6	Probenentnahme	44
2.13.7	Immunologische Untersuchungen	45
2.13.8	Klinische Untersuchungen	45
2.14	Statistik	45
3.	Ergebnisse	46
3.1	Etablierung der Methoden	46
3.1.1	Funktionsanalyse am Durchflußzytometer	46
3.1.1.1	Ermittlung der DiO-Konzentrationen für verschiedene Targetzelllinien, Toxizität des Farbstoffs	46
3.1.1.2	Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit	47
3.1.1.3	Effektorzellfärbung durch DiO-Freisetzung aus zerstörten Targetzellen	47
3.1.1.4	Vergleich der Methoden, Korrelationsanalysen	48
3.1.2	ADCC	49
3.1.2.1	Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit	49
3.1.2.2	Targetzelloptionierung, Ermittlung der geeigneten Antikörperkonzentration	50
3.1.2.3	Spezifität des Testsystems für ADCC durch NK-Zellen	51
3.1.2.4	Statistische Untersuchungen zur ADCC	51
3.1.3	Phagozytostest	52
3.1.3.1	Färbung der Bakterien, Ermittlung der optimalen DIO-Konzentration	52
3.1.3.2	Optimierung der Phagozytosedauer	53
3.1.3.3	Optimierung des Leukozyten- <i>E.coli</i> -Ratio	53
3.1.3.4	Vergleich mit kommerziellem Phagozytostest	54
3.2	Vorversuche	55
3.2.1	Enzymaktivitäten in DMEM und DMEM + FCS im zeitlichen Verlauf	55
3.2.2	Bestimmung der toxischen Enzymkonzentration für PBL	56

3.2	Einfluß der Enzymmischung auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten <i>in vitro</i>	57
3.3.1	Wirkung einer einmaligen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten <i>in vitro</i>	57
3.3.2	Wirkung einer täglichen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten <i>in vitro</i>	58
3.3.2.1	NK-Zellaktivität	58
3.3.2.2	NK-LAK-Aktivität	60
3.3.2.3	Nicht MHC-restringierte CTL-Aktivität	61
3.3.2.4	LAK-Aktivität	63
3.3.3	Wirkung einer zweifachen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten <i>in vitro</i>	64
3.3.3.1	NK-Zellaktivität	64
3.3.3.2	NK-LAK-Aktivität	65
3.3.3.3	Nicht MHC-restringierte CTL-Aktivität	66
3.3.3.4	LAK-Aktivität	66
3.3.4	Effekt einer einmaligen Enzymgabe auf die ADCC <i>in vitro</i>	67
3.3.4	Wirkung einer einmaligen Enzymgabe auf Phagozytose und Sauerstoffradikalproduktion durch Granulozyten und Monozyten <i>in vitro</i>	68
3.3.5	Einfluß einer Enzymmischung auf den Phänotyp peripherer Leukozyten <i>in vitro</i>	70
3.3.7	Einfluß einer hochdosierten Enzymgabe auf Oberflächenrezeptoren am Beispiel CD8 <i>in vitro</i>	71
3.3.8	Enzymatische Stimulierung von PBL in Serum-freiem Medium <i>in vitro</i>	71
3.4	Wirkung von Retinoiden auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten <i>in vitro</i>	72
3.4.1	Wirkung von <i>all-trans</i> Retinsäure und Retinol auf die zellzytotoxische Funktionen peripherer Lymphozyten im zeitlichen Verlauf <i>in vitro</i>	72
3.4.2	Wirkung von <i>all-trans</i> Retinsäure und Retinol auf die ADCC <i>in vitro</i>	73
3.4.3	Einfluß von <i>all-trans</i> Retinsäure und Retinol auf den Phänotyp peripherer Leukozyten <i>in vitro</i>	74
3.5	Klinische Pilotstudie: Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Enzym- oder Vitamin-A-Therapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich	76

3.5.1	Klinische Parameter und Tumor-Grading	76
3.5.2	Immunologische Parameter, Gesamtübersicht	78
3.5.2.1	T-Zellen	78
3.5.2.2	B-Zellen	78
3.5.2.3	NK-Zellen	78
3.5.2.4	Aktivierungs-bzw. Zellreifungsparameter (CD45, CD45R0, HLA-Dr)	79
3.5.2.5	Relative Anteile der Leukozytensubpopulationen (PBL, PMNL, Monozyten) im peripheren Blut	81
3.5.3	Lymphozyten- und Leukozytensubpopulationen im zeitlichen Verlauf	82
3.5.3.1	T-Lymphozyten (CD3 ⁺)	82
3.5.3.2	B-Lymphozyten (CD19 ⁺)	86
3.5.3.3	Natürliche Killerzellen (CD56 ⁺)	87
3.5.3.4	PBL (CD45 ⁺)	88
3.5.4	Begleituntersuchungen	89
4.	Diskussion	90
4.1	Methoden	90
4.1.1	Funktionsanalyse: Europiumrelease-Assay vs. Durchflußzytometer	90
4.1.2	Durchflußzytometrische Bestimmung der NK-Zell abhängigen ADCC	91
4.1.3	Bestimmung der Phagozytose am Durchflußzytometer	93
4.1.4	Durchflußzytometrische Bestimmung des oxidativen Bursts	93
4.1.5	Immunphänotypisierung	94
4.2	Einfluß der Medikationen auf Effektorfunktionen und Phänotyp von Leukozyten <i>in vitro</i>	94
4.2.1	Einfluß von Enzymen auf Leukozyten <i>in vitro</i>	95
4.2.2	Einfluß von Retinol und Retinsäure auf PBL <i>in vitro</i>	99
4.3	Klinische Studie: Einfluß einer Enzymmischung und Retinol auf Funktion und Phänotyp peripherer Lymphozyten bei Tumorpatienten <i>in vivo</i>	101
4.3.1	PBL-Subpopulationen und -Aktivitäten bei Patienten und Kontrollen	102
4.3.1.1	T-Zellen	102
4.3.1.2	B-Zellen (CD19 ⁺)	104
4.3.1.3	NK-Zellen (CD56 ⁺)	104
4.3.1.4	Lymphozytenanteil an Gesamtleukozyten	104
4.3.1.5	Schlußbetrachtungen	105

4.3.2	Studiendurchführung	106
4.4	Zusammenfassung	107
5.	Literatur	108
	Danksagung	125
	Erklärung	126

In dieser Arbeit gebrauchte Abkürzungen:

α 2-Mg	α 2-Makroglobulin
Abb	Abbildung
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
BAEE	Benzoyl-L-Arginin-Ethylester
BSA	Rinderserumalbumin
BTEE	Benzoyl-L-Tyrosine-ethylester
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CIK	Zytokin induzierte Killerzellen
CRABP	Zytoplasmatisches Retinsäure-bindendes Protein
CRBP	Zytoplasmatisches Retinol-bindendes Protein
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
DHR-123	Dihydrorhodamin 123
DIO	3,3-Dioctadedyloxacarbocyanin-perchlorat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylenetriaminpentaacetic-Säure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure-dinatriumsalz-dihydrat
E	Patienten mit Enzym-Medikation
FACS	Fluoreszenz-aktivierter-Zellsorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL-1	Fluoreszenz-1 (grün)
FL-2	Fluoreszenz-2 (orange)
FL-3	Fluoreszenz-3 (rot)
FSC	Vorwärtsstreulicht
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HNO	Hals-/Nasen-/Ohren
ICAM-I	Interzelluläres Adhäsionsmolekül I
IgG	Immunglobulin, Klasse G

IL	Interleukin
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnlicher-Rezeptor
Kon	Kontrollkollektiv
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
LFA	Leukozyten-Funktions-Antigen
M	Anzahl der Messungen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MP	Meßpunkt
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
n	Patienten- oder Probenzahl
NK-LAK	Lymphozyten, die nach IL-2 Stimulierung NK-Zell-Aktivität zeigen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PMNL	Polymorphkernige Leukozyten, synonym für neutrophile Granulozyten
Plac	Patienten mit Placebo-Medikation
PSA	Proteolytische Serumaktivität
RA	Retinsäure, synonym für all- <i>trans</i> -Retinsäure verwandt
RAR	Retinsäurerezeptor
RBP	Retinol-bindendes Protein
ROH	Retinol
RXR	Retinsäurerezeptor X
SSC	Seitlichtstreuung
Tab	Tabelle
TAME	p-Toluene-Sulfonyl-L-Arginin-Methylester
TCR	T-Zellrezeptor
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
TNF	Tumornekrose Faktor
V-A	Patienten mit Vitamin-A-Medikation

1. Einleitung

Tumorerkrankungen sind in den industrialisierten Ländern nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache und trotz aller therapeutischen Bemühungen sterben ca. 20% eines Jahrgangs an den Folgen einer Krebserkrankung. Für die Bundesrepublik Deutschland bedeutet dies jährlich ca. 350.000 Neuerkrankungen und 220.000 Todesfälle.

Die hohe Letalität und das mit einer Krebserkrankung verbundene Leid machen es notwendig, nach Therapiealternativen zu suchen, um die Schädigungen durch die Erkrankung bzw. die durchgeführten Standardtherapien zu mildern und somit die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

Kernpunkt dieser Arbeit sind Untersuchungen zur Wirkung zweier systemischer, adjuvanter Therapien, bestehend aus einer Enzymkomposition und hochdosiertem Vitamin-A, auf die zirkulierenden, zellulären Komponenten des peripheren Immunsystems bei Patienten mit Tumoren im Kopf-/Halsbereich.

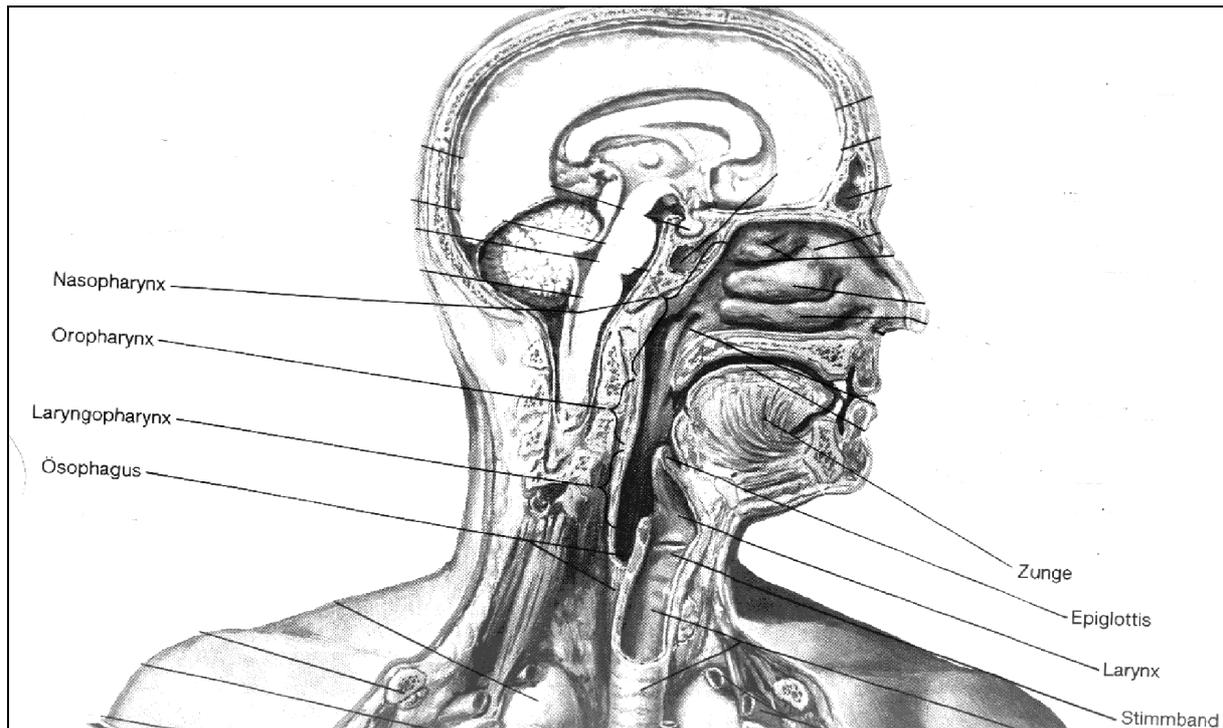
1.1 Plattenepitheltumoren im Kopf-/Halsbereich

In den folgenden Abschnitten werden die Ursachen und Mechanismen der Tumorentstehung, mit Schwerpunkt von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich, die Therapiemöglichkeiten und die Rolle des Immunsystems bei Tumorentstehung und -bekämpfung näher betrachtet.

1.1.1 Anatomie des Kopf-/Halsbereichs

Der **Larynx** oder Kehlkopf ist der kraniale, d.h. dem Kieferapparat zugewandte Teil der Luftröhre mit der Doppelfunktion als Pförtner der unteren Luftwege und Apparat der Stimmbildung. Er besteht aus einem Gerüst von Knorpeln, die durch Gelenke, Bänder und Membranen beweglich verbunden sind. Die Stellung der Knorpel und die Spannung der Bänder werden durch die quergestreiften Kehlkopfmuskeln reguliert. Die Kehlkopfhöhle ist von Schleimhaut ausgekleidet, die zwei Paare sagittal gestellter Falten bildet, eine obere Plica vestibularis (Taschenfalte) mit Flimmerepithel und eine untere Plica vocalis (Stimmfalte) mit Plattenepithel, in der das Ligamentum vocale (Stimmband) und der Musculus vocalis (Stimmuskel) liegen.

Pharynx oder Rachen bzw. Schlund ist ein ca. 12-13 cm langer membranös-muskulärer, von Schleimhaut ausgekleideter Schlauch, der von der Schädelbasis bis zum Ösophagusmund in Höhe des Ringknorpels reicht. Er bildet den gemeinsamen Teil des Atem- und Speisewegs im Anschluß an Nasen- und Mundhöhle bis zum Eingang in Trachea bzw. Ösophagus. Der Pharynx wird in drei Etagen unterteilt: Pars nasalis (**Epipharynx**), Pars oralis (**Mesopharynx**) und Pars laryngea (**Hypopharynx**).

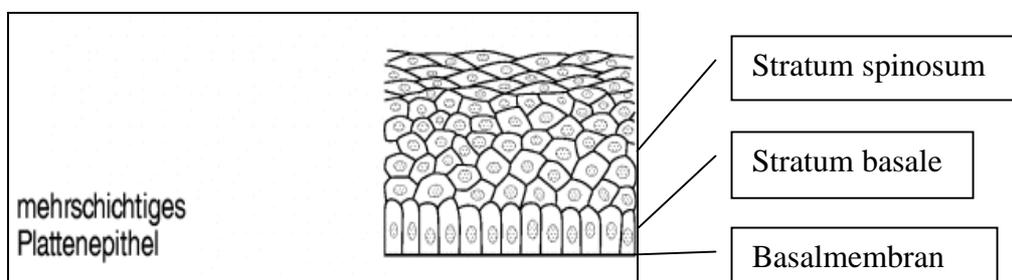


aus Netter: Farbatlanten der Medizin Band 4 „Atmungsorgane“

Abbildung 1.1: Querschnitt des Kopf-/Halsbereichs. Lokalisation von Larynx, Pharynx und Stimmapparat.

1.1.2 Plattenepitheltumoren und präkanzeröse Läsionen im Kopf-/Halsbereich

Epithelgewebe ist ein geschlossener Zellverband, der innere oder äußere Körperoberflächen bedeckt. Seine Funktionen sind Schutz, Stoffaustausch und Reizaufnahme. Es existieren zwei Arten des Plattenepithels: Einschichtig, z.B. Peritoneum und mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel, welches z.B. Mundhöhle, Ösophagus, Vagina auskleidet (Abb. 1.2). Die Epidermis wird von verhorntem Plattenepithel gebildet. Die unterste Zellschicht, das Stratum basale, liegt der Basalmembran auf, welche die Grenzfläche zwischen Epithel und Bindegewebe darstellt und sich vor allem aus Kollagen (Typ IV), Glykoproteinen (Laminin, Fibronectin, Entaktin) und sauren Proteoglykanen (Heparansulfat) zusammensetzt. Die Zellen des Stratum basale sind zur Zellteilung befähigt und ersetzen kontinuierlich abgeschilferte Zellen der oberen Zellschichten.



Aus Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage

Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau des mehrschichtigen Plattenepithels.

Das Plattenepithelkarzinom oder auch Epithelioma spinocellulare bzw. Spinaliom ist ein maligner Tumor der Haut und Schleimhaut und mit Abstand die häufigste Tumormorph im Kopf-/Halsbereich. Plattenepitheltumoren entwickeln sich aus präkanzerösen Vorstufen, den sogenannten Dysplasien. Unterschieden wird zwischen drei Stufen mit steigendem

Malignitätsgrad. Als einfache Dysplasie werden klinisch gutartige, reversible Hyperplasien (Vergrößerung eines Gewebes durch Zunahme der Zellzahl bei unveränderter Zellgröße) ohne Kernatypien bezeichnet. Die mittelgradigen Dysplasie ist gekennzeichnet durch Änderungen in der Mitoserate, der Basalzellpolarität und –form. Bei der hochgradigen Dysplasie ist die Mitoserate deutlich erhöht, die Epithelschichtung gestört, und die Zellen sind polymorph. Diese Störungen sind bei dem Karzinoma *in situ* stärker ausgeprägt, dieser Tumor ist noch nicht invasiv.

Für die weitere Klassifizierung der Tumoren wurde das TNM-System eingeführt; „T (0-4)“ steht für steigende Tumorgröße, „N (0-4)“ für den wachsenden Befall lokoregionärer Lymphknoten und „M (0-4)“ für den Metastasierungsgrad des Tumors.

Das invasive Wachstum von Plattenepithelkarzinomen ist stark vom benachbarten Gewebe abhängig. Drüsen, Muskeln und lockeres Bindegewebe dienen dem Tumor als Leitbahn. Knochen, Knorpel, Membranen und Blutgefäße hingegen bieten dem Tumor einen hohen Widerstand. Etwa ein Drittel der Larynxkarzinome zeigten eine Infiltration der Membranen und Blutgefäße. Metastasierung erfolgt meist über die Lymphgefäße, ein Befall der benachbarten Lymphknoten wurde in ca. 25% der Fälle beobachtet. Metastasen in weiter entfernten Organsystemen sind eher selten und treten anscheinend nur auf, wenn sämtliche lokoregionäre Lymphknoten schon befallen sind. Von 600 untersuchten Patienten in Frankfurt mit Larynxkarzinom konnten bei 13 Metastasen hauptsächlich in der Lunge festgestellt werden (Meyer-Breiting, 1981). Bei Patienten mit Primärtumoren des Hypopharynx konnte ein Tumorbefall der Knochen, Wirbelsäule und des Schädels nachgewiesen werden (Ganzer et al, 1982). Mikrosatellitenanalysen ergaben, daß Metastasen bei HNO-Tumoren sich in den meisten Fällen von dem Primärtumor ableiten lassen (Bedi et al, 1996).

Die Prognose ist stark abhängig von der Lokalisation des Primärtumors, bei frühzeitiger Diagnosestellung und der seltenen Fernmetastasierung ist sie z.B. bei dem Glottiskarzinom¹ günstig; beim supraglottischem Karzinom jedoch deutlich schlechter wegen schneller lokaler Metastasierung in die Lymphknoten.

Lautet die Diagnose Hypopharynxkarzinom, so beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate nur ca. 20 %.

1.1.3 Zelluläre Veränderungen bei Plattenepithelkarzinomen

Maligne Tumoren im Hals-/Nasen-/Ohrenbereich (HNO-Tumore) stammen von einer klonalen Population von Zellen und sammeln in ihrer Entwicklung eine Vielzahl genetischer Änderungen in einem vielstufigen Prozeß an (Carey et al, 1993).

Mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisation-(FISH)-Untersuchungen wurden bei HNO-Tumoren häufig komplexe Muster chromosomaler Deletionen, Translokationen und Amplifikationen hauptsächlich auf den Chromosomen 3p, 5q, 8p, 9p und 18q gefunden (Carey et al, 1993, Van Dyke 1994). Es wird angenommen, daß die verlorengegangenen Regionen möglicherweise Tumorsuppressorgene, hoch amplifizierte Regionen mögliche proto-Onkogene enthalten.

Die Region 11q13 ist oft bei HNO-Tumoren amplifiziert. Sie kodiert unter anderem für *Cyclin D1*, ein Protein, welches den Übergang von der G1- zur S-Phase fördert. *Cyclin D1* wird konstitutiv in HNO-Tumoren gebildet und konnte mit Tumorprogression und Mortalität in Zusammenhang gebracht werden (Callender et al, 1994; Jares et al, 1994).

Die bei HNO-Tumoren am häufigsten deletierte Region enthält das Gen *p16*, welches als wichtiger Inhibitor des Cyclin-CDK-Komplex fungiert (Kamb et al, 1994). Über 90% der HNO-Tumoren zeigen eine Telomeraseaktivität, die mit dem Malignitätsgrad korreliert

¹ Glottis=Stimmband

werden kann. (Mutringura et al, 1996). Im Gegensatz zu anderen Tumorarten (Kolon-, Lungen-, Schilddrüsenkrebs) konnte das *ras*-Onkogen nur bei 5% der HNO-Tumoren nachgewiesen werden (Sheng et al 1990).

Die Expression des Proteins *p53*, welches eine sehr wichtige Rolle bei der Zellreparatur innehat und mit viele Proteinen, Wachstumsfaktoren, Onkogenen und Tumorsuppressorgenen interagieren kann, ist bei HNO-Tumoren verändert (Rowley et al, 1997). Oft konnten Mutationen des *p53*-Gens bei den Tumoren nachgewiesen werden (Rowley et al, 1998; Schoelch et al, 1999).

Die Empfindlichkeit der Tumorzellen für externe Proliferationssignale wird durch die starke Exprimierung des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) erhöht (Ishitoya et al, 1989). Die Expression von bestimmten Matrixmetalloproteasen, die für Gewebeinvasion mitverantwortlich sind (DeClerck, 2000), scheint mit der EGF-R-Genexpression assoziiert zu sein (Kusukawa et al, 1996).

Viele der hier aufgeführten Veränderungen vermögen alleine noch kein Tumorwachstum hervorzurufen. Treten sie jedoch gehäuft auf, so werden zum einen die Mechanismen inaktiviert, die eine Zelle vor Entartung schützen, bzw. eine entartete Zelle kontrolliert abtöten (Apoptose) und zum anderen die Regelkreise außer Kraft gesetzt, die die Mitose regulieren.

1.1.4 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die verschiedenen Krebsarten unterscheiden sich in ihrer Letalität und Häufigkeit. Tumoren im Hals-/Nasen-/Ohrenbereich treten vergleichsweise selten auf, sie machen ca. 5% der Krebserkrankungen in Europa aus, die Mortalitätsrate beträgt ca. 30% (DeLaney et al, 1996).

Von Plattenepitheltumoren bzw. präkanzerösen Veränderungen im HNO-Bereich sind hauptsächlich Männer in der 7. Lebensdekade betroffen. Der Anteil Frauen, die an dieser Tumorart erkranken, beträgt in der Bundesrepublik Deutschland nur 4% bis 8% (Schwab und zum Winkel, 1975; Bohndorf und Höcker, 1976), für andere Industrienationen konnten Werte in ähnlicher Größenordnung erhoben werden z.B. USA: 13% (Devesa und Silverman, 1978) und Schweden: 9,7% (Olofsson und Van Nostrand, 1973). Der Anteil der Frauen bei den Neuerkrankungen steigt jedoch an, diese Beobachtung wird in Zusammenhang mit einem erhöhten Tabakkonsum der weiblichen Bevölkerung gesehen (Ramadan, 1982).

Epidemiologische Untersuchungen im ehemaligen Jugoslawien, wo zur Zeit der Erhebung offensichtlich kaum Unterschiede bezüglich der Rauchgewohnheiten und Arbeitsbedingungen zwischen den Geschlechtern bestanden, ergaben ein prinzipiell erhöhtes Erkrankungsrisiko für Männer (Kambic et al, 1984). Die Häufigkeit von malignen Veränderungen korreliert hierbei mit der Größe des Larynx und der Länge der Stimmbänder. Beides ist hormonabhängig und bei Männern stärker ausgeprägt als bei Frauen (Scott, 1976). Als weitere endogene Risikofaktoren werden neben genetischer Prädispositionen bei ca. 1% der Erkrankungen (Ankathil et al, 1996) eine Infektion mit humanen Papillomaviren (Brandwein et al, 1993; Clayman et al, 1994) und Vitamin-A-Mangel (Graham et al, 1981) diskutiert.

Die klassischen exogenen Risikofaktoren für Tumorerkrankungen im HNO-Bereich sind Tabakkonsum und Alkoholmißbrauch. Starker Zigarettenkonsum führt zu einem ein sechsfach, hoher Alkoholkonsum zu einem fünffach erhöhten Erkrankungsrisiko (Burch et al, 1981). Die Kombination von Alkohol und Zigarettenrauch hat einen leichten synergistischen Effekt, das Tumorrisiko ist um 50% gegenüber der Summe der Einzelrisiken erhöht (Herity et al, 1982). Es wird diskutiert, daß der Alkohol zum einen kanzerogene Substanzen aus dem Zigarettenkondensat löst und so dem Organismus verfügbar macht und zum anderen die Lebensweise im Zuge einer Alkoholsucht zu einer Mangelernährung führt (Maier et al, 1992).

Desweiteren scheint die Inhalation von Noxen wie z.B. Asbeststäube (Sturm et al, 1995) und Dieselrauch (Muscat et al, 1995) das Erkrankungsrisiko leicht zu erhöhen.

1.1.5 Diagnose und Therapie von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich

Die Diagnose von HNO-Tumoren ist im Gegensatz zu Tumoren, die innere Organe befallen haben, mit vergleichsweise einfachen Mitteln erreichbar. Die meisten neoplastischen Veränderungen des Aerodigestivtraktes können laryngoskopisch aufgrund von Verdickungen, farblichen Veränderungen und narbenartigen Vertiefungen der Schleimhaut identifiziert werden. Zur abschließenden Beurteilung der Malignität ist jedoch eine histologische Untersuchung einer Gewebeprobe notwendig. Ausdehnung, Größe und eventuelle Streuung des Tumors werden derzeit hauptsächlich mittels Computertomographie ermittelt.

In der klinischen Erprobung befinden sich Verfahren, z.B. radioaktiv markierte Antikörper gegen EGF-R, die in Kombination mit Computertomographie und modernen bildgebenden Verfahren die Detektion kleinerer neoplastischer Veränderungen erlauben.

Die Wahl der Tumorthherapie richtet sich nach der histologischen und morphologischen Zuordnung des Tumors. Als Behandlungsverfahren für HNO-Tumoren stehen derzeit die chirurgische Entfernung des Tumors, die Bestrahlung und in geringeren Umfang die Chemotherapie zur Verfügung.

Die **Chirurgische Therapie** hat die vollständige Entfernung des Tumors und der lokoregionären Lymphknoten zum Ziel und ist bei lokal abgegrenzten Tumoren das Mittel der Wahl. Je nach Lokalisation bzw. Zugänglichkeit des Tumors sind hierzu verschiedene Operationstechniken anzuwenden. Bei der als Neck-dissection bezeichneten Operation werden die Halsweichteile und je nach Ausdehnung alle Lymphknotengruppen und einige nicht lymphatische Strukturen, z.B. Schilddrüse, entfernt. Es wird dabei versucht, die aufgrund der Radikalität der Operation unvermeidlichen funktionellen Defekte mit Transplantaten und anderen rekonstruktiven Maßnahmen auszugleichen. Die chirurgische Therapie bietet nur bei lokal begrenzten Tumoren gute Heilungsaussichten (Bootz et al, 2000). In einer Studie an 200 Patienten mit HNO-Tumoren betrug die 5 Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit nach chirurgischer Behandlung 81% bei lokal begrenzten Tumoren, 64 % bei zusätzlichem Lymphknotenbefall und 21% bei metastasierten Tumoren (Woolgar et al, 1999).

Bei der **Radiotherapie** werden die befallenen Areale intensiver Röntgen- oder Gammastrahlung ausgesetzt. Postoperativ eingesetzt, hilft sie versprengte Tumorzellen zu eliminieren. Den Zellen in den bestrahlten Arealen werden schwere genetische Schäden zugefügt, die direkt zum Absterben oder aber zur Auslösung der Apoptose führen. Im allgemeinen verkraften gesunde Zellen eine Bestrahlung besser als Tumorzellen, so bleiben nach einer Strahlenherapie die anatomischen Strukturen weitestgehend erhalten. Dies ist bei Karzinomen im Larynx/ bzw. Pharynxbereich vorteilhaft, da dem Patient die Sprechfähigkeit erhalten bleibt.

Die Gesamtdosis bei HNO-Tumoren beträgt im Schnitt 30 Gy (Gray = J/kg) verteilt auf 15 Sitzungen mit einer Dosis von 2 Gy, die 3-Jahres-Überlebensrate liegt zwischen 35 – 65% abhängig von Tumorart und -größe (Skolnik et al, 1975; Snow et al, 1980).

Die Radiotherapie birgt jedoch das Risiko strahleninduzierter Sekundärtumoren, die einige Jahre nach Beendigung der Therapie auftreten können (Teo et al, 1999)

Die **Chemotherapie** wird hauptsächlich bei schnell wachsenden Tumoren (z.B. Hodenkrebs) eingesetzt oder um abgesiedelte Tumorzellen und Metastasen bekämpfen zu können. Die Chemotherapeutika können nach ihrem Wirkmechanismus verschiedenen Gruppen zugeordnet werden:

- Antimetabolite, z.B. 5-Fluoruracil (5-FU): Hemmung der Nucleotidsynthese
- Alkylierende Substanzen, z.B. Cisplatin: Einbau von Alkylgruppen in die DNA, Quervernetzung der DNA-Stränge
- Pflanzliche Alkaloide, z.B. Taxol: Verhinderung der Zellteilung durch Störung der Tubulinfasern

Zur Therapie von HNO-Tumoren werden oft Kombinationen verschiedener Zytostatika eingesetzt: Eine verbesserte Ansprechrate und eine leicht erhöhte Überlebensrate wurde mit einer Kombinationstherapie mit Cisplatin und Fluoruracil erreicht (Zidan et al, 1997).

Andere erreichten längere Überlebenszeiten bei metastasierenden HNO-Tumoren mit einer Kombination von Cisplatin, 5-FU und einem pflanzliches Alkaloid (Hussain et al, 1999).

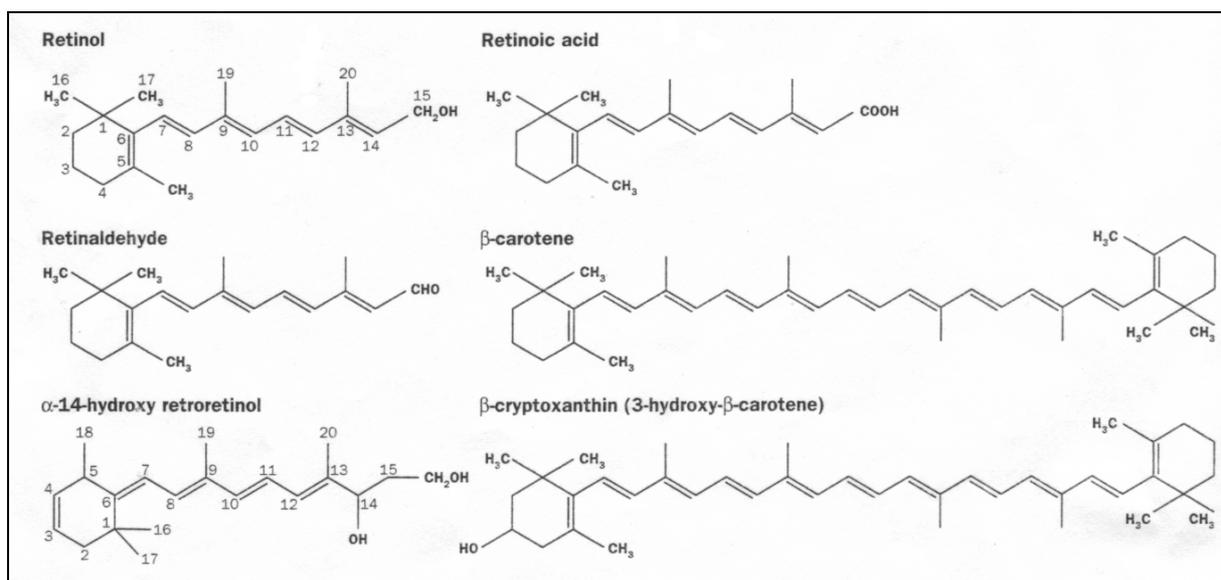
Alternative Therapieansätze:

Die Schwere der Erkrankung zum Anlaß, wird derzeit eine Vielzahl verschiedener Therapiestrategien im Tierversuch oder schon in klinischen Pilotstudien erprobt. Getestet werden derzeit Genterapien, Immuntherapien und Ansätze zur Chemoprävention.

Die immunologischen Konzepte gründen auf der Hoffnung, eine Zerstörung der Tumorzellen durch Auslösung einer spezifischen Immunantwort gegen definierte Tumorantigene, der Gabe spezifischer Antikörper, die z.B. den Epidermal-Growth-Faktor-Rezeptor (EGF-R) blockieren (Knecht et al, 1997) oder aber einer allgemeinen, systemischen Stimulierung des Immunsystems z.B. durch Zytokine (IL-2), Mistelextrakte oder proteolytische Enzyme zu erreichen.

Ein anderer Ansatz zielt auf eine Redifferenzierung, d.h. eine Normalisierung der entarteten Zellen. Hier zu nennen ist das Vitamin-A und abgeleitete Retinoide. Neben der Redifferenzierung der Tumorzellen wird ein Potential zur Chemoprävention maligner Erkrankung im Kopf-/Halsbereich durch Vitamin-A vermutet.

1.1.6 Vitamin-A



Aus Bates CJ; Vitamin A; Lancet **345** (1995), 31-35

Abbildung 1.3: Strukturen des Vitamin-A (Retinol) und einiger Vitamin-A Metabolite (Retinsäure, Retinal, α -14-hydroxy Retroretinol), 2 pflanzliche Carotinoide.

Als Vitamin-A werden nach der UIPAC-Nomenklatur von 1991 alle natürlichen Verbindungen des Vitamin-A verstanden, die alle Vitamin-A-Wirkungen beinhalten. Dies schließt eindeutig die Retinoide aus, denen definitionsgemäß die Retinsäure (RA) und ihre natürlichen und synthetischen Derivate zugeordnet werden. Beispielsweise ist die RA in der Spermatogenese und beim Sehvorgang nicht wirksam. Die geringere Wirkungsbreite der Retinoide liegt darin begründet, daß unter natürlichen Bedingungen RA nicht zu Retinol (ROH) reduziert werden kann, während aus ROH die ganze Spannbreite möglicher Derivate im Stoffwechsel entstehen kann.

Vitamin-A ist beim Menschen entscheidend beteiligt am Sehvorgang (in Form von 11-*cis*- oder all-*trans*-Retinal) an Wachstum, der Entwicklung und Differenzierung von Epithelgeweben, Reproduktion (Spermatogenese, Entwicklung der Plazenta, Fetalentwicklung) und der Testosteronproduktion. Vitamin-A-Mangelkerkrankungen stehen unter den Vitaminmangelzuständen weltweit an erster Stelle. Durch längere Mangel- oder Fehlernährung kann es zur Störung der Dunkeladaptation bis Nachtblindheit als Frühsymptom, zu Störungen des Wachstums, der Differenzierung epithelialer Gewebe, Xerophthalmie (Regenerationsstörung von Rhodopsin; Untergang von Photorezeptoren, Epithelstörungen an Bindehaut u. Hornhaut), Verhornung der Talgdrüsen, Atrophie der Schleimdrüsen und Schleimhäute, Störungen der Knochenbildung, der Fortpflanzung (Atrophie der Testes und Ovarien) und in der Schwangerschaft zu Fehlbildungen des Feten kommen. Der tägliche Vitamin-A-Bedarf liegt bei Erwachsenen bei ca. 3.000-5.000 I.E. Retinol (entspricht 1,0 – 1,5 mg Retinoläquivalente/Tag) oder 6 mg all-*trans*- β -Carotin od. 12 mg anderer Provitamin-A-Carotinoide.

Vitamin-A aus natürlichen Quellen ist meist mit langkettigen Fettsäuren verestert (häufig Retinolpalmitat) und findet sich in tierischen Produkten wie z.B. Fischleberöl, Leber, Eier, Milch und Milchprodukte, als Carotinoide in Gemüse und Obst.

1.1.6.1 Vitamin-A: Metabolisierung und Wirkmechanismen

Nach der Aufnahme mit der Nahrung werden Retinylester im Darm durch unspezifische Esterasen gespalten und im Dünndarm resorbiert. In physiologischen Konzentrationen erfolgt die Aufnahme des Retinols in die Mukosazellen durch einen passiven, energieunabhängigen Prozeß. Bei pharmakologischen Konzentrationen findet der Transport eher über einen passiven Diffusionsvorgang statt. Innerhalb der Mukosazellen bindet das ROH an das cytoplasmatische-retinolbindende-Protein II (CRBP II), wird erneut mit langkettigen Fettsäuren verestert und verpackt in sogenannte Chylomikronen über das lymphatische System in die Blutbahn geschleust. In der Leber werden die Retinylester über spezifische Rezeptoren in Kurzzeitspeicherzellen (Parenchymzellen) oder Langzeitspeicherzellen (Stellatumzellen) aufgenommen. Die homöostatisch kontrollierte Freisetzung des hydrolysierten ROH erfolgt 1 : 1 gebunden an das in der Leber synthetisierte retinolbindende Protein (RBP). Im Blut bindet der RBP-Retinol-Komplex 1 : 1 an Transthyretin und wird zu der Zielzelle transportiert.

β -Carotin wird nach Resorption durch das Enzym Dioxigenase in zwei Retinalmoleküle gespalten, die weiter zu ROH oder RA verstoffwechselt werden können. Die Konversionsrate beträgt ca. 15% (Lorenz und Biesalski, 1993).

Hohe Vitamin-A-Plasmaspiegel führen zu einer negativen Rückkopplung der Resorption und der enzymatischen Konversion des β -Carotins (Biesalski, 1990).

Über einen bisher nicht exakt definierten Membranrezeptor gelangt ROH in die Zielzelle und bindet dort an CRBP I bzw. CRBP II oder wird zu RA oxidiert. Während über die Funktion des ROHs in der Zelle noch Unklarheit besteht, so hat man über die Wirkungsweise der RA

mittlerweile klare Vorstellungen. RA bindet an das zytoplasmatische retinsäurebindende-Protein (CRABP), wird in den Zellkern transloziert und kann dort mit dem Kernrezeptor in Verbindung treten. Es existieren zwei Familien der RA-Kernrezeptoren: RAR binden *9-cis* RA und *all-trans* RA (ATRA); RXR binden nur *9-cis* RA mit hoher Affinität. Jede der zwei Familien hat drei Mitglieder, RAR α , β , γ bzw. RXR α , β , γ . Zu jedem der Familienmitglieder existieren zudem noch verschiedene Isoformen. RARs und RXRs weisen Homologien mit anderen Mitgliedern der Kernrezeptorsuperfamilie auf, wie z.B. Steroidhormon-Rezeptoren, Vitamin-D-Rezeptoren und Thyroidhormon-Rezeptoren. Wie diese enthalten sie 6 Domänen, A-F (A/B: Ligandenunabhängige Transaktivierung; C: zwei Zinkfinger für Bindung an DNA; D: Verbindungsregion; E: Verantwortlich für Dimerisierung, Liganden- und Cofaktorbinding, Ligandenabhängige Transaktivierung; F: unbekannte Funktion). Das RAR/RXR-Heterodimer ist die aktive Form des RA-Rezeptors, der an spezifische DNA-Sequenzen, den RA-responsiven Elementen (RARE) in der Promotorregion der Zielgene bindet. RXR kann auch mit anderen Mitgliedern der Kernrezeptorsuperfamilie Dimere bilden.

Die molekulare Regulierung des RA-Signals erfolgt durch aktivierende (CoA) und inhibierende (CoR) Kofaktoren, Proteinkomplexe, die sich jeweils aus mindestens drei Proteinen zusammensetzen. Nach RA-Bindung an den RAR/RXR-Komplex dissoziiert CoR, CoA kann durch Bindung an das Heterodimer Nukleosomen acetylieren, somit die Chromatinstruktur öffnen und durch Rekrutierung des Basistranskriptionskomplex die Genexpression starten.

Durch die vielen Möglichkeiten der Heterodimerisierung zwischen diversen RAR- und RXR-Typen bzw. mit anderen Mitgliedern der Rezeptorsuperfamilie kann eine große Bandbreite biologischer Antworten generiert werden (zusammengefaßt nach Freedmann, 1999; Zhang et al, 2000).

1.1.6.2 Vitamin-A und Vitamin-A-Derivate in Therapie und Chemoprävention von Tumoren des Aerodigestivtraktes

Nachdem in den achtziger Jahren epidemiologische Untersuchungen einen starken Zusammenhang zwischen Plattenepithelkarzinomen des Aerodigestivtraktes und Vitamin-A-Mangelernährung ergaben (Hong Kong Cancer Registry, 1982; Koo, 1988), wurde die Idee geboren, die Tumorentstehung bei Risikogruppen durch eine ausreichende Versorgung mit Retinoiden zu verhüten. Dieser Ansatz wird als Chemoprävention bezeichnet. Chemoprävention beruht auf der Annahme, daß die Akkumulation biochemischer und genetischer Schäden in den Zellen durch die regelmäßige Zuführung bestimmter Substanzen zu verhindern bzw. zu verlangsamen ist und somit der Übergang zu einer Krebszelle aufgehalten oder zumindest verzögert werden kann.

Gestützt wurde dieser Gedanke durch verschiedene Tierversuche. Hamster wurden Carcinogenen ausgesetzt, diejenigen mit ausreichender ROH-Versorgung bildeten keine Plattenepitheltumoren aus, aufgetretene Tumoren in der Vitamin-A defizienten Gruppe bildeten sich nach Vitamin-A-Gaben zurück (Chu und Malmgren, 1965). Die protektive Wirkung von Retinoiden konnte in späteren Studien für andere Karzinogene bestätigt werden (Goodwin et al, 1986; Inoe et al, 1993).

In den vergangenen Jahren wurden breit angelegten Studien zur Chemoprävention von Plattenepithelkarzinomen mit ROH, RA (RA-Derivate) und β -Carotin gestartet. Die Majorität der Studien beschränkt sich auf die Prävention von Rezidivtumoren, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. Sankaranarayanan et al (1997) fanden in einer Studie mit anfänglich 160 Patienten einen kompletten Tumorrückgang in der ROH-Gruppe bei 52%, in der Placebogruppe bei 10 % der Patienten. In einer anderen Studie konnten bei vergleichbaren Patientengut ähnliche Ergebnisse mit *13-cis*-RA erreicht werden (Benner et al, 1994). In

beiden Studien sprachen Patienten mit homogenen und kleineren Läsionen besser auf die Behandlung an, nach Beendigung der Medikation traten bei der Hälfte der erfolgreich Behandelten erneut Tumorrezidive auf.

In einer weiteren Studie mit 93 Patienten konnte kein positiver Effekt einer ROH-Medikation beobachtet werden (Jyothirmayi et al, 1996). Die 1988 begonnene EUROSCAN Studie zeigte nach Auswertung von über 2.500 Patienten keine signifikanten Verbesserungen durch eine präventive Behandlung mit Acetylcystein oder ROH bei Patienten mit frühen Stadien von HNO- bzw. Lungenkrebs (Van Zandwijk et al, 2000). In der placebokontrollierten CARET-Studie (über 18.000 Teilnehmern) wurde Risikopatienten ROH und β -Carotin verabreicht. Nach 21 Monaten mußte die Studie nach deutlicher Zunahme der Todesfälle (+17%) und Neuerkrankungen (Lungenkrebs, +28%) in der Verumgruppe abgebrochen werden (Omenn et al, 1996).

1.1.7 Proteolytische Enzyme

Enzyme sind definitionsgemäß Proteine, selten auch Ribonukleinsäuren, die als Biokatalysatoren chemische Reaktionen ohne Verschiebung ihres Gleichgewichts beschleunigen. Die Funktion eines Enzyms ist an die Intaktheit seines räumlichen Aufbaus gebunden, wobei durch die Anordnung mehrerer nicht benachbarter Aminosäurereste das sogenannte Aktivitätszentrum gebildet wird, an das sich die an der Reaktion beteiligten Substanzen (Substrate) anlagern. Ein Enzym kann jeweils nur eine der für ein Substrat möglichen Reaktionen katalysieren.

Im folgenden werden aus der Vielzahl der Enzyme nur die Proteasen Trypsin, Chymotrypsin und Papain näher betrachtet, die die wirksamen Bestandteile der in dieser Arbeit untersuchten Testmedikation darstellen.

Als **Papain** werden unterschiedliche Extrakte und Aufreinigungen des mexikanischen Melonenbaumes *Carica papaya* bezeichnet, hier steht Papain für ein gereinigtes und getrocknetes Extrakt aus dem Milchsafte unreifer Früchte mit einem Molekulargewicht von 22,9 kDa. Papain wird der Klasse der Cysteinproteinasen zugerechnet (EC Nr. 3.4.22.2), die in ihrem katalytisch aktiven Zentrum eine Cysteinhaltige SH-Gruppe besitzen. Eine Substratspezifität ist nur wenig ausgeprägt, die hydrolytische Spaltung von Peptiden erfolgt bevorzugt an der kovalenten Bindung der Carboxylgruppe der Aminosäuren Arginin, Lysin und Phenylalanin. Das Aktivitätsoptimum entfaltet Papain bei pH 6,4 und ist stabil bis 55°-60°C, Inaktivierung bei Temperaturen höher als 70°C. Spezifische Inhibitoren sind Oxidationsmittel, Übergangsmetalle und Jodacetat. Aktivierend wirken sich Reduktionsmittel, -SH und EDTA aus.

Trypsin (EC Nr. 3.4.21.4) ist eine Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 24 kDa. Trypsin enthält in dem aktiven Zentrum eine Histidengruppierung, die gemeinsam mit einer Seringruppe die Hydrolyse von Peptid-, Amid- und Esterbindungen bevorzugt an basischen Aminosäuren Arginin und Lysin katalysiert. Trypsin wird als inaktive Vorstufe (Trypsinogen) aus einem Bauchspeicheldrüsenextrakt von Schweinen oder Rindern durch fraktionierte Fällung isoliert und anschließend im leicht alkalischen pH-Bereich aktiviert. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 10,1 und das Aktivitätsoptimum im Bereich von pH 7-9.

Chymotrypsin (EC Nr. 3.4.21.1) ist ebenfalls eine Serinprotease, das Molekulargewicht beträgt ca. 25 kDa. Das Enzym spaltet Peptid-, Ester- und Amidbindungen an deren Bildung die Carboxylgruppe der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin beteiligt sind. Chymotrypsin wird durch fraktionierte Fällung aus saurem Pankreassaft als Chymotrypsinogen isoliert. Die Aktivierung zu Chymotrypsin erfolgt enzymatisch mit Trypsin. Der isoelektrische Punkt liegt bei 8,5, das pH-Optimum zwischen pH 7-9 (van Eimeren et al, 1994 (Papain, Trypsin, Chymotrypsin)).

1.1.7.1 Grundlagen der systemischen Immuntherapie mit proteolytischen Enzymen, Anwendungen proteolytischer Enzyme in der Medizin

Der Beginn der medizinische Anwendung von Enzymen läßt sich bis in die Frühgeschichte der Menschheit zurückverfolgen. In Mittel- und Südamerika benutzen Indianer seit jeher Blätter und Früchte des Melonenbaums oder die Ananasfrucht zur Behandlung von Wunden und Geschwüren. Die Nutzung des Feigenenzym *Ficin* ist sogar biblisch verbürgt. Der Prophet Jesaja heilte Hiskia durch Auflegen eines Feigenpflasters (2. Buch der Könige, 20. Kapitel, Vers 7). Enzyme sind auch heute noch das Mittel der Wahl bei der Behandlung des *Ulcus cruris* (Unterschenkelgeschwür).

Ende des 19. Jahrhunderts begann für die Enzymtherapie eine neue Phase, statt topischer Behandlung wurde durch den Arzt John Beard Tumorpatienten frischer, gereinigter Pankreaspreßsaft venös und in Tumornähe injiziert und so der Krankheitsverlauf gebremst. Dies war der Grundstein der systemischen Enzymtherapie, d.h. statt einer lokale Applikation eines Medikamentes wird dieses über den Blutkreislauf an die Wirkorte transportiert.

Der Mediziner Wolf und die Zellbiologin Benitez nahmen die Idee der systemischen Enzymtherapie auf und in langen Versuchsreihen ermittelten sie Enzymkombinationen, die sich als besonders erfolgreich gegen kultivierte Tumorzellen erwiesen. Durch Kombination pflanzlicher und tierischer Enzyme mit verschiedenen Spezifitäten können Proteine an unterschiedlichen Stellen geschnitten werden, die Enzyme ergänzen sich zudem hinsichtlich ihrer Aktivitätsbereiche. Die in dieser Arbeit untersuchte Enzympräparation enthält die Enzyme Papain, Trypsin und Chymotrypsin im Verhältnis von 2.5: 1: 1 (g/g/g) und basiert auf den Ergebnissen von Wolf und Benitez. Durch die systemische Applikation ist es möglich, mit einem Therapieansatz ein breites Spektrum an Erkrankungen zu therapieren. Die Bandbreite aktueller und etablierter Anwendungen ist in Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

Der Einfluß einer systemischen Enzymtherapie auf die Komponenten des Immunsystems und auf den Krankheitsverlauf bei Tumorpatienten wird ausführlich in der Diskussion behandelt.

1.1.7.2 Resorption der Enzyme

Durch eine geeignete Umhüllung der Dragees wird sichergestellt, daß die Enzyme erst im Dünndarmbereich freigesetzt werden. Dies ist notwendig, da Trypsin im sauren Magenmilieu innerhalb von 30 min und Chymotrypsin innerhalb von 180 min 90 % der Aktivität einbüßt.

Der Nachweis einer Resorption funktionsfähiger Enzyme ist Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen und gestaltet sich schwierig. Endogene, im Pankreasekret enthaltene Hydrolasen haben eine biochemisch fast identische Wirkung wie die in der Medikation enthaltenen Enzyme. Da aber auch Pankreasenzyme teilweise über den enteropankreatischen Kreislauf rückresorbiert werden, ist mit der Bestimmung der enzymatischen Aktivität im Serum keine Trennung zwischen exogenen und endogenen Enzymen möglich. Zudem können die in Blut und Lymphe enthaltenen Antiproteasen Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin (α_2 -Mg) nicht nur mit endogenen sondern auch mit resorbierten, körperfremden Proteasen interagieren. Dies führt zu einer Maskierung antigener Strukturen, so daß immunologische Nachweisverfahren ebenso systematische Mängel aufweisen.

An Kanichen, Meerschweinchen und Ratten wurde die Resorption radioaktiv markierter Enzyme untersucht. Die Plasmabestandteile wurden aufgetrennt und die Radioaktivität der in der Größenordnung der Enzyme liegenden Moleküle bestimmt. Daraus wurden durchschnittliche Resorptionsraten zwischen 11% (Steffen et al, 1979, 1985) und 21% (Seiffert et al, 1979) errechnet. Für die verschiedenen Enzyme ergaben sich nach Seiffert unterschiedliche Resorptionsraten: Chymotrypsin 16%; Trypsin 29 %; Papain 7% (Seiffert et al, 1979).

Untersuchungen zur Enzymresorption bei Menschen beschränkten sich auf indirekte Nachweismethoden, dem Rückgang des α 2-Mg-Serumtiters und Steigerung der proteolytischen Eigenschaften des Plasmas aufgrund resorbierter Proteasen. Wie oben kurz angesprochen, interagieren Proteasen mit α 2-Mg, einem H-förmigen Protein mit zwei Bindungstaschen für Liganden. Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung, der Komplex bindet an spezifischen Rezeptoren hauptsächlich auf Makrophagen und wird durch Endozytose aus der Blutbahn entfernt (Feige et al, 1996). In kontrollierten Versuchen konnte bei Probanden wiederholt jeweils 1 Stunde nach Enzymeinnahme ein Rückgang des α 2-Mg-Serumtiters um durchschnittlich 15 % beobachtet werden, Normalisierung des Titers erfolgte nach ca. 24 h (Van Schaik, 1989).

Es wird angenommen, daß die Majorität der Enzymmoleküle auf zytopenptischem Weg (Durchschleusung in Bläschen eingeschlossener gelöster Stoffe durch die Zelle) von der Mukosa- auf die Serosaseite des Darmes gelangen. Dieser vesikuläre Transport von Makromolekülen ist in membranösen Darmepithel- oder M-Zellen im Bereich der Peyerplaques besonders intensiv. M-Zellen nehmen ca. 25% der Fläche des humanen Dünndarms ein (Kleinmann und Walker, 1984).

Tabelle 1.1.: Einsatzgebiete der Enzymtherapie (Zusammenfaßt aus Wrba et al, 1998).

Fachgebiet	Anwendung	Autor
HNO/Zahnchirurgie	Besserung von chronischer Sinusitis Besserung des postoperativen Verlaufs nach Zahnextraktion und Strahlenmukositis	Wohlrab R Vinzenz K et al
Gynäkologie	Behandlung von Lymphödemen Behandlung der fibrozystischen Mastopathie Behandlung bei Mastopathie und Adnexitis Schwellungsreduktion bei Episiotomie Einsatz bei Endometriose	Wald M, Korpan M Adamek J Rammer E Baumgartner LN Dittmar FW
Infektiologie	Positiver Einfluß bei Lyme-Arthritis Schmerzreduktion bei Herpes Zoster	Gasser R Billigmann P
Neurologie	Supportiver Einsatz bei Multipler Sklerose	Baumhackl U
Onkologie	Gute Erfahrungen bei supportiver Tumortherapie Therapiealternative beim multiplen Myelom im Anfangsstadium Supportive Therapie beim multiplen Myelom Supportive Therapie bei Brustkrebs Reduktion von Strahlennebenwirkungen Verringerung von Bleomycin induzierten Nebenwirkungen	Wrba H Sakalova A Desser L Rokitansky O Beaufort F Stauder G
Phlebologie	Positiver Einfluß beim Postthrombotischen Syndrom	Klimm HD
Rheumatologie	Positiver Einfluß auf den Zytokinhaushalt bei rheumatischen Erkrankungen	Kullich W
Traumatologie	Verbesserter Hämatomabbau Positiver Einfluß auf Sportverletzungen Besserung von Schmerzen nach Sprunggelenktorsionen Besserung bei Wirbelsäulenschmerzsyndromen	Kleine MW Bachel N, van Eimeren et al Rahn HD Tischler H
Urologie	Besserung von Behandlungsergebnissen bei chronischen Harnwegsinfekten	Schlüter P

1.2 Die zellulären Bestandteile des Immunsystems

In den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit untersuchten Leukozyten- bzw. Lymphozytensubpopulationen und ihre Aufgaben im Immunsystem vorgestellt. Es kann zwischen zwei Abwehrsysteme unterschieden werden. Dies ist zum einen die sogenannte angeborene Immunität, dessen Komponenten den Organismus bis zum Einsetzen der spezifischen Immunantwort schützen und zum anderen die adaptive Immunabwehr, die durch die klonale Selektion antigenspezifischer Lymphozyten vermittelt wird.

