

---

Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer

DER EINFLUSS EINER EINMALIGEN, ORALEN GABE VON  
DEXAMETHASON AUF LEUKOZYTEN, DIE PLASMASPIEGEL  
INFLAMMATORISCHER ZYTOKINE  
UND LÖSLICHE ZYTOKINREZEPTOREN

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Steffen Birkmann  
aus  
Regensburg

2005

---

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. T. Pollmächer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Reincke  
Prof. Dr. E. Faist

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. A. Schuld

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2005

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Medizingeschichtlicher Überblick .....	6
1.1.1	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse .....	6
1.1.2	Das Immunsystem.....	7
1.2	Das unspezifische Immunsystem.....	8
1.3	Interaktionen zwischen Neuroendokrinum und der unspezifischen Immunantwort .....	9
1.3.1	Autoregulation der HHN-Achse und ZNS-Interaktionen .....	9
1.3.2	Aktivierung der HHN-Achse durch Zytokine .....	10
1.3.3	Regulation der Zytokinausschüttung durch Glukokortikoide.....	12
1.3.4	Glukokortikoide beeinflussen die Leukozytenzahl .....	13
1.3.5	Glukokortikoide beeinflussen die Leukozytenaktivität .....	13
1.4	Zirkadiane Rhythmik des neuroendokrinen Systems .....	14
1.4.1	Physiologische zirkadiane Schwankungen.....	14
1.4.2	Zirkadiane Rhythmik der Kortisol-Ausschüttungen.....	15
1.4.3	Zirkadiane Rhythmik immunologischer Prozesse.....	16
1.5	Veränderungen in der Aktivierung der HHN-Achse bei Patienten mit Depression .....	17
1.6	Veränderungen immunologischer Funktionen bei Patienten mit Depression .	18
1.7	Zielsetzung.....	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Ethische Aspekte.....	21
2.2	Population .....	21
2.3	Aufbau des Experimentes .....	22
2.4	Blutkonservierung.....	24
2.5	Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung des Kortisolspiegels.....	24
2.5.1	Prinzip und Funktion des RIA.....	24
2.5.2	Bestimmung von Kortisol.....	25
2.6	Blutbildbestimmung mit MAX-M-Counter, Coulter .....	27
2.7	FACS – Analyse für Granulozyten.....	27
2.7.1	Prinzip und Funktion der Immunfluoreszenzdurchflußzytometrie (FACS) .....	27
2.7.2	Eigenschaften des CD16b – Antikörpers.....	30
2.7.3	Eigenschaften des CD18 – Antikörpers.....	32

---

2.7.4	Bestimmung von Absolutwerten und Leuchtdichte.....	32
2.8	ELISA – Analyse der Zytokine.....	34
2.8.1	Prinzip und Funktion des ELISA.....	34
2.8.2	Bestimmung von Interleukin-6.....	35
2.8.3	Bestimmung von TNF- $\alpha$ .....	37
2.8.4	Bestimmung der TNF-Rezeptoren p55 und p75.....	38
2.9	Statistische Auswertung.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Beschreibung der Stichprobe.....	40
3.2	Tageszeitliche Schwankungen der Messparameter.....	40
3.3	Effekte der Dexamethasongabe auf die tympanische Temperatur.....	42
3.4	Effekte der Dexamethasongabe auf die Kortisol Plasmaspiegel.....	43
3.5	Effekte der Dexamethasongabe auf das Differentialblutbild.....	45
3.6	Effekte der Dexamethasongabe auf die Oberflächenmarker der zirkulierenden Zellen.....	50
3.7	Effekte der Dexamethasongabe auf die Zytokinspiegel.....	58
4	Diskussion.....	63
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	63
4.2	Tageszeitabhängige Unterschiede der Plasmaspiegel der gemessenen Parameter.....	66
4.3	Bedeutung und Ursache der Leukozytose nach Glukokortikoid-Stimulation ..	68
4.4	Der Einfluss von Dexamethason auf die Expression von CD18 Oberflächenantigen.....	69
4.5	Veränderung der Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine und löslicher Zytokinrezeptoren nach Gabe von Dexamethason.....	71
4.6	Physiologische Relevanz der Variation von Zytokinspiegeln bei Gesunden ..	73
4.7	Relevanz der in der Studie erhobenen Befunde für die biologisch- psychiatrische Forschung.....	74
5	Zusammenfassung.....	76
6	Anhang.....	78
6.1	Literaturverzeichnis.....	78
6.2	Lebenslauf.....	89
6.3	Danksagung.....	90