1.2.1 Die angeborene Immunabwehr

Die angeborene Immunabwehr umfaßt eine humorale Komponente, bestehend aus dem Komplementsystem (KS), den akuten Phase Proteinen (APP) und Antikörpern gegen Oberflächenantigene der häufigsten pathogenen Erreger. Die humoralen Bestandteile dienen hauptsächlich zur Opsonierung d.h. Kenntlichmachung der eingedrungenen Erreger für die zellulären Komponenten, den Phagozyten (neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen) und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Janeway und Travers, 1995).

1.2.1.1 Natürliche Killerzellen

Als Natürliche Killerzellen werden *große granuläre Lymphozyten* (LGL) mit einem Durchmesser von 15 µm, nierenförmigem Nukleus und oftmals 3 zytoplasmatischen Granula bezeichnet. Wie Lymphozyten entstehen sie aus Vorläuferzellen im Knochenmark, führen aber in ihrer Entwicklung keine Umordnung ihrer Gene für antigenspezifische Immunrezeptoren durch. Im Blut sind sie mit einem Anteil von ca. 10%-20% der Gesamtlymphozyten vertreten. Definitionsgemäß tragen sie den Phänotyp CD56⁺ und/oder CD16⁺, CD3⁻.

Ihren provokanten Namen verdanken sie ihrer Fähigkeit transformierte, virusinfizierte oder antikörpermarkierte Targetzellen (ADCC = Antikörperabhängige zellulär vermittelte Zytotoxizität) zu erkennen und sehr effektiv zu zerstören. NK-Zellen sind durch die Sekretion vieler Zytokine / Chemokine außerdem wichtige Regulatoren des Immunsystems. Unter anderem sezernieren sie TNF- α , GM-CSF (Granulozyten/Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor), IL-3, IL-5, IL-8, IL-10, IL-13, MIP1- α , MIP1- β (siehe Tabelle 1.3) (Lanier, 2000).

Ljungren et al (1985) entdeckten, daß NK-Zellen bevorzugt transformierte Zellen abtöten, die keine MHC-I-Expression zeigen. Daraus folgt, daß die Effektorfunktion der NK-Zellen von einer Balance positiver und negativer Signale diktiert werden muß. Ein positives Signal ist notwendig, um die Sekretion von Zytokinen oder den zellulären Prozeß auszulösen, dies kann aber durch inhibierende Signale abgemildert oder verhindert werden.

Inhibierende Rezeptoren sind Glycoproteine, die als Killerzell-Immunglobulin-ähnliche-Rezeptoren (KIR) bezeichnet werden (früher Killerzell-inhibierender Rezeptor) und bevorzugt die polymorphen MHC-I-Varianten HLA-B und HLA-C binden (Lanier et al, 1996). Um durch verändertes oder Fremd-MHC-I nicht inhibiert zu werden, existiert eine zweite, HLA-E erkennende Variante des KIR, der die inhibierende zytoplasmatische Domäne fehlt. Inhibierende KIR sind funktionell dominant über aktivierende KIR und andere zytotoxizitätsauslösende Signale. Letztgenannte sind hauptsächlich Ligandenbindung an CD2, CD16 (siehe Tabelle 1.2) und Fremd-MHC (Mason et al, 1996).

Die NK-Zell-Granula enthalten zwei Gruppen zytotoxischer Substanzen: Perforine, die porenbildende Proteine sind und die zu den Serinproteasen zählenden Granzyme. Die zelltoxischen Substanzen werden gezielt in den interzellulären Spalt zwischen Effektor- und Targetzelle sezerniert. Die Granzyme diffundieren durch die poröse Targetzellmembran und lösen einen internen, der Apoptose vergleichbaren Desintegrationsprozeß aus. Die Targetzelle wird innerhalb von 4 Stunden zerstört. Die zytotoxische Antwort kann durch Stimulierung mit IL-2 und IL-12 verstärkt werden. (Warren und Smyth, 1999).

1.2.1.2 Neutrophile Granulozyten

Granulozyten oder polymorphkernige Leukozyten (PMNL) bilden die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Mikroorganismen, die sie hauptsächlich durch Phagozytose und Freisetzung von Sauerstoffradikalen bekämpfen. Ihr Anteil an der Gesamtleukozytenpopulation beträgt ca. 60% - 70%. Die Granulozytenpopulation umfaßt die Subpopulationen der neutrophilen- (90%), der eosinophilen- (2% - 4%) und der basophilen (1%) Granulozyten. Die Abkürzung PMNL wird in dieser Arbeit synonym für neutrophile Granulozyten angewendet.

Sie werden in hoher Zahl (10^{11} /Tag bei Erwachsenen) im Knochenmark gebildet und entstammen der myeloischen Entwicklungslinie. Zirkulierende, reife PMNL (zPMNL) haben eine durchschnittliche Halbwertszeit von 6 - 7 Stunden im Blut und sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen. Nach dieser Zeit wandern die Zellen in verschiedene Gewebe oder werden durch chemotaktische Reize (IL-8, Endotoxin, Komplementkomponente C_{5a}) zu Entzündungsherden geleitet (Williams et al, 1990). Dort treten sie nach ein- bis zweitägiger Verweildauer in die Apoptose ein und werden wahrscheinlich von Makrophagen phagozytiert (Savill et al, 1989). Der Übertritt durch das Endothel in das Gewebe erfolgt in zwei Schritten, dem Rollen auf dem Endothel unter Beteiligung der Selektine und dem Festkleben und der Diapedese mit Beteiligung der Integrine (CD11b/CD18) seitens der PMNL und CD54 (ICAM-1) seitens der Endothelzellen (Panes und Granger, 1998).

Reife PMNL können neben Proteasen (Elastase) eine Vielzahl hauptsächlich proinflammatorischer Zytokine und Chemokine synthetisieren und sezernieren: IL-1 β , IL-3, IL-8, TGF- β , TNF- α , GM-CSF (siehe Tabelle 1.3) (Cassatella, 1995).

Phagozytose und die gezielte Freisetzung von Sauerstoffradikalen, der sogenannte oxidative Burst, sind Effektorfunktionen, die sich direkt gegen eingedrungene Erreger richten. PMNL tragen Rezeptoren, die Antikörper (CD16, CD32, CD64) und Komplementfaktoren (CD11/CD18, CD35) auf der Oberfläche opsonierter Bakterien erkennen und binden können. Die adhärenen Bakterien werden umschlossen und in die Zelle aufgenommen (Nussler et al, 1999). Der Phagozytosevorgang führt an der Plasmamembran der PMNL, die den phagozytierten Erreger umschließt, zu einer Zusammenführung des aus mehreren Untereinheiten bestehenden Komplex der NADPH-Oxidase. Dieser Komplex katalysiert die Übertragung eines Elektrons von NADPH auf molekularen Sauerstoff. Das entstehende Superoxidanion O₂⁻ dismutiert spontan oder katalytisch (Superoxid-Dismutase) zu H₂O₂, welches als Ausgangsmaterial für die Synthese weiterer reaktiver Sauerstoffspezies dient oder direkt in das Phagosom entlassen wird (Babior, 1999).

1.2.1.3 Monozyten

Monozyten sind große (Durchmesser: 16-22 μ m) mononukleäre Phagozyten, die sich von granulopoetisch determinierten myeloischen Stammzellen unter dem Einfluß humoraler Faktoren (GM-CSF) zu Monozyten (oder PMNL) entwickeln. Nach 1-2 tägiger Zirkulation

emigrieren sie in lymphoide und andere Organe (Leber, Darm, Lunge), wo sie zu Makrophagen differenzieren. Ihr Anteil im peripheren Blut beträgt 2% - 5% (Cruse und Lewis, 1999).

Monozyten/Makrophagen sind eine der Stützen der adaptiven Immunabwehr, als antigen-präsentierende Zelle (APC) prozessieren sie aufgenommene Antigene von Erregern oder Tumorzellen und präsentieren sie T- bzw. B-Lymphozyten über das humane Leukozyten Antigen DR (HLA-DR). HLA-DR setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen und wird auch als MHC-Klasse-II-Molekül bezeichnet (Unanue et al, 1984). Es besteht ein starker Zusammenhang zwischen Anzahl der HLA-DR-positiver Monozyten bzw. der HLA-DR-Dichte auf Monozyten und der Auslösung einer spezifischen Immunantwort (Lechler et al, 1985).

Tabelle 1.2: Oberflächenrezeptoren auf Leukozyten; CD=Cluster of Differentiation

Rezeptor	Wird exprimiert auf:	Funktion/ Ligand	Aufbau
CD2	T-Zellen, manche NK-Zellen	Leukozyten-Funktions-Antigen-2 (LFA-2), Adhäsionsmolekül, bindet an LFA-3 (CD58), kann T-Zellen aktivieren	50 kDa Glykoprotein, Einzelkette, Ig-Superfamilie
CD3	T-Zellen	Assoziiert mit T-Zellrezeptor (TCR), notwendig für TCR-Expression und TCR-Signaltransduktion	Komplex aus 5 Einzelketten: γ , δ , ϵ =Ig-Superfamilie; ζ/η =verwandt mit FcR γ
CD4	T-Helfer-Zellen, Monozyten/Makrophagen	Corezeptor für MHC-II-Moleküle, stabilisiert APC-T-Zellbindung	55 kDa, Ig-Superfamilie, Einzelkette
CD8	Zytotoxische T-Zellen, T-Suppressorzellen	Corezeptor für MHC-I-Moleküle; bindet an cytoplasmatische Tyrosinkinase ick	2 Ketten; Ig-Superfamilie $\alpha+\beta$ je 32-34 kD
CD14	PMNL, Monozyten	Rezeptor für Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS, Bestandteil der Bakterienwände) und LPS-bindendem Protein (LPS-BP)	53-55 kDa
CD16	NK-Zellen, PMNL, Monozyten	Fc γ III; niedrig-affiner Fc-Rezeptor; vermittelt Phagozytose und ADCC	50-80 kDa, IgSuperfamilie
CD18	T-Zellen, Monozyten, PMNL, NK-Zellen	β 2-Untereinheit der Integrine, bildet mit CD11a, b, c Adhäsions- und Komplementrezeptoren	95 kDa
CD19	B-Zellen	Bildet Komplex mit CD21 (Rezeptor für Komplement c3d); exprimiert in fast allen B-Zellreifungsstadien	90 kDa, Ig-Superfamilie
CD25	Aktivierte T-Zellen, aktivierte B-Zellen	α -Kette des IL-2-Rezeptor, assoziiert mit CD122 (β -Kette) und γ -Kette	55 kDa, CCP-Superfamilie
CD45	Alle Leukozytensubpopulationen	Tyrosinphosphatase, erhöht Signalvermittlung über Antigenrezeptor bei B- u. T-Zellen, viele Isoformen	180-240 kDa
CD45R0	T-Gedächtniszellen, B-Gedächtniszellen	Isoform des CD45, enthält nicht Exone A, B, C	180kDa
CD54	NK-Zellen, PMNL, Monozyten	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM-I), bindet LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18)	Ig-Superfamilie
CD56	NK-Zellen	Isoform des Neuronalen Adhäsionsmoleküls; Adhäsionsmolekül	Ig-Superfamilie
HLA-DR	Aktivierte B-Zellen, aktivierte T-Zellen, Monozyten	Antigenpräsentation	Glykoprotein, zusammengesetzt aus α -Kette (36 kDa) und β -Untereinheit (27 kDa)

1.2.2 Die adaptive Immunantwort

Während die angeborene Immunabwehr immer vorhanden ist, wird eine adaptive Immunantwort erst nach Antigenkontakt generiert und beinhaltet die Bildung antigenspezifischer Antikörper durch B-Zellen und die Vermehrung und Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen, die virusinfizierte Zellen abtöten oder andere Immunzellen stimulieren können. Sie endet mit der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches eine schnelle, spezifische Reaktion gegen einen erneuten Antigenkontakt erlaubt. Die beteiligten Zellen, mit Hauptgewicht auf T-Lymphozyten und B-Lymphozyten werden in den folgenden beiden Abschnitten vorgestellt.

1.2.2.1 T-Zellen: Entwicklung und Funktionen bei einer spezifischen Immunantwort, MHC-Restriktion

T-Zellen wurden nach ihrem Reifungsort, dem Thymus benannt. Sie haben einen Anteil von ca. 60-70% der zirkulierenden Lymphozyten, insgesamt befinden sich aber nur ca 5% der T-Zellen im peripheren Blut.

Nach ihrer Entstehung im Knochenmark wandern sie in einem sehr frühen Entwicklungsstadium in den Thymus. Dort erfolgt das Rearrangement der Gene für den T-Zellrezeptor (TCR), der antigenerkennenden Struktur der T-Zellen, nach einer genau festgelegten Abfolge. Die Umstrukturierung zweier verschiedener Rezeptorgensätze führt zu der Entwicklung zweier verschiedener T-Zellsorten. Die $\gamma:\delta$ -T-Zellen sind später im Thymus keiner Selektion unterworfen, ihre Funktion ist ungewiß. Der Anteil der $\alpha:\beta$ -T-Zellen beträgt ca. 95% (Winoto und Baltimore, 1989). Die Expression einer erfolgreich umstrukturierten β -Kette ist das Signal für die Expressierung der Corezeptoren CD4 und CD8 bzw. der Umordnung der Gene der α -Kette. Sind ihre Gene ebenfalls erfolgreich arrangiert worden, erfolgt die Selektion auf potentielle Liganden. T-Zellen, die Eigen-MHC erkennen, werden zur Proliferation angeregt. Potentiell autoreaktive T-Zellen und T-Zellen, die Selbst-MHC nicht erkennen, werden durch Apoptose eliminiert. Während dieser Phase der Reifung verlieren die T-Zellen einen ihrer Corezeptoren. T-Zellen, die Peptide an MHC-I detektieren, tragen den Corezeptor CD8, CD4 hingegen, wenn sie Peptide an MHC-II gebundene Peptide erkennen können (Teh et al, 1988). Der funktionstüchtige TCR ist mit den Ketten des CD3-Komplex assoziiert.

Naive T-Zellen treten in lymphatischen Organen auf professionelle antigenpräsentierende Zellen, den dendritischen Zellen und Makrophagen. Am MHC-I werden den $CD8^+$ -T-Zellen Antigene präsentiert, die von Pathogenen stammen, die sich im Cytosol der APC vermehren. Antigene, die von Pathogenen stammen, die sich in Vesikeln vermehren oder durch Phagozytose aufgenommen wurden, werden den $CD4^+$ -T-Zellen am MHC-II präsentiert. APC müssen den stimulierenden Kofaktor B7 und die Adhäsionsmoleküle ICAM-I, ICAM-3 und LFA-3 exprimieren, um eine passende T-Zelle zu aktivieren (Sevener et al, 1991).

Eine erfolgreiche Antigenpräsentierung führt zur Expressierung des IL-2-Rezeptors (IL-2R) oder CD25 auf den T-Zellen. Der Kontakt mit B7 führt zur IL-2 Produktion und autokrinen Stimulierung der T-Zelle. Die bei der nun einsetzenden klonalen Expansion entstehenden Tochterzellen differenzieren zu Effektorzellen, die gezielt ihren Aufgaben nachgehen. $CD4$ -Helferzellen Typ I (T_H1) aktivieren infizierte Makrophagen, T_H2 stimulieren antigenspezifische B-Zellen zur Antikörperbildung (Janeway and Travers, 1995). Differenzierte zytotoxische $CD8^+$ -T-Zellen (CTL) exprimieren CD2 und LFA-1 in großer Dichte, dadurch können sie auch mit Targetzellen interagieren, die nur wenig ICAM oder LFA-3 auf ihren Oberflächen tragen. Trägt eine Zielzelle das spezifische Antigen am MHC-I, so wird sie meist durch Perforine und Granzyme (Apasov et al, 1993) oder durch rezeptorvermittelte Apoptose

abgetötet (Rouvier et al, 1993). CD8 stabilisiert den TCR-MHC-I-Komplex (Garcia et al, 1996). Diese zellytische Aktivität ist MHC-restringiert, d.h. die Anwesenheit von MHC-I mit spezifischem Antigen ist Voraussetzung (siehe auch 4.2).

Nach Beendigung einer Immunreaktion wandeln sich einige der antigenspezifische T-Zellen in T-Gedächtniszellen um, die bei einer erneuten Infektion schneller eine spezifische Immunantwort generieren können. Aktuelle Forschungen propagieren zwei Formen der Gedächtniszellen, langlebige mit langsamer Antwort und kurzlebige Gedächtniszellen, die eine schnelle Immunantwort ermöglichen. B- und T-Gedächtniszellen exprimieren eine CD45-Isoform, das CD45R0 (Bell et al, 1998).

Tabelle 1.3: Funktion, Herkunft und Wirkung immunologisch relevanter Zytokine. IL=Interleukin (zusammengestellt nach Cruse und Lewis, 1999)

Zytokin	Wird sezerniert von:	Wirkt auf:	Stoffklasse/Größe
IL-1 β	Monozyten, PMNL	CD4 ⁺ T-Zellen: Proliferation B-Zellen: Wachstum und Differenzierung Monozyten : IL-1 β , IL-6 Synthese Wird durch löslichen IL-1Rezeptor antagonisiert	17 kDa, Protein
IL-2	CD4 ⁺ T-Zellen, (CD8 ⁺ T-Zellen)	CD4 ⁺ T-Zellen; (CD8 ⁺ T-Zellen): autokrine Proliferationsstimulierung; parakrine Wirkung auf benachbarte Zellen. Fördert IFN- γ und Lymphotoxinsynthese B-Zellen: Proliferation, Antikörpersynthese NK-Zellen: in hoher Konzentration Förderung der zytotoxischen Aktivität und Proliferation	15,5 kDa Glycoprotein
IL-6	Monozyten, aktivierte T _H 2-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen Auslöser: IL-1 β , TNF- α	B-Zellen: Proliferation, Differenzierung zur Plasmazelle Hepatozyten: Synthese von Akute Phase Proteine T-Zellen: kostimulatorisch mit anderen Zytokinen Hämatopoetische Stammzellen: Proliferationssteigerung mit anderen Zytokinen	26 kDa Protein
IL-8	Makrophagen/Monozyten PMNL, Endothelzellen	PMNL: T-Zellen: Chemotaxis PMNL: Induzierung der β 1-Integrine, erleichterte Adhäsion	8 kDa Protein
IL-10	T _H 2-Zellen, Makrophagen/Monozyten, aktivierte B-Zellen, Keratinocyten	T _H 1-Zellen: Inhibierung der Zytokinsynthese Monozyten: Inhibierung der Zytokinsynthese (IL-1 β , IL-6, TNF- α)	18 kDa, ohne Kohlenhydrate
IL-12	B-Zelle, Makrophagen/Monozyten	T-Zellen: Reifung zytotoxischer T-Zellen NK-Zellen: Stimulierung der zytotoxischen Aktivität	35 kDa-Kette, 40 kDa-Kette
TNF- α (Tumornekrosefaktor)	Monozyten/Makrophagen (PMNL, T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen) nach Stimulierung mit bakteriellen Toxinen	Wirkung abhängig von TNF-Rezeptoren: TNF-R1 \rightarrow Apoptose TNF-R2 \rightarrow zelluläre Aktivierung über NF κ B oder Apoptose	157 Aminosäuren lang
IFN- γ (Interferon γ)	Aktivierte T _H 1-Zellen Aktivierte NK-Zellen	Monozyten, NK-Zellen, PMNL: Aktivierung zytotoxischer Eigenschaften Erhöhung der MHC-II-Expression B-Zellen, T-Zellen: Differenzierungsförderung Hemmt virale Replikation	Glycoprotein 21-24 kDa, Homodimer

1.2.2.2 B-Zellen: Entwicklung und Funktionen bei einer spezifischen Immunantwort

B-Zellen sind nach dem Ort ihrer Entstehung bei Vögeln, der Bursa Fabricii, benannt. Bei Menschen entstehen sie aus lymphoiden Stammzellen im Knochenmark. B-Zellen exprimieren in fast allen Entwicklungsstufen CD19. Der Anteil CD19⁺-B-Zellen im peripheren Blut beträgt ca. 10% der Gesamtlymphozyten (Cruse und Lewis, 1999).

Jede B-Zelle trägt einen monospezifischen Rezeptor, in Form membranverankerter Antikörper der Subklassen IgD und IgM, der durch somatische Rekombination der Immunglobulingene während der Entwicklung im Knochenmark gebildet wird. Nach Eliminierung autoreaktiver Zellen werden B-Zellen in den Blutstrom entlassen bzw. wandern in periphere Lymphgewebe aus. Aktivierung und Differenzierung zur antikörpersezernierenden Plasmazelle erfolgt durch Antigenkontakt über die spezifischen Membranrezeptoren (Rezeptoren werden internalisiert, das Antigen prozessiert und am MHC-II präsentiert) und anschließender Interaktion mit antigenspezifischen T_H2-Zellen über MHC-II, die den Differenzierungsvorgang der B-Zellen durch kostimulatorische Rezeptoren und Ausschüttung von IL-2, IL-4 und IL-5 starten. Eine ausdifferenzierte Plasmazelle hat eine Lebensdauer von 4 Tagen.

Y-förmige Antikörper der häufigsten Subklasse IgG setzen sich aus zwei leichten (je 22 kDa) und zwei schweren Polypeptidketten (je 55 kDa) zusammen, die über Disulfidbrücken mit einander verbunden sind. An ihren Aminoenden tragen sie die antigenerkennende, variable Region (Fab-Teil). Der konstante C-Terminus der schweren Ketten bestimmt die Antikörpersubklasse (Fc-Teil). Antikörper tragen auf drei verschiedene Weisen zur Immunität bei: Indem sie durch Bedeckung der Pathogene deren Eindringen in die Zielzelle verhindern, indem Phagozyten und NK-Zellen über CD16 an IgG-markierte Pathogene binden und sie zerstören (ADCC), indem gebundene Antikörper das Komplementsystem aktivieren.

B-Zellen können entweder zur Plasmazelle oder zu einer B-Gedächtniszelle differenzieren. Die Gedächtniszellenbildung wird vielleicht durch T_H-Zellen über das CD40-System initiiert (Delves und Roitt, 2000a ; 2000b).

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die Wirkung einer Enzymkomposition und Retinol im Rahmen einer doppelblinden, randomisierten, placebo-kontrollierten Studie auf das zelluläre Immunsystem des peripheren Blutes (PBL) und das Tumorgeschehen untersucht werden.

Da mit Chemo- bzw. Radiotherapie starke Beeinträchtigungen des Immunsystems einhergehen, wurde untersucht, ob durch Verabreichung von proteolytischen Enzymen bzw. Retinol die immunsuppressiven Wirkungen der konventionellen Tumotherapie abzumildern sind und sich dadurch der Allgemeinzustand des Patienten verbessern läßt. Der Zustand des Immunsystems im Verlauf der Erkrankung wurde durchflußzytometrisch anhand der Oberflächenexpression definierter Rezeptoren und der Funktionsüberprüfung peripherer Blutlymphozyten bestimmt.

Im zweiten Teil sollte der Einfluß der Medikationen auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro* untersucht werden, um Erkenntnisse über Dosierungen, Wirkdauer und Wirkmechanismen *in vitro* zu erlangen. Hierzu sollte ein Panel von durchflußzytometrischen Methoden entwickelt bzw. etabliert werden, das eine genaue und effiziente Bestimmung der Effektorfunktionen von NK-Zellen (ADCC und Targetzellyse), CTL und LAK (Targetzellyse), PMNL und Monozyten (Phagozytose und oxidativer Burst) erlaubt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Branson Sonifier-Cell-Disrupter	Fa. Branson, Schwäbisch Gmünd
CO ₂ -begasbare Brutschränke für die Zellkultur	Fa. Heraeus, Hanau
Durchflußzytometer (FACScan)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Fluorometer (ELK)	Fa. Wallac, Turku, Finnland
Mikroskope	Fa. Olympia, Erfstadt-Lieblar
pH-Meter (pHM84)	Fa. Radiometer, Kopenhagen
Spektralphotometer	Fa. Zeiss, Jena
Steril-Werbank	Fa. Seag Envirco, Dortmund
Thomakammer	Fa. Schreck, Hofheim
Vortex-Gerät	Fa. Braun, Melsungen
Zentrifugen	Fa. Heraeus, Hanau

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

EDTA-Blutentnahmesystem (2,7 und 9 ml)	Fa. Sarstedt, Nürnberg
FACS-Probenröhrchen	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten, steril (5 ml, 10 ml)	Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Kryo-Röhrchen	Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Mikrotiterplatten (6, 24, 96 Vertiefungen)	Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipetten	Fa. Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porengröße)	Fa. Sartorius, Göttingen
Variopipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Venenpunktionsbesteck, <i>Venofix</i>	Fa. Braun-Melsungen, Melsungen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 50 cm ²)	Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Zentrifugenröhrchen (10 ml, 50 ml)	Fa. Nunc, Roskilde

2.1.3 Chemikalien

<i>all-trans</i> Retinsäure	Fa. Sigma, Deisenhofen
BAEE (Benzoyl-L-Arginin-Ethylester)	Fa. Sigma, Deisenhofen
BTEE (Benzoyl-L-Tyrosin-Ethylester)	Fa. Sigma, Deisenhofen

2. Material und Methoden

CaCl ₂	Fa. Merck, Darmstadt
Chymotrypsin	Fa. Mucos, Geretsried
DELFLIA-Enhancement-Solution	Fa. Wallac Oy, Turku, Finnland
Dextransulfat, MG 50.000	Fa. Sigma, Deisenhofen
Dihydrorhodamin 123 (DHR123)	Fa. Sigma, Deisenhofen
3,3-Dioctadedyloxacarbocyanin-perchlorat (DiO)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Diethylenetriaminpentaacetic-Acid (DTPA)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamin-tetraessigsäure-dinatriumsalz-dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe
Europium(III)acetat	Fa. Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Fa. Merck, Darmstadt
Ficoll-Histopaque 1077	Fa. Sigma, Deisenhofen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure	Fa. Gibco BRL, Eggenstein
Interleukin 2 (nIL-2)	Fa. Biotest, Dreieich
KCl	Fa. Merck, Darmstadt
KHCO ₃	Fa. Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Fa. Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Fa. Seromed, Berlin
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Fa. Riedel de Haën, Seelze
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Fa. Merck, Darmstadt
NH ₄ Cl	Fa. Merck, Darmstadt
Papain	Fa. Mucos, Geretsried
Penicillin/Streptomycin	Fa. Seromed, Berlin
PI (Propidiumjodid)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Polymorphprep™	Fa. Nycomed, Norwegen
Retinol	Fa. Sigma, Deisenhofen
p-Toluene-Sulfonyl-L-Arginin-Methylester (TAME)	Fa. Sigma, Deisenhofen
TRIS	Fa. USB, Cleveland, USA
Trypanblau (0,5%)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Fa. Mucos, Geretsried
Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%)	Fa. Seromed, Berlin

2.2 Zelllinien und Zellkultur

2.2.1 K562 und Raji

K562-Zellen (ATCC CCL 243) stammen von einer 53-jährigen Frau mit chronischer myelischer Leukämie im Endstadium. Sie wurde 1975 von Lozzio und Lozzio etabliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Die Zellen sind hochgradig undifferenziert und sind entspringen der myelischen Entwicklungslinie. Sie exprimieren keine MHC I-Antigene auf ihren Oberfläche und sind daher als *in vitro*-Target zum Nachweis der NK und der NK-LAK-Aktivität geeignet.

Raji-Zellen (ATCC CCL 86) wurden 1963 von einem 11-jährigen Schwarzen mit Burkitt-Lymphom etabliert (Pulvertaft, 1964). Diese Zellen exprimieren MHC I-Antigene in hoher Zahl und sind daher NK-Zell resistent. Sie werden zur *in vitro*-Bestimmung der Aktivität nicht-MHC-restringierter-T-Lymphozyten bzw. zur Aktivitätsbestimmung nicht-MHC-restringierten Lymphokin-aktivierten-Killerzellen (LAK) eingesetzt.

Beide Zelllinien wurden in einem Gasbebrütungsschrank bei 37°C und einem 5%igen CO₂-Gasanteil mit DMEM+10% FCS in Zellkulturflaschen (80 cm², Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Bei beiden Zelllinien wurde dreimal wöchentlich das Medium ausgetauscht. Hierzu wurden die Zellsuspensionen bei 350 g zentrifugiert und das Pellet in 50 ml frischem Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche überführt.

2.2.2 A431

A431-Zellen (ATCC CRL 1555) wurden aus einem epidermalen Tumor einer 85-jährigen Frau etabliert. Sie tragen in hoher Dichte EGF-Rezeptoren. Diese adhärente Zelllinie wird in dieser Arbeit zur Bestimmung der ADCC eingesetzt.

Diese Zelllinie wurde unter den gleichen Bedingungen und mit dem selben Medium kultiviert wie *Raji* und *K562*.

Die Zellkultur mußte zweimal wöchentlich geteilt werden. Hierzu wurde das Nährmedium abgesaugt und 3ml Trypsin/EDTA (0,05% / 0,02%; g/g) hinzugefügt und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 ml DMEM+FCS abgestoppt.

Die Zellen wurden einmal gewaschen (10 min, 350 g), in Nährmedium resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt.

Wurden Zellen für einen Versuch zur ADCC-Bestimmung benötigt, wurde die Trypsinierungszeit auf 30 s beschränkt.

2.2.3 Nährmedium für die Zelllinien und Lymphozytenkultivierung

Nährmedium: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM), pH 7,2, mit folgenden Zusätzen:

- 10 % v/v fötales Kälberserum (FCS)
- 2 mM L-Glutamin
- 1000 E/ml Penicillin/Streptomycin
- 10 mM HEPES
- 18 mM NaHCO₃

2.2.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden abzentrifugiert (350 g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in Einfriermedium bestehend aus DMSO 10% / FCS 90% (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C gelagert. Danach wurde das Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

2.2.5 Kultivierung kryokonservierter Zellen

Der Inhalt des Kryoröhrchens wurde unter handwarmen, fließendem Wasser aufgetaut. Der Inhalt wurde in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und auf 10 ml mit Kompletmedium aufgefüllt. Die Zellen wurden zentrifugiert (350 g, 10 min, 4°C), das Pellet in 5 ml Kompletmedium resuspendiert und auf eine Dichte von ca. 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturflasche (80 cm²) überführt und im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) bis zur Weiterverwendung kultiviert (siehe 2.2.1 und 2.2.2).

2.2.6 Vitalitätstest und Zellzählung

Die Zellsuspension wurde 1:1 mit einer 0.5%-igen Trypanblaulösung vermischt. Dieser Farbstoff kann nur durch defekte Zellmembranen in die Zellen diffundieren. Ungefähr 10 µl Zellsuspension wurden in eine Thomakammer gegeben und bei 400-facher Vergrößerung mikroskopisch ausgezählt.

Der Anteil der defekten Zellen berechnet sich nach der Formel:

$$\text{defekte Zellen \%} = \frac{\text{gefärbte Zellen} \times 100\%}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

2.2.7 Mykoplasmentest

Die Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmenbefall getestet. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Mykoplasmentest-Kit (*Mykotest*, Gibco BRL, Eggenstein) verwendet. Der Test wurde gemäß des Herstellerprotokolls durchgeführt. Mykoplasmen-positive Zelllinien wurden aussortiert.

2.3 Isolierung peripherer Lymphozyten aus Vollblut bzw. Buffy-Coat² und Isolierung polymorphkerniger Granulozyten aus Vollblut

2.3.1 Isolierung von PBL

Die Isolierung der peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut (Patienten- und Kontrollkollektiv) bzw. aus Buffy-Coat erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Plasmafreies Buffy-Coat wurde von dem Blutspendedienst des Landes Hessen bezogen. Die Verarbeitung erfolgte am Tag der Blutabnahme.

²Als Buffy-Coat bezeichnet man das Leukozytenkonzentrat einer Blutspende.

20 ml der Vollblutprobe, bzw. Buffy-Coat wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf das gleiche Volumen *Ficoll-Histopaque* ($\delta=1,077 \text{ g/cm}^3$) geschichtet. Der Gradient wurde 30 Minuten bei 350 g und 4°C im Schwenkbecherrotor ungebremst zentrifugiert.

Der an der Phasengrenze auf dem Ficoll aufschwimmende Lymphozytenring (PMNL und Erythrozyten befinden sich unterhalb des Ficolls im Pellet) wurde vorsichtig mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde auf 30 ml mit sterilem PBS aufgefüllt und 10 Minuten bei 350 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 30 ml sterilem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert.

Das PBS wurde dekantiert und das Pellet in 5 ml Kompletmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß (80 cm²) überführt. Dieses wurde auf 25 ml (Vollblut) bzw. 75 ml (Buffy-Coat) mit Kompletmedium aufgefüllt.

Den PBL aus den Patienten- bzw. Kontrollproben wurden zusätzlich 200 units/ml IL-2 zugegeben.

2.3.2 Isolierung von polymorphkernigen Leukozyten

10 ml Vollblut wurden über 10 ml *Polymorphprep* ($\delta=1,138 \text{ g/cm}^3$) geschichtet und 30 min bei 350 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation sind zwei Banden sichtbar: Die untere, auf dem Gradientenmedium aufsitzende Bande, enthält PMNL, die obere Bande beinhaltet PBL und Monozyten.

Die PMNL-Bande wurde abgesaugt, die Weiterverarbeitung erfolgte wie für PBL in 2.3.1 beschrieben.

2.3.3 Lösungen für die Leukozytenisolierung und -Kultivierung

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2

136 mM NaCl	7,9 g/l
3 mM KCl	0,22 g/l
0,5 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g/l
6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,15 g/l
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
1,0 mM CaCl ₂	0,08 g/l

2.4 Europiumrelease-Assay (Funktionsanalyse)

Mit dieser Methode wurde die Funktion von IL-2 stimulierten PBL von Patienten bzw. Kontrollen bestimmt. Als Targetzellen wurden zwei kommerziell erhältliche Zelllinien (*K562* und *Raji*) eingesetzt. In diese wurde ein Europiumkomplex eingeschleust. Durch Effektorzell-vermittelte Targetzellyse wurde der Europiumkomplex freigesetzt. Die Menge des freigesetzten, fluorometrisch nachweisbaren Europiumkomplexes verhielt sich proportional zur Zahl der lysierten Targetzellen.

Tabelle 2.1: Killerzellaktivitäten (Details in 4.2):

Erklärung: CIK=Zytokin-induzierte Killerzellen; CTL=zytotoxische T-Lymphozyten; LAK=Lymphokin-aktivierte Killerzellaktivität; NK=Natürliche Killerzellen

Effektorzellen	Targetzellen	Targetzellyse wird vermittelt von	Bezeichnung
PBL	K562	NK-Zellen (Inhibition durch MHC-I-Moleküle)	NK-Aktivität
PBL	Raji	nicht-MHC-restringierte CTL [CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ⁺]	CTL-Aktivität
PBL+IL-2	K562	lymphokinaktivierte NK-Zellen, geringer CIK-Anteil	NK-LAK-Aktivität
PBL+IL-2	Raji	Prädominant lymphokinaktivierte NK-Zellen, geringerer CIK-Anteil, ohne MHC-I-Restriktion-/Inhibition	LAK-Aktivität

2.4.1 Durchführung des Europiumrelease-Assay

Am Vortag wurden die Targetzellen mit frischem Nährmedium versorgt. Vor Testbeginn wurden die Targetzellen einer Vitalitätsprüfung unterzogen, Zellkulturen mit mehr als 25 % defekter Zellen fanden keine Verwendung. 1×10^7 Zellen *Raji* bzw. 5×10^6 Zellen *K562* wurden den Kulturgefäßen entnommen und zweimal in physiologischer Kochsalzlösung jeweils 10 Minuten bei 400 g gewaschen. Die Pellets wurden in jeweils 1 ml Labelpuffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden jeweils 30 µl CaCl₂ [0,1 M] zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Es schlossen sich vier Waschschrte an; die Zellen wurden jeweils in 10 ml DMEM+10% FCS+0,16% CaCl₂ [1 M] resuspendiert und 10 min bei 300 g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrte wurden die Targetzellen auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 µl der Targetzellsuspension wurden in 18 Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte vorgelegt. In die ersten drei Vertiefungen, die später die Werte für den Spontanrelease lieferten, wurden je 100 µl Kulturmedium zugegeben. In die drei folgenden Vertiefungen wurden 100 µl einer einprozentigen Triton X-100 Lösung (Serva) pipettiert, diese lieferten später den Totalrelease. In zwölf der Vertiefungen wurden vier verschieden stark konzentrierte Effektorzellsuspensionen in dreifachen Ansatz (Effektor/Targetratio= 5:1, 10:1, 20:1, 40:1) eingebracht.

Danach schloß sich eine 2½-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ an. Nach dieser erfolgte eine Zentrifugation der Mikrotiterplatten (10 min, 400 g). Aus jeder Vertiefung wurden 20 µl Überstand in eine Vertiefung eines Mikrotiterstreifens (*Immunomodule*, Fa. Nunc) transferiert.

Pro Vertiefung wurden 150 µl *DELFLIA-Enhancement-Solution* gegeben. Nach einer zehnminütigen Reaktionszeit erfolgte die Messung in einem Fluorometer.

Die Messwerte wurden in Bezug zum Nullwert („Spontanrelease“) und dem 100%-Wert („Totalrelease“) gesetzt, so daß die spezifische Effektorzell-vermittelte Lyse nach folgender Formel berechnet werden konnte.

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{Messwert} - \text{„Spontanrelease“}) \times 100\%}{(\text{„Totalrelease“} - \text{„Spontanrelease“})}$$

2.4.2 Lösungen für den Europiumrelease-Assay

Puffer A > pH 7.4:

50 mM HEPES	11.95 g/l
93 mM NaCl	5.435 g/l
5 mM KCl	0.373g/l
2 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O	0.407 g/l

Labelpuffer:

Für *Raji*: 770 µl Puffer A + 100 µl Europiumlösung + 100 µl DTPA + 33 µl Dextran

Für *K562*: 870 µl Puffer A + 50 µl Europiumlösung + 50 µl DTPA + 33 µl Dextran

Europiumlösung:	Europium(III)acetat [10 nM] in aqua dest.
DTPA:	Diethylenetriaminpentaacetic-Acid [25 mM] in 0.01 n NaOH
Dextran:	10 mg Dextransulfat MG 50.000 / ml aqua dest.

2.5 Immunfluoreszenzanalysen

2.5.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie

Ein Durchflußzytometer ist ein optisches Meßsystem das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel mittels eines Laserstrahls analysiert. Bei den derzeit aktuellen Geräten der verschiedenen Hersteller dient zur Anregung ein Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm in konstanter Stärke emittiert.

Die Größe einer Zelle wird im Durchlicht durch die Vorwärtslichtstreuung (FSC), die Granularität durch eine 90°-Ablenkung durch die Seitlichtstreuung (SSC) gemessen.

Drei Detektoren für verschiedene Wellenlängenbereiche erlauben die simultane Messung der Fluoreszenz von unterschiedlichen Fluorochromen.

Detektor 1 (FL-1) ist empfindlich für grüne Fluoreszenzen (um 520 nm), Detektor 2 (FL-2) für oranges Licht (um 580) und Detektor 3 (FL-3) für rotes Fluoreszenzlicht (> 600 nm) (Abbildung 2.1).

Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) ist ein gebräuchlicher Farbstoff für grüne Fluoreszenz (Emission: 520 nm), Phycoerythrin (PE) für orange-rote Fluoreszenz (Emission: 580 nm).

Die Fluoreszenzintensität eines Ereignisses ist abhängig von der Zellsorte, Anzahl der gebundenen, fluoreszenzgekoppelten Antikörper, den Fluoreszenzqualitäten des Farbstoffs (Excitation und Emissionswellenlänge), der Güte des Lasers und der angeschlossenen optischen Systeme und der angelegten Verstärkungsspannung der Photomultiplier. Die Instrumenteneinstellungen für unterschiedliche Tests und Immunfärbungen sind daher gerätespezifisch.

Die an den Rechner weitergeleiteten elektrischen Impulse werden entsprechend ihrer Voltzahl 256 Klassen zugeordnet. Ereignissen mit der geringsten Spannung wird Kanal 0, denen mit der höchsten Spannung Kanal 255 zugeteilt.

Die Meßdaten können als Einparameter-Histogramm oder als 2-Parameter-*Dotblot* dargestellt werden. Bei der Histogrammdarstellung werden in jedem Kanal die Ereignisse identischer Größe addiert. Sie zeigt z.B. an, wieviel Antikörper an eine Zelle gebunden haben, das Ergebnis wird als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) / Zelle angegeben.

Bei der Zweiparameter-Darstellung (*Dotblot*) werden pro Partikel zwei Meßparameter gegeneinander aufgetragen, zum Beispiel Zellgröße gegen Zellgranularität. Nur in dieser Darstellung ist die Unterscheidung verschiedener Leukozytenpopulationen möglich. Werden zwei Fluoreszenzen aufgetragen, können in dieser Darstellung Zellen, die beide Fluoreszenzen tragen, unterschieden werden von Zellen, die nur für jeweils einen Marker positiv sind.

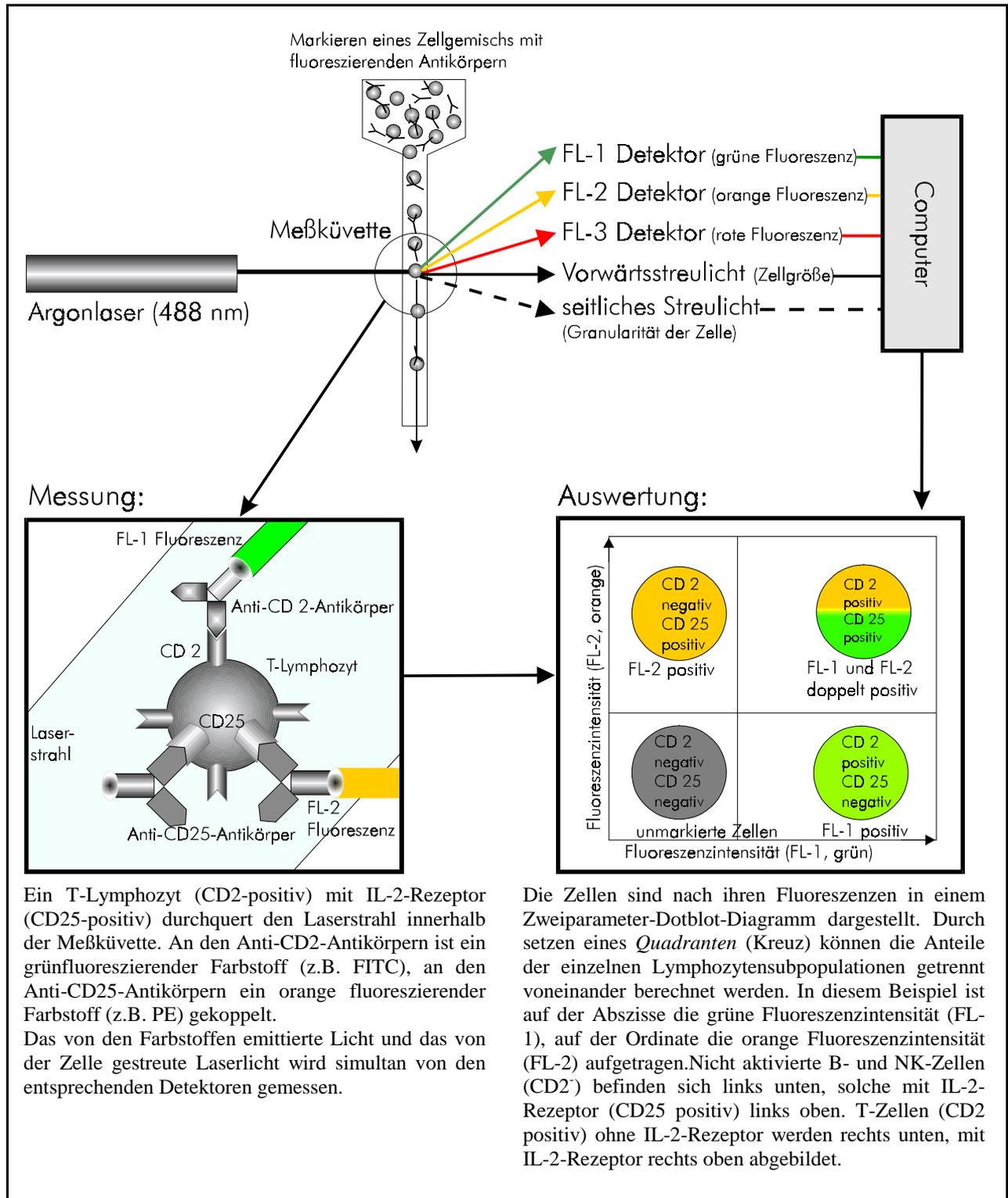


Abbildung 2.1: Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers

2.6 Phänotypisierung peripherer Lymphozyten mittels monoklonaler Antikörper

Das Immunsystem reagiert auf Infektionen und körperlichen Streß in einer Form, die von geprägten und genetischen Faktoren abhängt. Immunsupprimierende Therapien führen ebenfalls zur Verringerung der Immunreaktionen. Das Instrument der Phänotypisierung von Lymphozyten erlaubt eine sensitive Bestimmung der Immunlage.

Die Markierung bestimmter Leukozytenoberflächenantigene durch fluoreszenzkonjugierte Antikörper und eine anschließende Messung mit einem Durchflußzytometer ermöglicht die Unterscheidung und Charakterisierung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen aus einer Vollblutprobe.

Es können somit Aussagen über Reifegrad und Aktivierungszustand der einzelnen Leukozytenpopulationen eines Probanden oder Patienten getroffen werden.

2.6.1 Durchführung der Antikörperfärbung

Tabelle 2.1: Spezifität, Isotyp und Ursprung der verwandten monoklonale Antikörper (Maus-anti-human)

Abk.: FITC=Antikörper ist Fluorescein-isothiocyanat konjugiert; PE=Antikörper ist mit Phycoerythrin konjugiert

Antigen	Beschreibung	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-CD 2	pan T-Zell Marker	S5.2	IgG1 _{FITC}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 3	T-Zell-Rezeptor Komplex	SK7	IgG1 _{FITC}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 4	T-Helferzellen	SK3	IgG1 _{FITC}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 8	zytotoxische T-Zellen	SK1	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 14	LPS-Rezeptor	UCHM1	IgG2a _{FITC}	Fa. Dianova, Hamburg
Anti-CD 16	FC γ III-Rezeptor	CB16	IgG1 _{FITC}	Fa. Dianova, Hamburg
Anti-CD 18	β -2 Integrin, Untereinheit	MHM23	IgG1 _{FITC}	Fa. Dako, Hamburg
Anti-CD 19	B-Zellen	4G7	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 25	IL-2 Rezeptor, α -Kette	2A3	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 45	pan Leukozyten Marker	2D1	IgG1 _{FITC}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD45R0	T-Gedächtniszellen	UCHL-1	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD45RA	naive T-Zellen	L48	IgG1 _{FITC}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 54	ICAM-I	LB-2	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-CD 56	N-CAM, NK-Zellen	MY31	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-HLA-DR	MHC II	L243	IgG1 _{PE}	Fa. Becton Dickinson
Anti-EGFr	Epidermal-Growth-Factor-Receptor	MAB ₇₂₀₀₀ humanisiert	IgG1	Fa. Merck, Darmstadt
Anti-EGFr	Epidermal-Growth-Factor-Receptor	MAB42500	IgG2a	Fa. Merck, Darmstadt

Die Steuerung des Durchflußzytometers, die Messungen und Auswertungen wurden mit den Programmen *Consort 30* (Becton-Dickinson, bis Mitte 1995) und *Lysys II* (Becton-Dickinson) durchgeführt.

Jeweils 5 μ l der Antikörperlösung wurden in *FACS*-Probenröhrchen vorgelegt. Daraufhin wurde jeweils 100 μ l EDTA-Blut zugegeben und vermischt. Der Kontrollansatz enthielt nur

die Blutprobe. Alle im Folgenden genannten Inkubationszeiten fanden unter Lichtabschluß statt. Jede Zentrifugation dauerte 10 min bei 350 g und 4°C.

Daran schloß sich eine 30 minütige Inkubationszeit bei 4°C an. Durch Zugabe von jeweils 2 ml *Lysing-Solution* (Becton-Dickinson, 1 : 10 mit H₂O bidest (v/v) verdünnt) wurden die Erythrozyten während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Es schloß sich eine Zentrifugation an. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml PBS/0,1% Natriumazid (v/g) gewaschen.

Es folgte die Fixierung der Leukozyten in jeweils 2 ml PBS /2,0% Formaldehyd /0,1% Natriumazid (v/v/g) für 30 Minuten bei 4°C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 300 µl PBS/0,1% Natriumazid (v/g) resuspendiert und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Bei jeder Messung wurden 5000 Zellen registriert.

2.6.2 Auswertung

Die die zu untersuchende Leukozytenpopulation wurde im *FSC-SSC-Dotplot* (Zellgröße gegen Zellgranularität) durch Umfahren mit dem Cursor markiert. Dieser Vorgang wird als *gating*, der markierte Bereich als *Gate* oder *Region* bezeichnet. (Abbildung 2.2.a).

In der weiteren Auswertung wurden nur die Zellen in dem gesetzten Gate berücksichtigt. Um die Autofluoreszenz der jeweiligen Leukozyten zu bestimmen, wurden die Meßdaten des Kontrollansatz (Negativkontrolle) in einem *FL-1-FL-2-Dotplot* (grüne Fluoreszenz gegen orange Fluoreszenz) aufgetragen. Anhand der Negativkontrolle wurde ein *Quadrant* gesetzt (Abbildung 2.2.b).

Ereignisse, die nur eine FITC-Fluoreszenz aufweisen, erscheinen immer im 4. Quadranten, solche mit einer PE-Fluoreszenz nur im 1. Quadranten. Doppeltpositive Ereignisse befinden sich im 2. Quadranten (Abbildung 2.2.c).

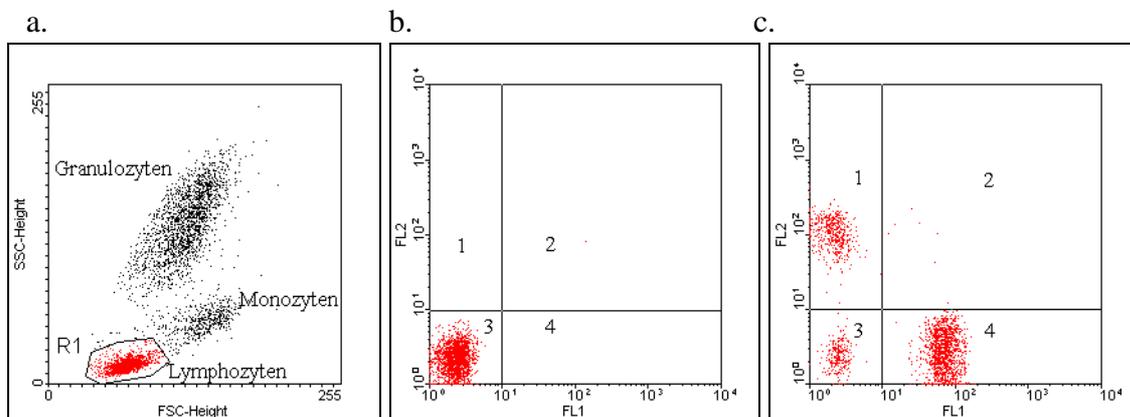


Abbildung 2.2: Immunphänotypisierung, Auswertung einer Vollblutprobe. FSC=Zellgröße, SSC= Zellgranularität, FL-1=FITC-Fluoreszenz, FL-2=PE-Fluoreszenz. a) Definition des Lymphozytengate R1. b) Unmarkierte Lymphozyten als Negativkontrolle. c) FL-1: CD3-FITC; FL-2: CD19-PE

Um die relative numerische Regulierung definierter Antigene bestimmen zu können, wird die interessierende Zellpopulation (PBL, PMNL oder Monozyten, Abb. 2.2) in einem der Antikörperfluoreszenz (FL-1 oder FL-2) entsprechenden Histogramm dargestellt. Die Software ermöglicht die Berechnung des Histogramm-Mittelwertes. Die Höhe des Mittelwertes ist direkt proportional zu der Anzahl an das jeweilige Antigen gebundener, fluoreszenzmarkierter Antikörper. Von diesem Wert wird der Mittelwert des Kontrollansatzes

(Probe ohne Antikörper) subtrahiert (Abb. 2.3). Das Ergebnis wird als die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bezeichnet.

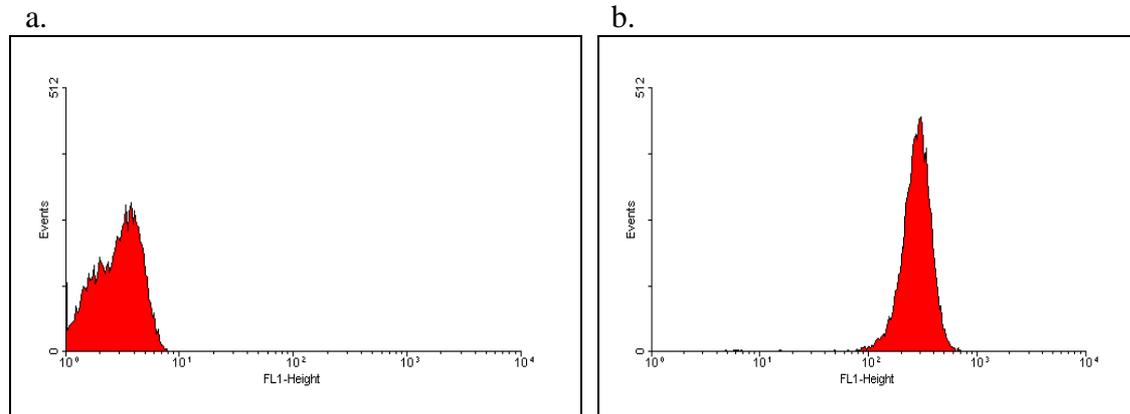


Abbildung 2.3: Bestimmung der relativen Rezeptordichte (CD18) auf PMNL.

Auswertung einer Vollblutprobe. Dargestellt sind die Zellen der Granulozytenpopulation in Histogramm-darstellung. a) Negativkontrolle ohne spezifische Antikörper. b) CD18-positive Granulozyten. FL-1=FITC-Fluoreszenz, Events = Ereignisse.

2.7 Funktionsanalyse am Durchflußzytometer (FACSCAN)

Bei der durchflußzytometrischen Bestimmung der Lymphozytenaktivität ergibt sich das Problem der Trennung von Effektor- und Targetzellen. Die Unterscheidung wird durch die Färbung der Targetzellen mit dem Membranfarbstoff DiO³ ermöglicht. Dessen Anregungswellenlänge beträgt 485 nm, die Emmissionswellenlänge 504 nm.

Bei der Messung können somit die fluoreszierenden Targetzellen eindeutig von den nicht-gefärbten Effektorzellen unterschieden werden. Registriert werden nur die DiO-gefärbten Targetzellen.

Defekte Targetzellen werden durch Inkorporation von Propidiumjodid (PI) nachgewiesen. PI ist ein interkalierender DNA (RNA)-Farbstoff und kann nur durch eine beschädigte Membran in das Innere einer Zelle gelangen. An DNA bzw. RNA gebundenes PI wird durch den Argonlaser des *FacsCan* (488 nm) zu einer Rotfluoreszenz (617 nm) angeregt.

Beschädigte Targetzellen weisen eine Rot- und eine Grünfluoreszenz auf und sind eindeutig von unbeschädigten Targetzellen (nur Grünfluoreszenz) zu unterscheiden.

2.7.1 Präparation der Targetzellen

Pro ml Zellsuspension (ca. 5×10^5 Zellen/ml) der am Vortag versorgten Targetzelllinien (*K562* und *Raji*, siehe 2.2.1) wurden 20 μ l (*K562*) bzw. 25 μ l (*Raji*) DiO-Stammlösung [3×10^{-6} M] gegeben. Anschließend wurden die Zellsuspensionen gut durchmischt, 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend zweimal in PBS gewaschen (10 min, 350 g).

Die Pellets wurden in Einfriermedium resuspendiert. Aliquots mit jeweils 10^5 Zellen in 200 μ l Einfriermedium wurden bei -80°C eingefroren (siehe 2.2.4).

³DIO: 3,3-Dioctadedyloxacarbocyanin-perchlorat; C₅₃H₈₅ClN₂O₆

2.7.2 Durchführung der durchflußzytometrischen Funktionsanalyse

Die eingefrorenen Targetzellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und einmal mit Komplettmedium (DMEM+10% FCS) gewaschen (10 min, 350 g). Das Pellet wurde in 1 ml Komplettmedium resuspendiert und auf eine Dichte von 1×10^4 Zellen pro 100 µl eingestellt. Zu den Ansätzen wurden jeweils 4×10^5 Effektorzellen in 150 µl Komplettmedium zugegeben (Effektor/Targetratio = 40:1). Pro Targetzelllinie wurde ein Kontrollansatz zur Bestimmung der Spontansterblichkeit ohne Effektorzellen angesetzt.

Die Ansätze wurden mittels Vortex gut gemischt und für drei Minuten bei 120 g zentrifugiert. Danach schloß sich eine vierstündige Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ an.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Ansätze mittels Vortex gründlich resuspendiert und auf Eis gestellt, es wurden jeweils 5 µl Propidiumjodidlösung zugegeben und nochmals für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

2.7.3 Messung

Im ersten Schritt wurde ein Gate (Targetzellgate) auf die grünfluoreszierenden Targetzellen des Kontrollansatz im FL-1-Histogramm gesetzt (Abb. 2.4).

Bei den folgenden Messungen wurden nur die Ereignisse berücksichtigt, die innerhalb des Targetzellgates lagen.

Nicht grünfluoreszierende Zellen (Effektorzellen) wurden somit von der Messung ausgeschlossen.

2.7.4 Auswertung

Die aufgenommenen Daten wurden in einem FL-3-Histogramm (rote Fluoreszenz) aufgetragen. Abbildung 2.5 zeigt ein typisches FL-3-Histogramm zur Bestimmung der toten, bzw. defekten Targetzellen im Kontrollansatz. Der Anteil der spontan beschädigten Targetzellen wurde durch Setzen eines Auswertemarkers *M1* über den Bereich der höheren FL-3-Fluoreszenzintensität (von 10^1 bis 10^4) bestimmt.

Die Bestimmung der defekten Targetzellen im Testansatz (Abb. 2.6) erfolgte analog der Bestimmung der Spontansterblichkeit durch Messung des prozentualen Anteils der defekten Zellen innerhalb der Markerregion *M1*. Die prozentuale Lyserate wurde durch die Differenz von Kontrollwert (Targetzellen ohne Effektorzellen) und Testwert (Targetzellen mit Effektorzellen) ermittelt.

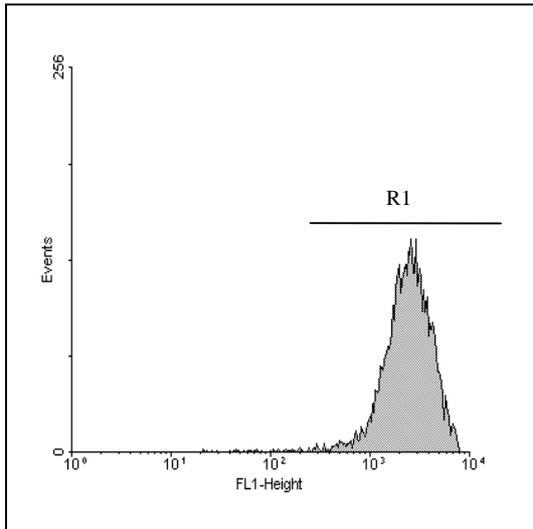


Abbildung 2.4: FL-1-Histogramm (grüne Fluoreszenz). Bestimmung der Targetzellfluoreszenz und Definition des Targetzellgates im Kontrollansatz.

Auf der Abszisse ist die relative Intensität der Grünfluoreszenz logarithmisch aufgetragen.

Durch das Setzen eines „Live-Gates“ über die grünfluoreszierenden Targetzellen (K562) des Kontrollansatzes (nur Targetzellen) wurden nur Ereignisse mit dieser Fluoreszenzeigenschaft bei der Messung registriert.

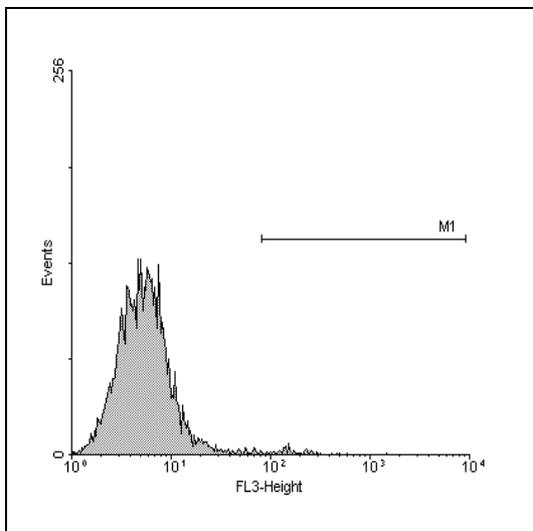


Abbildung 2.5: FL-3-Histogramm (rote Fluoreszenz).

Auswertung des Kontrollansatzes (nur Targetzellen) zur Bestimmung des Anteils spontan defekter Targetzellen (K562). Der Peak geringer Rotfluoreszenz (von 0 bis 10^1) repräsentiert die Population intakter Targetzellen. In dem sich bei einer Fluoreszenzintensität von ca. 10^2 abzeichnenden Peak werden die Ereignisse mit einer hohen Rotfluoreszenz summiert, dies ist der Anteil der spontan defekten Targetzellen. Durch das Setzen eines Markers (hier *M1* genannt) kann die Software den prozentualen Anteil defekter Zellen berechnen.

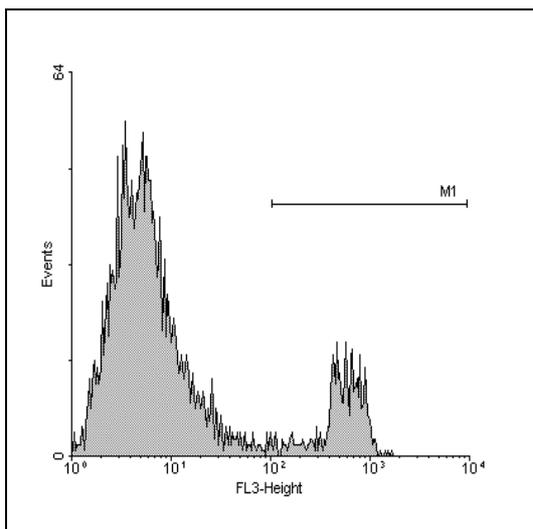


Abbildung 2.6: FL-3-Histogramm (rote Fluoreszenz). Auswertung eines Testansatzes, dieser enthält Effektor- und Targetzellen.

Zerstörte Targetzellen inkorporieren Propidiumjodid und weisen eine hohe Rotfluoreszenz auf. Der Marker über dem Peak der defekten Targetzellen (hohe Rotfluoreszenz) ermöglicht die Berechnung des prozentualen Anteils defekter Targetzellen. Für die Auswertung wurde von diesem Wert der prozentuale Anteil spontan defekter Targetzellen subtrahiert.

2.7.5 Ermittlung der DiO-Konzentrationen

Die Targetzelllinien (*A431*, *K562*, *Raji*) wurden in Kompletmedium mit aufsteigenden DiO-Konzentrationen (5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l DiO-Färbelösung/ml Zellsuspension/ 5×10^5

Zellen) jeweils 15 min gefärbt. Nach 2 Waschschritten mit PBS (Zentrifugation jeweils 8 min bei 350 g) wurde das Pellet in 500 µl PBS resuspendiert und 5 µl PI-Lösung [10 µg/ml] zugegeben. In einem *FL-1*-Histogramm wurde die Intensität der DiO-Färbung gemessen, in einem *FL-3*-Histogramm die Vitalität der Zellen.

2.7.6 Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit

Hierzu wurden ein Europiumrelease-Assay und die durchflußzytometrische Methode parallel nach oben beschriebenen Protokollen durchgeführt. Die Effektor-Targetzell-Inkubationszeiten betragen bei der FACS-Methode 2h, 3h und 4h.

2.7.7 Effektorzellfärbung durch DiO-Diffusion aus zerstörten Targetzellen

Ca. 5×10^5 Dio-gefärbte *K562*-Zellen in Komplettmedium wurden mittels Ultraschall zerstört. Nach 1h wurden die Zellfragmente bei 5000 g abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. PBL wurden für 4h in dem Überstand inkubiert. Die PBL wurden am FACS im Vergleich zu unbehandelten PBL auf erhöhte Grünfluoreszenz untersucht.

2.7.8 Lösungen für die Funktionsanalyse am Durchflußzytometer

DiO-Färbelösung (gesättigt):	3 mg DiO [3×10^{-6} M] wurden in 100 µl DMSO und 900 µl absoluten Ethanol gelöst, zurückbleibende Kristalle wurden abfiltriert. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert.
DNA-Färbelösung:	Propidiumjodid [10 µg/ml] in PBS.
Komplettmedium:	DMEM + 10% FCS (v/v)

2.8. Bestimmung der ADCC am Durchflußzytometer

Als ADCC (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität) wird die Reaktion natürlicher Killerzellen und Makrophagen gegen Zellen bezeichnet, die mit Antikörpern der Klasse IgG opsoniert sind.

Die Zellyse durch NK-Zellen ist ein mehrstufiger Prozeß, der mit der Bildung eines stabilen Komplex zwischen NK-Zelle und Zielzelle beginnt. Drei Oberflächenstrukturen auf den NK-Zellen sind dafür notwendig: CD2, CD11/CD18 und CD16 (FcyIII, IgG-Rezeptor).

Die Immunzellen binden über ihre FcyIII-Rezeptor an den konstanten Teil der auf den Zielzellen gebundenen Antikörper der Klasse IgG.

Dies löst die Aktivierung der zellytischen Prozesse aus und die Targetzellen werden zerstört.

Als Targetzellen dienen Zellen der Linie *A431*. Diese Zellen weisen eine hohe EGF-Rezeptordichte auf auf. Die eingesetzten Antikörper binden hochspezifisch an der Mitogen-Bindungstelle des EGF-Rezeptors. Sie existieren in zwei Varianten, die jedoch identische Antigenerkennungsregionen besitzen:

*EMD*₇₂₀₀₀, Isotyp: human IgG1 (Merck AG, Darmstadt)

*Mab*₄₂₅₀₀₀, Isotyp: Maus IgG2a (Merck AG, Darmstadt)

Humane NK-Zellen können über ihre Fc γ III-Rezeptoren (CD16) an den konstanten Bereich von *EMD*₇₂₀₀₀ binden, jedoch nicht an den murinen *Mab*₄₂₅₀₀₀. Mit *Mab*₄₂₅₀₀₀ markierte Zellen dienen als Negativkontrollen. Um den Einfluß der murinen Antikörper im Assay zu bestimmen, wurden unmarkierte *A431*-Zellen als zusätzliche Negativkontrolle eingesetzt.

2.8.1 Durchführung der durchflußzytometrischen ADCC-Messung

Die Targetzellen wurden durch leichtes trypsinieren (30 s) aus der Kulturflasche gelöst und für 30 min in DMEM+10% FCS bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert.

In ersten Schritt wurden die Zellen mit dem grünfluoreszierenden Membranfarbstoff DiO [20 μ l/ml DiO-Stammlösung] analog zu 2.7 *Funktionsanalyse am Facscan* eingefärbt.

Danach schloß sich die Opsonierung der Targetzellen an. Von circa 1.5×10^6 Zellen wurde ein Drittel mit *EMD*₇₂₀₀₀ [1 μ g/ml], ein weiteres Drittel mit *Mab*₄₂₅₀₀₀ [1 μ g/ml] markiert, der Rest blieb unbehandelt. Die 30 minütige Markierung erfolgte bei RT in einem Volumen von 1 ml in PBS. Danach erfolgten 2 Waschschrte mit PBS. Nach Beendigung der Waschschrte wurden die Zellen in 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Targetzellen wurden gezählt, pro Ansatz wurden 1×10^4 Zellen in FACS-Probenröhrchen pipettiert und auf ein Volumen von 100 μ l mit Komplettmedium aufgefüllt. Um Monozyten durch Adhäsion zu depletieren, wurde die frisch isolierte Leukozytenpräparation 2h in einer Petrischale inkubiert, die im Überstand befindlichen PBL wurden weiter kultiviert. Lymphozyten wurden zu den Zielzellen in einem Verhältnis von 10:1 in einem Volumen von 150 μ l in Komplettmedium zugegeben und gut durchmischt, es schloß sich eine dreißigminütige Inkubationszeit bei 37°C an.

Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 10 μ l Propidiumjodidlösung [10 μ g/ml in PBS] zu jedem Ansatz.

Die Messung und Auswertung fand am Durchflußzytometer statt und erfolgte wie in 2.7 *Funktionsanalyse am Facscan* beschrieben.

Das Ergebnis der Negativkontrolle (unmarkierte bzw. mit *MAB*₄₂₅₀₀₀ opsonierte *A431*) wurde von dem Testwert subtrahiert.

2.8.2 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration

Jeweils 5×10^5 DiO-gefärbte *A431*-Zellen wurden mit *EMD*₇₂₀₀₀-Antikörpern in Konzentrationen von 0,001 μ g, 0,01 μ g, 0,1 μ g, 1 μ g, 4 μ g, 8 μ g/ml für 30 min opsoniert. Durchführung und Auswertung des Tests erfolgte wie oben beschrieben.

2.8.3 Ermittlung der Effektor-Target-Inkubationszeit

Hierzu wurden jeweils 5×10^5 DiO-gefärbte *A431*-Zellen, die mit *EMD*₇₂₀₀₀ [1 μ g/ml] markiert worden sind, über 30 min, 60 min und 120 min mit Effektorzellen (E:T=10:1) inkubiert. Weitere Durchführung und Auswertung des Tests erfolgte wie oben beschrieben.

2.8.4 Spezifität des Assays für ADCC durch NK-Zellen

PMNL haben eine hohe CD16-Expression und können ebenfalls an IgG markierte Ziele binden und diese über andere Effektormechanismen (z.B. O_2^- -Bildung) zerstören. In dem Experiment wurde untersucht, ob PMNL *EMD*₇₂₀₀₀-opsonierte *A431*-Zellen zerstören können. PBL und PMNL wurden aus Vollblut isoliert (siehe 2.3) und in Verhältnissen von PBL : PMNL = 4 : 1 bzw. PBL : PMNL = 1 : 1 als Effektorzellen in dem Test eingesetzt. Targetzellen waren DiO-gefärbte *EMD*₇₂₀₀₀-opsonierte *A431*-Zellen. Das Effektor-Targetzellverhältnis betrug 10 : 1. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll (siehe 2.8.1.).

2.9 Bestimmung der Phagozytoseleistung peripherer Granulozyten und Monozyten am Durchflußzytometer

2.9.1 Opsonierung und Färbung der Bakterien

Falls nicht anders angegeben, wurde PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} verwandt. Es wurden 50 mg lyophilisierte *E.coli* (Sigma; Strain *K12*) für 24 h bei 37°C in 50 ml DMEM inkubiert. Die Bakterien wurden mit PBS gewaschen und die Zahl photometrisch bestimmt (Extinktion von 0.1 bei 350 nm entspricht ca. 3×10^7 Bakterien). Die Bakterien wurden 6 min bei 4000 g abzentrifugiert und in frischen, gepoolten Humanserum (nicht hitzeinaktiviert) in einer Konzentration von ca. 4 mg/ml resuspendiert. Es folgte 40 Minuten Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die opsonierten Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen und in einem Endvolumen von 5 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 150 µl DiO-Lösung [3mg/ml]; Endkonzentration [90 µg/ml] und 15 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C. Die Bakterien wurden einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml Einfriermedium resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.9.2 Durchführung des Phagozytoseassay

Ein Bakterienaliquot wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut; es wurden 900 µl PBS hinzugefügt, die Bakterien resuspendiert und 5 min bei 5.000 g zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 500 µl PBS sorgfältig resuspendiert und auf Eis gekühlt. Zu jeweils 100 µl Blut (auf 4°C gekühlt), (bzw. 5×10^5 Leukozyten in 100 µl Komplettmedium) wurden jeweils 20 µl Bakteriensuspension zugegeben. Dies entsprach ungefähr einem Verhältnis von ca. 50 Bakterien zu einem Leukozyten. Ein Ansatz verblieb als Negativkontrolle auf Eis, ein zweiter als Testansatz im Wasserbad bei 37°C. Die Reaktionszeit betrug 12 min.

Nach der Inkubation wurde zu jedem Ansatz 100 µl Trypanblau [0,5%] (4°C) gegeben. Danach folgten 3 Waschschrte: Die Probe wurde in jeweils in 3 ml PBS resuspendiert und 8 min bei 350 g zentrifugiert. Bei der Untersuchung von Vollblutproben wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von jeweils 2 ml *Lysing-Solution* während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Das Erythrozytenlysat wurde durch zwei Waschschrte entfernt (3 ml PBS; 8 min bei 350 g). Es folgte die Fixierung der Leukozyten in jeweils 2 ml PBS/2,0% Formaldehyd/0,1% Natriumazid (v/v/g) für 30 Minuten bei 4°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min, 350g) wurde das Pellet in 300 µl PBS/0,1% Natriumazid (v/v/g) resuspendiert, pro Ansatz wurden 10 µl PI-Lösung [10 µg/ml in PBS] zugegeben und bis zur Messung auf Eis gelagert (max. 60 min).

2.9.3 Messung

Im *FL-2*-Histogramm wurde ein Live-Gate über den 2. DNA-Peak (diploide Zellen) gesetzt. Nur diploide Zellen wurden somit bei der Messung registriert. Einstreuende Bakterien wurden von der Messung ausgeschlossen (Abb. 2.7).

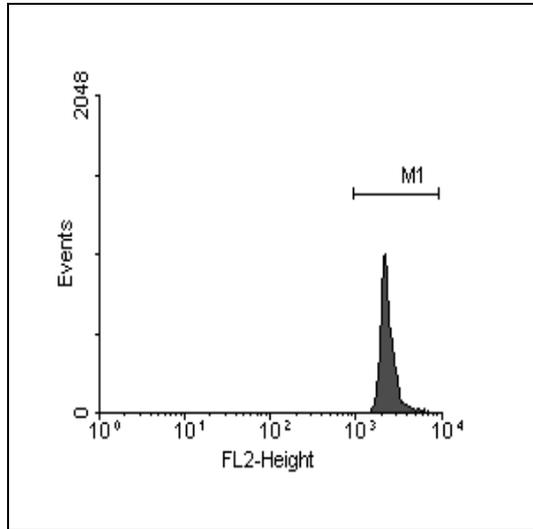


Abbildung 2.7: *FL-2*-Histogramm; Live-Gate über DNA-Peak der Leukozyten
Durch dieses Gate wurde verhindert, daß Bakteriencluster in die Granulozytenwolke einstreuen und das Ergebnis verfälschen.

2.9.4 Auswertung

Um die Phagozytoseleistung der Granulozyten bestimmen zu können, wurde im *FSC-SSC*-Dotplot-Diagramm ein Polygon-Gate über die Granulozytenpopulation gelegt (Abb. 2.8).

Im nächsten Schritt wurde dieselbe Datei mit aktiviertem Granulozytengate (R1) als *SSC-FL-1*-Dotplot-Diagramm dargestellt.

Zur Auswertung wurde ein Quadrant so gesetzt, daß beide Populationen getrennt waren. Anhand des Quadranten konnte die Software den Anteil der phagozytierenden Zellen und deren MFI berechnen. Diese gilt als Maß für die Menge der aufgenommenen Bakterien.

Das Ergebnis errechnete sich aus der Differenz von Testwert (Granulozyten/Monozyten bei 37°C) und Kontrollwert (Granulozyten/Monozyten bei 4°C) (Abb. 2.9).

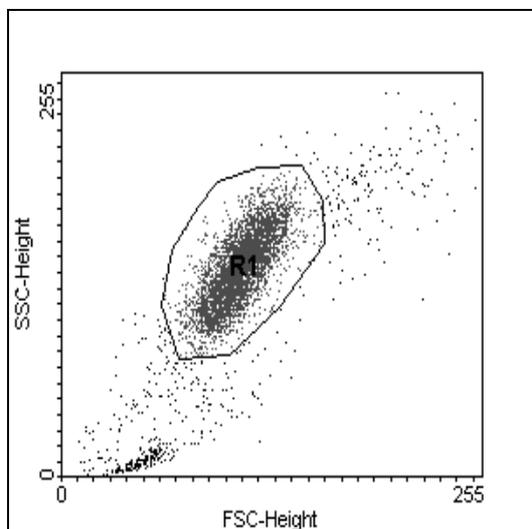


Abbildung 2.8: *FSC-SSC*-Dotplot-Diagramm; Zellgröße (FSC) gegen Zellgranularität (SSC). Granulozyten-Gate (R1) im Kontrollansatz.

DiO-Färbelösung:	3 mg DiO (Sigma) [$3 \cdot 10^{-6}$ M] in 100 μ l DMSO + 900 μ l Ethanol (abs.)
Fixierlösung:	2% Formaldehydlösung in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}
Quenchlösung:	Trypanblau [0,5%]
Lysing-Solution:	
0,155 M NH_4Cl	8,29 g/l
0,01 M KHCO_3	1,0 g/l
0,0001 M EDTA	0,04 g/l
Propidiumjodid-Lösung:	[10 μ g/ml], in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}

2.10 Durchflußzytometrische Messung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion durch Granulozyten und Monozyten

Die Bildung des Superoxidanions durch PMNL und Monozyten nach Stimulierung mit *E.coli* wurde nach der Methode von Rothe und Valet (Rothe et al, 1991) gemessen. Dieser Nachweis basiert auf der Oxidation von Dihydrorhodamin-123 (DHR123, Sigma) zu Rhodamin-123 (R123) durch das Superoxidanion (O_2^-), R123 wird durch die Emission grüner Fluoreszenz bei Anregung durch Licht der Wellenlänge 488 nm nachgewiesen. Die R123-Bildung verhält sich proportional zur Sauerstoffradikalmenge.

2.10.1 Präparation der Bakterien

Zentrifugiert wurde jeweils für 6 min bei 5000 g. Falls nicht anders angegeben, wurde PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} verwandt.

E.coli (Strain K12, Sigma) wurden für 24h bei 37°C in DMEM inkubiert. Die Bakterien wurden zweimal mit PBS gewaschen. Nach den Waschschritten wurde das Pellet in PBS resuspendiert. Bestimmung der Bakterienzahl und Opsonierung erfolgten analog zu 2.9.1. Die Bakterien wurden auf eine Dichte von 3×10^9 Zellen / ml eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.10.2 Durchführung

Zu 100 μ l Vollblut bzw. Leukozytensuspension (5×10^6 Zellen/ml) in DMEM + 10% FCS wurden 10 μ l der Bakteriensuspension (Testansatz) bzw. 10 μ l PBS (Kontrollansatz) zugegeben. Dies entspricht einem Verhältnis von *E.coli*:Leukozyten = 40-50:1. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 37°C wurden 10 μ l DHR123 [1,1 mM] in 990 μ l PBS zu den Ansätzen gegeben und gemischt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei 37°C wurden zu den Ansätzen jeweils 2 ml PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} gegeben und die Proben 10 Minuten bei 350 g zentrifugiert. Danach folgten 2 Waschschriffe: Die Probe wurde in jeweils in 3 ml PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} resuspendiert und 8 min bei 350 g zentrifugiert. Zur Untersuchung von Vollblutproben wurden die Erythrozyten durch die Zugabe von jeweils 2 ml *Lysing-Solution* während einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Das Erythrozytenlysat wurde durch zwei Waschschriffe entfernt (3 ml PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 8 min bei 350 g). Es folgte die Fixierung der Leukozyten in jeweils 2 ml PBS/2,0% Formaldehyd/0,1%

Natriumazid (v/v/g) für 30 Minuten bei 4°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (8 min, 350 g) wurde das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert, pro Ansatz wurden 10 µl PI-Lösung zugegeben und bis zur Messung auf Eis gelagert (max. 60 min).

2.10.3 Auswertung

Im *FL-2*-Histogramm wurde ein Live-Gate über den 2. DNA-Peak (diploide Zellen) gesetzt (siehe 2.9.3)

Im zweiten Schritt wurden die interessierenden Zellpopulationen im *FSC-SSC*-Diagramm durch das Setzen entsprechender Gates selektiert (Abbildung 2.10). Daraufhin wurde dieselbe Datei mit aktiviertem Granulozytengate (R1) (oder Monozyten-Gate (R2)) als *SSC-FL-1*-Dotplot-Diagramm dargestellt. Anhand der Negativkontrolle wurde ein Quadrant gesetzt (Abb. 2.11), durch den die Software den Anteil der O₂⁻-produzierenden-Zellen und deren MFI berechnen konnte. Diese gilt als Maß für die Menge der erzeugten Sauerstoffradikale (Abb. 2.12).

Das Ergebnis errechnete sich aus der Differenz von Testwert (Granulozyten/Monozyten mit *E.coli*) und Kontrollwert (Granulozyten/Monozyten ohne *E.coli*).

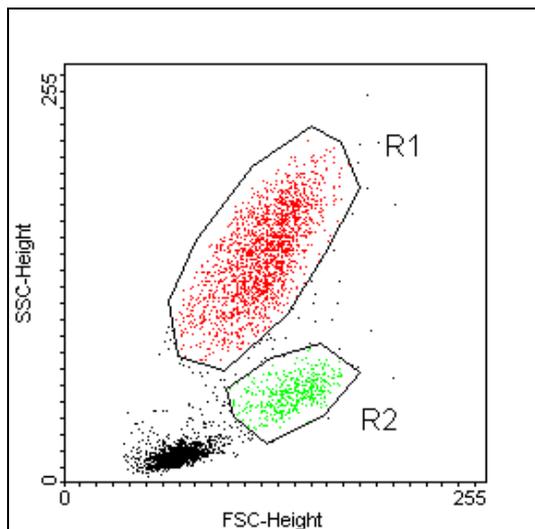


Abbildung 2.10: *FSC-SSC*-Dotplot-Diagramm; Zellgröße (*FSC*) gegen Zellgranularität (*SSC*) Granulozyten-Gate (R1) und Monozyten-Gate (R2) im Kontrollansatz.

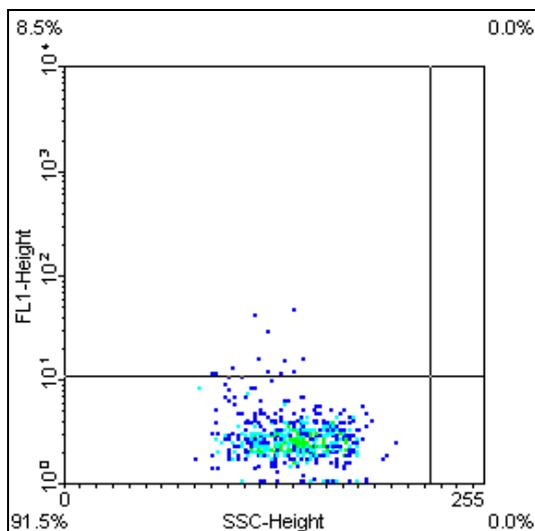


Abbildung 2.11: Kontrollansatz; *SSC-FL-1*-Dotplot-Diagramm; Zellgranularität (*SSC*) gegen grüne Fluoreszenz (*FL-1*) Anhand der Negativkontrolle wurde ein Quadrant gesetzt. Die unstimulierten Granulozyten weisen nur eine geringe Grünfluoreszenz auf. Sie haben kaum O₂⁻-Radikale gebildet, das DHR123 wurde nicht oxidiert.

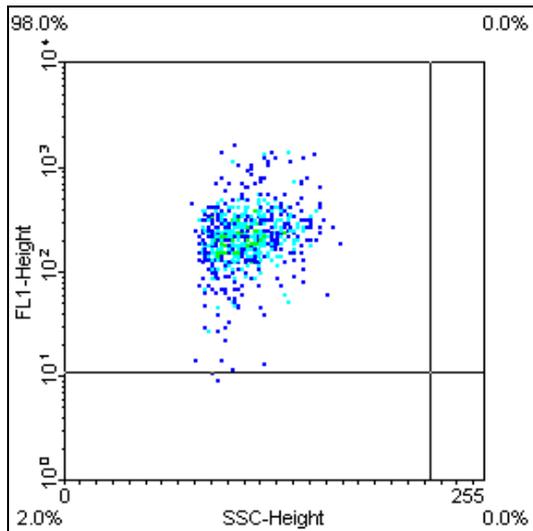


Abbildung 2.12: Testansatz; *SSC-FL-1*-Dotplot-Diagramm; Zellgranularität (SSC) gegen grüne Fluoreszenz (FL-1)

Nach Stimulierung mit *E.coli* wurde das DHR123 durch die gebildeten O_2^- -Radikale oxidiert.

Die Granulozyten weisen eine hohe Grünfluoreszenz auf.

2.10.4 Lösungen für die Bestimmung der phagosomalen Wasserstoffperoxid-Produktion

DHR123-Lösung DHR123 [1,1 mM] in N,N-Dimethylformamid

Lysing-Solution:

0,155 M NH_4Cl 8,29 g/l

0,01 M $KHCO_3$ 1,0 g/l

0,0001 EDTA 0,04 g/l

Fixierlösung: 2% Formaldehydlösung in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}

Propidiumjodid-Lösung: PI-Stammlösung (100 $\mu g/ml$)
1:10 mit PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} verdünnt

2.11 Enzymaktivitäten

2.11.1 Herkunft der Enzyme

Das Chymotrypsin wurde, nach Herstellerangaben, aus dem Pankreas von Rindern gewonnen, das Trypsin aus dem Pankreas von Schweinen aus kontrollierten Zuchten. Das Papain stammt aus Milchsaft der unreifen Früchte von *Carica papaya* Linné.

Die hier beschriebenen Methoden wurden dem *Worthington Manual* entnommen.

2.11.2 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Chymotrypsin

Zur Bestimmung der Chymotrypsinaktivität wurde die Hydrolysierungsrates von Benzoyl-L-Tyrosine-Ethylester (BTEE) als eine Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 256 nm gemessen. Eine Einheit entspricht der Hydrolysierung von 1 μmol Substrat in einer Minute bei einem pH von 7.8 und einer Temperatur von 25 °C.

In zwei Küvetten wurden jeweils 1,5 ml des Puffers und 1,4 ml der Substratlösung vorgelegt. In die Kontrollküvette wurde 100 µl 0,001 M HCl gegeben und gemischt. In die Testküvette wurde 10 µl der zu untersuchenden Enzymlösung [0,1 µg Enzym/1 µl] in 90 µl 0,001 M HCl gegeben.

Es wurde die Absorption bei 256 nm in 30 Sekunden-Intervallen über einen Zeitraum von 5 min protokolliert.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{units/mg Enzym} = \frac{\Delta A_{256}/\text{min} \times 1000 \times 3.0}{964 \times \text{mg eingesetztes Enzym}}$$

„964“ entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten von N-Benzoyl-DL-Tyrosine bei 254 nm.

2.11.3 Lösungen für die Chymotrypsinbestimmung

Substrat:

BTEE, 0,00107 M in 50% Methanol g/g

Puffer:

Tris, 0,08 M

CaCl₂, 0,1 M

pH 8,1

Methanol:

Methanol 50% g/g 63 ml Methanol zu 50ml H₂O

2.11.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Trypsin

Als Maß für die Trypsinaktivität wird die Hydrolyse von TAME (p-Toluene-Sulfonyl-L-Arginin-Methylester) als Zunahme der Absorption photometrisch bei 247 nm gemessen.

Eine Enzymeinheit wird definiert als die Hydrolyse von 1 µmol TAME pro Minute bei einem pH von 8,1 und einer Temperatur von 25°C.

In zwei Küvetten wurden jeweils 1,5 ml des Puffers und 1,4 ml der Substratlösung vorgelegt. In die Kontrollküvette wurde 100 µl 0,001 M HCl, 0,3 ml Substrat und 2,6 ml Puffer gegeben und gemischt. In die Testküvette wurde 0,3 ml Substrat, 2,6 ml Puffer und 10 µl der zu untersuchenden Enzymlösung [0,1 µg Enzym / µl] in 90 µl 0,001 M HCl gegeben.

Es wurde die Absorption bei 247 nm in 30 Sekunden-Intervallen über einen Zeitraum von 5 min protokolliert.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{units/mg Enzym} = \frac{\Delta A_{247}/\text{min} \times 1000 \times 3.0}{540 \times \text{mg eingesetztes Enzym}}$$

„540“ entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten von p-Toluensulfonyl-L-Arginin bei 247 nm.

2.11.5 Lösungen für die Trypsinbestimmung

Substrat:

TAME, 0,01 M 37,9 mg TAME in 10 ml H₂O

Puffer:

Tris, 0,046 M, pH 8,1

CaCl₂, 0,0115 M

2.11.6 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Papain

Eine Einheit Papain entspricht der Hydrolyse von 1 µmol Benzol-L-Arginin-Ethylester (BAEE) in einer Minute bei 25°C.

Das Papain wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in dem Diluent gelöst.

Die Messung erfolgte an einem pH-Meter in einem Becherglas unter permanenten Rühren. 5 ml Substrat, 5 ml H₂O, 5 ml 3 M NaCl und 1 ml Enzymverdünnung wurden in ein Becherglas gegeben. Es wurde das Volumen [ml] 0,01 M NaOH notiert, welches pro Minute benötigt wurde, um den pH-Wert bei 6,2 zu halten. Es wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten gemessen.

Die Enzymaktivität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{units/mg Enzym} = \frac{\text{ml/min} \times \text{M NaOH} \times 1000}{\text{mg eingesetztes Enzym}}$$

2.11.7 Lösungen für die Papainbestimmung

Enzymdiluent:

H₂O 70 ml

EDTA, 0,01 M 10 ml

Mercaptoethanol, 0,06 M 0,1 ml

Cystein, 0,05 M 10 ml

Substrat:

BAEE, 0,041 M in 30 ml H₂O

EDTA, 0,01 M 1,6 ml

Cystein, 0,05 M 1,6 ml

pH-Wert auf 6,2 einstellen, auf 42 ml mit H₂O auffüllen

NaCl, 3,0 M

NaOH, 0,01 M

2.12 Versuchsanordnungen

2.12.1 Einfluß von Enzymen auf Funktion und Phänotyp von PBL, PMNL und Monozyten *in vitro*

Die lyophilisierten Enzyme wurden in den entsprechenden Konzentrationen in PBS gelöst und sterilfiltriert. Die filtrierten Lösungen wurden sogleich in den Experimenten eingesetzt.

Die Enzymmischung enthielt Papain: Trypsin: Chymotrypsin in einem Verhältnis von 2,5:1:1 (g/g/g) analog zu dem in der klinischen Studie eingesetzten Präparats.

Die Lymphozyten wurden aus Buffy-Coat isoliert (siehe 2.3) und in Kompletmedium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, jeweils 10 ml wurden in eine Bohrung einer 6-Lochplatte gegeben.

Die entsprechenden Enzymansätze wurden in Konzentrationen von 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml, 320 µg/ml zugegeben und vermischt.

Nach 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurden die Lymphozyten gezählt und die für die Test notwendige Anzahl entnommen. Die PBL wurden in den oben beschriebenen Funktionsanalysen (ADCC, Zytotoxizitäts-Assays) und Immunphänotypisierungen eingesetzt.

Bei einigen Experimenten erfolgte nach 72 Stunden eine zweite Enzymzugabe in den genannten Konzentrationen. Es folgten weitere Messungen 96 und 120 Stunden nach Versuchsbeginn.

In einem anderen Versuch wurden täglich die Enzyme in Konzentrationen von 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml zugegeben. Zur Bestimmung der NK-LAK, bzw. LAK-Aktivität wurden die PBL 3 Tage vor Enzymzugabe mit IL-2 [200 units/ml] vorinkubiert.

Zur Bestimmung von Phagozytose und oxidativem Burst wurden PMNL wie in 2.3. beschrieben, isoliert und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen /ml mit Kompletmedium in 6-Lochplatten kultiviert. Die Enzyme wurden in Konzentrationen von 40 µg/ml, 80 µg/ml, 160 µg/ml zugegeben. Nach 24h wurden die Funktionstests und Immunphänotypisierungen durchgeführt.

2.12.2 Messungen der Enzymaktivitäten

Hierzu wurden die Enzyme (Papain, Trypsin, Chymotrypsin) und die Enzymmischung in Konzentrationen von 100 µg/ml in H₂O, PBS, DMEM, DMEM+10% FCS gelöst. Die Aktivitätsmessungen wurden sofort, 60 min, 24h, 48h nach Enzymzugabe durchgeführt.

2.12.3 Einfluß von Retinol und *all-trans* Retinsäure auf Funktion und Phänotyp von PBL *in vitro*

Retinol bzw. *all-trans* Retinsäure wurden unter Lichtabschluß und sterilen Bedingungen in einer Endkonzentration von 10^{-3} M in DMSO gelöst. Aliquots beider Lösungen wurden in Kryoröhrchen bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert

Die Lymphozyten wurden aus Buffy-Coat isoliert (siehe 2.3) und in Kompletmedium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, jeweils 10 ml wurden in eine Bohrung einer 6-Lochplatte gegeben.

Retinol bzw. *all-trans*-Retinsäure wurden in Konzentrationen von 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M zugegeben und vermischt. Die DMSO-Konzentration wurde bei allen Ansätzen auf 0,1 % v/v eingestellt. Zusätzlich wurde eine DMSO-Kontrolle [0,1%] angesetzt.

Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Lymphozyten gezählt und eine entsprechende Menge entnommen. Diese wurden in den oben beschriebenen Funktionsanalysen (ADCC, Zytotoxizitäts-Assays) und Immunphänotypisierungen eingesetzt.

2.13 Klinische Pilotstudie „Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Enzym- oder Vitamin-A-Therapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich

2.13.1 Einschlußkriterien für die Patientenstudie

In die Studie aufgenommen wurden freiwillige Probanden, die folgende Bedingungen erfüllten:

- Patienten mit histologisch oder zytologisch nachgewiesenen Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich
- TNM Klassifikation : Tis , T1, T2, T3; N0 bis N2; M0
- männliche oder weibliche Patienten zwischen 18 und 65 Jahren, die aufgeklärt wurden und ihr Einverständnis erklärt haben

2.13.2 Ausschlußkriterien für die Patientenstudie

- bekannte Enzym- und /oder Vitamin-A-Unverträglichkeit
- bekannte Unverträglichkeit gegen einen in der Prüfmedikation enthaltenen Hilfsstoff
- schwere Gerinnungsstörungen
- Frauen im gebärfähigen Alter ohne ausreichende Kontrazeption
- Frauen im gebärfähigen Alter, die zu Studienbeginn einen Schwangerschaftstest ablehnen
- Puerperium / Schwangerschaft / Stillzeit
- Karnofsky Index <50%
- stark eingeschränkte Leberfunktion
- stark eingeschränkte Nierenfunktion
- behandlungsbedürftige systemische Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus)
- behandlungsbedürftige Hypertriglyceridämie, Hypercholesterinämie, Hyperkalziämie
- Glaukom
- Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der letzten 30 Tage
- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie

Bei Auftreten von unerwünschten Begleiterscheinungen, die in einem kausalen Zusammenhang mit der Prüfmedikation stehen, erfolgte der Ausschluß des Patienten aus der Studie.

Für jede Gruppe (*Enzyme, Vitamin A, Placebo, Kontrollen*) wurde eine Anzahl von 15 Probanden geplant.

2.13.3 Medikation

Die Tagesdosis Retinol betrug 150.000 IE/d (*A-Mulsin*, Retinolpalmitat, Fa. Mucos, Geretsried), Enzyme (*WobeMugos*, Fa. Mucos, Geretsried) wurden 3 x täglich a 4 Dragees appliziert (proteolytische Aktivität: 20880 F.I.P.-E/d). Ein Dragee enthält 100 mg Papain, jeweils 40 mg Trypsin bzw. Chymotrypsin. Die *Compliance*⁴, wurde bei den monatlichen Tumorsprechstunden kontrolliert.

Die „Placebo“-Tabletten sind von identischem Aussehen und enthielten nur die Hilfsstoffe.

⁴*Compliance* = „Vertrauenswürdigkeit“; Prozentsatz der eingenommenen Medikation; gesamte Medikation eingenommen = 100%

2. Material und Methoden

Tabelle 2.2: Diagnose, Prüfmedikation, Therapie, Untersuchungszeitraum und Daten der Patienten. Die Altersangabe bezieht sich auf den jeweiligen Studienbeginn. Abk.: m=männlich; w=weiblich; PleKa=Plattenepithelkarzinom; Hypopha=Hypopharynx

Patient	Nummer	Ge- schlecht	Alter ⁵	Gruppe	histolog. Befund	Lokali- sation	Status TNM	Thera- pie ⁶	Untersuchungs- zeitraum
E.H.	504	m	53	Enzym	PleKa,mäßig differenziert	Oro- pharynx	T3/N1/M0	Radio/ Chemo	03.02.1995- 08.12.1995
O.H.	508	m	62	Enzym	PleKa,mäßig diff., G2	Larynx- Hypopha.	T4/N3/M1	----	25.04.1995- 13.12.1995
K.H.	509	m	53	Enzym	PleKa,mittel diff., G2	Larynx- Hypopha.	T3/N3/M0	Radio/ Chemo	10.05.1995- 05.06.1996
S.G.	513	m	52	Enzym	PleKa,gering verhornt	Larynx- Hypopha.	T3/N3/M0	Radio/ Chemo	17.07.1995- 23.01.1996
B.A.	517	m	66	Enzym	PleKa,schle- cht diff., G3	Larynx- Hypopha.	T2/N1/M0	Radio/ Chemo	23.09.1995- 13.12.1995
H.K.	505 b	m	44	Enzym	PleKa	Oro- pharynx	T3/N2/M0	Radio/ Chemo	25.10.1995- 17.05.1996
N.J.	519	m	46	Enzym	PleKa,mäßig diff., G2	Larynx- Hypopha.	T3/N1/M0	Chemo	13.12.1995- 05.06.1996
S.H.	521	m	60	Enzym	PleKa	Oro- pharynx	T1/N0/M0	----	22.01.1996- 03.06.1996
T.U.	523	m	55	Enzym	PleKa, invasiv	Larynx- Hypopha.	T2/N0/M0	----	15.02.1996- 03.06.1996
K.I.	501	w	49	Vitamin- A	PleKa, gering diff.	Oro- pharynx	T3/N3/M0	----	07.01.1995- 15.02.1995
W.P.	507	m	61	Vitamin- A	PleKa, invasiv	Larynx- Hypopha.	T3/N0/M0	----	25.04.1995- 15.01.1995
W.L.	512	m	54	Vitamin- A	PleKa, mäßig diff.	Oro- pharynx	T3/N3/M0	Radio/ Chemo	07.07.1995- 13.12.1995
B.M.	514	m	58	Vitamin- A	PleKa,mäßig verhornt	Oro- pharynx	T3/N3/M0	Radio/ Chemo	23.08.1995- 06.12.1995
H.F.	515 b	m	60	Vitamin- A	PleKa	Larynx- Hypopha.	Tx/Nx/Mx	?	13.12.1995- 31.01.1996
H.K.	520	m	65	Vitamin- A	PleKa	Larynx- Hypopha.	T0/N0/M0	----	15.01.1996- 06.03.1996
F.E.	516	m	54	Placebo	PleKa, ulzeriert	Oro- pharynx	T3/N3/M0	Radio/ Chemo	23.09.1995- 02.05.1996
R.K.	518	m	64	Placebo	PleKa, schlecht diff.	Larynx- Hypopha.	T1/N2/M0	----	25.10.1995- 06.02.1996
M.W.	503 b	m	59	Placebo	PleKa, invasiv, G3	Larynx- Hypopha.	T4/N1/M0	Chemo	25.10.1995- 03.06.1996
A.H.	502	m	57	Abbruch	PleKa, mäßig diff.	Mundhö., Orophx.	T4/N1/M0	----	----
K.K.	503 a	m	53	Abbruch	PleKa,breit invasiv, G1	Mund- höhle	T3/N0/M0	----	----
H.G.	505 a	w	48	Abbruch	PleKa,mäßig diff., G2	Oro- pharynx	T4/N2/M0	----	----
H.H.	506	m	78	Abbruch	Basaloides Karzinom	Oro- pharynx	T3/N1/M0	----	----
S.H.	510	m	59	Abbruch	PleKa, schlecht diff.	Mund- höhle	T3/N2/M0	----	----
S.F.	511	m	43	Abbruch	PleKa, schlecht diff.	Oro,-Lar- Hypophx	T2/N1/M0	----	----
D.D.	515 a	m	49	Abbruch	PleKa,schlecht diff., G3	Larynx- Hypopha.	T4/N2/M0	----	----
P.T.	524	m	53	Abbruch	PleKa	?	T2/N0/M0	----	----

⁵Alter bei Studienbeginn

⁶Während der Studie

2.13.4 Gruppeneinteilung

Die Patienten wurden gemäß ihrer Prüfmedikation drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Die erste Untersuchung der Patienten fand präoperativ statt, die Einnahme der Prüfmedikation begann ca.7-14 Tage nach der Operation.

Tabelle 2.3: Gruppensammensetzung der zur Auswertung gelangten Patienten, Alter und Prüfmedikation. Alter [Jahre]: Mittelwert ± Standardabweichung. Als Verum wird die wirksame Prüfsubstanz bezeichnet.

Gruppe	Alter	Anzahl der Patienten	Enzym	Vitamin-A
Enzym	54 ± 7	8	Verum	Placebo
Vitamin-A	57 ± 5	5	Placebo	Verum
Placebo	59 ± 4	3	Placebo	Placebo

2.13.5 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv umfaßte 15 freiwillige, gesunde Probanden, die über einen Zeitraum von einem Jahr in 6-wöchigen Abständen untersucht wurden und mit dem Tagesbedarf an Vitamin-A (5.000 IU) versorgt wurden. Das Kontrollkollektiv umfaßte 6 Frauen, Alter 36 +/- 9 Jahre und 9 Männer, Alter 40 ± 14 Jahre.

Tabelle 2.4: Untersuchungszeitraum und Daten des Kontrollkollektivs. Die Altersangabe bezieht sich auf den jeweiligen Studienbeginn. Abk.: m=männlich; w=weiblich

Name	Geschlecht	Alter [Jahre] ⁷	Untersuchungszeitraum
B.H.	w	29	02.11.1994 - 08.09.1995
B.C.	w	32	20.10.1994 - 30.10.1995
B.M.	m	39	09.11.1994 - 26.11.1995
D.F.	m	33	06.10.1994 - 17.10.1995
G.C.	w	31	06.10.1994 - 09.10.1995
H.D.	m	26	06.10.1994 - 09.10.1995
J.P.	m	24	18.11.1994 - 20.11.1995
L.C.	m	48	19.10.1994 - 22.09.1995
L.E.	m	61	26.10.1994 - 07.11.1995
O.J.	m	32	06.10.1994 - 26.09.1995
R.F.	w	28	08.11.1994 - 10.11.1995
S.B.	w	39	03.11.1995 - 29.11.1995
S.J.	m	24	02.11.1994 - 07.11.1995
T.L.	m	63	26.10.1994 - 23.10.1995
W.B.	w	55	19.10.1994 - 18.10.1995

2.13.6 Probenentnahme

Für die Untersuchung der immunologischen Parameter wurden den Patienten bzw. den Kontrollen mittels *Butterfly*-Venenpunktionsbesteck 2 x 10 ml Blut (für die Funktionsanalyse) und einmal 3 ml Blut (für die Immunphänotypisierung) in EDTA-Röhrchen *Monovetten*, 1,6 mg EDTA/ml Blut) entnommen und bis zur Aufbereitung bei 4°C gelagert. Die Zeit bis zur Weiterverarbeitung betrug in der Regel nicht mehr als 2h.

⁷Alter zu Studienbeginn

2.13.7 Immunologische Untersuchungen

Es wurden folgende Doppelmarkierungen durchgeführt:

CD4_{FITC}/CD8_{PE} : T-Helfer-Zellen (CD4⁺); Zytotoxische-/Suppressor-T-Zellen (CD8⁺)

CD3_{FITC}/CD19_{PE} : reife T-Zellen (CD3⁺); frühe und reife B-Zellen (CD19⁺)

CD2_{FITC}/CD25_{PE} : aktivierte T- und NK-Zellen (CD2⁺/CD25⁺), aktivierte B- und NK-Zellen (CD2⁻/CD25⁺)

CD45_{FITC}/HLA-DR_{PE} : Leukozyten (CD45⁺), aktivierte B- und T-Lymphozyten

Einfachmarkierungen wurden für folgende Parameter durchgeführt:

CD56_{PE} : Natürliche Killerzellen (CD56⁺)

CD45R0_{PE} : B- und T-Gedächtniszellen (CD45R0⁺)

Als Ergebnis wurde der prozentuale Anteil der PBL angegeben, die für das entsprechende Antigen positiv waren. Die lytische Aktivität von NK-Zellen und die Aktivität nicht-MHC-restringierter LAK wurde mit dem Europiumrelease-Assay gemessen.

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile von PBL, PMNL und Monozyten anhand der FACS-Daten wurde im *FSC-SSC*-Dotplot-Diagramm jeweils ein *Gate* über die entsprechende Leukozytensubpopulation gelegt und die Zahl der Ereignisse innerhalb der *Gates* bestimmt (Abb.2.2a). Die Anteile wurden wie folgt berechnet:

- PBL [%] = (PBL-Zahl * 100%) / Leukozyten_{Gesamt}
- PMNL [%] = (PMNL-Zahl * 100%) / Leukozyten_{Gesamt}
- Monozyten [%] = 100 % - PBL% - PMNL %

2.13.8 Klinische Untersuchungen

Die klinischen Untersuchungen seitens der betreuenden HNO-Ärzte umfaßten:

- Tumoreinteilung nach der TMN-Klassifikation
- Beurteilung des Allgemeinbefindens
- Bestimmung des Blutbildes und der Leberwerte
- begleitende Krankheiten (z.B. Infektionen)
- Komplikationen, die auf die Prüfmedikation zurückzuführen sein könnten (Leberwerte, Augeninnendruck, Kopfschmerzen, Verdauungsstörungen)

2.14 Statistik

Die Signifikanz der Ergebnisse der klinischen Studie wurde mit dem *Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test* überprüft, die Signifikanz der *in vitro* Versuche wurde mit dem *Kruskal-Wallis-Test* für unverbundene Wertereihen mit unterschiedlichem Stichprobenumfang überprüft (Sachs, 1992). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Diese nichtparametrischen Test wurden gewählt, da biologische und medizinische Phänomene selten der Gauß'schen Normalverteilung folgen. Die Meßwerte der Funktionsanalysen bzw. prozentualen Verteilungen der Leukozytensubpopulationen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung [Prozentpunkte] angegeben.

Korrelationsanalysen zum Vergleich des Europiumrelease-Assays mit der durchflußzytometrischen Methode wurden mit dem *Spearman-Rang Test* durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Bias, Version 6.0*.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der Methoden

3.1.1 Funktionsanalyse am Durchflußzytometer

Um die Wirkung der Testmedikationen auf die zytotoxischen Funktionen peripherer Lymphozyten *in vitro* mit einem vertretbaren Arbeitsaufwand zu bestimmen, wurde eine durchflußzytometrische Methode zur Bestimmung der Lymphozytenzytotoxizität etabliert und mit dem Europiumrelease-Assay verglichen.

Hierzu waren Vorversuche zur Toxizität, sowie zum Fluoreszenz- und Diffusionsverhaltens des ausgewählten Farbstoffs (DiO) notwendig.

Um zu dem Europiumrelease-Assay vergleichbare Ergebnisse zu erhalten mußte der Parameter Effektor-Targetzell-Inkubationszeit variiert werden.

3.1.1.1 Ermittlung der DiO-Konzentrationen für verschiedene Targetzelllinien, Toxizität des Farbstoffs

In dieser Versuchsreihe wurden die DiO-Konzentration für die Zelllinien *K562*, *Raji*, *A431* bestimmt, die bei einer hinreichend hohen Fluoreszenz (MFI ≥ 1000) mit einer noch vertretbaren Toxizität einhergehen.

In den Tabellen 3.1 und 3.2 sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihen für drei Targetzelllinien aufgeführt. Bei einer Konzentration von 25 μl einer gesättigten DiO-Färbelösung / ml Medium zeigten *Raji* und *A431* eine Erhöhung des Anteils defekter Zellen auf 12% bzw. 11%, der Anteil defekter *K562*-Zellen lag bei 6%.

Es ergab sich somit eine Konzentration von 20 μl DiO-Stammlösung pro ml Zellsuspension für die Färbung der Zelllinien *Raji* und *A431*; für die Targetzelllinie *K562*-Zellen 25 μl DiO / ml Zellsuspension.

Tabelle 3.1: Abhängigkeit der MFI (FL-1) der Targetzellen *K562*, *Raji*, *A431* von der DiO-Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

DIO Stamm- lösung [$\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium]	Kontrolle MFI	5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ MFI	10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ MFI	15 $\mu\text{l}/\text{ml}$ MFI	20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ MFI	25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ MFI
<i>K562</i>	22	56	110	255	504	1080
<i>Raji</i>	18	50	97	201	434	935
<i>A431</i>	30	49	112	250	547	1023

Tabelle 3.2: Abhängigkeit der Targetzell-Vitalität von der DiO-Konzentration.

Dargestellt ist der Anteil PI-positiver Zellen nach der Färbung [%]. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

DIO Stamm- lösung [$\mu\text{l} / \text{ml}$ Medium]	Kontrolle Defekte Zellen [%]	5 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Defekte Zellen [%]	10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Defekte Zellen [%]	15 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Defekte Zellen [%]	20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Defekte Zellen [%]	25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Defekte Zellen [%]
<i>K562</i>	0	2	3	3	6	6
<i>Raji</i>	0	3	6	8	9	12
<i>A431</i>	1	3	5	9	9	11

3.1.1.2 Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit

Der Einfluß der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit auf die spezifische Lyse wird in Abbildung 3.1 veranschaulicht, in der die Mittelwerte aus drei Versuchen dargestellt sind. Die Inkubationszeit betrug bei dem Europiumrelease-Assay 2,5h. Mit der durchfluß-zytometrischen Methode wurden vergleichbare Ergebnisse nach einer Inkubationszeit von 4h erzielt. Die Spontanlyse der Targetzellen fiel beim Europiumrelease-Assay mit durchschnittlich 33% deutlich höher aus, als bei dem FACS-Assay, dort betrug sie bei 4h Inkubationszeit im Mittel 5%.