---

ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
AP	Alkalische Phosphatase
BKS	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
BMI	Body Mass Index
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
DEX	Dexamethason
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Immunfluoreszenzdurchflußzytometrie
FITC	Fluorescein Isocyanat
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
$\gamma$ -GT	gamma-Glutamyl-Transpeptidase
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
LIF	Leukämie-inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
Mnl X	mittlere Leuchtintensität
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
OSM	Onkostatin M
PE	Phycoerythrin
PTT	Thromboplastinzeit
RIA	Radioimmunoassay
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TSH	Thyrotropin; Thyroidea-stimulierendes Hormon
ZNS	zentrales Nervensystem
ZNTF	ziliärer neurotrophischer Faktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Medizingeschichtlicher Überblick

### 1.1.1 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Nachdem bereits im späten 19. Jahrhundert Nebennierenextrakte zur Behandlung des Morbus Addison eingesetzt wurden, konnte der Wiener Arthur Biedl (1869-1933) zeigen, dass nicht der vermutete Mangel des 1897 durch John Jakob Abel entdeckten Epinephrins (=Adrenalins) zum Tod bei Entfernung der Nebennieren führt und setzte sich somit konsequenterweise für die therapeutische Verwendung von Extrakten der Nebennierenrinde ein, deren Wirksubstanzen bis dato unklar waren. Als die Arbeitsgruppe um den Schweizer Chemiker Tadeusz Reichstein 1936 erstmals wahrscheinlich machen konnte, dass es sich bei der lange gesuchten Wirksubstanz der Nebennierenrinde um ein Steroidhormon handeln könnte, dauerte es nur noch wenige Monate, bis fast zeitgleich in drei verschiedenen Arbeitsgruppen von Wintersteiner, Reichstein und Kendall Kortisol isoliert werden konnte. Nachdem besonders mit dem von Kendall als „compound E“ bezeichneten Kortikoid an den Mayo-Kliniken durchschlagende Erfolge bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis erzielt wurden, war der Siegeszug des Kortisons nicht mehr aufzuhalten.

So erhielten, lange noch bevor sich die rasante Entwicklung und Differenzierung in Mineralo- und Glukokortikoide abzeichnete, die wesentlichen Protagonisten dieser Entwicklung, Tadeusz Reichenstein (1897-1996), Phillip Hench (1896-1965) und Edward Kendall (1886-1972), im Dezember 1950 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Eine Entdeckung, die dabei nahezu unbeachtet blieb, war die der übergeordneten Steuerung der Nebennieren. Hier konnte ein Schüler Arthur Biedls in Prag, Hans Selye (1907-1982) zeigen, dass die Nebennierenhormone für das innere Gleichgewicht des Organismus verantwortlich sind und von einem zentralnervösen Organ – nämlich der Hirnanhangsdrüse – gesteuert werden. Ebenso gehen die rezeptionsgeschichtlichen Begriffe „Stress“, „Adaptationssyndrom“ und

„(Hypothalamus-)Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) sowie die Differenzierung von Mineralokortikoiden und Glukokortikoiden auf Selye zurück.

### **1.1.2 Das Immunsystem**

Ebenso wie die Erforschung der Nebennieren und der HHN-Achse ist die Immunologie eine relativ junge Wissenschaft. Gemeinhin wird ihre Entstehung mit einer Entdeckung Edward Jenners im Jahr 1796 gleichgesetzt, der beobachtete, dass eine Infektion mit Kuhpocken (*Vaccinia*) vor einer Ansteckung mit humanen Pocken, die oft tödlich verliefen, schützen konnte. Trotz dieser Entdeckung sollte es beinahe weitere 200 Jahre dauern, bis nach weltweiten Impfkampagnen die Pocken 1979 von der World Health Organisation (WHO) als ausgerottet erklärt werden konnten. Während Robert Koch am Ende des 19. Jahrhunderts erfolgreich nachweisen konnte, dass Infektionen durch verschiedene Mikroorganismen herbeigeführt werden, entwickelte Louis Pasteur in Frankreich erfolgreich weitere Impfstoffe gegen Cholera und Tollwut (*Rabies*). Dieser Triumph führte wiederum zur Suche nach den zugrunde liegenden Mechanismen der erfolgreichen Impfungen und somit zur Immunologie als Wissenschaft.