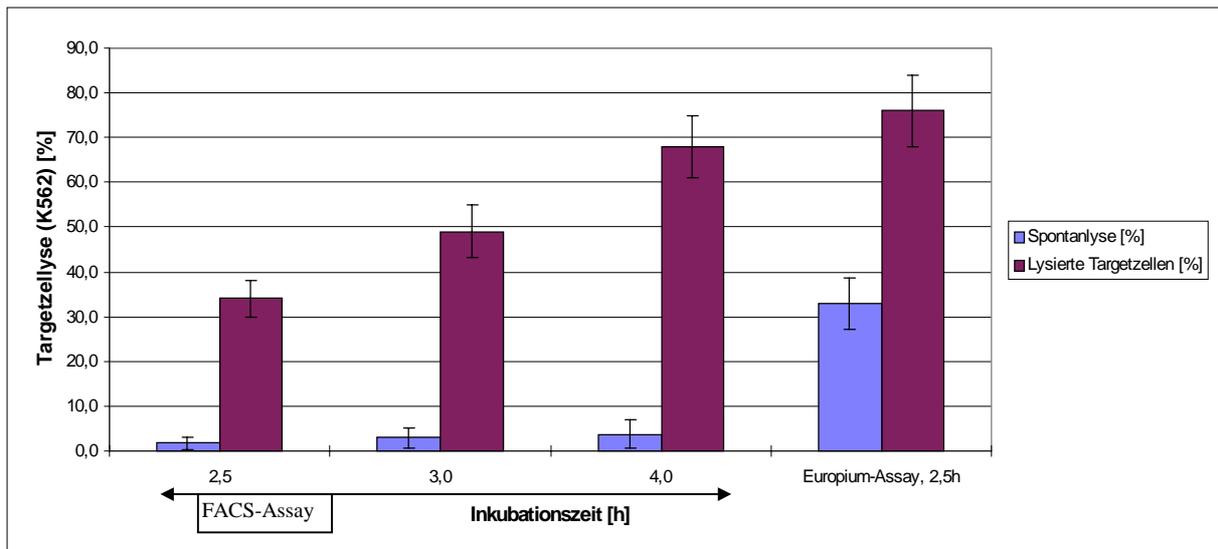


Abbildung 3.1: Spezifische Targetzellyse (K562) bei steigender Effektor-Targetzell-Inkubationszeit bei Verwendung des FACS-Assays; Vergleich mit dem Europiumrelease-Assay.

Auf der Abszisse ist die Effektor-Targetzell-Inkubationszeit [h], auf der Ordinate die spezifische Targetzellyse [%] aufgetragen. Dunkelgraue Säulen repräsentieren die spezifische Targetzellyse, die hellgrauen Säulen stehen für den Prozentsatz spontan lysierter Targetzellen. Die Inkubationszeiten für den FACS-Assay betragen 2,5h, 3h, 4h, beim Europiumrelease-Assay 2,5h. Die Effektor-Targetzellratio betrug 40:1. Gezeigt sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen, die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

3.1.1.3 Effektorzellfärbung durch DiO-Freisetzung aus zerstörten Targetzellen

Mit dem Experiment wurde überprüft, ob DiO aus defekten Targetzellen in das Medium diffundieren und die Effektorzellen anfärben kann. Dieser Vorgang würde die Diskriminierung zwischen Target- und Effektorzellen erschweren. Dazu wurden DiO-gefärbte Targetzellen durch Ultraschall lysiert und PBL für 4h mit den zerstörten Targetzellen inkubiert. Die MFI der K562-Targetzellen vor der Lysierung betrug 7450, die der Kontrollymphozyten zu Versuchsbeginn 11,9. Nach einer vierstündigen Inkubation stieg die Fluoreszenz der PBL auf einen Wert von 13,5 an (Abb. 3.2).

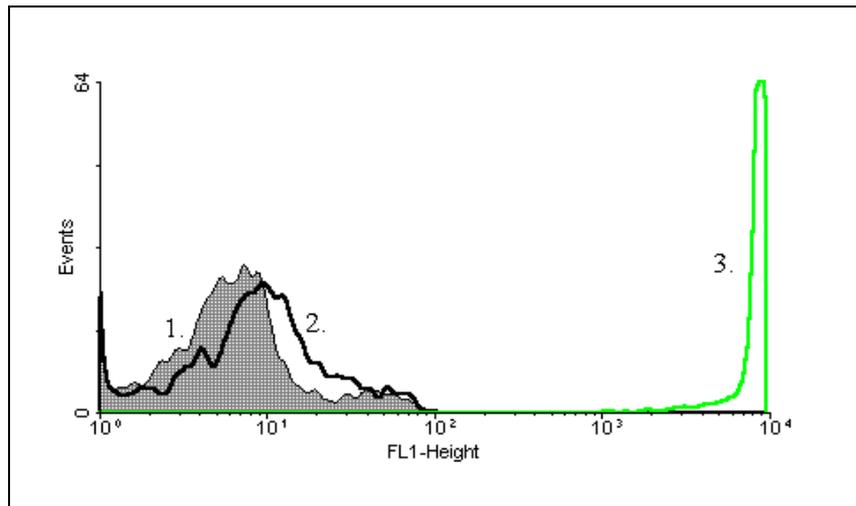


Abbildung 3.2: Effektorzellfärbung durch freigesetztes DiO aus zerstörten Targetzellen.

FL-1-Histogramm; Peak 1 (grau gefüllt) repräsentiert die Fluoreszenzverteilung der PBL zu Versuchsbeginn, Peak 2 (schwarze Linie) die der PBL nach 4h Inkubation mit dem Targetzellysat. In Peak 3 (graue Linie) sind die DiO-gefärbten K562-Zellen vor der Lysierung aufsummiert.

3.1.1.4 Vergleich der Methoden, Korrelationsanalysen

Der Methodenvergleich wurde simultan mit PBL aus 14 (K562) bzw. 11 (Raji) verschiedenen Blutproben durchgeführt.

Der Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigten für die Zelllinien K562 und Raji bei einer Effektor-Target-Ratio von 40:1 keine signifikanten Unterschiede (Europium vs. FACS: K562: $p = 0,62$; Raji: $p = 0,19$). Die Werte des Europiumrelease-Assays für die Zelllinie Raji lagen im Mittel über den Werten, die durchflußzytometrisch gemessen wurden. Für K562-Zellen wurde der Korrelationskoeffizient zu 0,91 (Korrelationsanalyse nach Spearman-Rang), für Targetzellen Raji zu 0,83 berechnet (Abb. 3.3 und 3.4).

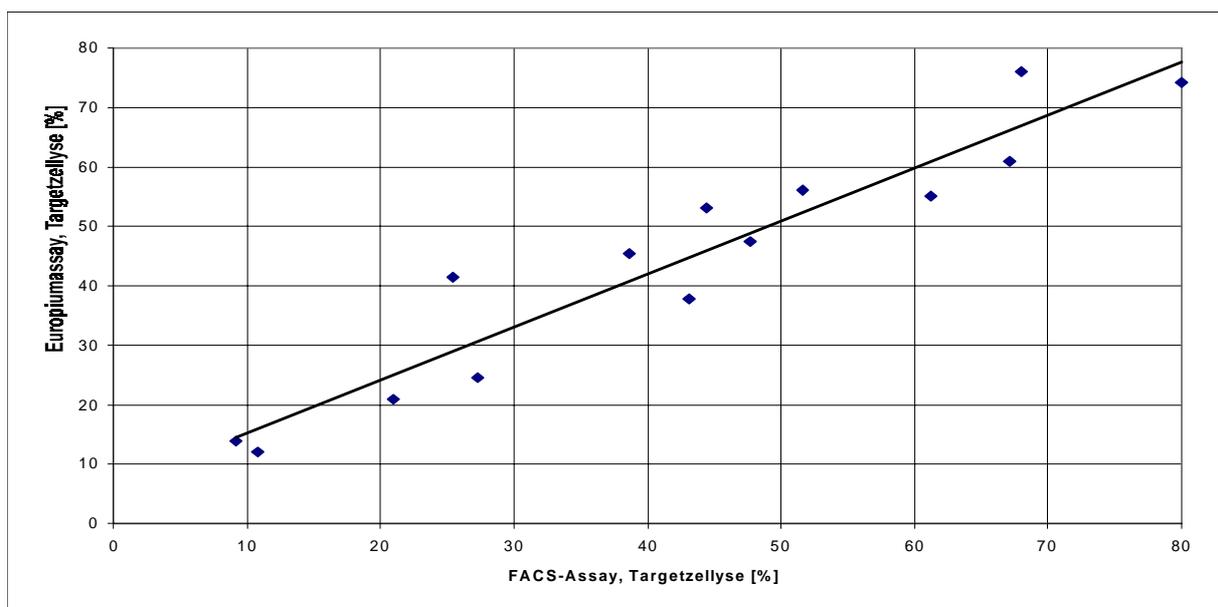


Abbildung 3.3: Korrelation des Europiumrelease-Assay mit der durchflußzytometrischen Methode für die Targetzelllinie K562. Auf der Abszisse ist die spezifische Targetzellyse [%] gemessen mit der FACS-Methode aufgetragen, auf der Ordinate die Targetzellyse [%], die mit dem Europiumrelease-Assay ermittelt wurde. Dargestellt sind die Werte aus 14 Vergleichsmessungen bei einer Effektor- Targetzellratio von 40 zu 1. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,91. Die Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant.

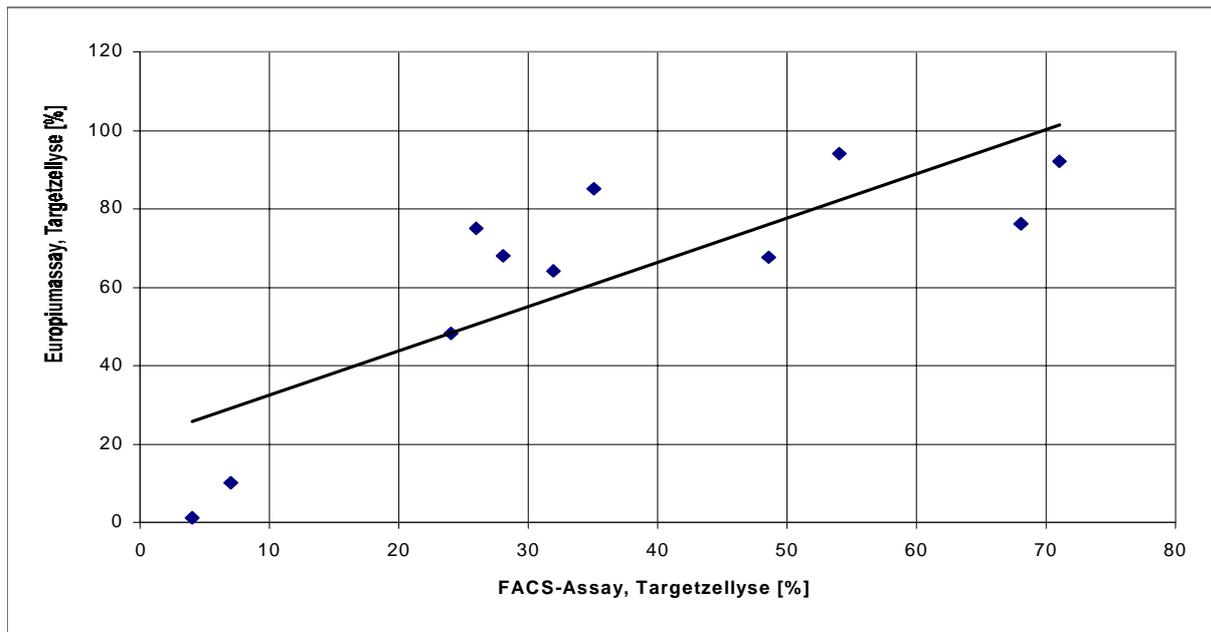


Abbildung 3.3: Korrelation des Europiumrelease-Assays mit der durchflußzytometrischen Methode für die Targetzelllinie *Raji*.

Auf der Abszisse ist die spezifische Targetzellyse [%] gemessen mit der FACS-Methode aufgetragen, auf der Ordinate die Targetzellyse [%], die mit dem Europiumrelease-Assay ermittelt wurde. Dargestellt sind die Werte von 11 Vergleichsmessungen bei einer Effektor-Targetzellratio von 40 zu 1. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,83. Die Ergebnisse beider Methoden unterscheiden sich nicht signifikant.

3.1.2 ADCC

Eine wichtige Funktion von NK-Zellen ist die Befähigung zur ADCC. Die durchflußzytometrische Bestimmung der ADCC basiert auf der Lyse DiO-gefärbter Targetzellen, die mit einem humanisierten Antikörper (*EMD72000*) gegen den Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFr) opsoniert worden sind (*A431_{EMD72}*). Mit dem murinen EGFr-Antikörper (*MAB425000*) markierte Targetzellen (*A431_{MAB425}*) dienen als Negativkontrolle. Die Fluoreszenzintensität und Vitalität DiO-markierter *A431*-Zellen sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführt.

Für die Etablierung der Methode wurden die Parameter DiO-Konzentration, Targetzell-opsonierung und Effektor-Targetzell-Inkubationszeit variiert.

3.1.2.1 Ermittlung der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit

Der Einfluß der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit und der Antikörperspezies auf die spezifische Targetzellyse wird in Tabelle 3.3 gezeigt, in der die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen dargestellt sind. Bei einer Inkubationszeit von 30 min zeigte sich eine zweifach erhöhte Targetzellyse (70,8%) für *A431_{EMD72}*, gegenüber den unmarkierten Kontrollen (33,9%) bzw. *A431_{MAB425}* (37,6%).

Mit steigender Inkubationszeit verringerte sich die Differenz der Targetzellyse un behandelter *A431* und *A431_{MAB425}* gegenüber *A431_{EMD72}*.

Tabelle 3.3: Abhängigkeit der spezifischen Lyse [%] IgG-opsonierter A431-Targetzellen von der Antikörperspezies (humanisierter bzw. muriner Antikörper) und der Effektor-Targetzell-Inkubationszeit. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen. Die Konzentration der Antikörper bei der Opsonierung betrug jeweils $1 \mu\text{g}$ Antikörper / 5×10^5 Zellen / ml. Die Effektor-Targetzellratio betrug 10 : 1. A431: nicht-opsonierte Targetzellen; $A431_{EMD72}$: mit EMD72000 opsonierte A431-Zellen; $A431_{MAB425}$: mit MAB425000 opsonierte A431-Zellen.

Inkubationszeit	A431 defekte Zellen [%]	$A431_{EMD72}$ defekte Zellen [%]	$A431_{MAB425}$ defekte Zellen [%]
30 min	33,9	70,8	37,6
60 min	56,4	78,0	54,6
120 min	58,2	82,3	63,0

3.1.2.2 Targetzellopsonierung, Ermittlung der geeigneten Antikörperkonzentration

Die geeignete Antikörperkonzentration für eine effektive Targetzellopsonierung wurde in einer Versuchsreihe ermittelt, bei der A431-Zellen mit steigender Antikörperbeladung als Targetzellen eingesetzt wurden. Die Antikörper-Konzentrationen sind in [μg EMD72000 / ml / 5×10^5 A431] angegeben.

Nach einer Effektor-Targetzell-Inkubationszeit von 30 min zeigte sich eine Zunahme der Targetzellyse bei Targetzellen, die mit einer Antikörperkonzentration von $0,1 \mu\text{g}$ markiert wurden (51,7%), gegenüber den unmarkierten Kontrollen (35,2%). Mit steigender Antikörperbeladung erhöht sich die Targetzellyse (60 % bei $1 \mu\text{g}$), ab einer Konzentration von $4 \mu\text{g}$ (64,0%) konnte nur eine unwesentliche Steigerung der Targetzellyse verzeichnet werden (64,7% bei $8 \mu\text{g}$). Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden bei weiteren Versuchen die A431-Zellen einheitlich mit einer Antikörperkonzentration von $1 \mu\text{g}/\text{ml}/5 \times 10^5$ Zellen opsoniert.

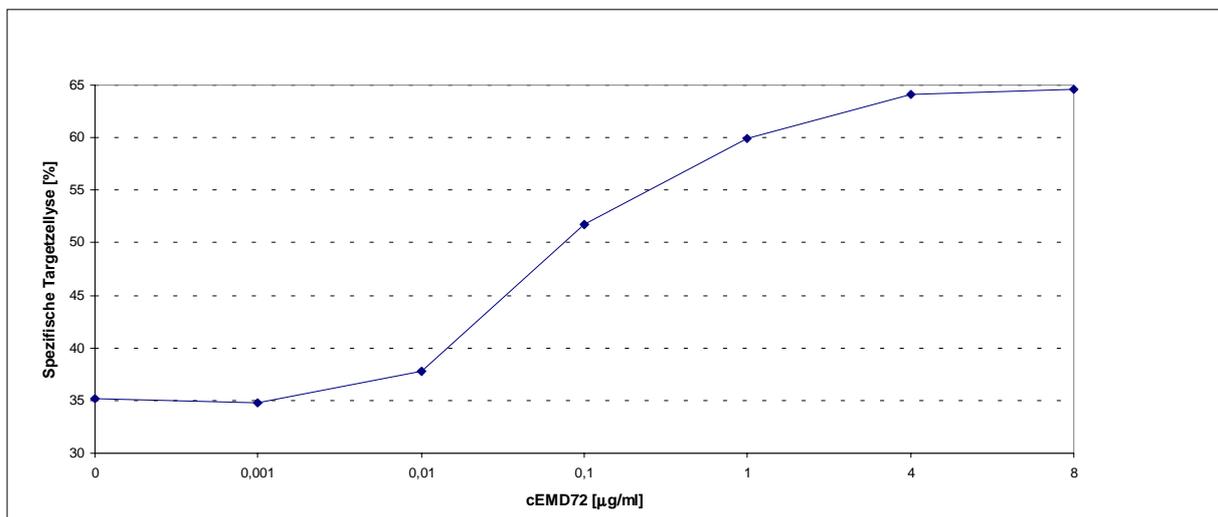


Abbildung 3.4: Spezifische Targetzellyse [%] von A431-Zellen in Abhängigkeit von der Beladung mit EMD72000-Antikörpern.

Auf der Abszisse ist die Konzentration der Antikörper [μg / ml / 5×10^5 Zellen] aufgetragen, mit der die Targetzellen vorinkubiert wurden. Auf der Ordinate ist die spezifische Targetzellyse [%] aufgetragen. Die Effektor-Targetzellratio betrug 10 : 1, die Effektor-Targetzell-Inkubationszeit 30 min. Die gezeigten Resultate sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

3.1.2.3 Spezifität des Testsystems für ADCC durch NK-Zellen

PMNL sind über den CD16-Rezeptor, der an IgG-Antikörper bindet, zur Zerstörung von Targetzellen befähigt.

Das nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll gewonnene Leukozytenkonzentrat enthält neben PBL und Monozyten einen geringen Prozentsatz (ca. 5%) PMNL. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um den Anteil der PMNL an der Lyse IgG-opsonierter Targetzellen zu ermitteln.

Es konnte gezeigt werden, daß die Lyse der IgG-markierten Targetzellen (*A431_{EMD72000}*) mit steigendem PMNL-Anteil abnimmt. Die Targetzellyse lag im Schnitt bei einem PBL : PMNL - Verhältnis von ca. 4 : 1 bei 53%. War das Verhältnis PBL : PMNL = 1 : 1, so wurden 12% der Targetzellen lysiert (Abb. 3.5).

Es scheint, daß sich die spezifische Targetzellyse proportional zum Anteil der Lymphozyten im Effektorzellgemisch verhält.

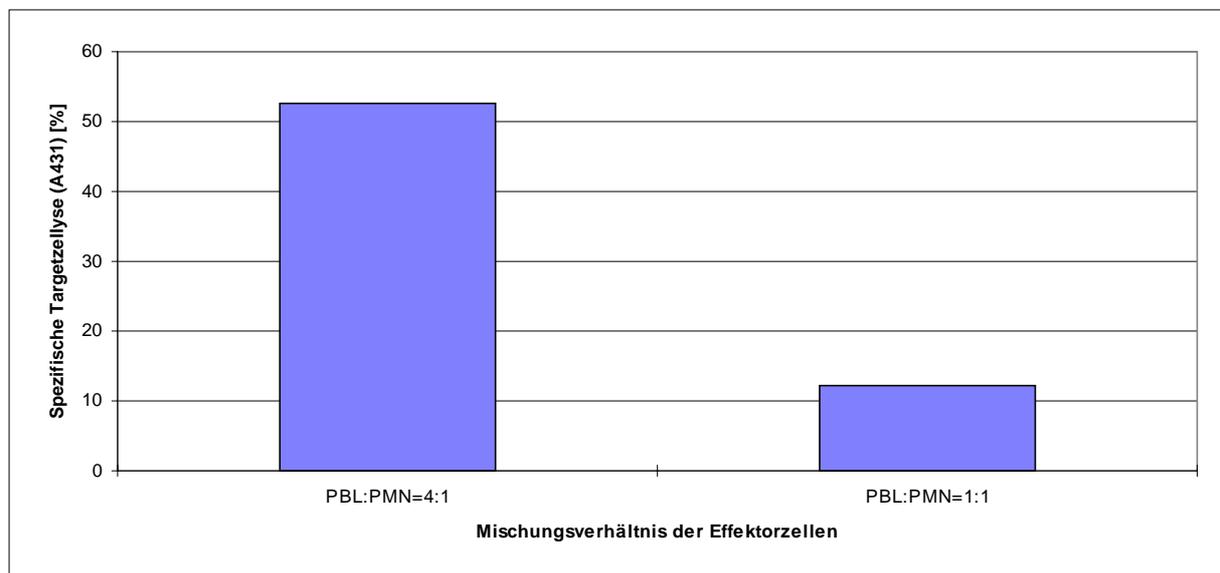


Abbildung 3.5: Spezifische Targetzellyse [%] von *A431_{EMD72}* bei unterschiedlichen PBL/ PMNL-Verhältnissen. Auf der Abszisse ist das Verhältnis von PBL zu PMNL im Versuchsansatz aufgetragen, auf der Ordinate die spezifische Targetzellyse [%].

Die linke Säule steht für die mittlere Targetzellyse bei einem PBL : PMNL-Verhältnis von 4:1. Die rechte Säule zeigt die mittlere Targetzellyse bei einem Verhältnis PBL : PMNL = 1:1. Die Effektor-Targetzellratio betrug 10 : 1, die Effektor-Targetzell-Inkubationzeit 30 min. Die gezeigten Resultate sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen. PBL und PMNL stammten jeweils von einem Spender, die Leukozytenisolierung erfolgte am jeweiligen Vortag, es erfolgte keine Vorstimulierung mit IL-2.

3.1.2.4 Statistische Untersuchungen zur ADCC

In die statistischen Untersuchungen flossen die Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten ein. Hierzu wurde der ADCC-Assay mit unstimulierten bzw. mit IL-2 [200 units/ml] stimulierten PBL als Effektorzellen durchgeführt. Diese sind zu *A431*-Targetzellen gegeben worden, die zuvor entweder mit dem humanisierten IgG *EMD72000* (*A431_{EMD72}*) oder dem murinen Antikörper *MAB425000* (*A431_{MAB425}*) opsoniert worden sind.

Die mittlere Lyse von *A431_{EMD72}* durch unstimulierte PBL betrug 34,1%, von *A431_{MAB425}* 7,8%. Dieser Unterschied konnte statistisch abgesichert werden ($p < 0,01$). Ebenfalls signifikant unterschiedlich war die Lyse von *A431_{EMD72}* (50,2%) von der *A431_{MAB425}*-Lyse (22,7%) durch IL-2-stimulierte NK-Zellen ($p < 0,05$) (Tab. 3.4).

Parallel zur ADCC wurde die NK-Zellaktivität gemessen. Die ADCC korreliert mit der NK-Zellaktivität (Korrelationsanalyse nach Spearman-Rang) mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,5.

Tabelle 3.4: Spezifische Targetzelyse in Abhängigkeit von Antikörperspezies und der Effektorzellstimulation. Angeben sind Mittelwert und Standardabweichung aus 6 unabhängigen Versuchen. Die Konzentration der Antikörper bei der Opsonierung betrug jeweils 1 µg Antikörper / 5×10^5 Zellen / ml. Die Effektor-Targetzellratio betrug 10 : 1. *A431*_{EMD72}: mit *EMD72000* opsonierte *A431*-Zellen; *A431*_{MAB425}: mit *MAB425000* opsonierte *A431*-Zellen; NK: native NK-Zellen; NK-LAK: IL-2-stimulierte NK-Zellen
**** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; ↑ = Mittelwert der spezifischen Targetzelyse ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); ↓ = Wert ist niedriger.

ADCC, n=6	<i>A431</i> _{MAB425} + NK defekte Zellen [%]	<i>A431</i> _{EMD72} + NK defekte Zellen [%]	<i>A431</i> _{MAB425} +NK-LAK defekte Zellen [%]	<i>A431</i> _{EMD72} +NK-LAK defekte Zellen [%]
Mittelwert ± Standardabweichung	7,8 ± 3,6	34,1 ± 11,0	22,7 ± 8,5	50,2 ± 14,3
Statistik	<i>A431</i> _{EMD425} vs.	<i>A431</i> _{MAB72} vs.	<i>A431</i> _{EMD425} +IL-2 vs	<i>A431</i> _{MAB72} +IL-2 vs.
<i>A431</i> _{EMD425} + NK				
<i>A431</i> _{MAB72} +NK	** ↑			
<i>A431</i> _{EMD425} + NK-LAK	p=0,06; n.s.	n.s.		
<i>A431</i> _{MAB72} + NK-LAK	**** ↑	n.s.	* ↑	

3.1.3 Phagozytostest

Die Bestimmung der Phagozytoserate polymorphkerniger Leukozyten (PMNL) erforderte die Einstellung der Parameter Bakterienfärbung, Phagozytosedauer und PMNL - *E.coli*-Verhältnis.

Damit auf der PMNL-Oberfläche adhärierende Bakterien nicht als phagozytierte Bakterien gewertet werden, muß die Fluoreszenz der adhärenenten Bakterien ausgelöscht werden. Hierzu wurde die Eignung von Trypanblau als Quencherfarbstoff untersucht und der Test mit einem kommerziellen Testsystem verglichen.

3.1.3.1 Färbung der Bakterien, Ermittlung der optimalen DiO-Konzentration

Um eine eindeutige Trennung phagozytischer von nicht phagozytischer PMNL zu erreichen, müssen die phagozytierten Partikel, d.h. die Bakterien, eine intensive Fluoreszenz tragen.

Die Bakterien wurden in DMEM mit aufsteigenden DiO-Konzentrationen (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl gesättigter DiO-Färbelösung / ml Bakteriensuspension [1×10^9 *E.coli*]) jeweils 15 min gefärbt. Die Intensität der Färbung wurde durchflußzytometrisch bestimmt.

Eine Farbstoffkonzentration von 40 µl DiO / ml ergab gegenüber 30 µl DiO / ml nur eine geringfügige Steigerung der MFI der Bakterien (Tab. 3.4). Um möglicherweise schädliche Einflüsse der Lösungsmittel (Ethanol und DMSO) so gering wie möglich zu halten, wurden die Bakterien für die folgenden Versuche mit 30 µl DiO / ml / 1×10^9 *E.coli* fluoreszenzmarkiert.

Tabelle 3.5: Abhängigkeit der FL-1-Fluoreszenzintensität der Bakterien (*E.coli*, Strain *K12*) von der DiO-Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte der MFI aus zwei Bestimmungen.

DIO-Stammlösung [µl/ml Medium]	Kontrolle	10 µl/ml	20 µl/ml	30 µl/ml	40 µl/ml
MFI der <i>E.coli</i>	5,3	2100	4525	7410	7900

3.1.3.2 Optimierung der Phagozytosedauer

Um eine geeignete Phagozytosedauer zu ermitteln, wurde eine PMNL-*E.coli*-Suspension im Verhältnis 1:50 für 2,5 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min und 40 min bei 37°C inkubiert.

Aus Graphik 3.6 geht hervor, daß der Anteil der phagozytierenden PMNL innerhalb der ersten 10 Minuten eine Plateauphase (von 75% auf 97%) erreichte, nach 40 minütiger Inkubationszeit nähert sich dieser Wert einem Maximalwert von 99% an.

Die MFI pro Granulozyt (Maß für die Anzahl aufgenommener Bakterien) stieg nach einer Lagphase (2,5 bis 5 min) im weiteren Versuchsverlauf linear an. Die lineare Phase endete nach dreißigminütiger Inkubationszeit; die Fluoreszenzzunahme innerhalb des Zeitraums von 30 min bis 40 min nach Inkubationsbeginn fiel deutlich geringer aus. Anhand dieser Resultate wurde für die weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 12 min festgelegt.

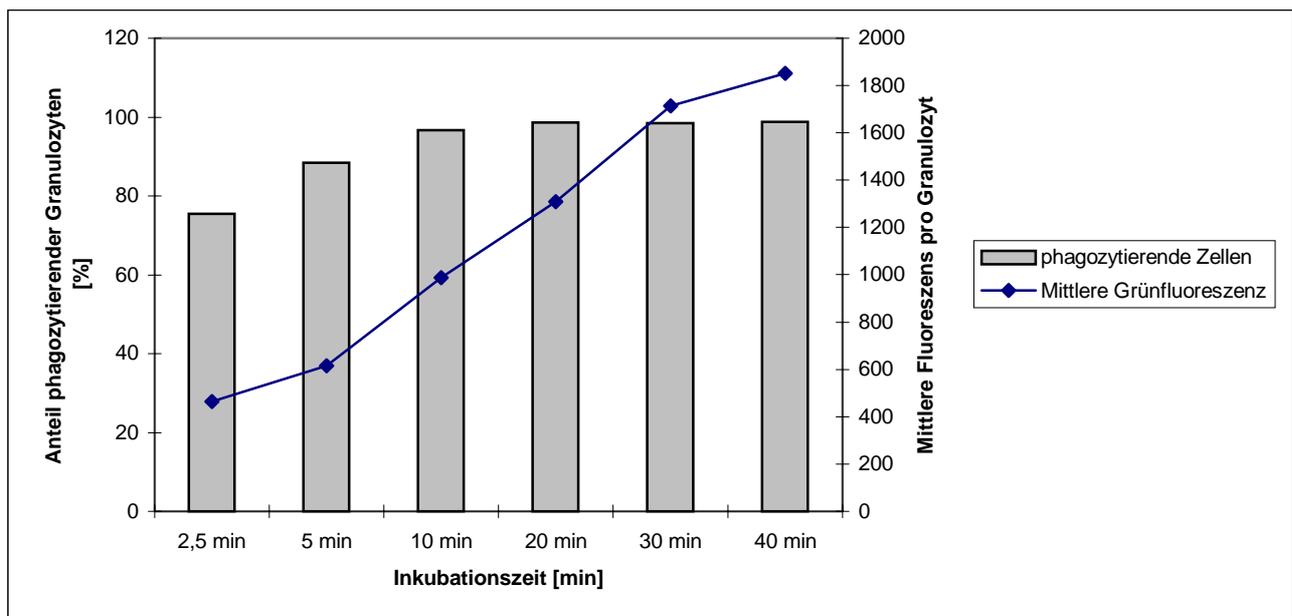


Abbildung 3.6: Einfluß der Inkubationszeit auf den Anteil phagozytierender Granulozyten und die Menge phagozytierter Bakterien. Auf der Abszisse ist die Inkubationszeit [min] aufgetragen, auf der 1. Ordinate (links) der Anteil der phagozytierenden PMNL (graue Säulen), auf der 2. Ordinate (rechts) die mittlere Fluoreszenz pro Granulozyt (Linie). Das Bakterien - Leukozytenverhältnis betrug 50 : 1. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen an Vollblutproben gesunder Probanden..

3.1.3.3 Optimierung des Leukozyten-*E.coli*-Ratio

Hierzu wurde der Phagozytostest nach dem oben beschriebenen Protokoll mit variierender Leukozyten : Bakterienratio und gleichbleibender Inkubationsdauer (12 min) durchgeführt. Die Granulozyten - Bakterienverhältnisse betragen 1 : 50, 1 : 25, 1 : 12,5, 1 : 6,25, 1 : 3,125.

Wie in Graphik 3.7 zu sehen ist, nahm der Anteil phagozytierender Granulozyten (21% bei 1:3,125) sowie die MFI/PMNL (95) mit steigender Bakterienkonzentration kontinuierlich zu.

Bei einem Verhältnis von 1:50 betrug der Anteil phagozytischer PMNL 95%, die MFI pro Zelle 402.

Von den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ausgehend, wurde bei den weiteren Experimenten ein Granulozyten-/ *E.coli*- Verhältnis von 1 : 50 gewählt.

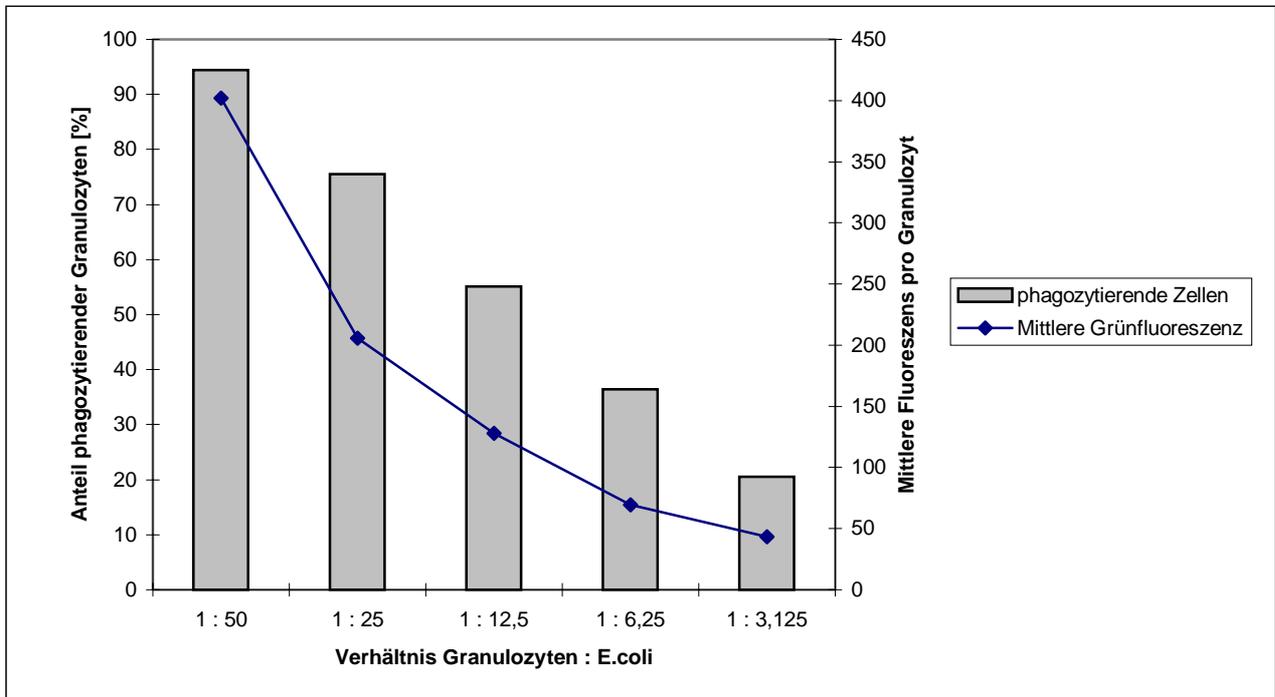


Abbildung 3.7: Einfluß des Granulozyten-*E.coli*-Verhältnisses auf die Phagozytoserate von Granulozyten. Auf der Abszisse ist das Granulozyten-Bakterien-Verhältnis aufgetragen, auf der 1. Ordinate (links) der Anteil der phagozytischen Zellen (graue Säulen), auf der 2. Ordinate (rechts) die MFI pro Granulozyt (Linie). Die Phagozytosedauer betrug jeweils 12 min. Die Vollblutproben stammten von 2 gesunden Probanden. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

3.1.3.4 Vergleich mit kommerziellem Phagozytostest

In dieser Versuchsreihe wurde unser Protokoll mit Trypanblau [50 µg/ml] als Quenchlösung mit dem kommerziellen *Phagotest* (Fa. Orpegen, Heidelberg) verglichen. Es zeigte sich, daß bei der Verwendung von Trypanblau gegenüber dem kommerziellen Produkt vergleichbare Ergebnisse gemessen werden konnten. Ohne Gebrauch einer Quenchlösung zeigte sich eine deutliche Erhöhung des Anteils positiver Zellen beim Testwert und der Negativkontrolle aufgrund der nicht gelöschten Fluoreszenz adhärenter Bakterien auf den Leukozyten (Tab. 3.6).

Tabelle 3.6: Vergleich zwischen einem kommerziellen und dem selbstentwickelten Phagozytoseassay. Anteil positiver, d.h. phagozytischer Granulozyten [%] in Abhängigkeit von der Zugabe einer Quenchlösung. Die Phagozytosedauer betrug 15 min (Orpegen) bzw. 12 min, das Bakterien-Leukozyten-Verhältnis war 50:1. Für den kommerziellen Test wurden FITC-markierte *E.coli*, bei dem eigenen Test DiO-gefärbte *E.coli* eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

Anteil der phagozytischen PMNL [%]	Orpegen Phagotest	Eigener Test: Trypanblau	Eigener Test: keine Quenchlösung
Testwert (37°C)	55	53	66
Negativkontrolle (4°C)	1	1	5

3.2 Vorversuche

3.2.1 Enzymaktivitäten in DMEM und DMEM + FCS im zeitlichen Verlauf

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, wie sich die Aktivität der Enzymmischung im zeitlichen Verlauf im Kulturmedium mit bzw. ohne FCS-Zusatz verändert.

Gegenüber den Enzymaktivitäten in DMEM zeigte sich, daß FCS die Aktivität der untersuchten Enzyme schnell hemmte. Die Hemmung betrug unmittelbar nach Zugabe der Enzyme in das jeweilige Medium bei Trypsin 57%, bei Chymotrypsin 72% und bei Papain 46%. Die Enzymaktivitäten fielen bei FCS-haltigen Medium nach 24h fast bis zur Nachweisgrenze ab und lagen auf dem Niveau der 48h-Werte.

Der Aktivitätsverlust der Enzyme in DMEM fiel deutlich geringer aus, nach 48h betrug die Trypsinaktivität 62%, die Chymotrypsinaktivität 27% und die Papainaktivität 14% des Ausgangswertes.

Tabelle 3.7: Änderung der Aktivitäten von Trypsin, Chymotrypsin und Papain in Zellkulturmedium im zeitlichen Verlauf, Einfluß des FCS-Anteils.

Es wurden 100 µg/ml der Enzymmischung in DMEM bzw. in DMEM + 10% FCS gelöst. Die Aktivitäten der Einzelkomponenten wurden sofort, nach 24h bei 37°C und nach 48h bei 37°C gemessen. Die Werte sind in units angegeben, die wie folgt definiert sind: Chymotrypsin: 1 unit = Hydrolyse von 1 µmol BTEE/min bei 25°C und pH 7,8; Trypsin: 1 unit = Hydrolyse von 1 µmol TAME/min bei 25°C und pH 8,1; Papain: 1 unit = Hydrolyse von 1 µmol BAEE/min bei 25°C und pH 6,2. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen.

	0 h	24 h	48 h
Trypsinaktivität in DMEM	91,8	72,7	56,8
Trypsinaktivität in DMEM +FCS	39,0	2,9	0,9
Chymotrypsinaktivität in DMEM	50,3	24,9	13,7
Chymotrypsinaktivität in DMEM + FCS	14,0	1,6	2,0
Papainaktivität in DMEM	46	10	5
Papainaktivität in DMEM +FCS	25	2	0

Vergleichsmessungen ergaben, daß das Chymotrypsinsubstrat BTEE in geringem Umfang auch durch Trypsin umgesetzt wurde. Bei der Untersuchung der Enzymmischung betrug der Anteil des Trypsins an der Chymotrypsinaktivität ca. 5%. Eine Beeinflussung des Substrats BTEE durch Papain konnte nicht beobachtet werden. TAME (Trypsinsubstrat) wurde nicht von Chymotrypsin und Papain, BAEE (Papainsubstrat) nicht von Trypsin und Chymotrypsin umgesetzt.

Für diese Untersuchungen wurden die Einzelsubstanzen, ihrem Anteil in der Enzymmischung entsprechend, in den Aktivitätsassays der jeweils anderen Enzyme eingesetzt (z.B. Trypsin wurde auf Chymotrypsin- und Papainaktivität überprüft).

3.2.2 Bestimmung der toxischen Enzymkonzentration für PBL

Hierzu wurden PBL für 30 Minuten mit steigenden Enzymkonzentrationen in DMEM, bzw. in DMEM + 10% FCS inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, daß in DMEM ab Konzentrationen $> 320 \mu\text{g/ml}$ der Anteil geschädigter Lymphozyten zunahm. Wurde dem Medium FCS (10% v/v) zugefügt, so konnte eine Zunahme des Anteils defekter PBL über das normale Niveau hinaus (ca. 1-2%) auch bei der höchsten Konzentrationsstufe (640 $\mu\text{g/ml}$) nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.8).

Für die weiteren Untersuchungen zur Enzymwirkung auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten wurden aufgrund dieser Ergebnisse ein Bereich von 40 - 320 $\mu\text{g/ml}$ gewählt. Unter Voraussetzung der in der Literatur beschriebenen Resorptionsraten (durchschnittlich 20%, Seiffert et al, 1979) und der täglich oral zugeführten Enzymmenge (3 x 720 mg Enzyme/d) könnte bei Menschen eine Enzymkonzentration im Serum von 20 - 40 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden.

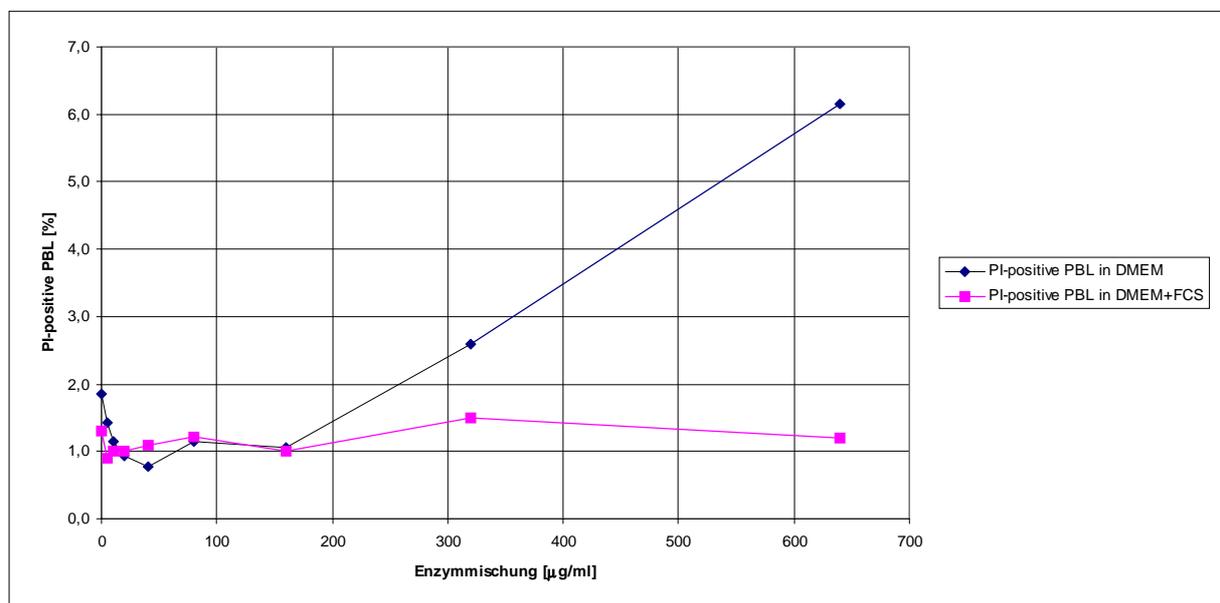


Abbildung 3.8: Bestimmung der toxischen Enzymkonzentration für PBL in DMEM bzw. DMEM+FCS.

Auf der Abszisse ist die Konzentration der Enzymmischung in $\mu\text{g/ml}$, auf der Ordinate der Anteil der defekten Zellen in Prozent aufgetragen.

Die PBL wurden 30 Minuten in DMEM, bzw. DMEM + 10% FCS mit der Enzymmischung in den Konzentrationen 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Nach Zugabe von Prodigiumjodid (PI) wurde der Anteil der defekten Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.

3.3 Einfluß der Enzymmischung auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro*

3.3.1 Wirkung einer einmaligen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten *in vitro*

In dieser Versuchreihe wurde die Wirkung einer einmaligen Zugabe der Enzymmischung auf die zellzytotoxische Aktivität sowohl nativer als auch IL-2-stimulierter PBL untersucht.

Zu den Kulturen wurde die Enzymmischung in den Konzentrationen 40, 80, 160, 320 µg/ml zugegeben. Die Messung erfolgte 24h später.

Die Aktivität peripherer Lymphozyten unterlag individuellen, spenderspezifischen Unterschieden. Die Aktivität nativer NK-Zellen der 10 untersuchten Blutproben überspannte einen Bereich von 35% bis 65% spezifischer Targetzellyse. Proben, die eine NK-Zellaktivität < 30% und eine LAK-Aktivität < 4% aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt.

Um den statistischen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen, wurden die Kontrollwerte gleich 100% gesetzt. Es wurden somit die prozentualen Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten verglichen.

In Tabelle 3.8 sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßwerte aufgeführt, ebenso die prozentualen Veränderungen gegenüber den Kontrollen. Tabelle 3.9 enthält die statistische Analyse der Änderungsraten.

Tabelle 3.8: Wirkung einer einmaligen Enzymzugabe auf die lytische Aktivitäten von PBL *in vitro*.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt, in der unteren Hälfte die prozentuale Veränderung ± Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%). Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 10 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Angabe: Mittelwert ± Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Messwerte	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
Kontrolle, n=10	50 ± 14	64 ± 19	2 ± 2	10 ± 8
40 µg/ml, n=10	56 ± 19	69 ± 18	2 ± 2	11 ± 7
80 µg/ml, n=10	64 ± 13	75 ± 12	3 ± 3	11 ± 7
160 µg/ml, n=10	38 ± 26	57 ± 20	2 ± 3	12 ± 11
320 µg/ml, n=10	29 ± 25	54 ± 30	5 ± 4	16 ± 12
Meßwerte, bezogen auf 100%	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
Kontrolle, n=10	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
40 mg/ml, n=10	110 ± 30	109 ± 9	81 ± 75	134 ± 48
80 mg/ml, n=10	128 ± 17	124 ± 22	190 ± 223	139 ± 90
160 mg/ml, n=10	79 ± 48	97 ± 35	74 ± 73	184 ± 112
320 mg/ml, n=10	53 ± 38	67 ± 57	180 ± 155	296 ± 384

Statistisch signifikant ($p < 0,005$) war die prozentuale Zunahme der NK-Zellaktivität um 28% gegenüber dem Ausgangswert nach 24 stündiger Inkubation mit 80 µg Enzym/ml. Nach einer Gabe von 320 µg/ml war ein statistisch signifikanter Abfall auf 53% der Ausgangsaktivität zu verzeichnen ($p < 0,01$).

Der Anstieg der NK-LAK-Aktivität nach Zugabe von 40 bzw. 80 µg/ml Enzym war signifikant ($p < 0,005$) gegenüber den Ausgangswerten. Höhere Enzymkonzentrationen (160 µg bzw. 320 µg/ml) bewirkten einen signifikanten Rückgang der NK-LAK-Aktivität gegenüber den NK-LAK-Zellen, die mit 40 bzw. 80 µg Enzym/ml behandelt wurden. Es war

zu beobachten, daß die Streuung der Meßwerte ab einer Konzentration von 160 µg/ml stark zunahm.

Die CTL-Aktivität lag ohne vorherige IL-2 Stimulierung bei ca. 2%, bei einer Enzymkonzentration von 320 µg/ml war ein signifikanter Aktivitätsanstieg auf 5% zu verzeichnen.

Die Zunahme der LAK-Aktivität mit steigender Enzymkonzentration (von 10% auf 16% bei 320 µg/ml) war statistisch nicht abzuschließen.

Tabelle 3.9: Signifikanzüberprüfung; Vergleich der prozentualen Veränderungen gegenüber den Kontrollen (=100 %).

Die prozentualen Veränderungen gegenüber den Ausgangswerten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanz überprüft. *** = p<0,005; ** = p<0,01; * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = ↑; Wert ist niedriger = ↓

Kontrolle vs.	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
40 µg/ml, n=10	n.s.	** ↑	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=10	*** ↑	*** ↑	* ↑	n.s.
160 µg/ml, n=10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
320 µg/ml, n=10	** ↓	n.s.	** ↑	n.s.
40 µg/ml, n=10 vs.	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
80 µg/ml, n=10	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.
160 µg/ml, n=10	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
320 µg/ml, n=10	n.s.	* ↓	* ↑	n.s.
80 µg/ml, n=10 vs.	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
160 µg/ml, n=10	n.s.	* ↓	* ↓	n.s.
320 µg/ml, n=10	*** ↓	* ↓	n.s.	n.s.
160 µg/ml, n=10 vs.	NK-Aktivität	NK-LAK-Aktivität	CTL-Aktivität	LAK-Aktivität
320 µg/ml, n=10	n.s.	n.s.	** ↑	n.s.

3.3.2 Wirkung einer täglichen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten *in vitro*

Während einer Enzymtherapie nehmen Patienten das Enzympräparat 3 x täglich ein, um einen konstanten Spiegel enzymatischer Aktivität zu gewährleisten. In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß einer kontinuierlichen, d.h. täglichen enzymatischen Stimulierung auf die Funktionen von PBL untersucht. Zusätzlich zu den Kontrollen wurden Ansätze mit inaktiviertem Enzymgemisch [80 µg/ml] inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch 24 stündige Inkubation bei 37°C in DMEM + 10% FCS. Den PBL-Kulturen wurden täglich über einen fünftägigen Zeitraum die Enzymmischung in den Konzentration von 40, 80, 160 µg/ml, bzw. die inaktivierte Enzymmischung zugegeben.

3.3.2.1 NK-Zellaktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer täglichen Enzymgabe auf die NK-Zellaktivität sind in den Tabellen 3.10 und 3.11 zusammengefaßt.

Tabelle 3.10: Wirkung einer täglichen Enzymzugabe auf die NK-Zellaktivität über 5 Tage *in vitro*.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt, in der unteren Hälfte die prozentuale Veränderung ± Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%). Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt. Angabe: Mittelwert ± Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	60 ± 8	59 ± 7	54 ± 7	43 ± 3	35 ± 3
40 µg/ml, n=5	62 ± 16	62 ± 17	49 ± 21	33 ± 15	9 ± 4
80 µg/ml, n=5	62 ± 18	64 ± 15	24 ± 6	4 ± 2	0 ± 1
160 µg/ml, n=5	61 ± 25	7 ± 2	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	62 ± 4	67 ± 4	62 ± 5	39 ± 3	25 ± 1
Meßwerte, bezogen auf 100%	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	100	98 ± 2	90 ± 5	72 ± 6	59 ± 13
40 µg/ml, n=5	101 ± 18	100 ± 19	77 ± 31	53 ± 22	15 ± 7
80 µg/ml, n=5	103 ± 14	109 ± 6	47 ± 25	6 ± 2	1 ± 2
160 µg/ml, n=5	94 ± 40	11 ± 3	3 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	97 ± 6	104 ± 4	96 ± 6	61 ± 4	38 ± 1

Tabelle 3.11: Signifikanzüberprüfung. NK-Zellaktivität: Vergleich der prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (=100 %).

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich der Änderungsraten gegenüber der Kontrolle, auf den jeweiligen Testtag bezogen, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Veränderungen innerhalb einer Konzentrationstufe mit dem jeweiligen 24h-Wert verglichen. **** = p<0,0001; *** = p<0,005; ** = p<0,01; * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt)=↑; Wert ist niedriger=↓

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* ↓
80 µg/ml, n=5	n.s.	* ↑	* ↓	** ↓	** ↓
160 µg/ml, n=5	* ↑	n.s.	** ↓	*** ↓	*** ↓
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	** ↓	n.s.
96 h	*** ↓	*** ↓	*** ↓	*** ↓	n.s.
120 h	**** ↓	**** ↓	**** ↓	**** ↓	* ↓

Über den fünftägigen Beobachtungszeitraum ging die lytische Aktivität der Kontrollen um 41% auf 59% des Ausgangswertes zurück. Ab dem vierten Tag war Änderungsrate gegenüber Tag 1 statistisch absicherbar (96h: p<0,001; 120h: p<0,0001).

Die Reduzierung der lytischen Zellaktivität wurde durch tägliche Enzymzugabe verstärkt. Mit steigender Enzymkonzentration war die Aktivitätsabnahme ausgeprägter.

Nach 24 Stunden lagen die NK-Zellaktivitäten sämtlicher Konzentrationsstufen auf dem Niveau der Kontrollen (ca. 60% K562-Lyse).

Wurde den Zellen täglich 40 µg/ml Enzym zugegeben, so war nach 24h und 48h keine Abnahme, an den beiden folgenden Meßtagen (72h, 96h) ein Rückgang der NK-Zellaktivität von 62% auf 35% zu verzeichnen. Nach 96h sank die NK-Aktivität auf 53% (p<0,01), nach 120h auf 14% des Ausgangswertes ab (p<0,001).

Die tägliche Zugabe von 80 µg Enzym/ml bewirkte einen leichten Anstieg der NK-Aktivität nach 48h. Die prozentuale Zunahme um 9% ist im Vergleich zur 48h-Kontrolle statistisch signifikant ($p < 0,05$). Die prozentuale Abnahme der NK-Zellaktivität gegenüber den Kontrollen bei 72h ($p < 0,05$), 96h und 120h war ebenfalls signifikant ($p < 0,01$). Die prozentuale Abnahme gegenüber dem Ausgangswert betrug nach 72h 53%, nach 96h 94% ($p < 0,005$) und nach 120h 99% ($p < 0,0001$).

Die Inkubation mit 160 µg Enzym/ml/d bewirkte am ersten Tag keine Änderung der NK-Aktivität. Bei den Messungen an den beiden darauffolgenden Tagen (48h, 72h) konnte eine steile Abnahme der Aktivität um 97% verzeichnet werden ($p < 0,01$). Im weiteren Verlauf (96h, 120h) war bei dieser Konzentrationsstufe keine zellytische Aktivität, jedoch ein starker Rückgang der Zellzahlen zu beobachten. Der Aktivitätsrückgang war sowohl gegenüber den täglichen Kontrollen, als auch dem 24h-Ausgangswert statistisch absicherbar.

PBL, die mit dem hitzeinaktivierten Enzym behandelt wurden, zeigten eine den Kontrollen ähnliche Entwicklung der lytischen Aktivität.

3.3.2.2 NK-LAK-Aktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer täglichen Enzymgabe auf die NK-LAK-Aktivität sind in den Tabellen 3.12 und 3.13 zusammengefaßt.

Die lytische Aktivität der Kontrollen nahm während des fünftägigen Beobachtungszeitraums gleichmäßig um 10%-Punkte auf 74% ab.

Die prozentuale Änderung gegenüber dem Ausgangswert (Tag 1) an Tag 5 war statistisch absicherbar ($p < 0,05$).

Nach 24 Stunden lagen die NK-LAK-Aktivitäten auf dem Niveau der Kontrollen (ca. 80%), mit Ausnahme des 160 µg/ml-Ansatzes.

Bei täglicher Enzymzugabe von 40 µg/ml konnte nach 48h und 72h keine signifikante Aktivitätsänderung beobachtet werden. Am 4. Tag (96 h) erfolgte ein Aktivitätsrückgang auf 88% des 24h-Wertes, nach 120 Stunden ein statistisch signifikanter Abfall der NK-LAK-Aktivität auf 19%. Dieser Rückgang war signifikant gegenüber der täglichen Kontrolle ($p < 0,05$) und dem Ausgangswert ($p < 0,05$).

Die Gabe von 80 µg Enzym/ml bewirkte einen leichten, nicht signifikanten Anstieg der NK-LAK-Aktivität nach 24h. Die prozentuale Abnahme der NK-LAK-Aktivität gegenüber der täglichen Kontrolle nach 96h ($p < 0,05$) und 120h war ebenfalls signifikant ($p < 0,001$). Die prozentuale Abnahme gegenüber dem Ausgangswert betrug nach 96h 53% ($p < 0,05$). Nach 120 h konnte keine NK-LAK-Aktivität nachgewiesen werden.

160 µg Enzym/ml/d bewirkten nach 24h einen signifikanten Aktivitätsabfall auf 87% der Kontrolle ($p < 0,05$). Bei den Messungen an den beiden darauffolgenden Tagen (48h, 72h) konnte eine steile Abnahme der Aktivität um jeweils ca. 25% - Punkte verzeichnet werden ($p < 0,01$).

Im weiteren Verlauf (96h, 120h) war in dieser Konzentrationsstufe kaum (3% bei 96h) bzw. keine (120h) zellytische Aktivität zu beobachten. Dieser Rückgang war sowohl gegenüber den täglichen Kontrollen, als auch dem 24h-Ausgangswert statistisch absicherbar ($p < 0,001$).

Die Inkubation mit der hitzeinaktivierten Enzymmischung führte, im Vergleich zur täglichen Kontrolle, nach 120h nicht zu einem signifikanten Aktivitätsabfall. Der Aktivitätsrückgang gegenüber dem Ausgangswert um 56% war signifikant ($p < 0,05$).

Tabelle 3.13: Wirkung einer täglichen Enzymzugabe auf die NK-LAK-Aktivität über 5 Tage *in vitro*.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) \pm Standardabweichung aufgeführt, in der unteren Hälfte die mittlere prozentuale Veränderung \pm Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%). Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Angabe: Mittelwert \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	84 \pm 8	85 \pm 4	77 \pm 3	74 \pm 7	74 \pm 7
40 μ g/ml, n=5	78 \pm 1	85 \pm 5	75 \pm 4	69 \pm 12	19 \pm 11
80 μ g/ml, n=5	79 \pm 3	85 \pm 6	71 \pm 7	37 \pm 12	0 \pm 0
160 μ g/ml, n=5	73 \pm 1	50 \pm 12	24 \pm 9	3 \pm 3	0 \pm 0
80 μ g/ml, n=4 (inaktiviert)	82 \pm 4	83 \pm 4	80 \pm 8	62 \pm 5	36 \pm 6
Meßwerte, bezogen auf 100%	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	100	102 \pm 11	92 \pm 8	89 \pm 11	88 \pm 11
40 μ g/ml, n=5	93 \pm 9	102 \pm 12	90 \pm 8	82 \pm 16	23 \pm 14
80 μ g/ml, n=5	94 \pm 9	102 \pm 10	85 \pm 11	44 \pm 14	0 \pm 0
160 μ g/ml, n=5	87 \pm 8	60 \pm 14	29 \pm 10	3 \pm 3	0 \pm 0
80 μ g/ml, n=4 (inaktiviert)	96 \pm 7	98 \pm 11	94 \pm 7	73 \pm 9	42 \pm 7

Tabelle 3.14:

Signifikanzüberprüfung. NK-LAK-Aktivität: Vergleich der prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (=100 %).

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich der Änderungsraten gegenüber der Kontrolle, auf den jeweiligen Testtag bezogen, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Veränderungen innerhalb einer Konzentrationstufe mit dem 24h-Wert verglichen. **** = $p < 0,0001$; *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = \uparrow ; Wert ist niedriger = \downarrow

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 μ g/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow
80 μ g/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	*** \downarrow
160 μ g/ml, n=5	* \downarrow	** \downarrow	** \downarrow	*** \downarrow	*** \downarrow
80 μ g/ml, n=4 (inaktiviert)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 μ g/ml, n=5	80 μ g/ml, n=5	160 μ g/ml, n=5	80 μ g/ml, n=4 (inaktiviert)
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	n.s.
96 h	n.s.	n.s.	* \downarrow	** \downarrow	p=0,08 \downarrow
120 h	* \downarrow	** \downarrow	** \downarrow	**** \downarrow	* \downarrow

3.3.2.3 Nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer täglichen Enzymgabe auf die CTL-Aktivität sind in den Tabellen 3.15 und 3.16 zusammengefaßt.

Sämtliche Messwerte bewegten sich auf einem niedrigen Niveau knapp über der Nachweisgrenze. Dies bedeutet, daß Meßungenauigkeiten einen großen Einfluß auf die Ergebnisse haben. Daher werden hier nur die Werte beschrieben, bei denen ein Effekt durch den Enzymzusatz wahrscheinlich ist.

Die lytische Aktivität der Kontrollen verblieb während des fünftägigen Beobachtungszeitraums auf einem Niveau von ca. 2%. Statistisch abzusichern war der Verlust der CTL-Aktivität bei täglichen Zusatz von 80 bzw. 160 µg/ml Enzymmischung nach 120h ($p < 0,05$). Die Beobachtung, daß die Zugabe inaktivierter Enzyme im Vergleich zur Kontrolle bzw. im Vergleich zum Ausgangswert zu keiner Verminderung der CTL-Aktivität führte, scheint nicht auf Meßfehler zurückzuführen zu sein.

Tabelle 3.15: : Wirkung einer täglichen Enzymzugabe auf die nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität über 5 Tage *in vitro*.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) \pm Standardabweichung aufgeführt, in der unteren Hälfte die mittlere prozentuale Veränderung \pm Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%). Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Angabe: Mittelwert \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	2 \pm 2	2 \pm 2	3 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1
40 µg/ml, n=5	3 \pm 1	1 \pm 1	4 \pm 1	3 \pm 2	0 \pm 0
80 µg/ml, n=5	2 \pm 1	2 \pm 1	5 \pm 1	0 \pm 0	0 \pm 0
160 µg/ml, n=5	3 \pm 2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	1 \pm 1	1 \pm 1	3 \pm 1	5 \pm 1	3 \pm 1
Meßwerte, bezogen auf 100%	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	100 \pm 0	56 \pm 42	180 \pm 147	76 \pm 42	137 \pm 133
40 µg/ml, n=5	310 \pm 412	129 \pm 153	276 \pm 210	370 \pm 416	0 \pm 0
80 µg/ml, n=5	124 \pm 65	293 \pm 340	532 \pm 542	0 \pm 0	0 \pm 0
160 µg/ml, n=5	203 \pm 173	1 \pm 2	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	212 \pm 228	109 \pm 169	227 \pm 260	397 \pm 364	143 \pm 153

Tabelle 3.16:

Signifikanzüberprüfung. Nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität: Vergleich der prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (=100 %).

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich der Änderungsraten gegenüber der Kontrolle, auf den jeweiligen Testtag bezogen, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Veränderungen innerhalb einer Konzentrationstufe mit dem 24h-Wert verglichen. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = \uparrow ; Wert ist niedriger = \downarrow

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	** \downarrow
160 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	* \downarrow	n.s.	** \downarrow
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	n.s.
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	** \downarrow	n.s.
96 h	n.s.	n.s.	* \downarrow	** \downarrow	n.s.
120 h	n.s.	n.s.	* \downarrow	** \downarrow	n.s.

3.3.2.4 LAK-Aktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer täglichen Enzymgabe auf die LAK-Aktivität sind in den Tabellen 3.17 und 3.18 zusammengefaßt.

Die lytische Aktivität der Kontrolllymphozyten stieg nach 48h um 100%. Im weiteren Verlauf schwächte sich die Aktivität ab, blieb aber höher als der Anfangswert. Die prozentuale Zunahme der LAK-Aktivität gegenüber Tag 1 war für die Tage 2 ($p < 0,01$), 3 und 4 ($p < 0,05$) statistisch signifikant.

LAK, denen täglich 40 µg Enzym/ml zugegesetzt wurde, wiesen bis zu dem dritten Tag (72h) eine gesteigerte Aktivität auf. Der 72h-Wert (17%) war gegenüber der 72h-Kontrolle (12%) statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Am 4. Tag (96h) erfolgte ein gegenüber der 96 h-Kontrolle signifikanter Aktivitätsrückgang auf 8% ($p < 0,05$), der Rückgang auf 2% nach 120 Stunden war gegenüber der 120h-Kontrolle ebenfalls signifikant ($p < 0,05$). Der Rückgang war gegenüber dem 24h-Wert nicht signifikant.

Tägliche Gabe von 80 µg Enzym/ml führten nach 48h zu einem Anstieg der LAK-Aktivität von 8% auf 33%, dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant zu der 48h-Kontrolle.

Der 72h-Wert (21 %) war signifikant ($p < 0,05$) gegenüber der 72h Kontrolle (12%) erhöht. Nach 96h fiel die lytische Aktivität gegenüber der Kontrolle signifikant ab ($p < 0,001$), nach 120h war eine LAK-Aktivität nicht mehr nachweisbar.

Wurden 160 µg Enzym/ml zugegeben, stieg die LAK-Aktivität nach 24h auf 162% des Kontrollwerts, dieser Anstieg war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

160 µg Enzym/ml/d bewirkten nach 48h einen signifikanten Aktivitätsabfall auf 31% der 48h-Kontrolle ($p < 0,05$) bzw. auf 38 % des Ausgangswertes. In den Messungen an den folgenden Tagen (96h, 120h) konnte keine LAK-Aktivität mehr nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit der hitzeinaktivierten Enzymmischung führte im Vergleich zur 120h-Kontrolle nach 120h zu keinem signifikanten Aktivitätsabfall. Der Rückgang gegenüber dem Ausgangswert um 56% nach 120h war signifikant ($p < 0,05$).

Tabelle 3.17: Wirkung einer täglichen Enzymzugabe auf die LAK-Aktivität über 5 Tage *in vitro*.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt, in der unteren Hälfte die prozentuale Veränderung ± Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%). Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt. Angabe: Mittelwert ± Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	8 ± 2	16 ± 3	12 ± 1	15 ± 1	11 ± 3
40 µg/ml, n=5	9 ± 2	17 ± 5	17 ± 1	8 ± 3	2 ± 1
80 µg/ml, n=5	8 ± 2	33 ± 14	21 ± 5	4 ± 2	0 ± 0
160 µg/ml, n=5	13 ± 2	5 ± 1	5 ± 1	0 ± 0	0 ± 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	8 ± 1	20 ± 3	15 ± 1	11 ± 0	3 ± 0
Meßwerte, bezogen auf 100%	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	100 ± 0	207 ± 55	160 ± 36	181 ± 36	131 ± 28
40 µg/ml, n=5	110 ± 14	220 ± 81	210 ± 43	103 ± 44	26 ± 15
80 µg/ml, n=5	106 ± 24	442 ± 213	278 ± 97	52 ± 27	0 ± 0
160 µg/ml, n=5	159 ± 36	63 ± 22	63 ± 14	0 ± 0	0 ± 0
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	100 ± 21	260 ± 51	196 ± 21	148 ± 17	46 ± 11

Tabelle 3.18: Signifikanzüberprüfung. LAK-Aktivität: Vergleich der prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle (=100 %).

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich der Änderungsraten gegenüber der Kontrolle, auf den jeweiligen Testtag bezogen, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Veränderungen innerhalb einer Konzentrationstufe mit dem 24h-Wert verglichen. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = \uparrow ; Wert ist niedriger = \downarrow

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	* \downarrow
80 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	* \uparrow	** \downarrow	** \downarrow
160 µg/ml, n=5	* \uparrow	* \downarrow	n.s.	*** \downarrow	*** \downarrow
80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=4 (inaktiviert)
48 h	** \uparrow	n.s.	n.s.	n.s.	** \uparrow
72 h	* \uparrow	* \uparrow	n.s.	* \downarrow	* \uparrow
96 h	* \uparrow	n.s.	n.s.	*** \downarrow	n.s.
120 h	n.s.	n.s.	* \downarrow	*** \downarrow	n.s.

3.3.3 Wirkung einer zweifachen Enzymgabe auf die zellzytotoxische Funktion peripherer Lymphozyten *in vitro*

Diese Untersuchungen dienten zur Klärung der Frage, ob eine enzymatische Stimulierung der Lymphozytenaktivität wiederholbar ist.

Hierzu wurden die Enzymmischung (40, 80, 160 µg/ml) zu den Zeitpunkten 0h und nach 72h zu kultivierten PBL gegeben. Die Messungen der lytischen Aktivitäten der PBL erfolgte täglich.

3.3.3.1 NK-Zellaktivität

Die NK-Zellaktivität stieg nach Zugabe von 80 µg/ml der Enzymmischung von 59% (24h) auf 64% nach 72h an und war signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht ($p < 0,05$). Nach der 2. Zugabe erfolgte ein leichter Anstieg auf 67%, nach 120h fiel die Aktivität auf den 72h-Wert zurück, war aber signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,05$). Der 96h-Wert (67%) war signifikant erhöht ($p < 0,05$) gegenüber dem 48h Wert (59%).

Die zweite Gabe von 160 µg Enzymgemisch nach 72h bewirkte gegenüber den Kontrollen und dem 24h-Wert einen signifikanten Aktivitätsrückgang von 57% (72h) auf 3% (96h) (Tab. 3.19, Tab. 3.20).

Tabelle 3.19: Wirkung einer zweiten Enzymzugabe 72h nach Versuchsbeginn auf die NK-Zellaktivität *in vitro*. In der Tabelle sind Mittelwerte (spezifische Targetzelyse [%]) \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt. Angabe: Mittelwert \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	50 \pm 12	53 \pm 9	54 \pm 4	53 \pm 7	43 \pm 8
40 µg/ml, n=5	53 \pm 16	57 \pm 12	56 \pm 18	47 \pm 15	60 \pm 8
80 µg/ml, n=5	59 \pm 10	59 \pm 6	64 \pm 5	67 \pm 7	63 \pm 5
160 µg/ml, n=5	56 \pm 18	61,8 \pm 11	57 \pm 6	3 \pm 2	1 \pm 1

Tabelle 3.20: Signifikanzüberprüfung. NK-Zellaktivität:

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich gegenüber der Kontrolle, bezogen auf den jeweiligen Testtag, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Werte einer Konzentrationsstufe mit dem jeweiligen 24-Stundenwert verglichen. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = \uparrow ; Wert ist niedriger = \downarrow

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	* \uparrow	n.s.	* \uparrow
160 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	** \downarrow
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
96 h	n.s.	n.s.	* \uparrow vs. 48 h	* \downarrow	
120 h	n.s.	n.s.	n.s.	** \downarrow	

3.3.3.2 NK-LAK-Aktivität

Die NK-LAK-Aktivität war 24h nach Enzymzugabe [80 µg/ml] signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen ($p < 0,05$). Bis zu dem Zeitpunkt der 2. Enzymzugabe lagen sämtliche NK-Zellaktivitäten auf einem ähnlichen Niveau. Die zweite Gabe von 160 µg/ml Enzym nach 72h bewirkte einen signifikanten Rückgang der NK-LAK-Aktivität von 81% (72h) über 29% (96h) auf 3% (120h) gegenüber den Kontrollen und dem 24h-Wert (Tab. 3.21, Tab. 3.22).

Tabelle 3.21: Wirkung einer zweiten Enzymzugabe 72h nach Versuchsbeginn auf die NK-LAK-Aktivität *in vitro*. In der Tabelle sind Mittelwerte (spezifische Targetzelyse [%]) \pm Standardabweichung aufgeführt. Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Angabe: Mittelwert \pm Standardabweichung; n = Anzahl der Versuche.

Meßwerte	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	80 \pm 3	85 \pm 4	81 \pm 5	78 \pm 7	84 \pm 14
40 µg/ml, n=5	82 \pm 2	84 \pm 3	81 \pm 4	85 \pm 4	81 \pm 12
80 µg/ml, n=5	85 \pm 3	85 \pm 2	85 \pm 4	82 \pm 7	84 \pm 12
160 µg/ml, n=5	80 \pm 5	81 \pm 6	81 \pm 2	29 \pm 10	5 \pm 1

Tabelle 3.22: Signifikanzüberprüfung. NK-LAK-Aktivität:

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich gegenüber der Kontrolle, bezogen auf den jeweiligen Testtag, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Werte einer Konzentrationsstufe mit dem jeweiligen 24-Stundenwert verglichen. ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = \uparrow ; Wert ist niedriger = \downarrow

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=5	* \uparrow	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
160 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	* \downarrow
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
96 h	n.s.	n.s.	n.s.	* \downarrow	
120 h	n.s.	n.s.	n.s.	** \downarrow	

3.3.3.3 Nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer zweiten Enzymgabe auf die CTL-Aktivität sind in den Tabellen 3.23 und 3.24 zusammengefaßt.

Sämtliche Messwerte bewegten sich auf einem niedrigen Niveau knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Daher werden hier nur die Werte beschrieben, bei denen ein Effekt durch den Enzymzusatz wahrscheinlich ist.

Die lytische Aktivität der Kontrollen verblieb während des fünftägigen Beobachtungszeitraums auf einem Niveau von ca. 1%.

Statistisch signifikant war der Aktivitätsanstieg nach der 2. Gabe von 80 µg/ml Enzym (96h) gegenüber der 96h-Kontrolle ($p < 0,05$).

Ebenfalls statistisch abzusicherbar war der Aktivitätsverlust nach dem 2. Zusatz von 160 µg/ml Enzym nach 96 und 120h ($p < 0,05$) gegenüber den entsprechenden 40 µg/ml- bzw. 80 µg/ml-Wert.

Tabelle 3.23: Wirkung einer zweiten Enzymzugabe 72h nach Versuchsbeginn auf die nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität *in vitro*.

In der Tabelle sind Mittelwerte (spezifische Targetzelyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt.

Meßwerte	24 h	48h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	1 ± 1	1 ± 0,5	1 ± 1	1 ± 0,5	1 ± 0,5
40 µg/ml, n=5	2 ± 0,5	1 ± 1	1 ± 1	2 ± 0,5	2 ± 0,5
80 µg/ml, n=5	3 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	6 ± 1	5 ± 2
160 µg/ml, n=5	2 ± 2	3 ± 0,5	3 ± 1	0 ± 0	0 ± 0

Tabelle 3.24: Signifikanzüberprüfung. Nicht-MHC-restringierte CTL-Aktivität:

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich gegenüber der Kontrolle, bezogen auf den jeweiligen Testtag, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Werte einer Konzentrationsstufe mit dem jeweiligen 24-Stundenwert verglichen. * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = ↑; Wert ist niedriger = ↓

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	* ↑	n.s.	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=5	n.s.	* ↑	n.s.	* ↑	* ↑
160 µg/ml, n=5	n.s.	* ↑	n.s.	* ↓ vs. 40, 80 µg	* ↓ vs. 40, 80 µg
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	
48 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
72 h	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
96 h	n.s.	n.s.	* ↑ vs. 48 h, 72 h	* ↓	
120 h	n.s.	n.s.	* ↑ vs. 72 h	* ↓	

3.3.3.4 LAK-Aktivität

Die Ergebnisse zu dem Einfluß einer zweiten Enzymgabe auf die CTL-Aktivität sind in den Tabellen 3.25 und 3.26 zusammengefaßt.

Die LAK-Aktivität der Kontroll-PBL war zu den Meßzeitpunkten 48h, 96h und 120h signifikant gegenüber dem 24h-Wert erhöht.

Zweimalige Enzymzugabe von jeweils 40 µg/ml bewirkte gegenüber den Kontrollen keine signifikante LAK-Aktivierung. Im Vergleich zum 24h-Wert war die Aktivität zu den Meßzeitpunkten 48h, 72h und 96h signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Nach zweimaliger Zugabe von 80 µg/ml war die LAK-Aktivität 96h nach Versuchsbeginn mit $p = 0,08$, nach 120h statistisch signifikant ($p < 0,05$) zu den Kontrollen erhöht. Der 72h-, der 96h- und der 120h-Wert waren gegenüber dem 24h-Wert signifikant erhöht ($p < 0,05$).

24h nach dem ersten Zusatz von 160 µg/ml Enzymgemisch war die LAK-Aktivität gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Die zweite Zugabe von 160 µg/ml Enzymgemisch nach 72h bewirkte einen signifikanten Rückgang der LAK-Aktivität gegenüber den 40 µg- und 80 µg-Werten von 16% (72h) auf 4% (96 h). Die Aktivität sank nach weiteren 24 Stunden auf 1% (120h) ab. Dieser Wert war sowohl im Vergleich zu den anderen 120h-Werten, als auch zu den LAK-Aktivitäten 24h, 48h und 72h nach Versuchsbeginn signifikant erniedrigt.

Tabelle 3.25: Wirkung einer zweiten Enzymzugabe 72h nach Versuchsbeginn auf die LAK-Aktivität *in vitro*.

In der Tabelle sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt. Die Untersuchungen wurden an Lymphozyten von 5 verschiedenen Spendern durchgeführt.

Meßwerte	24 h	48h	72 h	96 h	120 h
Kontrolle, n=5	6 ± 1	15 ± 3	11 ± 2	14 ± 0,5	11 ± 2
40 µg/ml, n=5	7 ± 1	14 ± 5	13 ± 3	14 ± 1	10 ± 4
80 µg/ml, n=5	8 ± 1	15 ± 6	13 ± 4	17 ± 2	21 ± 5
160 µg/ml, n=5	12 ± 4	19 ± 11	16 ± 8	4 ± 3	1 ± 1

Tabelle 3.26: Signifikanzüberprüfung. LAK-Aktivität:

In der oberen Tabellenhälfte ist der Vergleich gegenüber der Kontrolle, bezogen auf den jeweiligen Testtag, aufgeführt. In der unteren Tabellenhälfte werden die Werte einer Konzentrationsstufe mit dem jeweiligen 24-Stundenwert verglichen. * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) = ↑; Wert ist niedriger = ↓

Kontrolle; n=5 vs.	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
40 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
80 µg/ml, n=5	n.s.	n.s.	n.s.	$p = 0,08$ ↑	* ↑
160 µg/ml, n=5	* ↑	n.s.	n.s.	* ↓ vs. 40, 80 µg	* ↓ vs. Kon., 40, 80 µg
24 h vs.	Kontrolle, n=5	40 µg/ml, n=5	80 µg/ml, n=5	160 µg/ml, n=5	
48 h	** ↑	* ↑	n.s.	n.s.	
72 h	n.s.	* ↑	* ↑	n.s.	
96 h	** ↑	* ↑	* ↑	n.s.	
120 h	* ↑	n.s.	** ↑	* ↓ vs 24, 48, 72 h	

3.3.4 Effekt einer einmaligen Enzymgabe auf die ADCC *in vitro*

Die Manipulation der NK-Zell-Funktion ADCC mittels einer Enzymmischung wurde in dieser Testreihe untersucht. Zu isolierten, peripheren Lymphozyten von 6 verschiedenen Spendern wurde 40, 80, 160 µg/ml Enzymmischung gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation fand die Messung der ADCC statt.

Die ADCC konnte durch Inkubation mit 80 µg/ml Enzymmischung statistisch signifikant von 34% auf 48% erhöht werden ($p < 0,05$). Wurde die Kontrolle = 100% gesetzt und die

prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle verglichen, so ergeben sich Steigerungsraten von 33% bei 40 µg/ml ($p < 0,01$), von 46% bei 80 µg/ml ($p < 0,001$) und 18% bei 160 µg/ml (nicht signifikant) (Tab. 3.27).

Tabelle 3.27: Enzymwirkung auf die ADCC.

In der oberen Tabellenhälfte sind Mittelwerte (spezifische Targetzelyse [%]) \pm Standardabweichung und die prozentuale Veränderung \pm Standardabweichung gegenüber den Kontrollen (=100%) aufgeführt.

In unteren Tabellenhälfte ist die Signifikanzüberprüfung eingetragen. Es wurden zum einen die Meßwerte verglichen, zum anderen die prozentualen Veränderungen gegenüber der Kontrolle. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); \downarrow = Wert ist niedriger

ADCC, 24h	Meßwerte	prozentuale Änderung, Kontrolle =100%
Kontrolle, n=6	34 \pm 11	100 \pm 0
40 µg/ml, n=6	45 \pm 13	133 \pm 16
80 µg/ml, n=6	48 \pm 12	146 \pm 22
160 µg/ml, n=6	42 \pm 17	118 \pm 21
Statistik	Kontrolle vs.	Kontrolle% vs.
40 µg/ml, n=6	n.s.	** \uparrow
80 µg/ml, n=6	* \uparrow	*** \uparrow
160 µg/ml, n=6	n.s.	n.s.

3.3.5 Wirkung einer einmaligen Enzymgabe auf Phagozytose und Sauerstoffradikalproduktion durch Granulozyten und Monozyten *in vitro*

In dieser Versuchsreihe wurde die Enzymmischung in den Konzentrationen 40, 80, 160 µg/ml zu isolierten Granulozyten bzw. Monozyten von 7 verschiedenen Spendern gegeben und nach 24-stündiger Inkubation die Funktionen Phagozytose und Sauerstoffradikalproduktion untersucht.

Mit der angewandten Methode kann der Anteil der phagozytierenden Leukozyten und die Menge der aufgenommenen Bakterien über die MFI bestimmt werden.

Nach enzymatischer Stimulierung (40 µg/ml) stieg der Anteil der phagozytierenden Granulozyten von 54% auf 66% an. Wurde die Kontrolle zu 100% gesetzt, war dieser Anstieg signifikant ($p < 0,05$). Der Anstieg der MFI von 33,5 auf 49,5 nach Inkubation mit 40 µg/ml Enzymen war statistisch nicht abzusichern. Der Rückgang des Anteils phagozytierender PMNL nach Inkubation mit 160 µg/ml war im Vergleich zu den 40 µg/ml- und 80 µg/ml-Werten signifikant ($p < 0,05$).

Bei Monozyten konnte ein leichter, aber nicht abzusichernder Anstieg der Phagozytose nach Zugabe von 40 µg/ml bzw. 80 µg/ml Enzymmischung beobachtet werden. Die Verringerung des Anteils phagozytierender Monozyten und der MFI nach Zusatz von 160 µg/ml war signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) (Tab. 3.28).

Tabelle 3.28: Wirkung einer einmaligen Zugabe der Enzympräparation auf die Phagozytoseleistung von Granulozyten und Monozyten.

Messung erfolgte 24h nach Enzymzugabe. Im oberen Teil (*Phagozytose, Meßwerte*) sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt, im unteren Teil (*Statistik*) die statistische Analyse der Daten. (%) = Prozentualer Anteil phagozytischer Leukozyten. MFI = Maß für die aufgenommene Bakterienmenge. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); \downarrow = Wert ist niedriger

Phagozytose, Meßwerte	PMNL (MFI)	PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Monozyten (%)
Kontrolle, n=7	33,5 \pm 14,4	54,6 \pm 8,6	37,8 \pm 15,5	29,9 \pm 6,2
40 μ g/ml, n=7	49,5 \pm 16,9	66,0 \pm 8,7	47,9 \pm 29,9	30,2 \pm 12,0
80 μ g/ml, n=7	43,5 \pm 8,2	64,6 \pm 7,8	51,7 \pm 28,3	36,4 \pm 12,4
160 μ g/ml, n=7	12,4 \pm 9,7	40,7 \pm 19,6	4,1 \pm 6,2	3,9 \pm 4,7
Statistik				
Kontrolle vs.	PMNL (MFI)	PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Monozyten (%)
40 μ g/ml, n=7	n.s.	* \uparrow	n.s.	n.s.
80 μ g/ml, n=7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
160 μ g/ml, n=7	* \downarrow	n.s.	*** \downarrow	** \downarrow
40 μg/ml vs.	PMNL (MFI)	PMNL (%)	Monozyten(MFI)	Monozyten (%)
80 μ g/ml, n=7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
160 μ g/ml, n=7	*** \downarrow	* \downarrow	*** \downarrow	** \downarrow
80 μg/ml vs.	PMNL (MFI)	PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Monozyten (%)
160 μ g/ml, n=7	** \downarrow	* \downarrow	** \downarrow	*** \downarrow

Tabelle 3.29: Wirkung einer einmaligen Enzymzugabe auf den oxidativen Burst von PMNL und Monozyten.

Der Test wurde mit PMNL und Monozyten von 7 Spendern durchgeführt. Im oberen Teil (*oxidativer Burst, Meßwerte*) sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Im unteren Teil (*Statistik*) die statistische Analyse der Daten. (%) = Prozentualer Anteil der phagozytierenden Leukozyten; MFI= Maß für die gebildeten Sauerstoffradikale; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); \downarrow = Wert ist niedriger

Oxidativer Burst, Meßwerte	PMNL (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender Monozyten (%)
Kontrolle, n=7	37,6 \pm 27,6	73,0 \pm 11,4	50,2 \pm 20,7	79,9 \pm 7,2
40 μ g/ml, n=7	78,8 \pm 23,2	89,5 \pm 6,6	45,7 \pm 20,5	79,5 \pm 6,3
80 μ g/ml, n=7	81,4 \pm 38,1	89,2 \pm 6,1	44,2 \pm 19,6	77,1 \pm 7,0
160 μ g/ml, n=7	56,8 \pm 28,4	86,3 \pm 9,4	24,1 \pm 18,1	71,0 \pm 12,6
Statistik				
Kontrolle vs.	PMNL (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender Monozyten (%)
40 μ g/ml, n=7	* \uparrow	** \uparrow	n.s.	n.s.
80 μ g/ml, n=7	* \uparrow	* \uparrow	n.s.	n.s.
160 μ g/ml, n=7	n.s.	* \uparrow	* \downarrow	n.s.
40 μg/ml vs.	PMNL (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender Monozyten (%)
80 μ g/ml, n=7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
160 μ g/ml, n=7	n.s.	n.s.	* \downarrow	n.s.
80 μg/ml vs.	PMNL (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender PMNL (%)	Monozyten (MFI)	Anteil O ₂ ⁻ bildender Monozyten (%)
160 μ g/ml, n=7	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die angewandte Methode ermöglichte es, simultan den Anteil der O₂⁻ bildenden Leukozyten und deren MFI als Maß für die gebildete Sauerstoffradikalmenge zu bestimmen.

Nach Enzymzugabe von 40 µg/ml bzw. 80 µg/ml stieg die MFI/PMNL von 38 (Kontrolle) über 78,8 (40 µg/ml) auf 81 (80 µg/ml) an. Der Anstieg war gegenüber der Kontrolle signifikant (jeweils $p < 0,05$).

Der Anteil der O₂⁻-bildenden PMNL stieg von 73% auf 89,5% (40 µg/ml). Der Anteil blieb bei einem Enzymzusatz von 80 µg/ml auf dem gleichen Niveau und verringert sich bei Zusatz von 160 µg/ml auf 86,3%. Der Unterschied zur Kontrolle war bei allen Konzentrationstufen signifikant ($p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,05$).

Der Anteil O₂⁻-bildender Monozyten und die Quantität der gebildeten Sauerstoffradikale sank mit steigender Enzymkonzentration. Der Abfall der MFI von 50 (Kontrolle) auf 24 (160 µg/ml) war statistisch absicherbar ($p < 0,05$).

Der Rückgang des Anteils O₂⁻-bildender Monozyten von 80% (Kontrolle) auf 71% (160 µg/ml) war nicht signifikant (Tab. 3.29).

3.3.6 Einfluß einer Enzymmischung auf den Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro*

In der Versuchsreihe wurden Expressionsveränderungen bestimmter Oberflächenantigene nach Zugabe der Enzymmischung untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.30 (PMNL und PBL) zusammengefaßt.

Die Messungen ergaben eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der β_2 -Untereinheit der Integrine (CD18) auf PMNL nach 24-stündiger Stimulierung mit 80 µg Enzymmischung/ml. Die MFI stieg um den Faktor 1,8 von 48 auf 88 Einheiten.

Die numerische Expression des Adhäsionsrezeptors CD54 (ICAM-1) auf PMNL wurde signifikant ($p < 0,005$) um den Faktor 2,4 auf 58,5 Einheiten hochreguliert.

Die Zahl der Fc γ III-Rezeptor (CD16) auf PMNL reduzierte sich signifikant ($p < 0,01$) nach Enzymzusatz auf 47% des Kontrollwertes.

Für PBL konnten unter diesen Versuchsbedingungen keine signifikanten Änderungen der Oberflächenantigene CD16, CD18 und CD54 beobachtet werden (Tab. 3.30).

Tabelle 3.30: Wirkung einer einmaligen Zugabe der Enzympräparation auf den Phänotyp von PMNL und PBL.

Im oberen Teil (*Phänotypisierung*) sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aufgeführt. Angegeben wird die MFI/Leukozyt. Messung erfolgte 24h nach Zugabe der Enzymmischung. Im unteren Teil (*Statistik*) findet sich die statistische Analyse der Daten. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); \downarrow = Wert ist niedriger

Phänotypisierung	CD16 (MFI)	CD18 (MFI)	CD54 (MFI, FL-2)
PMNL Kontrolle, n=7	15,5 \pm 6,6	48,3 \pm 15,1	24,4 \pm 8,3
PMNL 80 µg/ml, n=7	7,3 \pm 2,1	88,0 \pm 27,9	58,5 \pm 7,2
PBL Kontrolle, n=7	0,1 \pm 0,1	13,3 \pm 3,2	1,9 \pm 0,3
PBL 80 µg/ml, n=7	0,2 \pm 0,1	14,2 \pm 6,5	2,5 \pm 0,9
Statistik	CD16 (MFI)	CD18 (MFI)	CD54 (MFI, FL-2)
PMNL-Kontrolle vs.			
PMNL 80 µg/ml, n=7	** \downarrow	* \uparrow	*** \uparrow
PBL-Kontrolle vs.			
PBL 80 µg/ml, n=7	n.s.	n.s.	n.s.

3.3.7 Einfluß einer hochdosierten Enzymgabe auf Oberflächenrezeptoren am Beispiel CD8 *in vitro*

Hohe Enzymkonzentrationen führten zum Funktionsverlust *in vitro*. Das könnte auf einen Funktionsverlust angedauerter Rezeptoren zurückzuführen sein. Als Maß für eine Rezeptordegradation wurde die Bindung spezifischer monoklonaler Antikörper auf enzymbehandelten PBL gemessen. 24h nach Enzymzugabe konnten fast keine gebundenen Antikörper nachgewiesen werden. An den folgenden 2 Tagen konnte eine ansteigende Antikörperbindung auf den enzymbehandelten PBL gemessen werden.

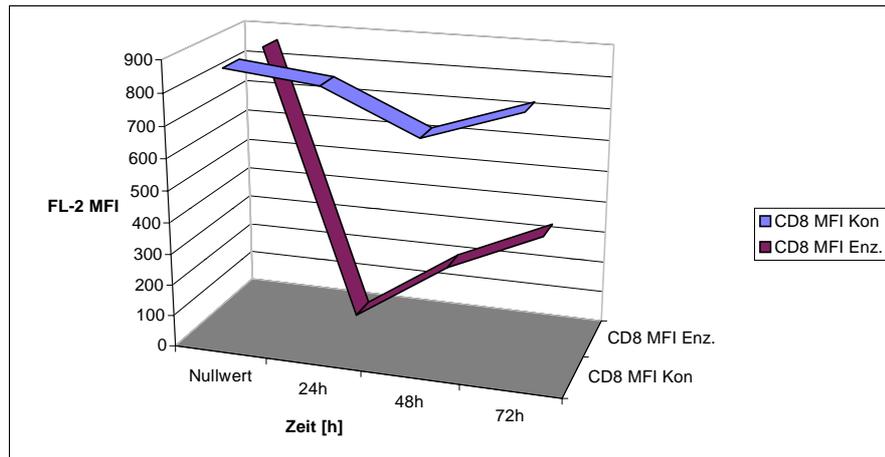


Abbildung 3.10: Einfluß der Enzymmischung auf den Nachweis von CD8 auf CTL.

Die CD8-Dichte (MFI/Zelle) wurde zum Zeitpunkt 0 durchflußzytometrisch bestimmt, danach erfolgte die Inkubation mit der Enzymmischung [640 µg/ml]. Die Kontroll-PBL wurden mit BSA [640 µg/ml] inkubiert. Die Zellen wurden 72h bei 37°C in DMEM+10% FCS inkubiert. Die Messungen erfolgten täglich. Vor der Antikörperzugabe bei nachfolgenden Phänotypisierungen wurden die PBL gewaschen, um Degradation der Antikörper durch Enzymrestaktivität zu vermeiden. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3.8 Enzymatische Stimulierung von PBL in Serum-freiem Medium *in vitro*

Mit diesem Experiment sollte geklärt werden, ob die Lymphozytenaktivierung auf direkte Enzymwirkung auf die Zellen zurückzuführen ist oder auf FCS-Spaltprodukte, entstanden durch die proteolytische Wirkung der zugegebenen Enzyme.

Dazu wurden kultivierte Lymphozyten (native und IL-2-stimulierte PBL) für 24h in DMEM, DMEM+FCS, DMEM + Enzyme und DMEM + FCS + Enzyme kultiviert und ihre lytische Aktivität bestimmt (Abb. 3.10).

Es konnte gezeigt werden, daß die lytische Aktivität der PBL nach enzymatischer Stimulierung, unabhängig von FCS-Anwesenheit, ähnliche Werte erreicht. Dies konnte für unstimulierte und für IL-2 stimulierte Lymphozyten gezeigt werden. Die LAK-Aktivität lag nach enzymatischer Stimulierung in FCS-haltigem Medium im Mittel bei 24%, bei 23% lag sie in FCS-freiem Medium. Die lytische Aktivität ohne vorherige IL-2-Stimulierung lag in beiden Medien mit Enzymzusatz bei 4%.

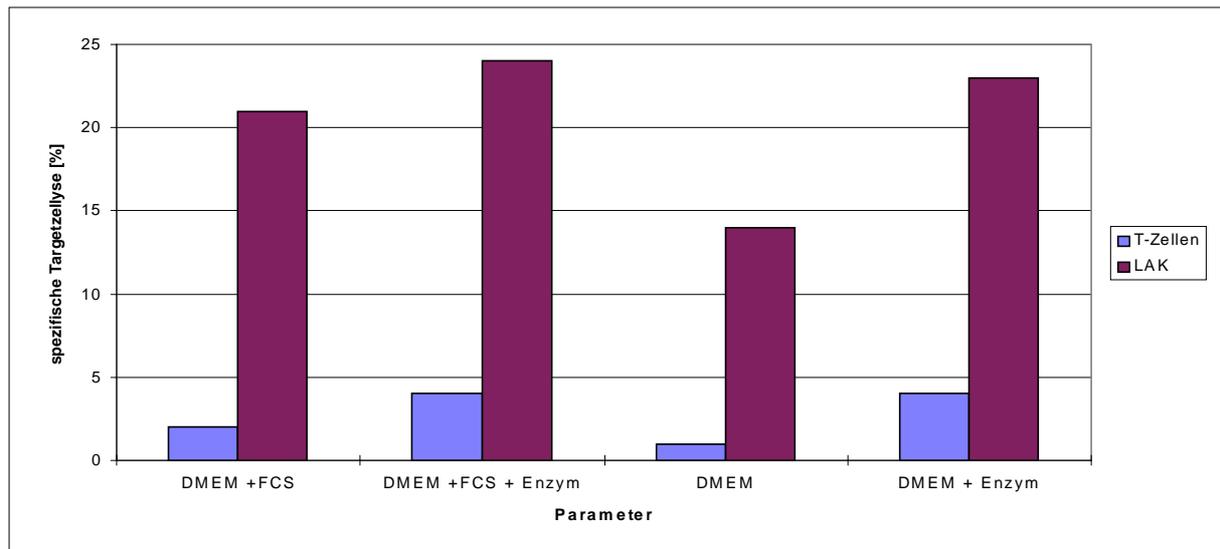


Abbildung 3.11: Einfluß von FCS auf die enzymatische Stimulierung von PBL *in vitro*.

Auf der Abszisse sind Komponenten der Versuchsmedien, auf der Ordinate die spezifische Targetzelle (*Raji*) [%] aufgetragen. Die hellgrauen Säulen stehen für die Aktivität nicht MHC-restringierter CTL, dunkelgraue Säulen repräsentieren die spezifische Targetzelyse durch nicht MHC-restringierte LAK. Die FCS-Konzentration betrug 10% v/v, die Ezymmischung wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Nach 24h Inkubation wurde die spezifische Targetzelyse durchflußzytometrisch bestimmt.

Die Effektor-Targetzellratio betrug 40:1. Gezeigt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

3.4 Wirkung von Retinoiden auf Funktion und Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro*

3.4.1 Wirkung von *all-trans* Retinsäure und Retinol auf zellzytotoxische Funktionen peripherer Lymphozyten im zeitlichen Verlauf *in vitro*

Die Wirkung von Retinol (ROH), *all-trans*-Retinsäure (RA) und dem Lösungsmittel DMSO auf die zellzytische Aktivität sowohl nativer, als auch IL-2-stimulierter PBL wurde in dieser Testserie untersucht.

ROH und RA wurden in den Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M den Kulturen zugegeben. Die DMSO-Konzentration betrug in allen Ansätzen, einschließlich der Kontrolle, 0,1% v/v. Die Messungen erfolgten nach 24h, 48h und 72h.

Proben, die eine NK-Zellaktivität < 30% und eine LAK-Aktivität < 4% aufwiesen wurden nicht berücksichtigt.

Sowohl die Inkubation mit RA, als auch mit ROH in den Konzentrationen von 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M über 72h bei täglicher Messung führte im Vergleich zu dem DMSO-Ansatz und der Kontrolle zu keiner signifikanten Änderungen der untersuchten Effektorzell-Aktivitäten (Tab. 3.31).

Tabelle 3.31: Wirkung von RA, ROH und DMSO auf die lytische Aktivität von PBL im zeitlichen Verlauf *in vitro*. Die Untersuchungen wurden mit Proben von 5 Spendern durchgeführt.
Angabe: Mittelwert (spezifische Targetzellyse [%] \pm Standardabweichung)

NK-Aktivität	24 h	48 h	72 h	NK-LAK-Aktivität	24 h	48 h	72 h
Kontrolle, n=5	49 \pm 8	42 \pm 9	55 \pm 12	Kontrolle, n=5	60 \pm 16	62 \pm 11	61 \pm 20
DMSO [0,1 ‰], n=5	47 \pm 9	44 \pm 11	51 \pm 7	DMSO [0,1 ‰], n=5	54 \pm 12	46 \pm 9	51 \pm 13
RA [10 ⁻⁷ M], n=5	42 \pm 7	55 \pm 12	48 \pm 10	RA [10 ⁻⁷ M], n=5	56 \pm 22	55 \pm 23	59 \pm 22
RA [10 ⁻⁶ M], n=5	47 \pm 5	46 \pm 8	50 \pm 7	RA [10 ⁻⁶ M], n=5	52 \pm 14	49 \pm 10	44 \pm 15
RA [10 ⁻⁵ M], n=5	43 \pm 6	41 \pm 7	55 \pm 13	RA [10 ⁻⁵ M], n=5	65 \pm 16	52 \pm 11	54 \pm 8
ROH [10 ⁻⁷ M], n=5	38 \pm 9	46 \pm 8	39 \pm 10	ROH [10 ⁻⁷ M], n=5	55 \pm 15	57 \pm 13	57 \pm 9
ROH [10 ⁻⁶ M], n=5	39 \pm 6	42 \pm 11	44 \pm 16	ROH [10 ⁻⁶ M], n=5	49 \pm 13	53 \pm 12	45 \pm 11
ROH [10 ⁻⁵ M], n=5	43 \pm 11	39 \pm 8	45 \pm 9	ROH [10 ⁻⁵ M], n=5	54 \pm 17	54 \pm 14	47 \pm 14
CTL-Aktivität	24 h	48 h	72 h	LAK-Aktivität	24 h	48 h	72 h
Kontrolle, n=5	1 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 1	Kontrolle, n=5	15 \pm 7	11 \pm 5	16 \pm 6
DMSO [0,1 ‰], n=5	3 \pm 1	2 \pm 2	2 \pm 1	DMSO [0,1 ‰], n=5	14 \pm 6	12 \pm 6	14 \pm 10
RA [10 ⁻⁷ M], n=5	2 \pm 2	3 \pm 2	2 \pm 2	RA [10 ⁻⁷ M], n=5	17 \pm 10	11 \pm 6	19 \pm 10
RA [10 ⁻⁶ M], n=5	2 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	RA [10 ⁻⁶ M], n=5	13 \pm 9	15 \pm 5	17 \pm 9
RA [10 ⁻⁵ M], n=5	3 \pm 2	2 \pm 2	3 \pm 2	RA [10 ⁻⁵ M], n=5	16 \pm 9	17 \pm 5	17 \pm 8
ROH [10 ⁻⁷ M], n=5	1 \pm 2	2 \pm 1	2 \pm 2	ROH [10 ⁻⁷ M], n=5	12 \pm 4	9 \pm 6	16 \pm 9
ROH [10 ⁻⁶ M], n=5	2 \pm 2	1 \pm 2	3 \pm 1	ROH [10 ⁻⁶ M], n=5	13 \pm 6	8 \pm 5	11 \pm 5
ROH [10 ⁻⁵ M], n=5	2 \pm 1	1 \pm 1	2 \pm 2	ROH [10 ⁻⁵ M], n=5	11 \pm 5	12 \pm 4	12 \pm 6

3.4.2 Wirkung von *all-trans* Retinsäure und Retinol auf die ADCC *in vitro*

Die Beeinflussung der ADCC durch NK-Zellen nach Inkubation mit RA und ROH wurde in dieser Testreihe untersucht. Zu nativen bzw. IL-2-stimulierten PBL von 4 Probanden wurde RA [10⁻⁶ M], ROH [10⁻⁶ M] und DMSO [0,01‰ v/v] zugegeben. Nach 24h, 48h und 72h Inkubation wurde die ADCC bestimmt.

Nach 24h war die ADCC der Kontrollen (nativ und IL-2-stimuliert) im Mittel höher als die der anderen Gruppen. Retinol bewirkte bei nativen und IL-2 stimulierten PBL einen signifikanten Rückgang der ADCC ($p < 0,05$) gegenüber den Kontrollen, jedoch keinen signifikante Reduzierung im Vergleich zu den entsprechenden DMSO-, bzw. RA-Ansätzen.

Nach 48h glichen sich die Kontroll- und Testwerte an. Die Werte nativer NK-Zellen streuten, unabhängig von der zugegebenen Substanz, um einen Mittelwert von 30%, die ADCC durch IL-2 stimulierte NK-Zellen um einen Mittelwert von 50%. Der Anstieg der Targetzellyse war für IL-2-stimulierte NK-Zellen mit RA-Zusatz statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Am dritten Testtag (72h) sank die mittlere Aktivität (mit hoher Standardabweichung) aller Ansätze auf ca. 50% des jeweiligen Vortagesniveau. Der Rückgang gegenüber dem 2.Tag war signifikant für IL-2-stimulierten NK-Zellen, die mit RA ($p < 0,01$), ROH ($p < 0,05$) und DMSO ($p < 0,05$) inkubiert wurden (Tab. 3.32, Tab 3.33).

Tabelle 3.32: ADCC durch PBL bzw. IL-2-stimulierten PBL nach 72-stündiger Inkubation mit RA, ROH und DMSO. In dem oberen Tabellenteil sind Mittelwerte (spezifische Targetzellyse [%]) ± Standardabweichung aufgeführt. In dem unteren Tabellenteil ist die statistische Auswertung zu finden. * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; ↑ = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); ↓ = Wert ist niedriger; Signifikanzen zu anderen Gruppen wurden extra vermerkt (z.B. *↑ vs. 48h).

NK-Zellen	24 h	48 h	72 h	NK-LAK-Zellen	24 h	48 h	72 h
Kontrolle, n=4	34 ± 8	31 ± 12	19 ± 16	Kontrolle, n=4	51 ± 11	46 ± 12	35 ± 28
DMSO [0,1 ‰], n=4	26 ± 7	28 ± 8	18 ± 15	DMSO [0,1 ‰], n=4	33 ± 9	46 ± 9	19 ± 16
RA [10 ⁻⁶ M], n=4	23 ± 7	31 ± 5	15 ± 13	RA [10 ⁻⁶ M], n=4	33 ± 10	49 ± 6	19 ± 15
ROH [10 ⁻⁶ M], n=4	20 ± 7	32 ± 12	18 ± 15	ROH [10 ⁻⁶ M], n=4	27 ± 12	50 ± 9	18 ± 15
Statistik: NK-Zellen Kontrolle, n=4 vs.	24 h	48 h	72 h	Statistik, NK-LAK Kontrolle, n=4 vs.	24 h	48 h	72 h
DMSO [0,1 ‰], n=4	n.s.	n.s.	n.s.	DMSO [0,1 ‰], n=4	n.s.	n.s.	n.s.
RA [10 ⁻⁶ M], n=4	n.s.	n.s.	n.s.	RA [10 ⁻⁶ M], n=4	n.s.	n.s.	n.s.
ROH [10 ⁻⁶ M], n=4	* ↓	n.s.	n.s.	ROH [10 ⁻⁶ M], n=4	* ↓	n.s.	n.s.

Tabelle 3.33: ADCC im zeitlichen Verlauf, statistischer Vergleich. Vergleich der Veränderungen gegenüber den Vortageswerten. **=p<0,01; * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; ↑ = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); ↓ = Wert ist niedriger; Signifikanzen zu anderen Gruppen wurden extra vermerkt (z.B. *↑ vs. 48 h).

Statistik, NK-Zellen 24 h, n=4 vs.	Kontrolle, n=4	DMSO [0,1 ‰]	RA [10 ⁻⁶ M]	ROH [10 ⁻⁶ M]
48 h, n=4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
72 h, n=4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Statistik, NK-LAK- Zellen: 24 h, n=4 vs.	Kontrolle, n=4	DMSO [0,1 ‰]	RA [10 ⁻⁶ M]	ROH [10 ⁻⁶ M]
48 h, n=4	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.
72 h, n=4	n.s.	* ↓ vs 48h	**↓ vs.48h	* ↓ vs.48h

3.4.3 Einfluß von *all-trans* Retinsäure und Retinol auf den Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro*

In der Versuchsreihe wurden Expressionsveränderungen funktions-assoziiertes Oberflächenantigene (CD2, CD54) auf PBL und Monozyten nach Inkubation mit RA [10⁻⁶M] und ROH [10⁻⁶] über 72h durchflußzytometrisch untersucht. Der Versuch wurde mit Blutproben von drei Probanden durchgeführt.

Die Messungen ergaben keine deutlichen Veränderungen der numerischen Expression der Rezeptoren auf PBL gegenüber den jeweiligen Kontrollansätzen bzw. der DMSO-Kontrolle [0,01‰ v/v]. Eine allgemeine, leicht erhöhte Expression von CD54 war nach 48h festzustellen. Die Expression der α-Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) blieb bei allen Untersuchungen konstant (Tab. 3.33).

Die Immunphänotypisierung von Monozyten, die mit RA bzw. ROH inkubiert wurden, ergab bei den Kontrollen und Testansätzen eine stetige Steigerung der CD54-Expression. Die CD25-Expression bei RA-, bzw. ROH-behandelten PBL (MFI = 111 bzw. 128) war nach 24h gegenüber der Kontrolle (MFI=56) und der DMSO-Kontrolle (MFI=71) erhöht (Tab.3.34).

Tabelle 3.34: Numerische Expression der Oberflächenantigene CD25 und CD54 auf PBL und Monozyten nach Inkubation mit RA, ROH und DMSO im zeitlichen Verlauf.

Die Messungen erfolgten 24h, 48h und 72h nach Zugabe der Substanzen. Angaben: Mittelwert \pm Standardabweichung.

Phänotypisierung 24 h	CD25 PBL (MFI)	CD54 PBL (MFI)	CD25 Monozyten (MFI)	CD54 Monozyten (MFI)
Kontrolle, n=3	6 \pm 1	7 \pm 2	56 \pm 7	263 \pm 33
DMSO [0,1 %], n=3	7 \pm 1	5 \pm 1	71 \pm 44	236 \pm 46
RA [10 ⁻⁶ M], n=3	6 \pm 1	5 \pm 1	111 \pm 44	259 \pm 25
ROH [10 ⁻⁶ M], n=3	7 \pm 1	7 \pm 1	128 \pm 54	257 \pm 37
Phänotypisierung 48 h	CD25 (MFI)	CD54 (MFI)	CD25 (MFI)	CD54 (MFI)
Kontrolle, n=3	6 \pm 1	8 \pm 2	85 \pm 32	367 \pm 128
DMSO [0,1 %], n=3	7 \pm 1	8 \pm 2	73 \pm 20	262 \pm 45
RA [10 ⁻⁶ M], n=3	7 \pm 1	10 \pm 2	115 \pm 41	317 \pm 72
ROH [10 ⁻⁶ M], n=3	7 \pm 1	9 \pm 3	125 \pm 44	354 \pm 129
Phänotypisierung 72 h	CD25 (MFI)	CD54 (MFI)	CD25 (MFI)	CD54 (MFI)
Kontrolle, n=3	6 \pm 1	9 \pm 3	89 \pm 10	400 \pm 55
DMSO [0,1 %], n=3	7 \pm 1	8 \pm 3	79 \pm 8	452 \pm 42,3
RA [10 ⁻⁶ M], n=3	8 \pm 2	7 \pm 2	116 \pm 12	464 \pm 45
ROH [10 ⁻⁶ M], n=3	6 \pm 1	7 \pm 2	97 \pm 25	429 \pm 100

3.5 Klinische Pilotstudie: Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Enzym- oder Vitamin-A-Therapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich

Die Wirkung der Prüfmedikationen auf die Verteilung der Lymphozytensubpopulationen des peripheren Immunsystems (T-Lymphozyten, B-Zellen, NK-Zellen) und deren Oberflächenrezeptoren bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-/Halsbereich wurde mittels monoklonaler Antikörper und Durchflußzytometrie untersucht. Der Einfluß der Substanzen auf die Funktion von LAK (gemessen an der spezifische Lyse der Targetzelllinie *Raji*) und NK-LAK-Zellen (gemessen an der spezifische Lyse der Targetzelllinie *K562*) bei den Patienten erfolgte mit dem Europiumrelease-Assay.

Zum Vergleich wurden diese Tests im gleichen Untersuchungsrhythmus an 15 Probanden durchgeführt.

Die Patienten wurden nach ihrer Prüfmedikation in drei Gruppen eingeteilt. Eine weitere Aufschlüsselung nach Art ihrer primären Tumotherapie konnte aufgrund der geringen Fallzahl nicht vorgenommen werden.

3.5.1 Klinische Parameter und Tumor-Grading

Im Rahmen der Akquisition des Patienten- und Kontrollkollektivs wurde in einer Einganguntersuchung ein Blutbild angefertigt, die Aktivität bestimmter Leberenzyme und die Konzentration wichtiger Ionen im Serum bestimmt.

Der Vergleich der *Kontrollen* mit den Nullwerten der Patienten (prätherapeutischer Status) zeigte eine signifikante Erniedrigung der Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, des Hämoglobingehalts und des Hämatokrits bei den Patienten, die Werte befanden sich aber noch im Normbereich. Es konnte eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl im Vergleich zum *Kontrollkollektiv* gefunden werden (Tab. 3.35).

Tabelle 3.35: Blutbild der Patienten und der Kontrollen zu Studienbeginn.