Im Jahr 1890 schließlich fanden Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato in den Seren Geimpfter Substanzen, die spezifisch an das relevante Pathogen banden und bezeichneten diese als Antikörper. Heute wird die Bildung spezifischer Antikörper gegen Antigene unter dem Begriff erworbenes oder auch spezifisches Immunsystem zusammengefasst.

Doch auch über die andere Komponente des Immunsystems, das angeborene oder unspezifische Immunsystem, war zu Zeiten Behrings Dank der Arbeiten von Elie Metchnikoff in Russland bereits einiges bekannt. Dieser hatte entdeckt, dass viele Mikroorganismen von einem Teil der Leukozyten direkt aufgenommen und verdaut werden konnten. Wegen dieser Eigenschaft nannte er später diese Zellen, die zum einen ohne vorherige Exposition und somit „Wiedererkennen“ und zum anderen in allen Individuen gleich - also unspezifisch - auf die Mikroorganismen reagierten, Makrophagen.

## **1.2 Das unspezifische Immunsystem**

Heute bezeichnet man als Immunsystem Strukturen des Individuums, die der Abwehr körperfremder Stoffe mithilfe von verschiedenen ihnen zur Verfügung stehenden Abwehrmechanismen dienen. Primär spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Elimination von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen, aber auch für die Abstoßung körperfremden Gewebes wie z.B. bei Organtransplantationen oder bei Prozessen gegen das Tumorwachstum zeigen sie sich verantwortlich.

Unter den vielen Unterteilungen und Differenzierungen des menschlichen Immunsystems ist die wichtigste die Unterscheidung in eine spezifische, erworbene Immunantwort, die einer unspezifischen, angeborenen gegenübersteht (Delves und Roitt, 2000).

Im Falle der spezifischen Immunabwehr kommt es in Folge eines (Wieder)Erkennens eines Antigens zu einer direkten, gegen den Erreger gerichteten Abwehr. Diese Antigene befinden sich zumeist an der Oberfläche des eingedrungenen Mikroorganismus, bei Viren jedoch werden sie von den infizierten Zellen selbst produziert und an der Oberfläche der befallenen Zellen exprimiert. Spezifisch gegen diese Antigene gerichtete Antikörper können an diese Antigene binden und somit die Zerstörung dieser Strukturen einleiten. Diese Antikörper selbst werden von sogenannten Plasmazellen, ausdifferenzierten lymphozytären Zellen der B-Zell-Reihe, produziert, welche wiederum durch das selbe Antigen aktivierte Helferzellen der T-Zell-Reihe stimuliert werden müssen.

Zum unspezifischen Teil des Immunsystems zählt man dagegen das kaskadenartig ablaufende Komplementsystem (Warrell et al., 2004), Natürliche Killer (NK)-Zellen lymphozytären Ursprungs, sowie die direkte Zerstörung von als körperfremd erkanntem Material durch Phagozytoseprozesse. Makrophagen, eosinophile und neutrophile Granulozyten tragen hierfür Rezeptoren, die Bakterien aufgrund häufiger Oberflächenproteine erkennen können (Gordon, 2002). Binden bakterielle Moleküle an diesen Strukturen, so werden sie zum einen von diesen Zellen phagozytiert, zum anderen sezernieren die Makrophagen und Granulozyten biologisch aktive Moleküle. Zu diesen Zellmediatoren gehören unter anderem auch inflammatorische Zytokine wie Interleukine und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Diese spielen lokal als Botenstoffe eine entscheidende Rolle in der Immunantwort, führen sie doch sowohl

zu einer vermehrten Aggregation immunkompetenter Zellen als auch zu einer Aktivierung des lokalen Inflammationsprozesses (Ward und Marks, 1989). Des Weiteren nehmen sie auch Einfluss auf weitere Symptome der Erkrankung, wie z.B. durch Interleukin-1 (IL-1), welches direkt im zentralen Nervensystem (ZNS) Krankheitsgefühl auszulösen scheint und zudem über die Thermoregulation Fieber induzieren kann (Dantzer et al., 1998), oder durch die Induktion von hepatischen Akute-Phase-Proteinen (Szalai et al., 2000).