Angaben: Mittelwerte \pm Standardabweichung. n=Patienten-/Probandenzahl; M=Anzahl der Messungen. In dem unteren Tabellenteil ist die Signifikanzüberprüfung aufgeführt. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) ; \downarrow = Wert ist niedriger

Blutbild	Erythrozyten [Mio/μl]	Leukozyten [*1000/μl]	Thrombozyten [*1000/μl]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]
<i>Kontrollen</i> n=15; M=15	4,8 \pm 0,4	7,1 \pm 1,3	271,2 \pm 64,1	15,1 \pm 1,5	43,6 \pm 2,9
<i>Patienten</i> n=24; M=24	4,1 \pm 0,5	9,8 \pm 2,9	240,6 \pm 52,5	13,1 \pm 1,5	40,5 \pm 4,3
<i>Patienten prätherapeutisch vs.</i>	Erythrozyten [Mio/μl]	Leukozyten [*1000/μl]	Thrombozyten [*1000/μl]	Hämoglobin [g/dl]	Hämatokrit [%]
<i>Kontrollen</i>	*** \uparrow	*** \downarrow	n.s.	*** \uparrow	* \uparrow

Die Eingangsuntersuchungen ergaben für die Tumorpatienten eine signifikante Erhöhung der sogenannten Leberwerte SGOT, SGPT, γ -GT und AP ($p < 0,06$) teilweise um das Doppelte gegenüber den *Kontrollen*. Die Werte lagen bei den Patienten somit am oberen Ende des

Normbereiches. Die Kreatinin-, Natrium-, Kalzium- und Kaliumionenkonzentrationen bei Patienten unterschieden sich kaum von entsprechenden Werten der Probanden. Chloridionen- und Eiweißkonzentration sind im Vergleich zu den *Kontrollen* leicht aber signifikant erniedrigt (Tab. 3.36).

Tabelle 3.36: Vielfachanalyse der Patienten und der Kontrollen zu Studienbeginn.

Angaben: Mittelwerte \pm Standardabweichung. In dem unteren Tabellenteil ist die Signifikanzüberprüfung aufgeführt. *** = $p < 0,005$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$; n.s. = nicht signifikant; \uparrow = Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt); \downarrow = Wert ist niedriger

Vielfach-analyse	SGOT ⁸ [U/l]	SGPT ⁹ [U/l]	γ -GT ¹⁰ [U/l]	AP ¹¹ [U/l]	Kreatini n[mg/dl]	Na ⁺ [mmol/l]	K ⁺ [mmol/l]	Ca ²⁺ [mmol/l]	Cl ⁻ [mmol/l]	Gesamt-eiweiß
<i>Kontrollen</i>	9,5 \pm 2,4	10,0 \pm 5,4	11,9 \pm 6,6	99,9 \pm 25	1,0 \pm 0,1	140,7 \pm 1,8	4,2 \pm 0,3	2,4 \pm 0,1	106 \pm 3,0	7,6 \pm 0,7
<i>Prätherap</i>	13,4 \pm 3,5	17,8 \pm 4,5	22,1 \pm 3,8	117,6 \pm 24	0,9 \pm 0,1	140,3 \pm 2,0	4,0 \pm 0,4	2,3 \pm 0,1	104 \pm 2,7	6,9 \pm 0,7
<i>Prätherap vs.</i>	SGOT [U/l]	SGPT [U/l]	γ -GT [U/l]	AP [U/l]	Kreatini n[mg/dl]	Na ⁺ [mmol/l]	K ⁺ [mmol/l]	Ca ²⁺ [mmol/l]	Cl ⁻ [mmol/l]	Gesamt-eiweiß
	*** \downarrow	*** \downarrow	*** \downarrow	p<0,06 \downarrow	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* \uparrow	* \uparrow

Das TNM-System unterteilt Tumorgröße (T), Ausdehnung (N=regionäre Lymphknoten) und Metastasierung (M) in jeweils 5 Stufen von 0 (= nicht nachweisbar) bis 4 (=stark entwickelt). Wie aus Tabelle 3.36 ersichtlich wird, hatten die Patientengruppen zu Studienbeginn und im weiteren Verlauf TNM-Werte gleicher Größenordnung bei vergleichbarer Streuung. Die leichten Verbesserungen im Studienverlauf der T- und N-Werte ließen sich primär auf die chirurgische Entfernung des Tumors zurückführen (Tab.3.37).

Tabelle 3.37: Entwicklung der Tumorgröße und -Streuung bei den Patienten im Verlauf der Studie nach dem TNM-System. Aufgeführt sind die prätherapeutischen und die während der Studie ermittelten Werte für die jeweiligen Patientengruppe. Angaben: Mittelwert \pm Standardabweichung; n=Patienten-/Probandenzahl; M=Anzahl der Messungen

Gruppe	T	N	M
<i>Enzym, prätherapeutisch, n=8</i>	2,8 \pm 0,8	1,8 \pm 1,2	0,1 \pm 0,3
<i>Enzym, Studie, n=8, M=19</i>	2,5 \pm 1,1	1,7 \pm 1,1	0,1 \pm 0,3
<i>Vitamin-A, prätherapeutisch, n=5</i>	2,7 \pm 1,2	1,8 \pm 1,3	0 \pm 0
<i>Vitamin-A, Studie, n=5, M=7</i>	2,4 \pm 1,0	1,4 \pm 1,3	0 \pm 0
<i>Placebo, prätherapeutisch, n=3</i>	2,7 \pm 1,2	1,7 \pm 0,5	0 \pm 0
<i>Placebo, Studie, n=3, M=5</i>	2,2 \pm 1,5	1,4 \pm 0,8	0 \pm 0

⁸ SGOT = Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; erhöhte Werte u. a. bei Lebererkrankungen

⁹ SGPT = Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase; erhöhte Werte u. a. bei Lebererkrankungen

¹⁰ γ -GT = Gammaglutamyltranspeptidase, erhöhte Werte u. a. bei Lebererkrankungen

¹¹ AP = Alkalische Phosphatase, erhöhte Werte u. a. bei Lebererkrankungen

3.5.2 Immunologische Parameter, Gesamtübersicht

In den folgenden Abschnitten (3.5.2.1 – 3.5.2.5) werden die immunologischen Parameter der Gruppen, vom zeitlichen Verlauf unabhängig, verglichen.

3.5.2.1 T-Zellen

Die Immunphänotypisierungen ergaben eine statistisch signifikante Erhöhung des Anteils CD2- und CD3-positiver PBL in der Gruppe *Enzym* ($76\% \pm 10$ bzw. $67\% \pm 10$) gegenüber den Gruppen *Placebo* ($70\% \pm 7$ bzw. $58\% \pm 10$), *Prätherapeutisch* ($70\% \pm 12$ bzw. $59\% \pm 14$) und *Vitamin-A* ($69\% \pm 11$ bzw. $55\% \pm 12$). Die CD2- bzw. CD3-Werte der *Kontrollen* ($76\% \pm 7$ bzw. $65\% \pm 9$) waren vergleichbar zu denen der Gruppe *Enzym*. Der Anteil der CD4-positiven T-Lymphozyten war bei allen Patientengruppen (zwischen 27% und 33%) gegenüber dem Kontrollkollektiv ($38\% \pm 11$) signifikant erniedrigt. Zwischen den Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieses Parameters gefunden werden.

Die Quote CD8-positiver Lymphozyten betrug bei der Gruppe *Enzym* im Mittel $40\% \pm 10$. Dieser Wert war signifikant erhöht gegenüber den anderen Gruppen, mit Ausnahme der Gruppe *Placebo* ($38\% \pm 10$). Der Anteil aktivierter, d.h. CD25-positiver T-Zellen war bei den Probanden der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt im Vergleich zur Gruppe der prätherapeutischen Patienten. Innerhalb des Patientenkollektivs waren keine signifikanten Unterschiede in der CD-25-Expression auf T-Zellen zu finden.

Der Anteil CD4/CD8 doppelt positiver Zellen belief sich bei den Tumorpatienten auf $3\% \pm 2$, bei den Kontrollen auf $2\% \pm 2$. Signifikant erhöht im Vergleich zum Kontrollkollektiv war dieser Wert bei den Patienten zu Studienbeginn (*prätherapeutisch*; $3\% \pm 4$).

Die LAK-Aktivität konnte durch die verschiedenen Therapieformen nicht signifikant beeinflusst werden. Die Meßwerte lagen bei allen Gruppen, bei großer Standardabweichung, auf einem vergleichbaren Niveau. Lediglich die LAK-Aktivität der Kontrollgruppe ($16\% \pm 11$) war im Vergleich zu den prätherapeutischen Werten der Patienten ($12\% \pm 10$) statistisch signifikant erhöht (Tab. 3.38 3.39).

3.5.2.2 B-Zellen

CD19 ist ein spezifischer B-Zellmarker. Der Anteil CD19-positiver Zellen war bei der Gruppe *Enzym* ($8\% \pm 7$) signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrollen, den prätherapeutischen Werten und der *Placebo*-Gruppe. Ebenfalls signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Gruppen *Kontrolle* ($11\% \pm 3$) und *Placebo* ($13\% \pm 5$) war der B-Zellanteil bei Patienten der *Vitamin-A*-Gruppe.

Für B-Zellen, die den IL-2-Rezeptor exprimieren ($CD27^-/CD25^+$; hauptsächlich aktivierte B-Zellen) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden (*Enzym* ($4\% \pm 5$), *Vitamin-A* ($4\% \pm 2$), *Placebo* ($4\% \pm 2$), *prätherapeutisch* ($6\% \pm 9$), *Kontrollen* ($3\% \pm 2$)) (Tab. 3.38; 3.39).

3.5.2.3 NK-Zellen

Die natürlichen Killerzellen werden durch das Antigen CD56 charakterisiert. Der Anteil CD56-positiver Zellen betrug bei den *Kontrollen* $24\% \pm 11$ und unterschied sich nicht signifikant von den prozentualen Anteilen bei prätherapeutischen Patienten ($24\% \pm 10$), der

Enzym- ($23\% \pm 8$), der *Vitamin-A*- ($27\% \pm 8$) und der *Placebo*-Gruppe ($19\% \pm 8$). Letztgenannter Wert war signifikant erniedrigt gegenüber der *Vitamin-A*-Gruppe.

Die NK-LAK-Zellaktivität erreichte bei allen Probanden ein ähnliches Niveau (ca. $64\% \pm 22$), es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Tab. 3.38; 3.39).

3.5.2.4 Aktivierungs- bzw. Zellreifungsparameter (CD45, CD45R0, HLA-DR)

CD45 ist ein ubiquitäres Protein, das auf allen Leukozytensubpopulationen zu finden ist. Der Anteil CD45-positiver PBL war bei *Kontrollen* ($96\% \pm 5$) signifikant gesteigert gegenüber den Gruppen *prätherapeutisch* ($93\% \pm 6$), *Vitamin-A* ($91\% \pm 7$) und *Placebo* ($92\% \pm 9$). Für die *Enzym*-Gruppe ($96\% \pm 2$) konnten signifikante Erhöhungen im Vergleich zu *Vitamin-A* und *Placebo* errechnet werden.

CD45R0 ist eine Isoform des CD45-Antigens und wird hauptsächlich auf B-, bzw. T-Gedächtniszellen exprimiert. Der Anteil CD45R0-positiver Zellen war bei den Gruppen *Kontrolle* ($45\% \pm 10$) und *prätherapeutisch* ($47\% \pm 14$) signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Gruppen *Enzym* ($56\% \pm 11$) und *Vitamin-A* ($53\% \pm 7$).

HLA-DR wird von aktivierten B-, bzw. T-Zellen exprimiert. Dieser Marker war bei dem Kontrollkollektiv ($16\% \pm 4$) signifikant erniedrigt gegenüber den anderen Gruppen (*Enzym* ($27\% \pm 13$), *Vitamin-A* ($23\% \pm 10$), *Placebo* ($30\% \pm 10$), *prätherapeutisch* ($24\% \pm 12$)) (Tab. 3.38; 3.39).

3. Ergebnisse

Tabelle 3.38: Funktion, Rezeptorstatus und Verteilung der Lymphozytensubpopulationen bei Patienten und Kontrollen unabhängig vom zeitlichen Verlauf.

Dargestellt sind Mittelwerte [%]± Standardabweichung. n=Patienten-/Probandenzahl; M=Anzahl der Messungen

Gruppe	CD2	CD3	CD4	CD8	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	CD2 ⁺ / CD25 ⁺	LAK- Aktivi- tät	CD19	CD2/ CD25 ⁺	CD56	NK-LAK Zell- Aktivität	CD45	CD45 R0	HLA- DR
Enzym n=8, M=41	76 ±10	67 ±10	32 ±12	40 ±10	3 ± 2	20 ± 8	14 ± 9	8 ± 7	4 ± 5	23 ± 8	63 ±24	96 ± 2	56 ±11	27 ±13
Vit.-A n=5, M=18	69 ±11	55 ±12	30 ±11	29 ±11	3 ± 2	17 ± 7	20±19	7 ± 4	4 ± 2	27 ± 8	68 ±22	91 ± 7	53 ± 7	23 ±10
Placebo n=3, M=12	70 ± 7	58 ±10	27 ± 7	38 ±10	3 ± 2	19 ± 7	12 ±7	13 ± 5	4 ± 2	19 ± 8	70 ±19	92 ± 9	48 ±12	30 ±10
Prätherap n=25, M=25	70 ±12	59 ±14	33 ±13	32 ± 8	3 ± 4	21 ± 8	12±10	13±11	6 ± 9	24 ±10	61±24	93 ± 6	47 ±14	24 ±12
Kontrolle n=15, M=126	76 ± 7	65 ± 9	38 ±11	32 ± 7	2 ± 2	17 ± 6	16±11	11 ± 3	3 ± 2	24 ±11	61 ±23	96 ± 5	45 ±10	16 ± 4

Tabelle 3.39: Signifikanzüberprüfung.

*** = p<0,005; ** = p<0,01; * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; ↑= Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) ; ↓= Wert ist niedriger; n=Patienten-/Probandenzahl; M=Anzahl der Messungen

Enzym vs. n=8, M=41	CD2	CD3	CD4	CD8	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	CD2 ⁺ / CD25 ⁺	LAK- Aktivität	CD19	CD2/ CD25 ⁺	CD56	NK-LAK Aktivität	CD45	CD45 R0	HLA- DR
Vit.-A n=5, M=18	*** ↓	*** ↓	n.s.	*** ↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	** ↓	n.s.	n.s.
Placebo n=3, M=12	** ↓	*** ↓	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Prätherap n=25, M=25	* ↓	* ↓	n.s.	*** ↓	n.s.	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.	n.s.	n.s.	* ↓	* ↓	n.s.
Kontrolle n=15, M=126	n.s.	n.s.	** ↑	*** ↓	*** ↓	n.s.	n.s.	*** ↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*** ↓	*** ↓
Vit.-A vs. n=5, M=18	CD2	CD3	CD4	CD8	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	CD2 ⁺ / CD25 ⁺	LAK- Aktivität	CD19	CD2/ CD25 ⁺	CD56	NK-LAK Aktivität	CD45	CD45 R0	HLA- DR
Placebo n=3, M=12	n.s.	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.	n.s.	n.s.	** ↑	n.s.	* ↓	n.s.	n.s.	n.s.	* ↑
Prätherap n=25, M=25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*** ↓	n.s.
Kontrolle n=15, M=126	*** ↑	*** ↑	* ↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*** ↑	n.s.	n.s.	n.s.	*** ↑	*** ↓	*** ↓
Placebo vs. n=3, M=12	CD2	CD3	CD4	CD8	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	CD2 ⁺ / CD25 ⁺	LAK- Aktivität	CD19	CD2/ CD25 ⁺	CD56	NK-LAK Aktivität	CD45	CD45 R0	HLA- DR
Prätherp n=25, M=25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Kontrolle n=15, M=126	*** ↑	* ↑	*** ↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	* ↑	n.s.	*** ↓
Prätherp vs. n=25, M=25	CD2	CD3	CD4	CD8	CD4 ⁺ / CD8 ⁺	CD2 ⁺ / CD25 ⁺	LAK- Aktivität	CD19	CD2/ CD25 ⁺	CD56	NK-LAK Aktivität	CD45	CD45 R0	HLA- DR
Kontrolle n=15, M=126	*** ↑	* ↑	p=0,07 ↑	n.s.	** ↓	** ↓	** ↑	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	** ↑	n.s.	*** ↓

3.5.2.5 Relative Anteile der Leukozytensubpopulationen (PBL, PMNL, Monozyten) im peripheren Blut

Anhand der *FACS*-Daten konnte als zusätzlicher Parameter die relativen Anteile der Leukozytensubpopulationen, d.h. das Verhältnis von PBL zu PMNL zu Monozyten berechnet werden (PMNL+PBL+Monozyten=100%). Dieses Verfahren läßt jedoch keine Aussage über die absoluten Zellzahlen zu.

Verglichen mit den Gruppen *Enzym* (18%±12), *Vitamin-A* (16%±6) und *prätherapeutisch* (15%±7) zeigte sich ein signifikant höherer PBL-Anteil bei den *Kontrollen* (23%±7).

Der Anteil der Monozyten betrug bei allen Gruppen im Schnitt 8%±4, die PMNL-Quote hat sich bei den Patienten dementsprechend erhöht (Tab. 3.40).

Tabelle 3.40: Verteilung der Leukozytensubpopulationen bei den Patientengruppen und dem Kontrollkollektiv. In dem oberen Tabellenteil sind Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. In dem unteren Tabellenteil ist die Signifikanzüberprüfung aufgeführt. n=Patienten-/Probandenzahl; M=Anzahl der Messungen¹²; **** = p<0,0001; *** = p<0,005; ** = p<0,01; * = p<0,05; n.s. = nicht signifikant; ↑= Wert ist höher als in der Bezugsgruppe (grau unterlegt) ; ↓= Wert ist niedriger

Gruppe	PBL [%]	PMNL [%]	Monozyten [%]
<i>Kontrolle</i> , n=15, M=118	23 ± 7	70 ± 7	7 ± 4
<i>Enzym</i> , n=8, M=34	18 ± 12	74 ± 11	8 ± 4
<i>Vitamin-A</i> , n=5, M=16	16 ± 6	76 ± 7	8 ± 3
<i>Placebo</i> , n=3, M=9	18 ± 9	63 ± 11	9 ± 3
<i>Prätherapeutisch</i> , n=25, M=25	15 ± 7	78 ± 12	7 ± 4
Statistik			
<i>Kontrolle vs.</i>	PBL	PMNL	Monozyten
<i>Enzym</i>	*** ↓	** ↑	n.s.
<i>Vitamin A</i>	* ↓	** ↑	n.s.
<i>Placebo</i>	* ↓	n.s.	n.s.
<i>Prätherapeutisch</i>	**** ↓	**** ↑	n.s.
<i>Enzym vs.</i>	PBL	PMNL	Monozyten
<i>Vitamin A</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Placebo</i>	n.s.	* ↓	n.s.
<i>Prätherapeutisch</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Vitamin A vs.</i>	PBL	PMNL	Monozyten
<i>Placebo</i>	n.s.	* ↓	n.s.
<i>Prätherapeutisch</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Placebo vs.</i>	PBL	PMNL	Monozyten
<i>Prätherapeutisch</i>	n.s.	** ↑	n.s.

¹² Abweichungen gegenüber Angaben in vorhergegangenen Tabellen sind auf fehlerhafte Disketten zurückzuführen, es war somit nicht immer möglich alle *FACS*-Messungen nachträglich auszuwerten.

3.5.3 Lymphozyten- und Leukozytensubpopulationen im zeitlichen Verlauf

Im folgenden wird die Entwicklung der Lymphozytensubpopulationen (B-, T-, NK-Zellen) und der Leukozytensubpopulationen (PBL, PMNL, Monozyten) der Studienteilnehmer im zeitlichen Verlauf betrachtet. Anzahl der Patienten bzw. Probanden pro Messpunkt sind in Tabelle 3.41 aufgeführt. Da die Patientenzahlen mit fortlaufender Studiendauer abnahm, können nur die Daten von fünf aufeinanderfolgenden Messpunkten (MP) zum Vergleich herangezogen werden.

Tabelle 3.41: Patienten-/Probandenzahl pro Gruppe und Messpunkt.

Gruppe	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i>	n=8	n=8	n=8	n=8	n=6
<i>Vitamin-A</i>	n=5	n=5	n=5	n=4	n=3
<i>Placebo</i>	n=3	n=3	n=3	n=3	Keine Daten
<i>Kontrolle</i>	n=15	n=15	n=15	n=15	n=15

3.5.3.1 T-Lymphozyten (CD3⁺)

Anhand des Markers CD3 wurde der T-Zellanteil im peripheren Blut der Studienteilnehmer während des Studienverlaufs ermittelt.

Dieses Antigen ist essentiell für die Funktion des T-Zell-Rezeptors und wird von sämtlichen T-Lymphozyten exprimiert. Das ebenfalls ubiquitär von T-Zellen synthetisierte CD2-Antigen kann in einem gewissen Umfang auch von Natürlichen Killerzellen gebildet werden und ist deshalb nicht als spezifischer T-Zellmarker geeignet.

Die Erhöhung des T-Zellanteils im peripheren Blut bei Patienten der Gruppe *Enzym* ließ sich auch im zeitlichen Verlauf nachweisen. Der CD3-Wert der Gruppe *Enzym* ($64\% \pm 10$) lag zu Studienbeginn über den Werten der Gruppen *Vitamin-A* ($54\% \pm 15$) und *Placebo* ($52\% \pm 10$). In der *Enzym*gruppe stieg der Anteil CD3⁺-PBL von dem Ausgangswert (MP1) auf einen Maximalwert von $72\% \pm 5$ an MP3. Dieser Wert war gegenüber MP1 signifikant erhöht (Abb. 3.12a, 3.12b).

Im Vergleich zu den Gruppen *Vitamin-A* und *Placebo* ergab sich eine signifikante Zunahme des T-Zellanteils bei der *Enzym*gruppe zu Messpunkt 3 ($59\% \pm 6$ bzw. $59\% \pm 8$), gegenüber *Vitamin-A* zudem auch zu den Messpunkten 4 ($68\% \pm 9$ vs. $56\% \pm 9$) und 5 ($68\% \pm 6$ vs. $45\% \pm 20$). Gegenüber der Kontrollgruppe, deren Werte von $72\% \pm 8$ an MP1 auf $61\% \pm 10$ an MP5 abnahmen, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb 3.12.d).

Die CD3-Werte der Gruppen *Vitamin-A* und *Placebo* streuten von MP1 bis MP4 um vergleichbare Mittelwerte, es ergaben sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, noch absicherbare Änderungen gegenüber den Ausgangswerten (Abb. 3.12c).

An MP5 war bei den *Vitamin-A*-Patienten ein starkes Sinken des Anteil CD3-positiver PBL zu verzeichnen ($45\% \pm 20$), dieser Abfall war gegenüber den vorhergegangenen Messpunkten statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zu der Gruppe *Kontrollen* waren die CD3-Werte der *Vitamin-A*-Gruppe an MP1, MP2 und MP5 signifikant erniedrigt, die der *Placebo*-Gruppe an MP2 (Abb. 3.12d).

Bei den *Kontrollen* war ein kontinuierliches Absinken der CD3-Werte festzustellen, der Abfall von $72\% \pm 7$ an MP2 auf $61\% \pm 10$ an MP5 war statistisch absicherbar (3.12d).

Abbildung 3.12 a-d: Anteil CD3-positiver PBL [%] bei Kontrollen und Patienten unter Enzym-, Vitamin-A oder Placebo-Medikation im zeitlichen Verlauf. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Messpunkten betrug ca. 6 Wochen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Messpunkt (MP) 1 entspricht der Eingangsuntersuchung. * = $p < 0,05$ vs. Vergleichsgruppe; ** = $p < 0,01$ vs. Vergleichsgruppe; # = $p < 0,05$ vs. MP1 der Gruppe

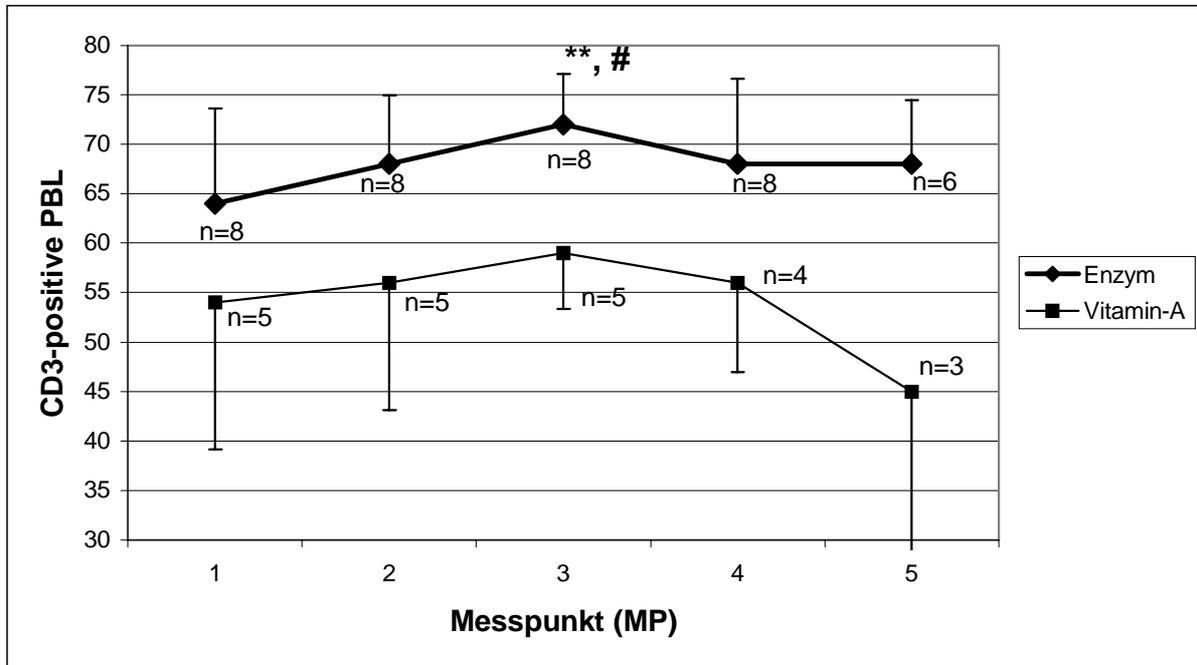


Abb.3.12.a: Vergleich der CD3-Werte im zeitlichen Verlauf: *Enzym* vs. *Vitamin-A*. Signifikante Erhöhung der CD3-Werte der Gruppe *Enzym* gegenüber MP1 an MP3, gegenüber *Vitamin-A* an MP3, MP4, MP5.

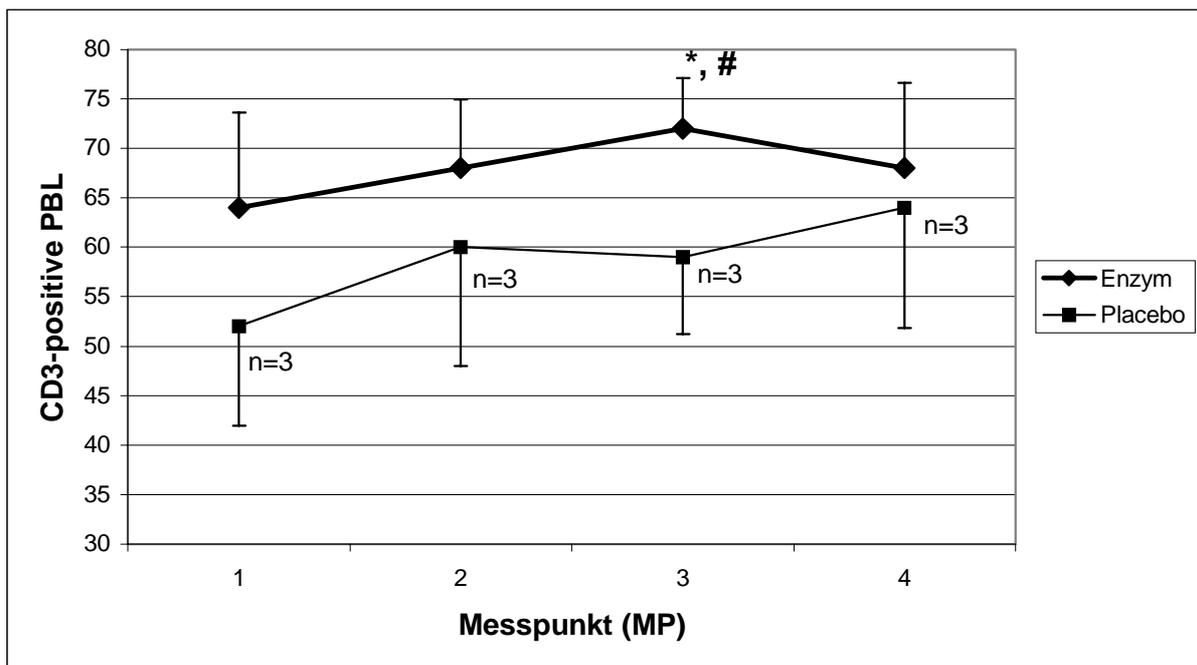


Abb.3.12.b: Vergleich der CD3-Werte im zeitlichen Verlauf: *Enzym* vs. *Placebo*. Signifikante Erhöhung der CD3-Werte der Gruppe *Enzym* an MP3 gegenüber *Placebo*.

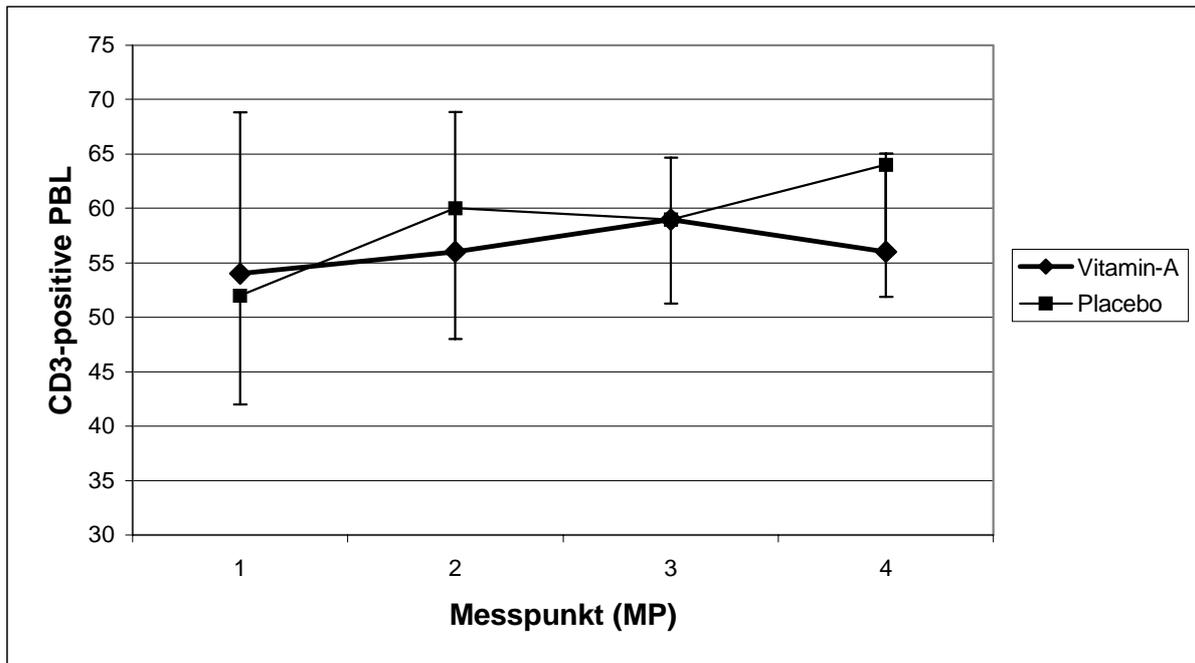


Abb.3.12.c: Vergleich der CD3-Werte im zeitlichen Verlauf: *Vitamin-A* vs. *Placebo*. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden werden.

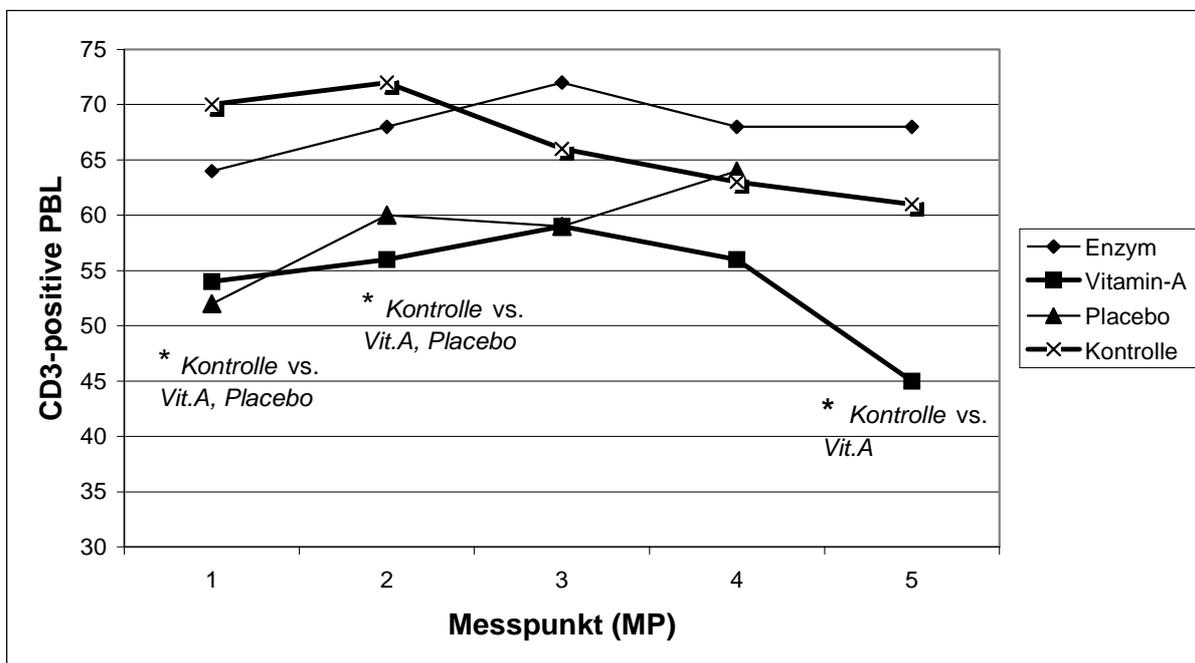


Abb.3.12.d: Vergleich der CD3-Werte im zeitlichen Verlauf: *Kontrolle* vs. *Enzym*, *Vitamin-A*, *Placebo*. Signifikant erhöhte CD3-Werte der Kontrollen gegenüber Vitamin-A an MP1, MP2, MP3, gegenüber Placebo an MP1.

Tabelle 3.42: T-Zellparameter CD2, CD4, CD8, CD25 und LAK-Aktivität bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf. Angaben: Anteil an Gesamtlymphozyten (Mittelwert [%]) \pm Standardabweichung; bei LAK-Aktivität: spez.Targetzelyse (Mittelwert [%]) \pm Standardabweichung; * = $p < 0,05$ vs. Gruppe (1-4); # = $p < 0,05$ vs. MP(1-5) aus gleicher Gruppe. Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

CD4 ⁺	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	30 \pm 11; *vs. 4	31 \pm 9; * vs. 4	38 \pm 13	32 \pm 11	31 \pm 11
<i>Vitamin-A</i> (2)	37 \pm 15	32 \pm 9; * vs.4	29 \pm 11	32 \pm 8	29 \pm 17
<i>Placebo</i> (3)	31 \pm 4	31 \pm 4; * vs.4	28 \pm 6	28 \pm 3	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	43 \pm 9	47 \pm 9	42 \pm 8	36 \pm 9; # vs. MP 2	32 \pm 10; # vs. MP 1, 2, 3
CD8 ⁺	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	34 \pm 6	41 \pm 9; * vs. 4	39 \pm 10	41 \pm 8, * vs. 2	40 \pm 9
<i>Vitamin-A</i> (2)	29 \pm 9	30 \pm 11	36 \pm 7	19 \pm 4; # vs. MP3	22 \pm 6
<i>Placebo</i> (3)	34 \pm 7	40 \pm 10	42 \pm 8	39 \pm 9	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	31 \pm 6	28 \pm 5; # vs.MP 5	30 \pm 5	35 \pm 8	35 \pm 6
CD2 ⁺	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	70 \pm 9; * vs. 4	74 \pm 7; * vs. 4	79 \pm 5;#vs.MP1	78 \pm 5	75 \pm 9
<i>Vitamin-A</i> (2)	68 \pm 8; * vs. 4	73 \pm 5; * vs. 4	75 \pm 3	67 \pm 5	50 \pm 18; # vs. MP2, 3
<i>Placebo</i> (3)	71 \pm 6	74 \pm 7	74 \pm 4	72 \pm 6	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	81 \pm 4	80 \pm 5	77 \pm 5	76 \pm 8	74 \pm 9
CD2 ⁺ CD25 ⁺	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	21 \pm 7	22 \pm 8; * vs. 4	22 \pm 8	22 \pm 8; *vs. 4	17 \pm 8
<i>Vitamin-A</i> (2)	23 \pm 10	15 \pm 6	15 \pm 6	17 \pm 5	15 \pm 7
<i>Placebo</i> (3)	26 \pm 3; * vs. 4	23 \pm 6	18 \pm 5	19 \pm 7	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	17 \pm 6	15 \pm 5	17 \pm 5	13 \pm 5	14 \pm 5
LAK-Aktivität	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	10 \pm 6	13 \pm 9	13 \pm 10	17 \pm 9	10 \pm 6
<i>Vitamin-A</i> (2)	23 \pm 13	26 \pm 13	12 \pm 5	12 \pm 12	9 \pm 4
<i>Placebo</i> (3)	22 \pm 20	15 \pm 3	11 \pm 4	7 \pm 2	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	13 \pm 6	15 \pm 7	14 \pm 8	14 \pm 9	14 \pm 7

Im folgenden wird die Verteilung der T-Helfer-Zellen (CD4⁺), der zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺), des IL-2-Rezeptors (CD25⁺), des LFA2-Antigens (CD2) und die LAK-Aktivität bei Patienten und Probanden während des Studienverlaufs näher betrachtet (Tab.3.42).

Bei *Kontrollen* war der Anteil CD4-positiver Lymphozyten zu jeder Untersuchung höher als bei den Patientengruppen, signifikant waren die Unterschiede an MP2 gegenüber dem gesamten Patientenkollektiv (*E*: 31% \pm 9; *V-A*: 32% \pm 9; *Plac*: 31% \pm 4), an MP1 gegenüber der Gruppe *Enzym* (30% \pm 11). Die Abnahme der CD4-Werte bei *Kontrollen* an MP5 (32% \pm 10) war signifikant gegenüber MP1 (43% \pm 9), MP2 (47% \pm 9) und MP3 (42% \pm 8).

Die CD8-Werte verhalten sich umgekehrt zu den CD4-Werten. Dieser Wert war bei den Gruppen *Enzym* und *Placebo* durchgängig gegenüber den *Kontrollen* erhöht, signifikant war dies für *Enzym* an MP2 (41% \pm 9 vs. 28% \pm 5). Die CD8-Werte der *Vitamin-A*-Gruppe waren an MP4 (19% \pm 4) signifikant erniedrigt gegenüber MP3 (36% \pm 7) und dem MP4-Wert der *Enzym*gruppe (41% \pm 8).

Die CD2-Werte der Studienteilnehmer entwickelten sich ähnlich zu den zuvor besprochenen CD3-Werten. In der Gruppe *Enzym* kam es zu einem signifikanten Anstieg des CD2-Wertes von MP1 (70% \pm 9) zu MP3 (79% \pm 5), bei *Vitamin-A* konnte ein signifikanter Abfall von MP3 (75% \pm 3) zu MP5 (50% \pm 18) beobachtet werden (jeweils $p < 0,05$). Der Anteil CD2-positiver PBL bei *Kontrollen* war an MP1 (*Kon*: 81% \pm 4 vs. *V-A*: 68% \pm 8; *E*: 70 \pm 9) und MP2 (*Kon*:

80%±5 vs. V-A: 73%±5; E: 74±7) gegenüber *Enzym* und *Vitamin-A* signifikant erhöht (jeweils $p < 0,05$).

Der IL-2-Rezeptor (CD25) wurde verstärkt auf CD2-positiven Lymphozyten der Patientengruppen exprimiert. Statistisch signifikant (alle $p < 0,05$) war dies an MP1 (*Plac*: 26%±3 vs. *Kon*: 17%±6), MP2 (*E*: 22%±8 vs. *Kon*: 15%±5) und MP4 (*E*: 22%±8 vs. *Kon*: 13%±5).

Die LAK-Werte streuten bei den Patientengruppen breit um vergleichbare Mittelwerte. Die Spanne der Messwerte war bei den Gruppen *Vitamin-A* und *Placebo* an MP1 gegenüber den Kontrollen stark erhöht aber nicht signifikant erhöht (*Kon*: 13%±6 vs. *V-A*: 23%±13; *Plac*: 22%±20).

3.5.3.2 B-Lymphozyten (CD19⁺)

Die Kurvenverläufe der CD19-Werte waren bei den Patientengruppen sehr ähnlich. Ausgehend von einem höheren Anfangswert (*E*: 11%±5; *V-A*: 13%±7; *Plac*: 10%±5) sanken die CD19-Werte leicht ab und befanden sich bei allen Patienten auf einem vergleichbaren Niveau. Sowohl innerhalb der Gruppen, als auch untereinander konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Der CD19-Wert betrug bei *Kontrollen* zu Studienbeginn 8%±3, die Werte an MP4 und MP5 (jeweils 11%±4) waren gegenüber MP1 signifikant erhöht. Die CD19-Werte der Kontrollen waren an den Messpunkten 2 – 5 höher als die entsprechenden Patientenwerte. An MP5 ergab sich ein signifikanter Unterschied zu der Gruppe *Vitamin-A* (*Kon*: 11%±4 vs. *V-A*: 5%±2; $p < 0,05$) (Tab. 3.43).

Tabelle 3.43: B-Zellparameter CD19 bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.

Angaben: Anteil an Gesamtlymphozyten (Mittelwert [%]) ± Standardabweichung; * = $p < 0,05$ vs. Gruppe (1-4); # = $p < 0,05$ vs. MP(1-5) aus gleicher Gruppe. Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

CD19 ⁺	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	11±5	7±4	7±6	7±5	7±3
<i>Vitamin-A</i> (2)	13±7	8±4	7±4	9±5	5±2; * vs.4
<i>Placebo</i> (3)	10±5	8±7	10±4	9±3	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	8±3;#vs.MP4,5	10±3	11±3	11±4	11±4,#vs.MP1;* vs. 2

Die Antigene HLA-DR und CD45R0 können sowohl von B-, als auch T-Zellen exprimiert werden. HLA-DR ist auf aktivierten B- und T-Lymphozyten zu finden. CD45R0 charakterisiert B- und T-Gedächtniszellen.

Im Rahmen der durchflußzytometrischen Untersuchungen wurde der Anteil der Zellen bestimmt, die für HLA-DR bzw. CD45R0 positiv sind. Es konnte nicht zwischen B-, bzw. T-Lymphozyten differenziert werden.

Die Anteile HLA-DR-positiver PBL waren bei den Patienten an allen Messpunkten gegenüber den *Kontrollen* erhöht. Statistisch signifikant war dies an MP1 (*E*: 26%±12 vs. *Kon*: 14%±3; $p < 0,05$), MP2 (*Plac*: 31%±9 vs. *Kon*: 13%±3; $p < 0,05$), MP3 (*Plac*: 33%±3, *V-A*: 29%±14 vs. *Kon*: 15%±4; $p < 0,05$), MP4 (*Plac*: 34%±3 vs. *Kon*: 16%±3; $p < 0,05$) und MP5 (*E*: 30%±11 vs. *Kon*: 14%±4; $p < 0,05$). Zwischen den Patientengruppen konnten keine statistisch absicherbaren Unterschiede gefunden werden. Tendenziell waren jedoch die HLA-DR-Werte der Gruppe *Vitamin-A* gegenüber *Enzym* und *Placebo* erniedrigt (Tab. 3.44).

Der Anteil CD45R0-positiver PBL streute bei den Studienteilnehmern zwischen 40% und 60%, mit tendentiell höheren Werten bei den Patientengruppen. Bei *Kontrollen* stieg der CD45R0-Mittelwert nicht über 50%, während bei den Patienten der Gruppen *Vitamin-A* und *Enzym* die 50%-Marke nur zu Studienbeginn unterschritten wurde. An MP4 wiesen die Patienten in der Gruppe *Enzym* ($57\% \pm 11$) einen signifikant erhöhten CD45R0-Wert gegenüber dem *Kontrollkollektiv* ($42\% \pm 11$) auf ($p < 0,05$) (Tab 3.44).

Tabelle 3.44: B- und T-Zellparameter HLA-DR und CD45R0 bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.

Angaben: Anteil an Gesamtlymphozyten (Mittelwert [%]) \pm Standardabweichung; * = $p < 0,05$ vs. Gruppe (1-4); # = $p < 0,05$ vs. MP(1-5) aus gleicher Gruppe. Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

HLA-DR +	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	26 \pm 12; *vs. 4	23 \pm 8	18 \pm 9; # vs. MP 5	23 \pm 10	30 \pm 11; *vs. 4
<i>Vitamin-A</i> (2)	20 \pm 8	17 \pm 6	29 \pm 14; # vs. MP5	22 \pm 4	18 \pm 4; # vs. MP3
<i>Placebo</i> (3)	26 \pm 11	31 \pm 9; *vs. 4	33 \pm 3; *vs. 4	34 \pm 3; *vs. 4	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	14 \pm 3	13 \pm 3	15 \pm 4; *vs. 2	16 \pm 3	14 \pm 4
CD45R0	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	48 \pm 14	57 \pm 11	58 \pm 11	57 \pm 11; *vs.4	53 \pm 10
<i>Vitamin-A</i> (2)	49 \pm 9	55 \pm 6	53 \pm 3	51 \pm 2	50 \pm 12
<i>Placebo</i> (3)	54 \pm 6	58 \pm 11	51 \pm 12	52 \pm 8	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	45 \pm 12	46 \pm 10	45 \pm 9	42 \pm 11	46 \pm 10

3.5.3.3 Natürliche Killerzellen (CD56⁺)

Die Messungen ergaben einen erhöhten NK-Zellanteil bei Patienten der *Vitamin-A*-Gruppe gegenüber den Patienten der anderen Gruppen bis zu MP4. An MP2 war der CD56-Wert gegenüber den *Kontrollen* signifikant erhöht (*V-A*: $28\% \pm 4$ vs. *Kon*: $17\% \pm 3$; $p < 0,05$), jedoch nicht gegenüber den anderen Patientengruppen. Die CD56-Werte der Gruppen *Enzym* und *Placebo* verliefen annähernd gleichförmig und streuten um einen Mittelwert von ca. 20%.

Fast parallel verlief die Entwicklung der CD56-Werte bei der *Kontroll*- und der *Enzym*-Gruppe, von $20\% \pm 8$ (beide Gruppen) an MP1 bis $29\% \pm 4$ (*Kon*) bzw. $28\% \pm 5$ (*E*) an MP5. Der CD56-Anstieg bei *Kontrollen* von $18\% \pm 3$ (MP2) auf $29\% \pm 4$ (MP5) war statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Tab 3.45).

Tabelle 3.45: NK-Zellparameter CD56 bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.

Angaben: Anteil an Gesamtlymphozyten (Mittelwert [%]) \pm Standardabweichung; * = $p < 0,05$ vs. Gruppe (1-4); # = $p < 0,05$ vs. MP(1-5) aus gleicher Gruppe. Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

CD56+	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	20 \pm 8	18 \pm 4	22 \pm 6	23 \pm 5	28 \pm 3
<i>Vitamin-A</i> (2)	27 \pm 7	28 \pm 4 ; * vs. 4	28 \pm 4	27 \pm 5	22 \pm 2
<i>Placebo</i> (3)	20 \pm 8	21 \pm 7	22 \pm 4	18 \pm 3	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	20 \pm 8	17 \pm 3; # vs. MP5	19 \pm 3; *vs. 2	26 \pm 4	29 \pm 4 ; # vs. MP2

Die lytische Aktivität der NK-LAK-Zellen unterlag bei allen Gruppen starken Schwankungen. Es konnten keine statistisch absicherbaren Unterschiede gefunden werden. Die NK-LAK-Werte der Gruppen *Kontrollen*, *Enzym*, *Placebo* streuten um eine mittlere Aktivität von ca. 60%. Die NK-LAK-Aktivität der Patienten der *Vitamin-A*-Gruppe lag durchschnittlich bei 70% (Tab.3.46).

Tabelle 3.46: NK-LAK-Aktivität bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.

Angaben: spez.Targetzelyse (Mittelwert [%]) \pm Standardabweichung; Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

NK-LAK-Aktivität	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	60 \pm 26	63 \pm 30	59 \pm 30	58 \pm 23	63 \pm 17
<i>Vitamin-A</i> (2)	79 \pm 16	74 \pm 16	69 \pm 17	50 \pm 29	73 \pm 11
<i>Placebo</i> (3)	61 \pm 17	75 \pm 9	70 \pm 14	62 \pm 16	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	67 \pm 16	64 \pm 19	58 \pm 20	51 \pm 22	63 \pm 19

3.5.3.4 PBL (CD45⁺)

Im Studienverlauf konnte gezeigt werden, daß der PBL-Anteil bei *Kontrollen* oftmals signifikant erhöht war gegenüber den Patienten (MP1: *Kon* vs. *E*, *V-A*, *Plac*, $p < 0,05$; MP2, MP3: *Kon* vs. *E*, *V-A*, $p < 0,05$; MP5: *Kon* vs. *V-A*, $p < 0,05$). Eine Erhöhung des PBL-Anteils von 12% \pm 5 auf 19% \pm 9 war bei der Gruppe *Enzym* von MP1 bis MP4 zu finden. Der PBL-Anteil betrug bei den *Vitamin-A*-Patienten durchschnittlich 12%, bei dem *Placebo*kollektiv schwankte dieser Wert zwischen 10% \pm 4 (MP1) und 24% \pm 5 (MP2); der Anstieg von MP1 zu MP2 war statistisch signifikant ($p < 0,05$) (Tab. 3.47).

Der Anteil CD45-positiver PBL stieg bei der *Enzym*gruppe signifikant von 92% \pm 5 (MP1) auf 98% \pm 1 (MP5). Damit lagen die CD45-Werte der *Enzym*gruppe ab MP3 auf dem gleichen Niveau wie die entsprechenden Werte des Kontrollkollektivs. Der Anteil CD45-positive PBL war in den Gruppen *Vitamin-A*- und *Placebo* verringert. Die CD45-Werte der *Vitamin-A*-Gruppe waren im Vergleich zu den anderen Gruppen an MP4 signifikant erniedrigt, die der *Placebo*-Patienten gegenüber den *Kontrollen* an MP 3 (jeweils $p < 0,05$) (Tab. 3.47).

Tabelle 3.47: PBL-Anteil und CD45-positive PBL bei Patienten und Kontrollen im zeitlichen Verlauf.

PBL: Anteil an Gesamtleukozyten, Mittelwert [%] \pm Standardabweichung; CD45+: Anteil CD45-positiver PBL, Mittelwert [%] \pm Standardabweichung; * = $p < 0,05$ vs. Gruppe (1-4); # = $p < 0,05$ vs. MP (1-5) aus gleicher Gruppe. Gruppen: *Enzym*=1; *Vitamin-A*=2; *Placebo*=3; *Kontrolle*=4

PBL	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	12 \pm 5; * vs. 4	16 \pm 7; * vs. 4	19 \pm 9; * vs. 4	19 \pm 13	15 \pm 8
<i>Vitamin-A</i> (2)	11 \pm 3; * vs. 4	12 \pm 3; * vs. 4, 3	16 \pm 3; * vs. 4	11 \pm 5	11 \pm 4; * vs. 4
<i>Placebo</i> (3)	10 \pm 4; * vs. 4	24 \pm 5; # vs. MP1	20 \pm 4	17 \pm 3	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	22 \pm 4; # vs. MP5	25 \pm 3; # vs. MP5	25 \pm 5; # vs. MP5	21 \pm 4	19 \pm 3
CD45+ (PBL)	Messpunkt 1	Messpunkt 2	Messpunkt 3	Messpunkt 4	Messpunkt 5
<i>Enzym</i> (1)	92 \pm 5; # vs. MP5	91 \pm 13	96 \pm 3	97 \pm 2; * vs. 2	98 \pm 1
<i>Vitamin-A</i> (2)	92 \pm 4; * vs. 4	92 \pm 7	93 \pm 5	91 \pm 2	89 \pm 10
<i>Placebo</i> (3)	90 \pm 10	88 \pm 7	85 \pm 8; * vs. 4	97 \pm 1; * vs. 2	Keine Daten
<i>Kontrolle</i> (4)	97 \pm 3	97 \pm 3	96 \pm 4	96 \pm 2; * vs. 2	96 \pm 3

3.5.4 Begleituntersuchungen

Untersuchungen bezüglich des Allgemeinbefindens, Nebenwirkungen und der Compliance ergaben folgendes:

Nebenwirkungen traten bei zwei Patienten des *Vitamin-A*-Kollektivs auf, 1 Patient mußte aufgrund verschlechterter Leberwerte aus der Studie ausgeschlossen werden, ein weiterer Patient wegen juckender Exantheme.

Über zeitweilige Übelkeit klagte ein Patient aus der *Enzym*-Gruppe. Ein Patient der *Placebo*-Gruppe litt an erhöhten Leberwerten.

Die Patienten des *Enzym*-Kollektivs blieben frei von Begleiterkrankungen, in den beiden anderen Gruppen trat jeweils ein Fall auf (chronische Bronchitis bei *Placebo*, Magengeschwür bei *Vitamin-A*)

Keine Unterschiede zwischen den Gruppen konnten bezüglich der Kriterien Müdigkeit, Allgemeinbefinden, Haarausfall, Haut- und Gewichtsveränderungen festgestellt werden.

Die durchschnittliche Compliance lag in der Gruppe *Enzym* bei 71%, in der Gruppe *Vitamin-A* bei 68% und in der *Placebogruppe* bei 65%.

4. Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß einer unterstützenden, systemischen Vitamin-A oder Enzymtherapie auf das periphere, zelluläre Immunsystem bei Patienten mit Plattenepitheltumoren im Kopf-/Halsbereich mittels Immunphänotypisierung und Funktionsanalyse zu untersuchen.

Im zweiten Teil sollte der Einfluß der Medikationen auf die Funktion und den Phänotyp peripherer Leukozyten *in vitro* untersucht werden, um Erkenntnisse über Dosierungen, Wirkdauer und Wirkmechanismen zu erlangen. Für diese Untersuchungen wurden durchflußzytometrische Methoden zur Bestimmung der NK-Zell-, NK-LAK-, CTL- und LAK-Aktivität, der ADCC, der Phagozytoserate und der O₂⁻-Bildung etabliert bzw. neu entwickelt.

4.1 Methoden

Den im Verlauf meiner Labortätigkeit etablierten durchflußzytometrischen Leukozytenfunktionstests ist gemeinsam, daß sie mit geringem Zeit- Proben- und Materialaufwand simultan durchgeführt werden können. Von B-Zellen abgesehen, können Funktionen aller Hauptleukozytenpopulationen bestimmt werden.

4.1.1 Funktionanalyse: Europiumrelease-Assay vs. Durchflußzytometrie

Für die klinische Studie wurden die zellytische Funktion von NK-LAK und LAK mit dem in unserem Labor etablierten Europiumrelease-Assay getestet. Dieses nichtradioaktive Testsystem ist hoch sensitiv und erreicht eine gute Reproduzierbarkeit (Volgmann et al, 1989). Dies gilt allerdings nur für den geübten Anwender, zudem ist eine ständige Kultivierung der Targetzelllinien erforderlich.

Versuche, einen Durchflußzytometer zur Bestimmung der NK-Zellaktivität einzusetzen, wurden seit den späten achtziger Jahren unternommen. Der Nachweis defekter Targetzellen wurde durch die Inkorporation von Propidiumjodid (PI) erreicht. Die Unterscheidung zwischen der Targetzell- und der Effektorzellpopulation beruhte nur auf Unterschieden in Granularität und Größe. Damit war die Methode limitiert auf die Verwendung von Zellpopulationen, die sich stark in ihren optischen Eigenschaften unterschieden (Papa et al, 1988). Bei Versuchen in unserem Labor war es nicht möglich anhand dieser Parameter Effektorzellen von Targetzellen reproduzierbar zu unterscheiden.

Eine erfolgreiche Trennung beider Populationen gelang 1994 Hatam et al, die Targetzellen mit dem lipophilen Membran-Fluoreszenzfarbstoff *PKH26* anfärben konnten (Hatam et al, 1994). Das von uns angewandte Testprinzip basiert auf der in dieser Arbeit vorgestellten Methode.

Der von uns gewählte Membranfarbstoff DiO, zur Gruppe der Carbocyanine gehörig, lagert sich in den äußeren Lipidlayer der Zellmembran ein und kann dort lateral diffundieren und sich über die gesamte Zellmembran verteilen, ohne jedoch die Zelle zu schädigen (Badley et al, 1973; Honig und Hume, 1986). Unsere Versuche ergaben bei drei verschiedenen Targetzelllinien (*K562*, *Raji*, *A431*) eine gute Verträglichkeit des Farbstoffs bei Konzentrationen, die eine ausreichende Fluoreszenz sicherstellten. Bei höheren Konzentrationen [ab 2,5% v/v] stieg der Anteil defekter Zellen stark an, was wahrscheinlich weniger eine Folge des Farbstoffs war, sondern sich auf die Toxizität der Lösungsmittel Ethanol und DMSO zurückführen ließ (Tab. 3.1, 3.2)

Eine Anfärbung der Effektorzellen durch eventuell freigesetzten Farbstoff aus defekten Targetzellen würde die Trennung der Target- und Effektorzellpopulation erschweren. Eine Effektorzellfärbung durch zerstörte Targetzellen konnten wir auch dann nicht beobachten, als wir stark gefärbte Zellfragmente über 4h mit PBL inkubierten (Abb. 3.2).

Carbocyanine (z.B. DiOC₁₈) wurden seit 1997 auch von anderen Gruppen für die Targetzellfärbung eingesetzt (Lötzerich und Hirt 1997; Lehmann et al, 1999).

Unsere Ergebnisse zeigen, daß der Europiumrelease-Assay und die durchflußzytometrische Funktionsanalyse alternativ benutzt werden können. Bei parallel durchgeführten Untersuchungen mit PBL von 14 verschiedenen Spendern und den Targetzellen *K562* bzw. *Raji* korrelierten die durchflußzytometrisch ermittelten Werte gut mit den Ergebnissen des Europiumrelease-Assays. Die Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3.3, 3.4). Der störungsanfälligste Schritt der klassischen Methode war die Permeabilisierung und Beladung der Targetzellen mit dem Europiumkomplex. Der Anteil spontan lysierter Targetzellen im Kontrollansatz war daher systembedingt deutlich höher (<30%) als bei der durchflußzytometrischen Methode (< 10%).

Die einfachere Durchführung bei guter Genauigkeit und Sensibilität erlauben die Untersuchung hoher Probenaufkommen mit vertretbarem Aufwand, dies macht gerade bei großen Probenaufkommen den durchflußzytometrischen Ansatz zur Methode der Wahl.

Tabelle 4.1: Methodenvergleich: Durchflußzytometrische Bestimmung der lytischen Zellaktivität vs. Europiumrelease-Assay

Arbeitsschritt	FACS-Assay	Europiumrelease-Assay
Targetzellpräparation:	2 Waschschriffe, 30 min Inkubationszeit, Zellen können auf Vorrat gefärbt und eingefroren werden ⇒ Verkürzung der Vorbereitungszeit auf 10 min.	6 Waschschriffe, 30 min Inkubationszeit, kein einfrieren präparierter Targetzellen möglich, Dauer: 120 min
Effektorzellpräparation:	1 Waschschriff, einstellen auf gewünschte E:T-Ratio; 2-fach-Ansatz (weniger PBL werden benötigt) direkt in FACS-Probenröhrchen.	1 Waschschriff, einstellen auf gewünschte E:T-Ratio; 5-fach-Ansatz in 96-Well Mikrotiterplatten.
Inkubationszeit:	4 h	2,5 h
Messung:	Zugabe von Propidiumjodid, Messung, pro Röhrchen ca. 30s.	zentrifugieren, abnehmen des Überstands, Zugabe der Enhancement-Solution, Messung
Ergebnisse:	Einfache Auswertung, Kontrolle der E:T-Ratio möglich, zusätzliche Messung verschiedener Lymphozyten- und Targetzellparameter (Größe, Granularität, Vitalität) in einem Arbeitsgang. Sicherung der Daten auf Disketten	langwierige Auswertung (abhängig vom Fluorometer), keine zusätzlichen Parameter.
Genauigkeit:	Intra-Assay: +/- 2 % Inter-Assay: +/- 3%	Intra-Assay: +/- 5 % Inter-Assay: +/- 5%

4.1.2 Durchflußzytometrische Bestimmung der NK-Zell abhängigen ADCC

Die ADCC durch NK-Zellen basiert auf der Bindung über den CD16-Rezeptor an IgG-markierter Ziele mit Beteiligung der Adhäsionsmoleküle CD2 und CD18 und der nachfolgenden Targetzellyse durch Perforine und Granzyme. Gemessen wurde die ADCC bislang mit einer Abwandlung des radioaktiven ⁵¹Cr-Release-Assays (Wisecarver et al, 1985;

Voltarelli et al, 1993) oder des nichtradioaktiven Europiumrelease-Assays (Cui und Bystry, 1992), seltener mit der durchflußzytometrischen Messung der Effektor-Target-Konjugatbildung. Letztgenannte Methode kann jedoch nicht das Abtöten der Targetzelle erfassen (Shaw and Luge, 1988).

Der in dieser Arbeit verwandte ADCC-Test war eine eigene Weiterentwicklung der durchflußzytometrischen Funktionsanalyse. Als Targetzellen wurden EGF-R-positive *A431*-Zellen eingesetzt, die mit DiO gefärbt und mit humanisierten, monoklonalen IgG1 (*EMD72.000*) gegen EGF-R markiert worden sind.

Die von uns ermittelte Antikörperkonzentration von 1 µg/ml (Abb. 3.4) steht im Einklang mit der Literatur, auch Sung et al (1996) opsonierten ihre Targetzelllinien (*PCI-1*, -13, 50) mit humanisierten Antikörpern in der Konzentration 1 µg/ml, die Effektor : Target-Inkubationszeit betrug jedoch 4h.

Die Meßwerte von Vuist et al (1993), ermittelt mit dem ⁵¹Cr-Release-ADCC-Assay, liegen in der selben Größenordnung wie unsere Werte. Nach IL-2 Stimulierung der Effektorzellen konnten Vuist et al einen Anstieg zerstörter Targetzellen um 70 % beobachten, bei ähnlichen Versuchsbedingungen (E:T-Ratio, IL-2-Konzentration) aber kürzerer Inkubationszeit (30 min vs. 60 min) erreichten wir eine Steigerung der Targetzellyse von 51% (Tab. 3.4). Unterlagen der Firma Merck unterstützen ebenfalls die Validität unseres Testsystems. Es wurden mit *EMD72.000* markierte *A431*-Zellen als Targetzellen in einem ⁵¹Cr-Release-ADCC-Assay eingesetzt, der Anteil defekter Targetzellen betrug bei einer E:T-Ratio von 10:1 im Schnitt 30,4% (Inkubationszeit nicht dokumentiert) (Haunschild et al, 1995), bei unseren Versuchen 34,1% (Tab. 3.4).

Die deutlich verkürzte Target:Effektor-Inkubationszeit unserer Methode kann auf die Präparation der Targetzellen zurückgeführt werden. Während die genannten Arbeitsgruppen den Test entweder an adhärennten Kulturen (Sung et al, 1996) oder mit Suspensionzelllinien durchführten (Vuist et al, 1993), könnte durch Trypsinierung und anschließender DiO-Färbung die Membranstabilität der Targetzellen herabgesetzt worden sein. Dies könnte die Zellen empfindlicher für die Angriffe der Effektorzellen gemacht haben.

Daß trotz der Trypsinierung das EGF-R-Epitop für die Opsonierung mit *EMD72.000* erhalten blieb, konnte durch eine FACS-Färbung mittels muriner *MAB425.000* und sekundären-FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörpern nachgewiesen werden.

Neben NK-Zellen sind Monozyten zur ADCC befähigt. PMNL sind ebenfalls in der Lage über CD16 an IgG markierte Ziele binden und diese über andere Effektormechanismen (z.B. O₂⁻-Bildung) zu zerstören. Monozyten wurden größtenteils im Verlauf der Lymphozyten-isolierung durch Adhäsion an das Kulturgefäß depletiert. PMNL trugen aus zweierlei Gründen nicht oder nur wenig zur Targetzellyse bei:

1. Aufgrund ihrer höhere Dichte schwimmen PMNL nicht auf dem Ficollkissen auf, sondern pelletieren zusammen mit Erythrozyten. Dadurch wird die PMNL-Population stark abgereichert.
2. Eventuell verbliebene PMNL verlieren mit zunehmenden Alter ihre Funktionsfähigkeit, nach 48h in Kultur sind sie komplett in die Apoptose eingetreten (Whyte et al, 1993). Bei Versuchen mit frisch isolierten PMNL konnten wir unter Anwendung unseres Testprotokolls nur eine geringe Lyse opsonierter Targetzellen durch PMNL messen (Abb. 3.5).

Diese durchflußzytometrische Methode erlaubt eine schnelle und reproduzierbare Messung der ADCC, *A431*-Zellen können auf Vorrat mit DiO gefärbt und bei -80° gelagert werden, die Opsonierung mit *EMD72.000*-Antikörpern übersteht aber eine solche Lagerung nicht. Daher müssen vor jedem Versuch die Targetzellen mit Antikörpern beladen werden.

Die Methode ist möglicherweise geeignet, um spezifisch die NK-LAK-Aktivität ohne vorherige Zellsortierung zu messen, da andere Lymphokin-aktivierte Killerzellpopulationen, z.B. T-Zellen mit Phänotyp [CD56⁺ CD16⁻ CD3⁺] nicht zur ADCC befähigt sind (siehe 4.2). Die Methode wurde auf der 13. Arbeitstagung "Anwendung der Durchflußzytometrie in der Klinischen Zelldiagnostik" vorgestellt.

4.1.3 Bestimmung der Phagozytose am Durchflußzytometer

Die Phagozytose opsonierter Partikel ist eine Effektorfunktion von PMNL und Monozyten. Im allgemeinen wird sie durchflußzytometrisch anhand der Aufnahme fluoreszenzmarkierter, opsonierter Partikel, z.B. Zymosan, Latexpartikel, oder Bakterien gemessen. Die durchflußzytomerische Bestimmung hat den Vorteil, daß sowohl die Anzahl phagozytischer Zellen, als auch die relative Menge der phagozytierten Partikel pro Zelle erfaßt werden können. (Heinzelmann et al, 1999; Bassoe et al, 1983).

Für die Etablierung des Tests, der auch mit Vollblut gute Ergebnisse liefert, diente der *Phagotest* der Firma Orpegen Pharma (Heidelberg) als Vorlage. Statt mit FITC, markierten wir die Bakterien (*E.coli*, K12) mit DiO. Dadurch erreichten wir eine etwas höhere Fluoreszenz der Bakterien und somit eine leicht verbesserte Trennung zwischen den Populationen der phagozytischen und nicht phagozytischen Leukozyten. Die Opsonierung der Bakterien wurde analog zu Roos et al (1981) mit frischem gepooltem Humanserum durchgeführt.

Damit zwischen adhärenzgebundenen und phagozytierten Bakterien unterschieden werden kann, mußte die Fluoreszenz der adhärenzgebundenen Bakterien gelöscht werden. Dies erreichten wir durch die Zugabe einer Trypanblaulösung.

Die Validität unseres Systems wurde in zwei unabhängigen, mit beiden Testsystemen simultan durchgeführten Versuchen unter den angegebenen Versuchsbedingungen (Inkubationszeiten Orpegen: 15 min; eigenes System: 12 min) überprüft. Dabei konnten wir nahezu identische Phagozytoseraten messen (Orpegen: 55%; eigenes System: 53 %). Das entwickelte Testsystem wird mittlerweile auch von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet (Holzer et al, 2000; Matheis et al, 2001).

4.1.4 Durchflußzytometrische Bestimmung des oxidativen Bursts

Diese einfach durchzuführende und zu etablierende Methode wurde von Rothe und Valet entwickelt und ohne Änderungen in unserem Labor etabliert. Die durchflußzytometrische Methode hat im Vergleich zum Sauerstoffradikalnachweis durch Chemilumineszenz den Vorteil, daß sie schneller und mit Vollblut durchgeführt werden kann. Allerdings ist sie weniger sensitiv und auf den Nachweis intrazellulär sezernierter Sauerstoffradikale limitiert (Rothe und Valet, 1991; Rothe et al, 1994).

Phagozytoseleistung und oxidativer Burst sind eng miteinander verknüpfte Funktionen. Beide Funktionen eignen sich als klinische Parameter zur Beobachtung eines Krankheitsverlaufs oder zur Beurteilung von Medikamenteneffekten. Erniedrigte Phagozytoseleistungen sind für bakterielle Haut- und Atemwegsinfektionen (Bassoe, 1984), bei Verbrennungen (Crogan, 1976) und AIDS (Dobmeyer et al, 1995), erniedrigter oxidativer Burst bei Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich (Kaffenberger et al, 1992) dokumentiert worden.

4.1.5 Immunphänotypisierung

Um den Einfluß einer bestimmten Krankheit und/oder Therapie auf die zellulären Komponenten des Immunsystems zu untersuchen, ist die Durchflußzytometrie die Methode der Wahl. Durch fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper, neu entwickelter Farbstoffe und apparativer Verbesserungen wird eine differenzierte Erhebung des Immunstatus ermöglicht (Übersicht in Herzenberg et al, 2000).

Die Lymphozytenphänotypisierung gibt keinen Aufschluß über die Funktion der Zellen, bzw. der gemessenen Rezeptoren. Ebenso wenig kann durch eine Phänotypisierung alleine auf Veränderungen in Organsystemen geschlossen werden, daher sollte mit der Immunphänotypisierung auch eine funktionelle Überprüfung der Leukozytenaktivität einhergehen (Donnerstag et al, 1994).

Ein systematisches Problem der Durchflußzytometrie ist, daß bei einer Messung nur relative Anteile bestimmt werden können, die keinen Aufschluß über tatsächliche Zellzahlen in einer Blutprobe geben. Abhilfe versprechen hier neuere Entwicklungen. Die Zugabe einer bekannten Anzahl von Partikeln in eine Blutprobe ermöglicht es, von den Relativanteilen der Leukozyten- und Partikelpopulationen auf die absoluten Zellzahlen in der Probe zurückzurechnen. Neben der Bestimmung der prozentuale Verteilung der Lymphozyten-subpopulationen kann als zusätzlicher Parameter die relative Dichte eines Antigens auf den Zellen bestimmt werden.

Die Bestimmung der Rezeptordichten im Verlauf der klinischen Studie war nicht verwertbar, die Meßwerte vor dem Einbau des neuen Lasers waren nicht vergleichbar mit den Werten, die nach dem Einbau gemessen wurden. Die Bestimmungen der prozentualen Verteilung der Lymphozyten-subpopulationen blieben jedoch durch die Reparatur unbeeinflusst.

4.2 Einfluß der Medikationen auf Effektorfunktionen und Phänotyp von Leukozyten *in vitro*

Das Hauptgewicht der Untersuchungen lag auf der Bestimmung des Einfluß der Testmedikationen auf die lytische Aktivität verschiedener Lymphozyten-subpopulationen. Daher wird an dieser Stelle die Selektivität der Testsysteme für definierte Killerzellaktivitäten diskutiert.

NK-Zellaktivität:

- Um die lytische Aktivität von NK-Zellen zu messen, werden seit den siebziger Jahren K562-Zellen als Targetzellen eingesetzt. Da sie keine MHC-I-Oberflächenexpression zeigen, können sie effektiv von NK-Zellen zerstört werden (Ortaldo et al, 1977). Diese Targetzellen werden jedoch nicht nur durch NK-Zellen [CD56⁺ CD16⁺ CD3⁻] lysiert, sondern auch in geringem Umfang durch T-Zellen mit NK-Zell-Eigenschaften [CD56⁺ CD16⁻ CD3⁺], jedoch nicht durch CD56-negative T-Zellen [CD56⁻ CD16⁻ CD3⁺]. Die K562-Lyse durch native PBL wird nach Phillips und Lanier (1986) hauptsächlich von NK-Zellen vorgetragen und in dieser Arbeit als **NK-Zellaktivität** bezeichnet.

NK-LAK-Aktivität:

- Durch Kultivierung von PBL mit IL-2 wird die Bildung mindestens zweier verschiedener Populationen sogenannter lymphokin-aktivierter Killerzellen (LAK) angeregt. Die Zellen der Hauptpopulation sind phänotypisch NK-Zellen (NK-LAK) und exprimieren kein CD3 [CD56⁺ CD16⁺ CD3⁻]. Die Inhibierung der lytischen Aktivität durch MHC-I-Moleküle

scheint herabgesetzt oder aufgehoben, dies ergaben Experimente von Phillips und Lanier (1986). Nach Schmidt-Wolf et al (1996) wird die NK-LAK-Aktivität, gemessen an der spezifischen *K562*-Lyse, fast ausschließlich von NK-Zellen vorgetragen. Diese Aktivität wird hier als **NK-LAK-Aktivität** bezeichnet.

Nicht-MHC-restringierte T-Zellaktivität:

- CTL lysieren Targetzellen normalerweise nur, wenn ihnen im Kontext mit MHC-I ein passendes Antigen präsentiert wird. Dies wird als MHC-Restringierung bezeichnet (Cruse und Lewis, 1999). Als nicht-MHC-restringierte T-Zellen bezeichnete Lanier et al (1986) CD3/CD56-positive PBL, die *in vitro* MHC-I-exprimierende, NK-Zell-resistente Targetzellen (*COLO*) lysieren konnten. Weitere Untersuchungen ergaben, daß diese Zellen zusätzlich CD8 exprimieren. Ca. 1-5% der PBL exprimieren diesen Phänotyp (Schmidt-Wolf et al, 1993). Aus ihnen entstehen wahrscheinlich nach IL-2-Stimulierung die sogenannten Zytokin-induzierten Killerzellen (CIK) (Lu und Negrin, 1994). Die Lyse der NK-Zell resistenten *Raji*-Zellen durch unstimulierte PBL wird wahrscheinlich von nicht MHC-restringierten, CD3/CD8/CD56-positiven T-Zellen vorgetragen und in dieser Arbeit als **CTL-Aktivität** bezeichnet.

Nicht-MHC-restringierte LAK-Aktivität:

- Die zweite, kleinere Zellpopulation, die nach Kultivierung von PBL mit IL-2 entsteht, besteht aus T-Zellen mit dem Phänotyp [CD3⁺ CD8⁺ CD56⁺]. Diese Zellen werden als Zytokin-induzierte Killerzellen (CIK) bezeichnet. Sie haben eine stärkere lytische Kapazität und eine höhere Proliferationsrate als NK-LAK (Schmidt-Wolf et al, 1996), sind aber nicht zur ADCC befähigt (Ortaldo et al, 1991). Die Lyse von MHC-I-reichen Targetzellen, wie z.B. *COLO* oder *Raji* durch IL-2 stimulierte PBL wird prädominant von NK-Zellen ohne MHC-Restriktion/-Inhibition und zu einem geringeren Teil von CIK vermittelt (Phillips und Lanier, 1986; Robertson und Ritz, 1990, Schmidt-Wolf et al, 1991; Schmidt-Wolf et al, 1993). Sie wird hier als **LAK-Aktivität** bezeichnet.

4.2.1 Einfluß von Enzymen auf Leukozyten *in vitro*

Die Beeinflussung der Funktionen von NK-Zellen (Leskovar, 1989), Monozyten und PMNL innerhalb einer Stunde nach Enzymzusatz ist von anderen untersucht worden (Leskovar, 1989; Zavadova et al, 1995). Daher konzentrierten wir uns auf die langfristigen Effekte bei nur einer (3 Tage), einer täglichen (5 Tage) und einer zweiten Enzymgabe (2. Enzymgabe nach 3 Tagen, Verlauf bis Tag 5) auf PBL. Da PMNL in Kultur sehr schnell altern und ihre Funktionen einbüßen (Whyte et al, 1993), konnten wir hier nur einen 24 h-Wert erheben.

In den Versuchen zur Enzymwirkung auf PBL *in vitro* konnte folgendes festgestellt werden: Eine einfache Enzymgabe führte bei niedrigen Konzentrationen [40 µg/ml, 80 µg/ml] eher zu einer über mehrere Tage nachweisbaren Aktivierung der NK- und NK-LAK-Funktion, nicht jedoch der CTL- bzw. LAK-Aktivität. In der Folge hoher Enzymkonzentrationen [160 µg/ml, 320 µg/ml] kam es zu einer Herabsetzung der NK- bzw. NK-LAK-Funktionen. War die Abnahme bei 160 µg/ml nicht immer signifikant, so kam es bei 24 stündiger Inkubation mit einer Enzymkonzentration von 320 µg/ml zu einem deutlichen Abfall der Zellaktivitäten. Die NK-LAK-Funktion war gegenüber hohen Enzymkonzentrationen unempfindlicher als die NK-Funktion. CTL- und LAK-Aktivität wurden durch höhere Enzymkonzentrationen eher stimuliert als inhibiert (Tab. 3.8, 3.9). Die ADCC durch NK-Zellen ließ sich analog zu der zytotoxischen NK-Aktivität stimulieren (Maximale Stimulierung bei 80 µg Enzyme/ml, Tab. 3.27).

Im Dreitagesverlauf zeigte sich, daß eine Funktionsaktivierung von nicht IL-2 stimulierten PBL über mindestens 48h anhielt, nach 72h kam es zu einer leichten, nicht signifikanten Abnahme der Aktivität (Tab. 3.19, 3.23).

Tägliche Enzymgaben führten mit steigender Konzentration zu einem früher eintretenden Funktionsverlust der PBL. Hier war festzustellen, daß mit einer Verdoppelung der Enzymdosis der Rückgang der Killerzellfunktionen jeweils 24h eher eintrat. Eine IL-2-Vorstimulierung hielt die Funktion bei einer bestimmten Enzymkonzentration für jeweils 24h länger aufrecht.

Eine zweite Enzymzugabe 72 h nach dem initialen Enzymzusatz führte bei [40 µg/ml] zu einer Aufrechterhaltung, bei [80 µg/ml] zu einer weiteren Steigerung der NK-, CTL- und LAK-Funktion. Die NK-LAK-Aktivität konnte nicht weiter erhöht werden.

160 µg/ml führte nach der 2. Enzymgabe zum Verlust der NK- und CTL-Funktion, bei IL-2-Vorstimulierung war die Aktivitätsminderung weniger drastisch.

Als zusätzliche Kontrolle wurden parallel PBL mit der inaktivierten Enzymmischung [80 µg/ml] behandelt. Inaktivierung der Enzyme erfolgte nach Desser und Rehberger (1990) durch 24 stündige Inkubation bei 37°C in DMEM+10% FCS und war, wie später die Messungen der Enzymaktivitäten ergaben, nicht vollständig. Dies könnte den Aktivitätsabfall gegenüber den Kontrollen bei einem täglichen Enzymzusatz erklären.

Der Anstieg der LAK-Aktivität bei einigen Kontrollansätzen war wahrscheinlich auf eine noch nicht abgeschlossene IL-2-Stimulierung der PBL zu Versuchsbeginn (=1.Enzymzugabe) zurückzuführen. Die IL-2 Stimulierungsphase wurde auf 3 Tage begrenzt, damit in den Parallelansätzen der mit der Kulturdauer einhergehende Funktionsverlust unstimulierter PBL nicht zu weit voranschreitet. Der Funktionsverlust ist gut an der signifikanten Abnahme der NK-Zellaktivität nach 96h stündiger Versuchsdauer (=168h Kultivierung) nachzuvollziehen (Tab. 3.10-3.18).

Hohe Enzymkonzentrationen führten zum signifikanten Funktionsverlust der PBL, möglicherweise wegen einer enzymatisch-vermittelten Rezeptordegredation. Um Hinweise auf die Richtigkeit der Hypothese zu finden, inkubierten wir PBL mit der Enzymmischung [640 µg/ml] und maßen die Bindung von anti-CD-8-Antikörpern auf den Zellen. Nach 24h fanden wir keine Antikörperbindung, in den anschließenden Tagen konnte eine ansteigende Antikörperbindung auf den enzymbehandelten PBL gemessen werden (3.3.7).

Ein Shedding, d.h. ein Abwerfen der CD8-Rezeptoren nach einem Reiz, ist in der Literatur nicht beschrieben worden. Dies spricht dafür, daß hohe Enzymdosen Oberflächenrezeptoren nachhaltig zerstören können und somit die Zelle funktionsunfähig wird, aber in der Lage ist, neue Rezeptoren zu bilden.

Funktionsverlust trat bei zweifacher bzw. täglicher Applikation der Enzyme auf, wenn die aufsummierte Enzymmenge mindestens einen Wert von ca. 200 µg/ml erreichte, d.h. bei 40 µg/ml täglich nach 5 Tagen, bei 80 µg/ml täglich nach 3 Tagen und bei 160 µg/ml täglich nach 2 Tagen.

Wird eine bestimmte Dosis (<40 µg/ml) überschritten, so führt die tägliche Enzymgabe wahrscheinlich zu einer Akkumulation von Oberflächenschäden bis hin zur Funktionsunfähigkeit. Denkbar wäre auch, daß die protease-inhibierende Kapazität des Serumanteils ab bestimmten Konzentrationen erschöpft war.

Eine Aktivierung mit IL-2 führt zur vermehrten Expression von Rezeptoren für verschiedene Funktionen, z.B. Adhäsion, und zu einer Erhöhung des Zellstoffwechsels im Zuge der gesteigerten Proliferationsrate (Janeway und Travers, 1995). Dies könnte erklären, daß IL-2-stimulierte Zellfunktionen jeweils einen Tag länger nachgewiesen werden konnten, da die Zellen zum einen über mehr Rezeptoren verfügten und zum anderen aufgrund eines

aktivierten Stoffwechsels vielleicht eher zerstörte Rezeptoren neu bilden konnten, als unstimulierte PBL.

Die O_2^- -Bildung/PMNL und der Anteil O_2^- -produzierender PMNL wurde durch 24h Inkubation mit Enzymen [80 $\mu\text{g/ml}$] erhöht, ebenso der Anteil phagozytischer PMNL, nicht jedoch die Zahl der aufgenommenen Bakterien. PMNL büßen mit zunehmender Kulturdauer ihre Funktionsfähigkeit ein, nach 48 h in Kultur sind sie nicht mehr funktionell und komplett in die Apoptose eingetreten (Whyte et al, 1993). Der höhere Anteil funktioneller PMNL nach enzymatischer Stimulierung könnte vielleicht auf eine Verzögerung der PMNL-Apoptose zurückzuführen sein. Die Apoptose von PMNL, die nach 24h in Kultur schon weit fortgeschritten ist, kann durch eine Vielzahl von Faktoren unterschiedlicher Herkunft *in vitro* gebremst werden, z.B. bakteriellen Spaltprodukten (FMLP¹³, LPS¹⁴), Komplementfaktoren (C_{5a}) (Lee et al, 1993), proinflammatorischen Zytokinen IL-6 (Biffi et al, 1996) und IL-8 (Kettritz et al, 1998).

Bei Monozyten konnte durch Enzyme keine Steigerung der Phagozytose und O_2^- -Bildung induziert werden. Diese Beobachtung steht nicht in direktem Widerspruch zu den Ergebnissen von Leskovar (1989) und Zavadova et al (1995), die eine Aktivitätssteigerung in der ersten Stunde nach Enzymzugabe fanden. Es könnte möglich sein, daß in unseren Experimenten eine Aktivierung stattfand, die Aktivität aber innerhalb der 24 h auf das Ausgangsniveau zurückgegangen ist (Tab. 3.28, 3.29)

Um zu prüfen, ob die Hochregulierung funktionsassoziierter Rezeptoren (CD16, CD18, CD54) Voraussetzung für die Funktionssteigerung nach milder enzymatischer Behandlung ist [80 $\mu\text{g/ml}$], wurde eine Immunphänotypisierung 24h nach Enzymzugabe durchgeführt.

Für PBL konnte keine Veränderung der Expression von CD16, CD18 und CD54 gefunden werden. Diese Ergebnisse gehen zum Teil konform mit denen einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls keine numerische Hochregulierung von CD18 und CD54 auf PBL nach enzymatischer Stimulierung finden konnten (Kleef und Bovbjerg, 1996).

Bei PMNL konnten wir eine signifikant erhöhte CD18- bzw. CD54- und eine signifikant erniedrigte CD16-Rezeptordichte bestimmen (Tab. 3.30).

Das Abwerfen der CD16-Moleküle scheint im Widerspruch zu den gemessenen Phagozytose- und O_2^- Bildungsraten zu stehen, wird aber als Indiz für eine zelluläre Aktivierung *in vitro* gewertet (Thiel et al, 1997). Anscheinend wird ein mit der CD16-Suppression einhergehender Funktionsverlust durch die vermehrte Expression von CD18 oder andere Fc-Rezeptoren (CD32, CD64), die ebenfalls für den Phagozytoseprozeß wichtig sind, kompensiert (Anderson et al, 1990). Für diese Hypothese sprechen die Untersuchungen von Wadell et al (1994), deren Ergebnisse für eine Unabhängigkeit des oxidativen Bursts von der CD16-Verfügbarkeit sprechen.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob durch eine proteolytische Spaltung von Serumbestandteilen Faktoren freigesetzt oder aktiviert werden, die zu einer zellulären Aktivierung beitragen können (3.3.8). Hierzu wurden unstimulierte bzw. IL-2 stimulierte PBL in DMEM bzw. in DMEM+FCS mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Enzymmischung 24h inkubiert. Die CTL-Aktivitäten mit bzw. ohne FCS waren identisch, ebenso die LAK-Aktivität mit bzw. ohne FCS. In den Ansätzen ohne FCS konnte durch die Enzymzugabe die LAK-Aktivität stärker gesteigert werden (von 14% auf 23%) als in den Ansätzen mit FCS (von 21% auf 24%).

Dieser Versuch ist natürlich kein Beweis für oder gegen die Richtigkeit der Hypothese, zeigt aber, daß eine zelluläre Aktivierung durch Proteasen sehr wohl ohne FCS-Zusatz induziert werden kann.

¹³ FMLP=N-Formyl-Met-Leu-Phe

¹⁴ LPS=Lipopolysaccharid

Dies leitet über zu der Frage, welche Mechanismen die zelluläre Aktivierung durch Proteasen vermitteln. In der Literatur gibt es Hinweise, daß die Stimulierung ein mehrstufiger Prozeß sein könnte, der mit einer proteolytischen Rezeptoraktivierung gestartet wird und in der Sezernierung proinflammatorischer Zytokine mündet, die ihrerseits zur weiteren Aktivierung beitragen.

Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) bilden eine Familie von Rezeptoren, die viele strukturelle Gemeinsamkeiten mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aufweisen. PAR-Rezeptoren teilen einen ungewöhnlichen Aktivierungsmechanismus, durch proteolytische Spaltung an einer definierten Stelle wird ein, frei übersetzt, angebundener („tethered“) Ligand erzeugt. Der neue Aminoterminus bindet an den Rezeptor und aktiviert ihn, dies führt über die Bildung von Inosit-1,4,5-trisphosphat zu einer Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium (Übersicht in Macey, 1998). PAR-1 wird hauptsächlich durch Thrombin aktiviert, Trypsin kann PAR-1 nur in hohen Konzentrationen [$>4 \times 10^{-6}$ M] aktivieren (Brass et al, 1992). Trypsin, aber nicht Chymotrypsin aktiviert spezifisch PAR-2 (Mari et al, 1996), zur Aktivierung genügen Trypsinkonzentrationen im nanomolaren Bereich (Nystedt et al, 1994). PAR-4 kann durch Thrombin und Trypsin aktiviert werden (Xu et al, 1998). Die Wirkung von Papain auf PAR (1-4) ist bislang nicht untersucht worden. PAR-2 wird von T-Lymphozyten (Mari et al, 1996) und PMNL exprimiert (Howells et al, 1997). Die Expression auf Monozyten ist noch nicht genauer untersucht worden.

Eine Aktivierung des PAR-2 führt unter anderem zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren wie z.B. Arachidonsäure, Prostaglandine (Dery et al, 1998), bei anderen Zelltypen konnte über die gleiche Signaltransduktionskaskade die Synthese von IL-6 (Hou et al, 1998 a) und IL-8 (Hou et al, 1998 b) induziert werden. Bei Leukozyten (Howell et al, 1997) und Tumorzellen konnte eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen beobachtet werden (Miyata et al, 2000).

Eine aktivierende Wirkung von Chymotrypsin auf Lymphozyten ist beschrieben worden, eine erhöhte primäre Antwort auf Schaferythrozyten fanden Stein-Streilein und Hart (1980). Andere Enzyme können ebenfalls Leukozyten aktivieren. Jaffray et al (2000) fanden, daß eine dreistündige Inkubation mit den Pankreasenzymen Carboxypeptidase A, Elastase oder Lipase bei Makrophagen zur TNF- α -Bildung über Aktivierung von NF- κ B führt. Sie diskutieren, daß das Signal über spezifische, noch nicht näher charakterisierte Oberflächenrezeptoren übermittelt wird.

Denkbar wäre auch, daß mit proteolytischer Andauung der Oberflächenrezeptoren Konformationsänderungen der Rezeptorstruktur einhergehen, die als Aktivierungssignal interpretiert werden.

Die in unseren Versuchen wirksamen Enzymkonzentrationen (80-160 μ g/ml) lassen vermuten, daß keine Aktivierung des PAR-1 stattgefunden hat (4×10^{-6} M Trypsin entspricht 432 μ g/ml Enzymmischung). In der Zellkultur könnte die Aktivierung Kalzium-abhängiger Prozesse über PAR-2/PAR-4 die rasche Aktivierung der Leukozytenfunktionen innerhalb einer Stunde erklären. Die langfristigen Aktivierungen, wie wir sie fanden, könnte auf eine PAR-2/PAR-4 induzierte Synthese von proinflammatorischen Mediatoren zurückzuführen sein, die zur weiteren Aktivierung der Zellen führte. Desser et al konnten eine Stimulierung der TNF-Synthese (1990) und von TNF- α , IL-1 β und IL-6 innerhalb von 24 Stunden nach enzymatischer Stimulierung finden (Desser et al, 1994). Diese Zytokine haben eine stimulatorische Wirkung auf verschiedene Leukozyten-Effektorfunktionen (Cruse und Lewis, 1999).

Die Versuche zeigten, daß viele Effektorfunktionen von Leukozyten durch eine Polyenzympräparation *in vitro* stimuliert werden können, wenn bestimmte Konzentrationen nicht überschritten werden. Eine Funktionsaktivierung ließ sich 24h – 48h nach Enzymzugabe nachweisen. Wiederholte Stimulierung von PBL-Funktionen war möglich, wenn die Enzymkonzentrationen unter einem Schwellenwert blieben.

4.2.2 Einfluß von Retinol und Retinsäure auf PBL *in vitro*

Wir untersuchten den Einfluß von Retinol (ROH) und all-*trans*-Retinsäure (RA) auf PBL *in vitro* in dosis- und zeitabhängiger Weise. Die Untersuchungen ergaben, daß weder ROH noch RA [jeweils 10^{-7} -, 10^{-6} -, 10^{-5} M] über einen Beobachtungszeitraum von 72 h die lytische NK-Zell-, die NK-LAK-, die CTL- und LAK-Funktion signifikant verändern konnten. ROH [10^{-6} M] minderte nach 24 h die ADCC von NK-, bzw. NK-LAK-Zellen signifikant. Das Lösungsmittel DMSO, in allen Ansätzen in einer Endkonzentration von 0,1%, dämpfte im Mittel, aber nicht signifikant, die Effektorzellaktivitäten. Der Einfluß von RA, bzw. ROH auf den Phänotyp von PBL und Monozyten wurde an nicht IL-2 vorstimulierten Zellen untersucht. Die Expression der Oberflächenmoleküle CD25 und CD54 auf PBL wurde weder durch RA noch durch ROH signifikant verändert. RA bewirkte eine Zunahme der CD25-Dichte auf Monozyten, CD54 blieb gleich.

Die Effekte von Retinoiden, insbesondere RA, auf Funktion und Phänotyp kultivierter Lymphozyten werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

Eine Aktivierung der NK-LAK- bzw. LAK-Funktionen konnte von Lin und Chu (1990) und Fegan et al (1995) gefunden werden, allerdings nur bei niedrigeren RA-Konzentrationen [$< 10^{-8}$ M]. Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde von Fegan et al Ethanol als Lösungsmittel benutzt und die Zellen 7 Tage mit RA inkubiert. Analog zu uns fand er ohne simultane IL-2-Stimulation keine Steigerung der lytischen Aktivität. Ich konnte nur bei RA [10^{-7} M], jedoch nicht bei höheren Konzentrationen, nach 48h eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der NK-LAK- und LAK-Aktivität gegenüber der unbehandelten und der Lösungsmittel-(DMSO)-Kontrolle feststellen (Tab. 3.38).

Die Erhöhung der LAK-, bzw. NK-LAK-Aktivität durch RA [10^{-10} - 10^{-8} M] wird unter anderem auf eine RA-induzierte, selektive Erhöhung des IL-2-Rezeptors (IL-2R) zurückgeführt. Die vermehrte IL-2-Bindung führt dann zu einer erhöhten Aktivität (Sidell et al, 1993, Fegan et al, 1995). Bei T-Zellen, die IL-2R maximal exprimierten, führte RA [10^{-10} - 10^{-8} M] zu einer Steigerung der IL-2 [10 units/ml] induzierten Proliferation. Hier wurde diskutiert, daß RA die Signaltransduktion über den IL-2R verbessert (Jiang et al, 1992).

Wir konnten keine signifikante RA [10^{-6} M] induzierte Expressionsteigerung des IL-2R (α -Kette=CD25) auf PBL feststellen (Tab. 3.34), der Grund könnte hier in der Präparation der Lymphozyten zu suchen sein. In den Arbeiten von Sidell et al wurden PBL vor RA-Zugabe 14 Tage mit hochdosiertem IL-2 stimuliert (1993), oder T-Zell-Lymphomazelllinien für die Versuche eingesetzt (1997).

Anders hingegen bei Monozyten, hier konnten wir ohne Vorstimulierung mit IL-2 nach RA-Zugabe [10^{-6} M] im zeitlichen Verlauf eine deutliche Erhöhung der IL-2R- α -Kette finden. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=3) konnten keine Signifikanzen errechnet werden (Tab. 3.34).

Für eine Zunahme der zytotoxischen Aktivität *in vitro* durch eine RA-abhängige Induktion proinflammatorischer Mediatoren gibt es keine Hinweise. RA inhibiert die Synthese bestimmter proinflammatorischer, stimulierender Zytokine wie z.B. IL-1 β , IL-6, IL-8 nach Stimulierung mit LPS oder IL-1 β (Gross et al, 1993).

Parallel zu den Zytotoxizitätsassays untersuchten wir die Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküls CD54, das wichtig für eine Interaktion mit Targetzellen ist. Hier fanden wir weder auf PBL noch auf Monozyten eine Änderung der Rezeptordichte nach Zugabe von all-*trans*-RA. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Audjit et al (1995).

Unsere Ergebnisse werden unterstützt durch die Arbeiten von Brown et al (1997) und Weber et al, (1995). Brown konnte zeigen, daß die CD54-Genexpression wahrscheinlich über den Kernrezeptor RXR induziert wird, der wie in der Einleitung erwähnt, hauptsächlich nur durch

13-*cis*-RA aktiviert wird (Brown et al, 1997). Weber et al (1995) fanden eine Inhibierung der IFN- γ -induzierten CD54-Expression und der basalen CD54-Produktion durch all-*trans*-RA bei Monozyten.

ROH zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen keine aktivierende Wirkung auf die untersuchten Funktionen bzw. Rezeptoren (Tab. 3.31-3.34). Daß ROH alleine keinen aktivierenden Einfluß auf zelluläre Funktionen hat, konnte von Allende et al (1997) nachgewiesen werden. Sie untersuchten den Einfluß von ROH [10^{-8} - 10^{-6} M] auf verschiedene Leukozytensubpopulationen und fanden, daß ROH [10^{-7} M] nur unter Zuhilfenahme eines Kofaktors (anti-CD3-IgG) nur auf PBL und PBMC immundefizienter Patienten stimulierend wirkte. Diese speziellen Bedingungen waren bei meinen Experimenten nicht gegeben.

RA-Derivate können zwar über die große Familie der RAR-, bzw. RXR-Kernrezeptoren eine Vielzahl von Genen regulieren, für ein komplexen Vorgang wie der zellulären Aktivierung sind aber wahrscheinlich auch Gene notwendig, die über andere Mechanismen gesteuert werden. Die Transkription letztgenannter Gene könnte über Kofaktoren induziert werden, die für die Aktivierung bestimmter Funktionen unerlässlich zu sein scheinen.

Auch ist denkbar, daß erst die Kofaktoren die Expression von CRBP und CRABP, den zellulären Transportproteinen oder der RXR- und RAR-Kernrezeptoren anregen und somit eine RA-Wirkung erleichtern.

Die Wirkungen der Retinoide auf Immunzellen beschränkt sich wahrscheinlich eher auf Differenzierungsprozesse, einige der nach RA-Inkubation erworbenen Fähigkeiten und Aktivierungen lassen sich wahrscheinlich auf Differenzierungsvorgänge zurückführen (Gross et al, 1993). Neuere Forschungen belegen die Relevanz von RA bei Zelldifferenzierungen, so hängt die Entwicklung von Monozyten zu Dendritischen Zellen oder Makrophagen entscheidend von RA ab. (Fritsche et al, 2000).

4.3 Klinische Studie: Einfluß einer Enzymmischung und Retinol auf Funktion und Phänotyp peripherer Lymphozyten bei Tumorpatienten *in vivo*

Die prospektive Pilotstudie wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde in dem Zeitraum von Oktober 1994 bis Juni 1996 durchgeführt. Eingangsuntersuchungen erfolgten an 25 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen, in die Studie aufgenommen wurden 18 Patienten; zur Auswertung gelangten 16 Patienten: 8 in der Gruppe *Enzym*, 5 in der Gruppe *Vitamin-A*, 3 in der Gruppe *Placebo*. 15 gesunde Probanden bildeten das Kontrollkollektiv.

Den Patienten wurde neben der konventionellen Therapie entweder Vitamin-A (Retinolpalmitat, 150,000 IE/d), eine Polyenzympräparation (proteolytische Gesamtaktivität 20,880 F.I.P.-E/d) oder Placebo verabreicht. In regelmäßigen Abständen (ca. 4-6 Wochen) wurde das Allgemeinbefinden, Nebenwirkungen, Blutbild und Leberwerte protokolliert, die peripheren Blutlymphozyten phänotypisiert und die NK-LAK-, bzw. LAK-Zell-Aktivität gemessen.

Festzustellen war, daß der Anteil CD3⁺-PBL postoperativ bei Patienten der *Enzym*-Gruppe signifikant gegenüber den anderen Patientengruppen erhöht war und das Niveau der Kontrollen erreichte.

Im Vergleich zu *Kontrollen* waren *prätherapeutisch* die Parameter CD4⁺/CD8⁺, CD25, CD45R0 und HLA-DR bei Patienten erhöht, der Anteil CD4-positiver Zellen und die LAK-Aktivität erniedrigt (Tab. 3.38, 3.39).

Die Ergebnisse der Medikamentenstudie sind aufgrund der geringen Fallzahlen vorsichtig zu bewerten. Sowohl Tumorgröße und Malignität, als auch ein chirurgischer Eingriff mit anschließender Radio- und/oder Chemotherapie haben Einfluß auf Verteilung und Zustand einzelner Lymphozytensubpopulationen. Die geringe Patientenzahl erlaubte keine weitere Aufteilung der Gruppen nach Tumorgröße, Tumormalignität und Primärtherapie. Da sich aber die Patienten bezüglich des Alters, der Schwere der Erkrankung und der Art der Primärtherapie relativ ähnlich waren, können einige Beobachtungen als Effekt der Medikation gewertet werden.

Zur Einteilung der Krankheitsstadien bedient man sich der TNM¹⁵-Klassifikation (siehe 3.5.1), die Tumorbeurteilung ist dabei nicht unerheblich vom Betrachter abhängig.

Die Patienten hatten zu Studienbeginn im Mittel vergleichbare Tumorgrößen und Lymphknotenbefall, Fernmetastasen lagen bei einem Patienten in der Enzymgruppe vor. Während des Studienverlaufs kam es zu einer leichten Erniedrigung der T- und N-Werte, dies war auf die chirurgische Tumorsektion und die Wirkung der Primärtherapien zurückzuführen (Tab 3.36).

Die Eingangsuntersuchungen ergaben bei den Tumorpatienten eine statistisch signifikante Erniedrigung der Leukozytenzahl und erhöhte, aber noch im Normbereich befindliche Leberwerte (SGOT, SGTP, γ -GT, AP). Die veränderten Werte lassen sich wahrscheinlich in den meisten Fällen eher auf den Lebenswandel (Risikofaktoren Alkohol und Nikotin), Ernährungssituation und das Alter der Patienten (56 \pm 8) zurückführen als auf tumorbedingte Störungen (Herity et al, 1982).

Die Altersverteilung in den Patientengruppen war annähernd gleich (Tab. 2.3), die Probanden des Kontrollkollektivs waren im Schnitt jünger (Tab. 2.4).

¹⁵ T(0-4)=Tumorgröße, N(0-4)=Befall benachbarter Lymphknoten, M(0-4)=Fernmetastasen

4.3.1 PBL-Subpopulationen und -Aktivitäten bei Patienten und Kontrollen

Wenn ein Wert sowohl bei zusammengelegten Daten, als auch im zeitlichen Verlauf zu einem Meßpunkt signifikant unterschiedlich zu den Vergleichsgruppen ist, könnte hierfür ein Medikamenteneffekt die Ursache sein. Dies traf insbesondere auf T-Zellen-assoziierte Parameter zu. In der folgenden Diskussion werden daher schwerpunktmäßig T-Lymphozyten besprochen.

4.3.1.1 T-Zellen

Die vom zeitlichen Verlauf unabhängige Auswertung der Daten ergab einen signifikanten Anstieg des T-Lymphozytenanteils [CD3⁺] auf das Niveau der Normwerte (*Kontrolle*) in der Gruppe *Enzym* im Vergleich zu den anderen Patientengruppen und den prätherapeutischen Werten.

Der Anteil CD2-positiver Zellen war ebenfalls signifikant erhöht. Dieses Antigen wird von T-Zellen und auch ca. 80% der NK-Zellen exprimiert, d.h. eine eindeutige Zuordnung zu T-Zellen ist in diesem Fall nicht möglich. Die Erhöhung des T-Zellanteils könnte auf einen erhöhte Anteil CD8-positiver Lymphozyten zurückzuführen sein. Dieser Parameter war in der Gruppe *Enzym* signifikant höher gegenüber *Vitamin-A*, *prätherapeutisch* und *Kontrollen*, nicht signifikant erhöht im Vergleich zu *Placebo* (Tab. 3.38, 3.39).

Auch im zeitlichen Verlauf konnte der Gruppe *Enzym* eine Erhöhung des CD3⁺-Anteils gefunden werden. Ausgehend von prätherapeutischen Werten, die im Mittel höher waren als bei *Vitamin-A* und *Placebo*, stieg der Anteil CD3-positiver PBL bis zu dem dritten Untersuchungstermin signifikant auf einen Maximalwert an und stabilisierte sich auf hohem Niveau. An den Meßpunkten 3 war der CD3-Wert signifikant erhöht gegenüber *Vitamin-A* bzw. *Placebo*, an den Meßpunkten 4 und 5 gegenüber *Vitamin-A* (Abb. 3.12a-d). Die CD2-Werte verhielten sich analog zu den CD3-Werten.

Eine signifikante Erhöhung der CD-8-Werte der Gruppe *Enzym* zu einem bestimmten Untersuchungszeitpunkt gegenüber den anderen Patientengruppen konnte nicht gefunden werden (Tab.3.42).

Bei Betrachtung der prätherapeutischen Werte (CD2, CD3, CD4) ist festzustellen, daß diese niedriger als die postoperativen- und die Normwerte waren (Abb. 3.12a-d, Tab.3.42). Schon seit den frühen achtziger Jahren ist die Erniedrigung der absoluten und auch der anteilmäßigen T-Zellzahl bei Patienten mit HNO-Tumoren bekannt (Bier und Nicklisch, 1981). Die Erniedrigung hängt aber auch teilweise von den Lebensumständen der Patienten ab, in der Literatur ist die Erniedrigung von T-Zellparametern im Zuge von Alkoholismus und dadurch resultierender Mangelernährung dokumentiert (Mufti et al, 1988). An dieser Stelle möchte ich erwähnen, daß dieses Argument leider auf einen Großteil der ausgewerteten Patienten zutraf; gutgenährten Alkoholikern ist allerdings kaum eine Immunsuppression nachzuweisen (Ericsson et al, 1980). Ein T-Zellrückgang kann auch auf streßbedingte Cortisolausschüttung beruhen (Jerrells et al, 1989).

Der Einfluß der chirurgischen Tumorresektion auf das Immunsystem, insbesondere auf die T-Lymphozyten ist von Heimlich et al (1997) ausführlich beschrieben worden. Demnach ist der T-Zellanteil im Blut entscheidend von der Operationsdauer, Blutverlust und eventuellen Komplikationen geprägt. Die Verminderung der Gesamtleukozytenzahl und eine signifikante Erniedrigung der T-Zellen korreliert mit der Operationsdauer. Bei komplikationsloser

Operation normalisieren sich die Werte innerhalb eines Monats (Heimlich et al, 1997, Hansbrough et al, 1984).

Bei der zweiten Untersuchung waren die T-Zell-Werte der Patientengruppen angestiegen, was daraufhindeutet, daß die Patienten das Operationstrauma gut überstanden haben. Die Krankenakten gaben keine Hinweise auf Störungen im Operationsablauf und in der Heilungsphase.

Immunparameter reagieren differenziert auf die Art der Tumorthherapie. Alleinige Bestrahlung führt zu einem deutlichen Anstieg des Anteils CD8⁺-T-Zellen und dementsprechend zu einem Rückgang des Anteils CD4⁺-T-Zellen bei Patienten mit HNO-Tumoren (Dammer et al, 1997). Mit einer Chemotherapie wird im allgemeinen eine Supprimierung des Immunsystems in Verbindung gebracht. Da bevorzugt Zellen mit hoher Teilungsrate abgetötet werden, ist das hämatopoetische System besonders betroffen. Dennoch kann einige Zeit nach einer Chemotherapie ein Anstieg der T-Zellen über den prätherapeutischen Status beobachtet werden (Dammer et al, 1997).

In der Gruppe *Enzym* erhielten 5 von 8 Patienten eine kombinierte Chemo- und Radiotherapie, einer eine Chemotherapie, in der Gruppe *Vitamin-A* erhielten 2 von 5 Patienten eine kombinierte Chemo- und Radiotherapie und 2 von 3 *Placebo*-Patienten eine Chemo- bzw. Radio-/Chemotherapie. Die Chemo-, bzw. Radiotherapien erfolgten im Anschluß an die Operation und sind bis auf Ausnahmen nicht in der Universitätsklinik durchgeführt worden. Während eines Zeitraums von ca. 2 Monaten konnten keine Blutproben von den Patienten erhalten werden. In der Zeit nach Therapieende hatte das Immunsystem der Patienten Gelegenheit zur Erholung.

Aufgrund der Ähnlichkeit und relativ gleichförmigen Verteilung der Standardtherapien wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen durch die Therapiefolgen wahrscheinlich in etwa gleich beeinflusst.

Diese Umstände und die Ergebnisse von Dammer et al könnten erklären, daß trotz massiver Eingriffe der Anteil CD3-, (CD2-) und CD8-positiver PBL bei allen Patientengruppen angestiegen, oder zumindest nicht weiter erniedrigt worden ist.

Trotz ähnlicher exogener Beeinflussungen ist einzig bei der Gruppe *Enzym* der Anteil CD3-positiver Lymphozyten gegenüber den prätherapeutischen Werten und den anderen Gruppen signifikant angestiegen. Das könnte als ein Effekt der Enzymtherapie gewertet werden.

Unterstützung findet dieser Gedanke in den Ergebnissen von Kim et al (1982) der nach palliativer systemischer Polyenzymtherapie bei Magenkrebspatienten (n=165; 2 Gruppen) signifikante Steigerung (5,4%) der relativen und absoluten T-Zellzahlen messen konnte.

Der Aktivierungszustand der PBL, gemessen an dem Anteil [CD2⁺/CD2⁻ CD25⁺]-PBL (umfaßt B-, NK- und T-Zellen), war zu Studienbeginn bei allen Patientengruppen einheitlich und teilweise signifikant gegenüber den Normwerten erhöht (Tab.3.38). Auch im zeitlichen Verlauf war die IL-2-R- α -Expression gegenüber den Kontrollen erhöht. Zwischen den einzelnen Patientengruppen konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden, im Mittelwert war aber CD25 auf PBL bei der Gruppe *Enzym* am stärksten exprimiert (Tab.3.42). Eine Hochregulierung des IL-2-Rezeptors auf PBL bei Tumorerkrankungen im HNO-Bereich ist im Zusammenhang mit Tumorevidenz und Tumorthherapie (Dammer et al, 1997) oder Alkoholmißbrauch (Sacanella et al, 1998) beschrieben worden, in einigen Studien konnte kein Anstieg der CD25-Werte beobachtet werden (Mantovani et al, 1994), beschränkt auf CD4⁺-T-Lymphozyten von Wolf et al (1989).

Ein anderer Oberflächenmarker, der mit einer Aktivierung des Immunsystems in Verbindung gebracht wird, ist HLA-DR auf B- und T-Lymphozyten (Palacios et al, 1981). Für die HLA-DR-Expression gilt, was auch über die CD25-Expression bei Patienten und Kontrollen

gefunden wurde: Signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollwerten, vergleichbare Expression innerhalb der Patientengruppen. Es konnte kein Einfluß der Testmedikationen auf die HLA-DR-Expression gefunden werden (Tab.3.38, 3.44).

4.3.1.2 B-Zellen (CD19⁺)

Der Verlauf der B-Zellen, Abfall vom prätherapeutischen Wert und Stabilisierung auf einem etwas niedrigeren Niveau als die Kontrollen, ist von Dammer et al (1997) und Papenhausen et al (1979) beschrieben worden. Die Testmedikationen hatten keinen erkennbaren Einfluß auf den prozentualen Anteil CD19-positiver PBL (Tab.3.43).