### ***1.3 Interaktionen zwischen Neuroendokrinum und der unspezifischen Immunantwort***

Zwischen dem unspezifischen Immunsystem und der hormonellen Regulation der Hypothalamus-Hypophyse-Nebennieren(HHN)-Achse besteht eine enge Beziehung (Tilders et al., 1994; Chrousos, 1995). So wird die HHN-Achse bei einer akuten Entzündung durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert, während Glukokortikoide ihrerseits wiederum die Ausschüttung entzündungsfördernder Botenstoffe inhibieren. Andererseits erhöhen Glukokortikoide wiederum die Zahl der zirkulierenden Leukozyten. Dieser Zusammenhang konnte dabei bereits von Thomas Addison vor etwa 150 Jahren erahnt werden, als er bei einem Patienten mit der nach ihm benannten Nebenniereninsuffizienz eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten, welche wiederum eine Subpopulation der Leukozyten darstellen, feststellte (Besedovsky und del Rey, 2000). Im Folgenden sollen die Interaktionen im Detail erläutert werden:

#### **1.3.1 Autoregulation der HHN-Achse und ZNS-Interaktionen**

Betrachtet man die HHN-Achse von ihrem „Ursprung“ im Hypothalamus bis zur Sekretion der Effektorhormone in der Nebennierenrinde, so ergibt sich folgendes Bild: Der primäre Kern, und somit auch Interaktionsstelle zwischen zentralem Nervensystem (ZNS) und der HHN-Achse, ist der Nucleus paraventricularis. Von hier wird Corticotropin-releasing Hormon (CRH), ein 41 Aminosäuren umfassendes Peptid, in ein spezialisiertes Kapillarnetzwerk, welches auch die Adenohypophyse speist, sezerniert. Im Hypophysenvorderlappen stimuliert CRH über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor die Ausschüttung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH)

und Melanozyten-stimulierendes-Hormon (MSH), die in die Blutbahn abgegeben werden. Durch das pulsatil ausgeschüttete ACTH werden nun die hormonproduzierenden Zellen in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde stimuliert und es kommt somit zur vermehrten Bildung und Ausschüttung von Glukokortikoiden.

Um ein Überschiessen dieser Reaktionen zu verhindern, ist die HHN-Achse über eine negative Feedback-Schleife reguliert: Die ausgeschütteten Glukokortikoide haben ihrerseits eine hemmende Wirkung sowohl auf die Ausschüttung von CRH im Hypothalamus, als auch auf die hormonproduzierenden Zellen des Hypophysenvorderlappens (Turnbull und Rivier, 1995; Chrousos, 1995).

Auch eine direkte Einflussnahme des ZNS ist über den Nucleus paraventricularis auf die HHN-Achse möglich. Die Ausschüttung von CRH ist dabei durch serotonerge, cholinerge und katecholaminerge Systeme positiv reguliert (Eskandari und Sternberg, 2002), während mittels  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) sensitiver Neurone eine Inhibition der Serotonin-vermittelten CRH-Ausschüttung nachgewiesen wurde (Calogero et al., 1988).

### **1.3.2 Aktivierung der HHN-Achse durch Zytokine**

Eine weiteres wichtiges System, welches die HHN-Achse reguliert, sind die wichtigsten Modulatoren des Immunsystems, die inflammatorischen Zytokine. Lokal an einer Entzündungsstelle ausgeschüttete Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) beeinflussen somit nicht nur direkt das ZNS um dort Krankheitsgefühl und Fieber zu induzieren (Dantzer et al., 1998), sondern spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation der HHN-Achse (Besedovsky et al., 1991; Berkenbosch et al., 1987).

Besonders IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), die aus aktivierten Makrophagen und Monozyten freigesetzt werden, stimulieren die HHN-Achse auf hypothalamischer, hypophysärer und adrenerger Ebene und sorgen somit für erhöhte Spiegel von CRH, ACTH und Kortisol. An verschiedenen Labortieren konnte nachgewiesen werden, dass eine durch die Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) oder dem viralen Erreger der Newcastle Krankheit

induzierten Aktivierung des HHN-Systems durch Antisera gegen diese Zytokine unterdrückt werden kann (Mulla und Buckingham, 1999). Die Ausschüttung der Zytokine selbst geschieht durch eine Aktivierung von Makrophagen entweder bei lokalen Entzündungsreaktionen oder bei systemischen Reaktionen wie Endotoxinämie oder Sepsis (Tilders et al., 1994; Bornstein und Chrousos, 1999). Dabei induzieren sich diese pro-inflammatorischen Zytokine teilweise selbst und haben an ihren Effektororganen zum Teil auch synergistische Wirkungen. So wird die IL-1 vermittelte ACTH Ausschüttung durch TNF- $\alpha$  (Van der Meer et al., 1995; Perlstein et al., 1993), IL-6 (Perlstein et al., 1991; Zhou et al., 1996) und hämatopoetischer Zytokine wie z.B. Ziliärer neurotrophischer Faktor (ZNTF), Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), Onkostatine M (OSM), Interleukin-11 und Kardiotrophin-1 (Benigni et al., 1996) weitaus mehr gesteigert, als ein rein additiver Effekt erwarten ließe.

In letzter Zeit mehren sich Hinweise darauf, dass die Aktivierung der HHN-Achse dabei jedoch nicht durch eine direkte Stimulation auf hypothalamischer und hypophysärer Ebene durch zirkulierende Zytokine erfolgt, sondern vielmehr in der Peripherie über Rezeptoren afferente, vagale Fasern stimulieren, die ihrerseits in den Hypothalamus projizieren. Aus immunologischer Sicht scheint dies sinnvoll, da somit der Herd vom Gehirn lokalisiert wird und die Effekte der freigesetzten Glukokortikoide durch verschiedene Mechanismen innerhalb einzelner Gewebetypen reguliert werden können (Rook, 1999; Hosoi et al., 2000).

Ob eine direkte Aktivierung der Nebennierenrinde durch Zytokine möglich ist, wird noch kontrovers diskutiert: So konnte an hypophysectomierten Ratten, trotz fehlendem Nachweis für IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  Rezeptoren in der Nebenniere, bei Gabe sehr großer Mengen von IL-1 $\beta$  in Studien eine erhöhte Sekretion von Kortikosteron nachgewiesen werden (Andreis et al., 1991). In anderen Studien hingegen konnte kein direkter Effekt nachgewiesen werden (Gwosdow et al., 1990). Ein weiteres Argument für die direkte Stimulierbarkeit der Nebennierenrinde durch pro-inflammatorische Zytokine liefern Studien am Menschen, wo nach Gabe von *Salmonella abortus equi* Endotoxin und somit Erzeugung einer iatrogenen Endotoxinämie es zum Anstieg der Kortisolspiegel, nicht aber zur Aktivierung der

HHN-Achse kam, da die ACTH-Spiegel hierdurch nicht beeinflusst wurden (Schuld et al., 2000).

### **1.3.3 Regulation der Zytokinausschüttung durch Glukokortikoide**

Wie innerhalb der HHN-Achse selbst, wo durch Glukokortikoide die Produktion und Ausschüttung der eigenen Induktorhormone CRH und ACTH gehemmt wird, existiert auch für Kortisol und die pro-inflammatorischen Zytokine ein negativer Feedback-Mechanismus. Die durch Zytokine vermittelte Sekretion der Glukokortikoide hemmt ihrerseits die Bildung inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) bei verschiedenen induzierten immunologischen Abwehrreaktionen des Körpers (Fantuzzi und Ghezzi, 1993).