4.3.1.3 NK-Zellen (CD56⁺)

Abgesehen von den Patienten der *Vitamin-A*-Gruppe zeigten sowohl *Kontrollen* als auch Patienten der Gruppen *Placebo* und *Enzym* im Verlauf ähnliche CD56-Werte. Eine Verminderung des Anteils und der Aktivität, wie sie oft in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen gesehen wird (Fujieda et al, 1990; Kessler et al, 1988), konnte ich nicht messen (Tab.3.45, 3.46).

Der erhöhte Anteil NK-Zellen in der *Vitamin-A*-Gruppe, signifikant vs. *Kontrollen* an Untersuchungszeitpunkt 2, könnte vielleicht auf eine *Vitamin-A*-Wirkung zurückgeführt werden. In der Literatur ist beschrieben, daß durch hochdosiertes *Vitamin-A* der Anteil CD56-positiver PBL bei Kindern mit HIV signifikant gesteigert werden konnte (Hussey et al, 1996).

Die NK-LAK-Aktivität erreichte, bei großer Streuung innerhalb der Gruppen, bei allen Studienteilnehmern vergleichbare Werte. Dies ist wahrscheinlich auf das Testsystem zurückzuführen (siehe 4.3.2), denn in der Literatur ist eine erhöhte NK-LAK-Aktivität bei HNO-Tumorpatienten beschrieben worden (Tatake et al, 1989).

Eine Steigerung der NK-LAK-Aktivität durch die Enzymmischung, wie sie in den *in vitro*-Untersuchungen gefunden wurde, konnte bei Patienten der *Enzym*gruppe nicht nachgewiesen werden. Dies könnte mit der 5-tägigen Kultivierung der Effektorzellen mit IL-2 erklärt werden. Während dieser Zeit könnten sämtliche Medikationseffekte auf die Effektorfunktionen verlorengegangen sein. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine zu geringen Resorptionsrate der Enzyme, d.h. eine Enzymkonzentration, die zu einer merklichen Aktivierung dieser Effektorzellfunktion führen würde, ist nicht erreicht worden.

4.3.1.4 Lymphozytenanteil an Gesamtleukozyten

Ein Problem dieser Studie ist das Fehlen absoluter Zellzahlen. Die Veränderung prozentualer Anteile erlaubt keine Aussagen über die numerische Größe einer bestimmten Lymphozyten-/Leukozytensubpopulation. Um diesen Nachteil abzumildern, wurde anhand der FACS-Daten das Verhältniss der Leukozytensubpopulationen PBL:PMNL:PBMC bestimmt. Mit dieser Auswertung wurde die Aussage ermöglicht, ob die Leukozytenpopulationen gemeinsam Veränderungen unterliegen (keine Änderung des PBL:PMNL:PBMC-Verhältnisses) oder ob eine bestimmte Population numerischen Veränderungen unterliegt. Es konnte gezeigt werden, daß die PBL-Anteile der Gruppe *Enzym*, *Vitamin-A* und *Placebo* signifikant erniedrigt waren gegenüber den *Kontrollen*. Auch im zeitlichen Verlauf erreichten die PBL-Anteile der Patienten im Mittel nie die Werte der Kontrollen (Tab.3.41, 3.47).

Dies kann beispielsweise für Untersuchungszeitpunkt 2 bedeuten, daß trotz Erhöhung des T-Zellanteil bei Patienten der Gruppe *Enzym* letztendlich die absoluten T-Zellzahl gegenüber den Patienten der Gruppe *Placebo* (mit einem höheren PBL-Anteil) erniedrigt ist.

Ingesamt deuten diese Untersuchungen auf eine veringerte Lymphozytenbildung bei den Patienten hin, dies ist für HNO-Tumoren beschrieben worden (Bier und Nicklisch, 1981).

4.3.1.5 Schlußbetrachtungen

Der Anstieg des Anteils CD3-positiver PBL in der *Enzym*-Gruppe ist möglicherweise eine Folge der verabreichten Polyenzympräparation. Dies leitet über zu der Frage, wie eine Enzymmedikation über einen längeren Einnahmezeitraum eine Steigerung des T-Zellanteils bewirken könnte.

Die Möglichkeit einer Aufnahme der Enzymmoleküle im Darm wird indirekt von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Die Resorption erfolgt demnach zytopenetisch über M-Zellen der Peyerschen Plaques im Dünndarm. M-Zellen besitzen kaum Lysosomen, aufgenommene Partikel bzw. Makromoleküle (z.B. alkalische Phosphatase) werden nahezu unbeschädigt durchgereicht. In Tierversuchen konnte nachgewiesen werden, daß über diesen Mechanismus effektiv sowohl Partikel als auch Makromoleküle das Darmepithel passieren können. Diese werden teilweise von Makrophagen aufgenommen und werden in benachbarten Lymphknoten präsentiert. Nicht aufgenommene Makromoleküle können wahrscheinlich in die Lymphgefäße oder die Blutbahn gelangen (Owen, 1999).

Die Aktivierung des Immunsystems verläuft wahrscheinlich auf unterschiedlichen Wegen. Eine direkte zelluläre Aktivierung könnte über PAR-2 und PAR-4 erfolgen. Dadurch könnte die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren induziert werden, die sich wiederum fördernd auf die Bildungs- und/oder Proliferationsrate von T-Lymphozyten wirken. Es konnte eine erhöhte Synthese der proinflammatorischer Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 durch IFN- γ stimulierte PBMC nach oraler Verabreichung der Polyenzympräparation gemessen werden (Desser et al, 1993).

Indirekte stimulatorische Wirkungen könnten aus den Wechselwirkungen mit Antiproteasen erwachsen. Die Antiproteasen gehören zu der Gruppe der Akute Phase Proteine. Serinproteasen werden von den sogenannten Serpinen gehemmt, Cysteinproteinasen von Cystatinen (Barret und Starkey, 1973; Barret und Salvesen, 1984). Die proteolytische Serumaktivität (PSA) resultiert aus dem Zusammenspiel von Proteasen, ihren Antagonisten und dem α 2-Makroglobulin. Durch die PSA werden Konzentrationen verschiedener Plasmaproteine modifiziert oder abgebaut, wie z.B. die in höheren Konzentrationen immunsupprimierend wirkenden globulären Peptide. Des weiteren werden durch die PSA Zelloberflächenmoleküle modifiziert (Adams et al, 1989; Borth et al, 1994). Es konnte gezeigt werden, daß die PSA nach oraler Enzymzugabe erhöht ist (Maeder und Weigelt, 1972; Kleine et al, 1996).

Der Einsatz von Vitamin-A in der Therapie von HNO-Tumoren erscheint durch seine differenzierungsfördernde Wirkung eher sinnvoll in Hinblick auf die Behandlung von epithelialen Tumoren im Frühstadium und eventuell in der Chemoprävention von Tumoren des Aerodigestivtraktes zu sein (1.1.6.2). Eine klinische Studie zum Einfluß von Vitamin-A auf präkanzeröse Leukoplakien mit dem von uns verwandten Vitamin-A-Präparat in bis zu zehnfach höherer Dosierung ergab komplette Remission der Leukoplakien in 65% der Fälle, eine partielle Remission in 26% der Fälle (Issing et al, 1996). Ein ungelöstes Problem ist die Toxizität des hochdosierten Retinols für die Leber (Oren und Ilan, 1992; Geubel et al, 1991). Retinol und Retinoide sind unerlässlich für die Hämatopoese (Göttgens und Green, 1995) und Vitamin-A-Mangelernährung führt zu Störungen der Blutzellbildung. Die immunsuppressiven

Effekte einer Vitamin-A-Mangelernährung können jedoch durch eine ausreichende Vitamin-A-Versorgung (Tagesbedarf) behoben werden (Semba et al, 1993). Die Literatur gibt keine Hinweise, ob durch hochdosiertes Vitamin-A Immunfunktionen entscheidend verbessert werden können.

4.3.2 Studiendurchführung

Das Aufkommen geeigneter Patienten fiel erheblich geringer aus als veranschlagt, die erwünschte Anzahl von 45 Studienteilnehmern konnte nicht erreicht werden.

Eine erstrebte Zusammenarbeit mit der städtischen Klinik in Frankfurt/Höchst kam aufgrund dortiger personeller Änderungen nicht zustande.

Die Durchführung dieser Studie war mit wahrscheinlich unvermeidbaren Schwierigkeiten behaftet. Von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich ist eine sehr homogene Bevölkerungsgruppe von häufig alkoholkranken, männlichen Patienten ab dem Alter von 50 Jahren betroffen. Diese Patienten sind schwierig zu führen und bezüglich der Einnahme der Medikation und Wahrung der Untersuchungstermine nicht immer zuverlässig.

Bei malignen Erkrankungen im Kopf-Halsbereich und in Folge einer chirurgischen Tumorresektion kommt es häufig zu Schluckbeschwerden, so daß Dragees nicht eingenommen werden können. Eine Medikamentengabe über eine Magensonde entfällt, da die Magensäure zu einer schnellen Denaturierung der Medikamente führen kann. Die Verabreichungsform der Testmedikation sollte daher mehr den Bedürfnissen der Patienten angepaßt werden.

Es hat sich sowohl für die Ärzte, als auch für die Patienten vorteilhaft erwiesen, die Studienteilnehmer an einem gesonderten Termin außerhalb der üblichen Tumorsprechstunde zu untersuchen.

Für die Funktionsanalyse (Lak und NK-LAK-Aktivität) wurden die PBL 5-6 Tage präinkubiert. Während dieses Zeitraums sind wahrscheinlich sämtliche Medikamenteneffekte verlorengegangen. Hier wäre zu überlegen, die Funktionsanalyse am Tag der Blutabnahme durchzuführen.

4.4 Zusammenfassung

Die doppelblinde Pilotstudie „Wirksamkeit und Verträglichkeit einer Enzym- oder Vitamin-A-Therapie bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich“ wurde in Zusammenarbeit mit der HNO-Klinik in dem Zeitraum von Oktober 1994 bis Juni 1996 mit 25 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und 15 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Den Patienten wurde neben der konventionellen Therapie entweder Vitamin-A (Retinolpalmitat, 150,000 IE/d), die Enzympräparation (proteolytische Gesamttaktivität 20,880 F.I.P.-E/d) oder Placebo zugeteilt.

In regelmäßigen Abständen wurde das Allgemeinbefinden/ Nebenwirkungen protokolliert, Blutbild und Leberwerte bestimmt, die peripheren Lymphozyten phänotypisiert und die NK-LAK, bzw. LAK-Zell-Aktivität gemessen. Zur Auswertung gelangten 16 Patienten. Statistisch signifikant war eine Erhöhung der CD2 und CD3-Werte der *Enzym*-Gruppe (41 Messungen) gegenüber den Patienten der Gruppen *Vitamin-A* (18 Messungen), *Placebo* (12 Messungen) und den Ausgangswerten der Patienten (25 Messungen). Auch im Verlauf konnte die Erhöhung der CD3-Werte bei der Enzymgruppe gegenüber den anderen Patientengruppen bestätigt werden. Der Anteil der T-Zellen im peripheren Blut lag im Bereich der gesunden Kontrollen.

Um die Wirkungen der Prüfmedikationen auf Leukozyten (PBL, PMNL, Monozyten) *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Panel durchflußzytometrischer Tests entwickelt, bzw. etabliert, die die Messung der Funktionen NK-Zellaktivität, LAK-Aktivität, ADCC, Phagozytose und Sauerstoffradikalbildung ermöglichten bzw. vereinfachten.

Die untersuchte Enzympräparation enthielt Papain, Trypsin und Chymotrypsin im Verhältnis 2,5:1:1. *In vitro*-Versuche ergaben eine dosisabhängige Stimulierung der NK-, NK-LAK, CTL- bzw. LAK-Aktivität und der ADCC durch NK-Zellen durch die Enzympräparation. Es war möglich, die Lymphozyten mehrfach zu stimulieren, eine Enzymdauerabgabe, bzw. hohe Enzymdosen führten zu einem Aktivitätsrückgang. Die Enzymmischung verbesserte die Phagozytose und den oxidativen Burst bei PMNL und erhöhte die CD18- und CD54- bzw. erniedrigte die CD16-Expression auf PMNL.

Mit all-*trans*-Retinsäure bzw. Retinol konnten die Lymphozytenaktivitäten *in vitro* mit den gewählten Versuchsbedingungen kaum beeinflußt werden, Änderungen konnten meist 48h bis 72h nach Zugabe beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant waren. Beobachtungen zu Vitamin-A-Wirkungen auf PMNL waren nicht möglich, da diese nur maximal 24h kultiviert werden konnten.

5. Literatur

Adams DO

Phagocytic cells: Cytotoxic activities of macrophages.

In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds.)

Inflammation-basic principles and clinic correlates

Raven Press New York (1989)

Allende LM, Corell A, Madrono A, Gongora R, Rodriguez-Gallego C, Lopez-Goyanes A, Rosal M, Arnaiz-Villena A

Retinol (vitamin-A) is a cofactor in CD3-induced human T-lymphocyte activation.

Immunology: **90** (1997), 388-396

Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK

Phagocytosis mediated by three distinct Fc γ receptor classes on human leukocytes.

J Exp Med: **171** (1990), 1333-1345

Ankathil R, Mathew A, Joseph F, Nair MK

Is oral cancer susceptibility inherited? Report of five oral cancer families.

Oral Oncol, Eur J Cancer: **32** (1996), 63-67

Apasov S, Redegeld F, Sitkovsky M

Cell-mediated cytotoxicity: Contact and secreted factors.

Curr Opin Immunol: **5** (1993), 404-410

Babior BM

NADPH Oxidase : An Update

Blood: **93** (1999), 1464-1476

Badley RA, Martin WG, Schneider H

Dynamic behaviour of fluorescent probes in lipid bilayer model membranes.

Biochemistry: **12** (1973), 268-275

Barret AJ, Starkey PM

The interaction of α_2 macroglobulin with proteinases.

Biochem J: **133** (1973), 709

Barret AJ, Salvesen G (eds.)

Proteinase inhibitors.

Verlag Elsevier, Amsterdam, 1986

Bassoe CF, Laerum OD, Solberg CO, Haneberg B

Phagocytosis of bacteria by human leukocytes measured by flow cytometry.

Proc Soc Exp Biol Med: **174** (1983), 182-186

Bassoe CF

Flow cytometric studies on phagocyte function in bacterial infections.

Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect. C: **92** (1984), 167-171

Bates CJ

Vitamin A.

Lancet **345** (1995), 31-35

Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D

Multiple head and neck tumors: Evidence for a common clonal origin.

Cancer Res: **56** (1996), 2484-2487

Bell EB, Sharpshott SM, Bunce C

CD4+ T-cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen – a unifying concept.

Immunol Today: **19** (1998), 60-64

Benner SE, Pajak TF, Lippmann SM, Earley C, Hong WK

Prevention of secondary primary tumors with isotretinoin in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck: longterm follow-up.

J Natl Cancer Inst: **86** (1994); 140-141

Bier J, Nicklisch U

Verlaufsuntersuchungen unspezifischer Immunparameter bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen.

Arch Oto-Rhino-Laryngol: **232** (1981), 145-163

Biesalski HK

Wirksamkeit von Beta-Carotin bei der Prävention von Krebs. Wunsch oder Wirklichkeit?

Vit Min Spur: **5** (1990), 1-32

Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC jr., Carl VS, Peterson VN

Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis.

Arch Surg: **131** (1996), 24-29

Bohndorf W, Höcker G.

Würzburger Ergebnisse beim Larynxkarzinom.

Strahlentherapie: **151** (1976), 132-143

Boetz F, Breuninger H, Draf W, Ganzer U, Glanz H, Hagen R, Howaldt HP, von Ilberg C, Iro H, Maier H, Müller RP, Mergenthaler HG, Wendt TG, Werner JA

Onkologie des Kopf-Hals-Bereiches.

HNO: **48** (2000), 104-118

Borth W, Feinmann RD, Gonia SL (eds.)

Biology of α_2 macroglobulin – its receptor and related proteins.

Ann NY Acad Sci: **737** (1994)

Brandwein MS, Nuovo GJ, Biller H

Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers.

Ann Otol Rhinol Laryngo: **102** (1993), 309-313

- Brass LF, Vasallo RR, Belmonte E, Ahuji M, Cichowski K, Hoxie JA
Structure and function of the human platelet thrombin receptor: studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus.
J Biol Chem: **267** (1992), 13795-13798
- Brown TR, Stonehouse TJ, Branch JS, Brickell PM, Katz DR
Stable transfection of U937 cells with sense or antisense RXR-alpha cDNA suggests a role for RXR- α in the control of monoblastic differentiation induced by retinoic acid and vitamin D.
Exp Cell Res: **236** (1997), 94-102
- Burch JD, Howe GR, Miller AB, Semenciw R
Tobacco, alcohol asbestos and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study.
JNCI: **67** (1981); 1219-1224
- Callender T, El-Nagger AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG
PRAD-1 (CCND1)/cyclin D1 oncogene amplification in primary head and neck squamous cell carcinoma.
Cancer: **74** (1994), 152-158
- Carey TE, Van Dyke DL, Worsham MJ
Nonrandom chromosomes aberrations and clonal populations in head and neck cancer.
Anticancer Res: **13** (1993), 2561-2568
- Cassatella MA
The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.
Immunol Today: **16** (1995), 21-26
- Chu EW, Malmgren RA
An inhibitory effect of vitamin A on the induction of tumors of forestomach and cervix in the Syrian hamster by carcinogenic polycyclic hydrocarbons.
Cancer Res: **25** (1965), 884-895
- Clayman GL, Stewart MG, Weber RS, el Naggar AK, Grimm EA
Human papillomavirus in laryngeal and hypolaryngeal carcinomas. Relationship to survival.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg: **120** (1994), 743-748
- Croghan JB
Altered neutrophil phagocytic function in burn patients.
J Trauma: **16** (1976), 734-738
- Cruse JM, Lewis RE
Atlas of Immunology.
Springer Verlag Heidelberg, 1999
- Cui J, Bystryn JC
An improved europium release assay for complement-mediated cytotoxicity.
J Immunol Methods: **147** (1992), 13-19

Dammer R, Wurm EM, Niederdellmann H, Fleischmann H, Knuchel R
Immunocytochemical venous blood studies in patients with manifest oral cavity carcinomas, oral precancerous conditions, benign tumors and in chronic alcoholic patients.
Mund Kiefer Gesichtschir: **1** (1997), 95-103

DeClerck
Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer.
Eur J Cancer: **36** (2000), 1259-1267

DeLaney TF, Afridi N, Taghian AG, Sanders DA, Fuleihan NS, Faller DV, Nogueira CP
PHASE I Trial of 9-cis retinoic acid in adults with solid tumors.
Cancer Res: **56** (1996), 2277-2280

Delves PJ, Roitt IM
Advances in Immunology: The Immune system (First of two parts)
New England J Med: **343** (2000), 37-49

Delves PJ, Roitt IM
Advances in Immunology: The Immune system (Second of two parts)
New England J Med: **343** (2000), 108-117

Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnet NW
Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases.
Am J Physiol: **274** (1998), 1429-1452

Desser L, Rehberger A
Induction of Tumor Necrosis Factor in human peripheral-blood mononuclear cells by proteolytic enzymes.
Oncology: **47** (1990), 475-477

Desser L, Rehberger A, Kokron E, Paukovitis W
Cytokine synthesis in human peripheral blood mononuclear cells after oral administration of polyenzyme preparations.
Oncology: **50** (1993), 403-407

Desser L, Rehberger A, Kokron E, Paukovitis W
Proteolytic enzymes and amylase induce cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro.
Cancer Biother Fall: **9** (1994), 253-263

Devesa S, Silverman D
Trends in cancer incidence and mortality in the United States: 1935 – 1974.
J Natl Cancer Inst: **60** (1978), 393-400

Dobmeyer TS, Raffel B, Dobmeyer JM, Findhammer S, Klein SA, Kabelitz D, Hoelzer D, Helm EB, Rossol
Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts.
Eur J Med Res: **1** (1995), 9-15

Donnerstag B, Henzel K, Staib-Sebler E, Oltrogge JB, Lorenz M, Träger L
Relevance of immunological parameters in progression of colorectal carcinoma.
Oncology Reports: **1** (1994), 419-422

Ericsson CD, Kohl S, Pickering LK, Davis J, Glass GS, Faillace LA
Mechanisms of host defense in well nourished patients with chronic alcoholism.
Alcoholism Clin Exp Res: **4** (1980), 261-265

Fegan C, Bailey-Wood R, Coleman S, Phillips SA, Neale L, Hoy T, Whittaker JA
All trans retinoic acid enhances human LAK activity.
Eur J Haematol: **54** (1995), 95-100

Feige JJ, Negoescu A, Keramidas M, Souchelnitskiy S, Chambaz EM
 α 2-Makroglobulin: A binding protein for transforming growth factor- β and various cytokines.
Horm Res: **45** (1996); 227-232

Freedmann LP
Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling.
Cell: **97** (1999), 5-8

Fritsche J, Stonehouse TJ, Katz DR, Andreesen R, Kreutz M
Expression of retinoid receptors during human monocyte differentiation in vitro.
Biochem Biophys Res Com: **270** (2000), 17-22

Fujieda S, Saito H, Hoshino T
Responses of killer cells in head and neck cancer patients.
Eur Arch Otorhinolaryngol: **247** (1990), 176-181

Garcia KC, Scott CA, Brunmark A, Carbone FR, Peterson PA, Wilson IA, Teyton L
CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes.
Nature: **384** (1996), 577-581

Ganzer U, Meyer-Breiting E, Ebbers J, Vosteen KH
Der Einfluß von Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Behandlungsart auf die prognose des Hypopharynxkarzinoms.
Laryngol Rhinol Otol: **61** (1982), 622-628

Geubel AP, de Galoscy C, Alves N
Liver damage caused by therapeutic vitamin-A administration: Estimation of dose-related toxicity in 41 cases.
Gastroenterology: **100** (1991), 1701-1709

Göttgens B, Green AR
Retinoic Acid and the differentiation of lymphohaematopoietic stem cells.
BioEssays: **17** (1995), 187-189

Goodwin WJ, Bordash GD, Huijing F, Altmann N
Inhibition of hamster tongue carcinogenesis by selenium and retinoic acid.
Ann Oto Rhinol Laryngol: **95** (1986), 162-166

- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA
Lymphokine activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes.
J Exp Med: **155** (1982), 1823- 1841
- Gross V, Villinger PM, Zhang B, Lotz M
Retinoic acid inhibits interleukin-1-induced cytokine synthesis in human monocytes.
J Leukoc Biol: **54** (1993), 125-132
- Hansbrough JF, Bender EM, Zapata-Sirvent R, Anderson J
Altered helper and suppressor lymphocyte populations in surgical patients.
Am J Surg: **148** (1984), 303-307
- Hatam L, Schuval S, Bonagura VR
Flow cytometric analysis of natural killer function as a clinical assay.
Cytometry: **16** (1994), 59-68
- Haunschild J, Lang K, Luckenbach GA, Rösener S, Steinfeld P, Uhl J
Humanized monoclonal antibody EMD72000 binding to the receptor for the human epidermal growth factor.
Investigator's brochure, firmeninterne Dokumentation der Merck AG (1995)
- Heimlich F, Dietz A, Daniel V, Maier H
Einfluß tumorchirurgischer Eingriffe im Kopf-Hals-Bereich auf das Immunsystem.
HNO: **47** (1999), 885-892
- Herity B, Moriarty M, Daly L, Dunn J, Bourke GJ
The role of tobacco and an alcohol in the aetiology of lung and larynx cancer.
Br J Cancer: **46** (1982), 961-964
- Herzenberg LA, De Rosa SC, Herzenberg LA
Monoclonal antibodies and the FACS: Complementary tools for immunobiology and medicine.
Immunol Today: **21** (2000), 383-390
- Holzer K, Henrich D, Konietzny P, Wilhelm K, Encke A
Einfluß der diffusen Peritonitis auf die Expression des Fc-Rezeptors Typ III (CD16) von emigrierten und zirkulierenden Leukozyten.
Chirurgisches Forum 2000 für experimentelle und klinische Forschung: **29** (2000), 527-540
- Hong Kong Cancer Registry
Cancer incidence in Hong Kong 1982.
Kowloon, Hong Kong: Hong Kong Government's Medical and Health Department Institute of Radiology and Oncology, InstitutetQueen Elizabeth Hospital. 1982
- Honig MG, Hume
Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long term cultures.
J Cell Biol: **103** (1986), 171-187

Howell GL, Macey MG, Carla C, Hou L, Fox MT, Harriot P, Stone SR
Proteinase-activated receptor-2: Expression by human neutrophils.
J Cell Science: **110** (1997), 881-887

Hou L, Ravenall S, Macey MG, Harriott P, Kapas S, Howells GL
Protease-activated receptors and their role in IL-6 and NF-IL-6 expression in human gingival fibroblasts.
J Periodontal Res: **33** (1998 a), 205-211

Hou L, Kapas S, Cruchley AT, Macey MG, Harriott P, Chinni C, Stone SR, Howells GL
Immunolocalization of protease-activated receptor-2 in skin: receptor activation stimulates interleukin-8 secretion by keratinocytes in vitro.
Immunology: **94** (1998 b), 356-362

Hussain M, Gagdeel S, Kucuk O, Du W, Salwen W, Ensley J
Paclitaxel, cisplatin and 5-fluorouracil for patients with advanced recurrent squamous cell caecinoma of the head and neck.
Cancer: **86** (1999), 2364-2369

Hussey G, Hughes J, Potgieter S
Vitamin-A status and supplementation and its effects on immunity in children with AIDS.
Abstract of the XVII International Vitamin-A Consultative Meeting,
Guatemala City, Washington DC: International Life Science Institute. (1996), 6

Inoue I, Yamamoto Y, Ito T, Takahashi H
Chemoprevention of tongue carcinogenesis in rats.
Oral Surg Oral Med Oral Path: **76** (1993), 608-615

Ishitoya J, Toriyama M, Oguchi N, Kitamura K, Oshima M, Asano K, Yamamoto T
Gene amplification and overexpression of EGF receptor in squamous cell carcinomas of the head and neck.
Br J Cancer: **59** (1989), 559-562

Issing WJ, Struck R, Naumann A, Kastenbauer E
A-Mulsin Hochkonzentrat, ein neues Therapiekonzept bei Larynxleukoplakien.
Laryngologie: **75** (1996), 29-33

Janeway CA, Travers P
Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)

Jaffrey C, Mendez C, Denham W, Carter G, Norman J
Specific pancreatic enzymes activate macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha: role of nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B proteins.
J Gastrointest Surg: **4** (2000), 370-377

Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J, Cardesa A
PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and timor progression in human laryngeal carcinomas.
Cancer Res: **54** (1994), 4813-4817

- Jerrells TR, Peritt D, Marietta C, Eckardt MJ
Mechanisms of suppression of cellular immunity induced by ethanol.
Alcohol Clin Exp Res: **13** (1989), 490-493
- Jiang XL, Dillehay DL, Everson MP, Tilden AB, Lamon EW
Potentiation of IL-2 induced T-cell proliferation by retinoids.
Int J Immunopharmacol: **14** (1992), 195-204
- Jyothirmayi R, Ramadas K, Varghese C, Jacob R, Nair MK, Sankaranarayanan R
Efficacy of vitamin-A in the prevention of locoregional recurrence and second primaries in head and neck cancer.
Oral Oncol, Eur J Cancer: **32B** (1996), 373-376
- Kaffenberger W, Clasen BPE, van Beuningen D
The respiratory burst of neutrophils, prognostic parameter in head and neck cancer ?
Clin Immunol Immunopath: **64** (1992), 57-62
- Kambic V, Radsel Z, Prezelj J, Zargi M
The role of testosterone in laryngeal carcinogenesis.
Am J Otolaryngol: **5** (1984), 344-349
- Kessler DJ, Mickel RA, Lichtenstein A
Depressed natural killer cell activity in cervical lymph nodes containing focal metastatic squamous cell carcinoma.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg: **114** (1988), 313-318
- Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk JR
Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis of human neutrophils.
Kidney Int: **53** (1998), 84-91
- Kim JP, Ha WS, Kim SJ
13th International Congress of Chemotherapy, Wien 28.08 – 02.09.1982
Zusammenfassung in Selecta Supl: **36** (1983), 15
- Kleef R, Bovbjerg D
Selective modulation of cell adhesion molecules on lymphocytes by bromelain protease 5.
Pathobiology: **64** (1996), 339-346
- Kleine MW, Stauder GM, Gebauer F
Kinetics of proteolytic enzyme activity of serum in a controlled randomized double blind study.
2nd International Congress on biological response modifiers, San Diego, USA, (1993)
- Kleinmann RE, Walker WA
Antigen-processing and uptake from the intestinal tract.
Clin Rev Allergy: **2** (1984), 25-37
- Knecht R, Stegmüller M, von Ilberg C
Effekt von EGF-Antikörpern auf das Wachstum von HNO-Plattenepithel-Ca.
HNO: **4** (1997), 266, Abstrakt 90

Koo LC

Dietary habits and lung cancer risk among chinese females in Hong Kong who never smoked.
Nutr Cancer: **11** (1988), 155-172

Kusukawa J, Harada H, Shima I, Sasaguri Y, Kameyama T, Morimatsu M

The significance of epidermal growth factor receptor and matrix metalloproteinase-3 in squamous cell carcinoma of the oral cavity.

Oral Oncol, Eur J Cancer: **32B** (1996), 217-221

Lanier LL, Phillips JH

Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells.

Immunol Today: **17** (1996),86-91

Lanier LL

The origin and function of natural killer cells.

Clin Immunol: **95** (2000), S14-S18

Lechler RI, Norcross MA, Germain RN

Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function by using Ia-expressing L cells.

J Immunol: **135** (1985), 2914-2922

Lee A, Whyte MKB., Haslett C

Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators.

J Leukoc Biol: **54** (1993), 283-288

Lehmann C, Glass B, Zeis M, Schmitz N, Uharek L

Investigating the lysis of small-cell lung cancer cell lines by activated natural killer (NK) cells with a fluorometric assay for NK-cell-mediated cytotoxicity.

Cancer Immunol Immunother: **48** (1999), 209-213

Leskovaar P

Neuartige immuntherapeutische Modelle bei neoplastischen Erkrankungen des Urogenitaltraktes unter besonder Berücksichtigung des Blasenkarzinoms.

Allerg Immunol: **35** (1989), 249-262

Lin TH, Chu TM

Enhancement of murine lymphokine-activated killer cell activity by retinoic acid.

Cancer Res: **50** (1990), 3013-3018

Ljunggren HG, Kärre K

Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants: Analysis of the mechanism.

J Exp Med: **162** (1985), 1745-1759

Lötzerich H, Hirt W

Durchflußzytometrische, nichtradioaktive Methode zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von natürlichen Killerzellen: Vergleich mit dem klassischen ⁵¹Cr-Release-Assay.

J Lab Med, **21** (1997), 13-20

Lorenz J, Biesalski HK

Vitamin-A-Mangel und Bronchialkarzinom: Perspektiven der Chemoprävention bronchialer Tumoren.

Pneumologie: **47** (1993), 657-665

Lozzio CB, Lozzio BB

Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.

Blood: **45** (1975), 321-334

Lu PH, Negrin RS

A novel population of expanded human CD3⁺CD56⁺ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with SCID.

J Immunol: **153** (1994), 1687-1696

Macey MG

The protease-activated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells.

Br J Haematol: **101** (1998), 1-9

Maeder K, Weigelt O

Die Bestimmung der proteolytischen und fibrinolytischen Aktivität auf Blut- und Hämoglobin-Agarplatten.

Arzneimittel-Forsch: **22** (1972), 116-117

Maier H, Gewelke U, Dietz A, Heller WD, Weidauer H

Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer.

Clin Investig: **70** (1992), 320-327

Mantovani G, Maccio A, Lai P, Turnu E, Del Giacco GS

Study of peripheral blood lymphocyte subset distribution and IL-2 receptor (IL-2 R) p55-p75 subunit expression in patients with cancer of different sites.

Cell Biophys: **24-25** (1994), 301-305

Mari B, Guerin S, Far DF, Breitmayer JP, Belhacene N, Peyron JF, Rossi B, Auberge P

Thrombin and trypsin-induced Ca²⁺ mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors.

FASEB: **10** (1996), 309-316

Mason LH, Anderson SK, Yokohama WM, Smith HRC, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR

The Ly49D receptor activates murine natural killer cells.

J Exp Med: **184** (1996), 2119-2228

Matheis M, Scholz M, Simon A, Henrich D, Wimmer-Greinecker G, Moritz A

Timing of Leukocyte Filtration during cardiopulmonary bypass.

Perfusion: **16** (2001), 31-37

Meyer-Breiting E

Zur Histopathologie bestrahlter und nicht bestrahlter Kehlkopfkarzinome.

Habilitationsschrift (1981), Frankfurt am Main

Miyata S, Koshikawa N, Yasumitsu H, Miyazaki K

Trypsin stimulates integrin $\alpha_5\beta_1$ -dependent adhesion to fibronectin and proliferation of human gastric carcinoma cells through activation of proteinase-activated receptor 2.

J Biol Chem: **275** (2000), 4592-4598

Mufti SI, Prabhala R, Moriguchi S, Sipes IG, Watson RR

Functional and numerical alterations induced by ethanol in the cellular immune system.

Immunopharmacol: **15** (1988), 85-94

Muscat JE, Wynder EL

Diesel exhaust, diesel fumes and laryngeal cancer.

Otolaryngol Head Neck Surg: **112** (1995), 437-440

Mutirangura A, Supiyaphun P, Trirekapan S, Sriuranpong V, Sakuntabhat A, Yenrudi S, Voravud N

Telomerase activity in oral leukoplasia and head and neck squamous cell carcinoma.

Cancer Res: **56** (1996), 3550-3533

Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG

Leukocytes, the janus cells in inflammatory disease.

Langenbeck's Arch Surg: **384** (1999), 222-232

Nystedt S, Emilsson IE, Wahlestedt C, Sundelin J

Molecular cloning of apotential proteinase-activated receptor.

Proc Natl Acad Sci: **91** (1994), 9208-9212

Olofsson H, Van Nostrand AW

Growth and spread of laryngeal carcinoma with reflection on the effect of preoperative irradiation.

Acta Otolaryngol: Suppl **308** (1973), 1-84

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL Jr, Valanis B, Williams JH Jr, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S

Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial.

J Natl Cancer Inst: **88** (1996), 1550-1559

Oren R, Ilan Y

Reversible hepatic injury induced by long-term Vitamin-A ingestion.

Am J Med: **93** (1992), 703-704

Ortaldo JR, Oldham RK, Cannon GC, Herbermann RB

Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line.

J Natl Cancer Inst: **59** (1977), 77-82

Ortaldo JR, Winkler-Pickett RT, Yagita H, Young HA

Comparative studies of CD3⁻ and CD3⁺CD56⁺ cells: examination of morphology, functions, T-cell receptor rearrangement, and pore forming protein expression.

Cell Immunol: **136** (1991), 486-495

Owen RL

Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches – a personal and historical perspective.

Semin Immunol: **11** (1999), 157-163

Panes J, Granger DN

Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease.

Gastroenterol: **114** (1998), 1066-1090

Palacios R, Möller G

HLA-DR antigens render resting T-cells sensitive to IL-2 and induce production of growth factors in autologous mixed lymphocyte reaction.

Cell Immunol: **63** (1981), 143-153

Papa S, Vitale M, Mariani AR, Roda P, Faccini A, Manzoli FA

Natural killer function in flow cytometry.

J Immunol Methods: **107** (1988), 73-78

Papenhausen PR, Kukwa A, Croft CB, Borowiecki B, Silver C, Emerson EE

Cellular immunity in patients with epidermoid cancer of the head and neck.

Laryngoscope: **89** (1979), 538-549

Phillips JH, Lanier LL

Dissection of the lymphokine-activated killer phenomenon.

J Exp Med: **164** (1986), 814-825

Pulvertaft RJV

Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma).

Lancet: **1** (1964), 238-240

Ramadan MF, Morton RP, Stelle PM, Pharoah POD

Epidemiology of laryngeal cancer.

Clin Otolaryngol: **7** (1982), 417-428

RobertsonMJ, Ritz J

Biology and clinical relevance of human natural killer cells.

Blood: **76** (1990); 2421-2438

Roos D, Bot AA, van Schaik ML, de Boer M, Daha MR

Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations.

J Immunol: **126** (1981), 433-440

Rothe G, Emmendorffer A, Oser A, Roesler J, Valet G

Flow cytometric measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123

J Immunol Methods: **138** (1991), 133-135

Rothe G, Valet G

Flow cytometric assays of oxidative burst activity in phagocytes.
Methods Enzymol: **233** (1994), 539-548

Rowley H, Helliwell TR, Jones AS, Roland NR, Field EA, Field JK

An immunohistochemical analysis of p53 protein expression in pre-malignant and malignant tissues of the oral cavity.
Clin Otolaryngol: **22** (1997), 23-29

Rowley H, Sherrington P, Kinsella AR, Helliwell TR, Jones AS

P53 protein expression and p53 mutations in pre-malignant and malignant tissues of the oral cavity.
Otolaryngol Head Neck Surg: **118** (1998), 115-121

Rouvier E, Luciani MF, Goldstein P

Fas involvement in Ca²⁺ independent T cell-mediated cytotoxicity.
J Exp Med: **177** (1993), 195-200

Sacanella E, Estruch R, Gaya A, Fernandez-Sola J, Antunez E, Urbano-Marquez A

Activated lymphocytes (CD25+ CD69+ cells) and decreased CD19+ cells in well-nourished chronic alcoholics without ethanol-related diseases.
Alcohol Clin Exp Res: **22** (1998), 897-901

Sankaranarayanan R, Mathew B, Varghese C, Sudhakaran PR, Menon V, Jayadeep A, Nair MK, Mathews C, Mahalingam TR, Balaram P, Nair PP

Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin-a and beta carotene: An assessment.
Oral Oncol: **33** (1997), 231-236

Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C

Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages.
J Clin Invest: **83** (1989), 865-75

Schmidt-Wolf IGH, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weismann IL

Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine induced killer cells with potent antitumor cell activity.
J Exp Med: **174** (1991), 139-149

Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weismann IL, Negrin RS

Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor recognition of cytokine induced killer cells.
Exp Hematol: **21** (1993), 1673-1679

Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, Scheffold C, Csipai M, Mehta B, Tsuruo T, Huhn D, Blume KG, Negrin RS

Sensitivity of multidrug resistant tumor cell lines to immunologic effector cells.
Cell Immunol: **169** (1996), 85-90

Schoelch ML; Regezi JA, Dekker NP, Ng IOL, McMillan A, Ziober BL, Thu Le Q, Silverman S, Fu KF
Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma.
Oral Oncol: **35** (1999), 333-342

Schwab W, zum Winkel J
Möglichkeiten der Strahlentherapie in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.
Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

Scott GBD
A quantitative study of microscopical changes in the epithelium and subepithelial tissue of the laryngeal folds, sinus and saccule.
Clin Otolaryngol: **1** (1976), 257-264

Seiffert J, Ganser R, Brendel W
Die Resorption eines proteolytischen Enzyms pflanzlichen Ursprungs aus dem Magen-Darm-Trakt in das Blut und die Lymphe von erwachsenen Ratten.
Z Gastroenterol: **17** (1979), 1-8

Semba RD, Muhilal, Ward BJ, Griffin DE, Scott AL, Natadisastra G, West KP, Sommer A
Abnormal T-cell subset proportions in vitamin-A-deficient children.
Lancet **341** (1993), 5-8

Shaw S, Luge GEG
The lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and CD2/LFA3 pathways of antigen independent human T cell adhesion.
J Immunol: **139** (1988), 1037-1045

Sheng ZM, Barrois M, Klijanienko J, Micheau C, Richard JM, Riou G
Analysis of c-Ha-ras-1 gene for deletion, mutation, amplification and expression in lymph node metastases of human head and neck carcinomas.
Br J Cancer: **62** (1990), 398-404

Sidell N, Chang B, Bhatti L
Upregulation of interleukin-2-receptor mRNA in human T lymphocytes by retinoic acid.
Cell Immunol: **146** (1993), 28-37

Sidell N, Kummer U, Aframian D, Thierfelder S
Retinoid regulation of interleukin-2 receptors on human T-cells.
Cell Immunol: **179** (1997), 116-125

Skolnik EM, Martin LD, Wheatley MA, Yee KF, Kottler R
Combined therapy in the management of laryngeal carcinoma.
Can J Otolaryngol: **4** (1975), 236-246

Snow JB, Gelber RD, Kramer S, Davis LW, Marcial VA, Lowry LDVA, Lowry LD
Randomized preoperative and postoperative radiation therapy for patients with carcinoma of the head and neck: preliminary report.
Laryngoscope: **90** (1980), 930-945

Steffen C, Zeitlhofer J, Menzel J, Smolen J

Antigen-induzierte experimentelle Arthritis als Prüfverfahren für Entzündungshemmung durch oral applizierte Substanzen.

Z Rheumatol: **38** (1979), 264-278

Steffen C, Menzel J, Smolen J

Grundlagenuntersuchung zur Enzymtherapie bei Immunkomplexen.

Wiener klein Wschr: **97** (1985), 376-385

Stein-Streilein J, Hart DA

Exogenous protease promotes specific antibody forming cell response in vitro.

Cell Immunol: **54** (1980), 284-292

Sturm W, Menze B, Krause J, Thriene B

Use of asbestos, health risks and induced occupational diseases in the former East Germany.

Toxicol Lett: **72** (1994), 317-324

Sung MW, Nagashima S, Johnson JT, Van Dongen GAMS, Whiteside T

The role of apoptosis in antibody-dependent-cell-mediated cytotoxicity against monolayers of human squamous cell carcinoma of the head and neck targets.

Cellular Immunol: **171** (1996), 20-29

Tatake RJ, Krishnan N, Rao RS, Fakih AR, Gangal SG

Lymphokine-activated killer-cell function of lymphocytes from peripheral blood, regional lymph nodes and tumor tissues of patients with oral cancer.

Int J Cancer: **43** (1989), 560-566

Teo PML, Chan ATC, Leung SF, Chau RMC, Yu PKW, King WWK, Johnson PJ

Increased incidence of tongue cancer after primary radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma – the possibility of radiation carcinogenesis.

Eur J Cancer: **35** (1999), 219-225

The HS, Kiesiliow P, Scott B, Kishi H Uematsu Y, Bluthmann H, von Boehmer H

Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of cells.

Nature: **335** (1988), 229-233

Thiel M, Holzer K, Kreimeier U, Moritz S, Peter K, Messmer K

Effects of adenosine on the functions of circulating polymorphonuclear leukocytes during hyperdynamic endotoxemia.

Infection Immunity: **65** (1997), 2136-2144

Unanue ER, Beller D, Lu CY, Allen PM

Antigen presentation: Comments on its regulation and mechanism.

J Immunol: **132** (1984), 1-5

Van Dyke DL, Worsham MJ, Benninger MS, Krause CJ, Baker SR, Wolf GT, Drumheller T,

Tilley BC, Carey TE

Recurrent cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the head and neck region.

Gene Chrom Cancer: **9** (1994), 192-206

Van Eimeren W, Biehl G, Tuluweit K
Therapie traumatisch verursachter Schwellungen.
Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York (1994)

Van Schaik W
Einflüsse der hochdosierten Wobenzym-Einnahme auf die hydolytische Aktivität des blutes
und den Titer verschiedener Serumproteine.
Studie der Medizinischen Enzymforschungsgesellschaft e.V., Geretsried

Van Seventer GA Simuzi Y, Shaw S
Roles of multiple accessory molecules in T cell activation.
Curr Opin Immunol: **3** (1991), 353-360

Van Zandwijk N, Dalesio O, Pastorino U, de Vries N, van Tinteren H
EUROSCAN, a Randomized Trial of Vitamin A and N-Acetylcysteine in Patients With Head
and Neck Cancer or Lung Cancer.
J Natl Cancer Inst: **92** (2000), 977-986

Volgmann T, Klein-Struckmeier A, Mohr H
A fluorescence-based assay for quantitation of lymphokine activated killer cell activity.
J Immunol Meth: **119** (1989), 45-51

Voltarelli JC, Gjerset G, Anasetti C
Adhesion of CD16⁺ K cells to antibody-coated targets is mediated by CD2 and CD18
receptors.
Immunology: **79** (1993), 509-511

Vuist WMJ, Visseren MJW, Otsen M, Bos K, Vyth-Dreese FA, Figdor CG, Melief CJM,
Hekman A
Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of human peripheral blood
lymphocytes with interleukin-2 and interferon α .
Cancer Immunol Immunther: **36** (1993), 163-170

Waddel TK, Fialkow L, Chan CK, Kishimoto TK, Downey GP
Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils.
J Biol Chem: **269** (1994), 18485-18491

Warren HS, Smyth MJ
NK cells and apoptosis.
Immunol Cell Biol: **77** (1999), 64-75

Weber C, Calzada-Wack JC, Goretzki M, Pietsch A, Johnson JP, Ziegler-Heitbrock HW
Retinoic acid inhibits basal and interferon-gamma-induced expression of intercellular
adhesion molecule 1 in monocytic cells.
J Leukoc Biol: **57** (1995), 401-406

Whyte MKB, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C
Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis.
J Immunol: **150** (1993), 5124-5134

Williams W.J., Beutler E., Erstler A.J., Lichtman M.A.
Hematology, 4th edition (1990); McGraw-Hill, New York

Winoto A, Baltimore D
Separate Lineages of T cells expressing the $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ receptors
Nature: **338** (1989), 430-432

Wisecarver J, Bechtold T, Collins M, Davis J, Lipscomb H, Sonnabend J, Purtilo DT
A method for determination of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human peripheral mononuclear cells.
J Immunol Methods: **79** (1985), 277-282

Wolf GT, Hudson J, Peterson KA, Poore JA, McClatchey KD
Interleukin 2 receptor expression in patients with head and neck squamous carcinoma: Effect of thymosin α_1 in vitro.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg: **125** (1989), 1345-1349

Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED
Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection.
Oral Oncol: **35** (1999), 257-265

Wrba H, Pecher O, von Wimpffen HH (Hrsg.)
Enzyme, Wirkstoffe der Zukunft.
Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg (1998)

Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC
Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4.
Proc Natl Acad Sci: **35** (1998), 6642-6646

Zavadova E, Desser L, Mohr T
Stimulation of reactive oxygen species production and cytotoxicity in human neutrophils in vitro and after oral administration of apolyenzyme preparation.
Cancer Biother: **10** (1995), 147-152

Zhang JW, Gu J, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z
Mechanisms of all-trans retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells.
J Biosci: **25** (2000), 275-284

Zidan J, Kuten A, Rosenblatt E, Robinson E
Intensive chemotherapy using cisplatin and fluorouracil followed by radiotherapy in advanced head and neck cancer.
Oral Oncol: **33** (1997), 129-135

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. L. Träger für seine gütige Unterstützung und Zuwendung zu jederzeit und in allen Fragen. Dafür, daß er uns auch in schwierigen Zeiten den Rücken freihielt, um die Laborarbeit abschließen zu können.

Herrn Prof. Dr. M. Brendel, der die externe Betreuung der Arbeit übernahm und dessen gute Seminare mir Anregung und Ideen lieferten.

Frau Dr. B. Donnerstag für die Themenstellung.

Herrn PD Dr. Knecht für die geleistete Überzeugungsarbeit in der Rekrutierungsphase und den Verhandlungen mit der Fa. Mucos.

Frau Dr. Y Kowalik und Dr. M. Oechler, die mir mit ihrem Einsatz und Engagement sehr geholfen haben, die klinische Studie zu einem versöhnlichen Ende zu führen.

Herrn Dr. E. Böcklen für den nie versiegenden Strom guter Einfälle und Diskussionen.

Herr Dr. B. Akoglu für die geduldige Mitarbeit, Anregungen und vielen interessanten Daten.

Herrn Dr. M. Amrani für stets passenden Rat in medizinischen Fragestellungen.

Frau B. Wittke (MTA), Frau C. Göbel (MTA), Frau A. Diehl (MTA) und Herrn V. Buchta (MTA) für ihre professionelle Unterstützung in allen Labor-Lebenslagen.

Den Kollegen und Freunden, die das Kontrollkollektiv bildeten.

Meinen lieben Freunden in Waltrop, Oberursel, Bad Homburg und Frankfurt, die mich effektiv auf andere Gedanken bringen konnten.

Meiner Freundin und Partnerin Marissa Penna-Martinez für die aufreibende Organisation der Zusammenarbeit mit der HNO-Klinik, für gute Ratschläge und Ideen, viel Wärme und Motivation.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, die meinen Studienwunsch unterstützte und meinem Vater, der mir das Studium durch viele Hilfestellungen erst ermöglicht hat. Meinen Geschwistern, deren ständige Sticheleien mich zum Abschluß der Arbeit motivierten.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Frankfurt am Main, den .2001

Darmstädter Landstraße 3
60594 Frankfurt am Main

Telefon: 069/96201040
Fax: 069/96201040
E-Mail: henrich@stud.uni-
frankfurt.de

Dirk Henrich

Persönliche Information

Familienstand: Ledig

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Alter: 33 Jahre; * 28.11.1967

Geburtsort: Waltrop/ Nordrhein-Westfalen

Eltern: Georg Henrich, *15.03.1937;

Brigitte Henrich, geb. Hoffmann, *01.09.1939

Ausbildung

1974 - 1978 Barbara-Grundschule in Waltrop

1978 - 1987 Theodor-Heuss-Gymnasium in Waltrop

1988 - 1989 Wehrdienst

10.1989 Beginn des Biologiestudiums an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität (JWG-Universität), Frankfurt am Main

10.1991 Vordiplom

11.1993 Mündliche Diplomprüfungen; Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer: Botanik, Biochemie

01.1994 - 10.1994 Diplomarbeit im Arbeitskreis *Kinematische Zellforschung*, Leiter Herr Prof.Dr. Bereiter Hahn, Thema: Ist die Motilität von Fibroblasten der menschlichen Haut durch Psoriasis verändert ?

Die Untersuchungen erfolgten mit einem Ultraschallmikroskop, welches kleinste Obeflächenveränderungen in hoher zeitlicher Auflösung nach dem Echolotprinzip detektieren kann.

Die Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. A. Bernd, ZDV, Klinikum der JWG-Universität.

Erlangung des akademischen Grades

Diplombiologe

Berufserfahrung

10.1994 – 12.1997 Gustav-Embden-Zentrum der biologischen Chemie, Klinikum der JWG-Universität, Frankfurt am Main

Promotion

Beginn der Dissertation im Institut *Biochemie der Hormone*, Leiter: Prof.Dr. L. Träger, Doktorvater ist Prof. Dr. M. Brendel.

Thema: *In vivo* und *in vitro* Untersuchungen zum Einfluß einer Enzym- bzw. Vitamin-A-Therapie auf das periphere Immunsystem bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom im Kopf-/Halsbereich.

01.1998 – 06.2001

Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie, Abteilung
Abdominalchirurgie, Klinikum der JWG-Universität

Beginn meiner Tätigkeit als nicht vollzeitbeschäftigter wissenschaftlicher Angestellter im Rahmen des DFG-Forschungsprojektes Ho 1546/2-1 (Untersuchungen zu Funktionen intraabdominaler und zirkulierender Leukozyten bei Patienten mit Peritonitis) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. K. Holzer im Wissenschaftliches Labor der Chirurgie, Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie, Leiter Prof. Dr. A. Encke.

Spezielle Qualifikationen

Projektleiterlehrgang Gentechnikrecht (Dechema), Voraussetzung für
Einrichtung und Betrieb gentechnischer Anlagen der Sicherheitsstufen 1 – 4.

Weitgehende Erfahrungen im Umgang mit Standard-Office-Anwendungen,
Graphikprogrammen, Internetapplikationen und Betriebssystemen
Programmiersprache Basic

Sprachkenntnisse

Englisch in Wort und Schrift

Veröffentlichungen

Henrich D.

Ist die Motilität dermalen Fibroblasten bei Psoriasis verändert ?
Diplomarbeit im FB16-Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität (1994)

Kippenberger S., Görmar F., Bernd A., Ramirez A., Theilig C., **Henrich D.**, Stitz
J., Bereiter-Hahn J., Holzmann H.

Strategies of keratinocytes and fibroblasts in wound closure observed in an
in vitro model.

In: Wound Healing and Skin Physiology; Eds: Altmeyer et al.

Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1995)

Henrich D., Bernd A., Bereiter-Hahn J., Kippenberger S., Holzmann H.,
Kaufmann R.

Enhanced stationary motility of psoriatic fibroblasts revealed by scanning acoustic
microscopy.

23. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Münster,
26-28.01.1996; Poster Nr. P15; Abstract-Band S.78

Scholz M., Blaheta R., **Henrich D.**, Cinatl J., Markus B., Doerr H., Cinatl J.

Immunomodulatory properties of the metal chelators desferrioxamine and
diethylenetriamine penta-acetic acid in vitro.

Transplantation, **62** (1996), 1371

Cinatl jr. J., Cinatl J., Scholz M., Driever P., **Henrich D.**, Kanabickova H., Vogel
J., Doerr H., Kornhuber B.

Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells.

Anti-Cancer Drugs, **7** (1996), 766

Henrich D., Knecht R., Akoglu B., Träger L., von Ilberg C.

Wirkung von Enzymen und Retinoiden auf Plattenepithelkarzinome im HNO-
Bereich.

68. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-
Heilkunde, Kopf und Halschirurgie, Poster P109

Henrich D., Akoglu B., Jelitto P., Böcklen E., Träger L.

Bestimmung der NK-Zell-Aktivität und ADCC am FACS, Vergleich mit dem
Europiumrelease-Assay.

13. Arbeitstagung "Anwendung der Durchflußzytometrie in der Klinischen
Zell Diagnostik"

Poster P29

Holzer K., Richter A., **Henrich D.**, Encke A.
Sauerstoffradikalproduktion emigrierter, intraabdomineller PMNL in Patienten mit sekundärer Peritonitis.
Langenbeck's Arch. Surg., Suppl. 1, Forumband (1999), 511

Henrich D., Wilhelm K., Encke A., Holzer K.
Increased TNF- α and TNF- α -R1-mRNA-Level in circulating and emigrated polymorphonuclear leucocytes in human peritonitis.
Proceedings of the 5th World Congress on Trauma, Shock Inflammation and Sepsis - Pathophysiology, Immune Consequences and Therapy
Ed. Faist E, Monduzzi Editore, Bologna, (2000), 569

Holzer K., **Henrich D.**, Konietzny P., Wilhelm K., Encke A.
Einfluß der diffusen Peritonitis auf die Expression des Fc-Rezeptors Typ III (CD16) von emigrierten und zirkulierenden Leukozyten.
Chirurgisches Forum 2000 für experimentelle und klinische Forschung, **29**, (2000), 527

Holzer K., **Henrich D.**, Richter A., Konietzny P., Wilhelm K., Encke A.
Analyse von emigrierten und zirkulierenden PMNL-Funktionen bei Patienten mit Peritonitis – gibt dies zusätzliche Informationen ?
Intensivmedizin und Notfallmedizin, **37 (Suppl. 2)**, (2000), Abstrakt 692

Matheis M., Scholz M., Simon A., **Henrich D.**, Wimmer-Greinecker G., Moritz A.
Timing of Leukocyte Filtration during cardiopulmonary bypass.
Perfusion, **16**, (2001), 31-37

Holzer K., Richter A., **Henrich D.**, Wilhelm K., Encke A.
Oxygen radical generation by emigrated, intra-abdominal and circulating PMNLs during human secondary peritonitis.
Shock, **15**, (2001), 90-94