Soweit bekannt, geschieht die Hemmung der Zytokinausschüttung auf molekularer Ebene über eine Glukokortikoid-vermittelte Inhibition der Transkription des IL-1 $\beta$  Genes, sowie einer Inhibition seiner post-transkriptionellen Expression. Zudem ist die mRNA für IL-1 $\beta$  nach Glukokortikoidgabe durch eine höhere Instabilität gekennzeichnet. Diese Faktoren zusammen ergeben eine signifikante Down-Regulation von IL-1 $\beta$ . Ebenso findet eine unterschiedliche Modulation der Expression von IL-1 Rezeptoren an der Zelloberfläche verschiedener immunkompetenter Zellen statt, in deren Zuge weniger Makrophagen und Monozyten zur Ausschüttung weiterer Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  stimuliert werden (Goujon et al., 1997; Chrousos, 1995).

Bei Mäusen zeigen sich nach Entfernung der Nebennieren und einer Stimulation des Immunsystems mit LPS deutlich höhere TNF- $\alpha$  und IL-6 Spiegel als bei einer kontrollierten und LPS stimulierten Vergleichsgruppe. Dabei kann die erhöhte Ausschüttung der Zytokine durch die Applikation von Dexamethason in hoher Dosierung vor der Stimulation durch LPS verhindert werden (Zuckerman et al., 1989).

In letzter Zeit konnte auch in Abwesenheit von Infektion oder Entzündung ein suppressiver Effekt von 1,5 mg Dexamethason auf die zirkulierenden pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie den löslichen TNF-Rezeptor p75,

zumindest bei einer Gruppe depressiver Patienten, nachgewiesen werden (Schuld et al., 2001). Da sich jedoch bei an Depression leidenden Patienten häufig auch eine Störung der Regulation der HHN-Achse im Sinne einer Überaktivierung nachweisen lässt (Holsboer und Barden, 1996), bleibt weiterhin unklar, ob diese Ergebnisse auf gesunde Menschen übertragbar sind.

#### **1.3.4 Glukokortikoide beeinflussen die Leukozytenzahl**

Ein Anstieg der Leukozytenzahl, insbesondere der Granulozyten, im peripheren Blut bei systemischer Therapie mit Glukokortikoiden ist bereits seit Jahrzehnten bekannt. Insbesondere nach intravenöser Applikation von Dexamethason kommt es bereits innerhalb weniger Stunden zu einem signifikanten Anstieg der reifen, neutrophilen Granulozyten, während sich zu diesem Zeitpunkt eine, zumindest relativ auf die Gesamtleukozytenzahl bezogene Lymphozytopenie findet. 24 Stunden nach der oralen Gabe von Dexamethason findet sich sowohl eine Lymphozytose, wie auch eine Granulozytose (Mishler und Emerson, 1977).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Dexamethason (Jilma et al., 1998; Schuld et al., 2001) und Methylprednisolon (Wakayama et al., 1996) die zirkulierende Menge an Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) signifikant erhöht und es somit wahrscheinlich macht, dass über diesen Weg eine Erhöhung der Leukozytenzahl zustande kommt.

#### **1.3.5 Glukokortikoide beeinflussen die Leukozytenaktivität**

Während bei Lymphozyten eine Veränderung des Aktivierungszustandes nach Gabe von Glukokortikoiden im Sinne einer verminderten Aktivität und vermindertem immunologischen Ansprechen auf Triggerreize beschrieben ist (Sauer et al., 1995), ist über den Aktivierungszustand neutrophiler Granulozyten beim Menschen unter dem Einfluss von Glukokortikoiden bisher wenig bekannt. Einzig an Rindern wurde bisher die Aktivität der neutrophilen Granulozyten anhand des Aktivierungsmarkers CD18 nach Gabe von Dexamethason untersucht, ohne jedoch signifikante Ergebnisse zu erzielen (Anderson et al., 1999). Dagegen zeigten *in vitro* Versuche mit neutrophilen Granulozyten, dass diese nach Zugabe von Hydrokortison eine

geringere Chemotaxis und Rezeptorbindung für LPS aufwiesen (Shea und Morse, 1978). Zudem zeigten neutrophile Granulozyten in *in vitro* Versuchen eine geringere Apoptoserate nach Zugabe von Glukokortikoiden (Weyts et al., 1998), was über die verlängerte Lebensdauer wiederum zu einer Erhöhung ihrer Gesamtzahl beitragen würde.

## **1.4 Zirkadiane Rhythmik des neuroendokrinen Systems**

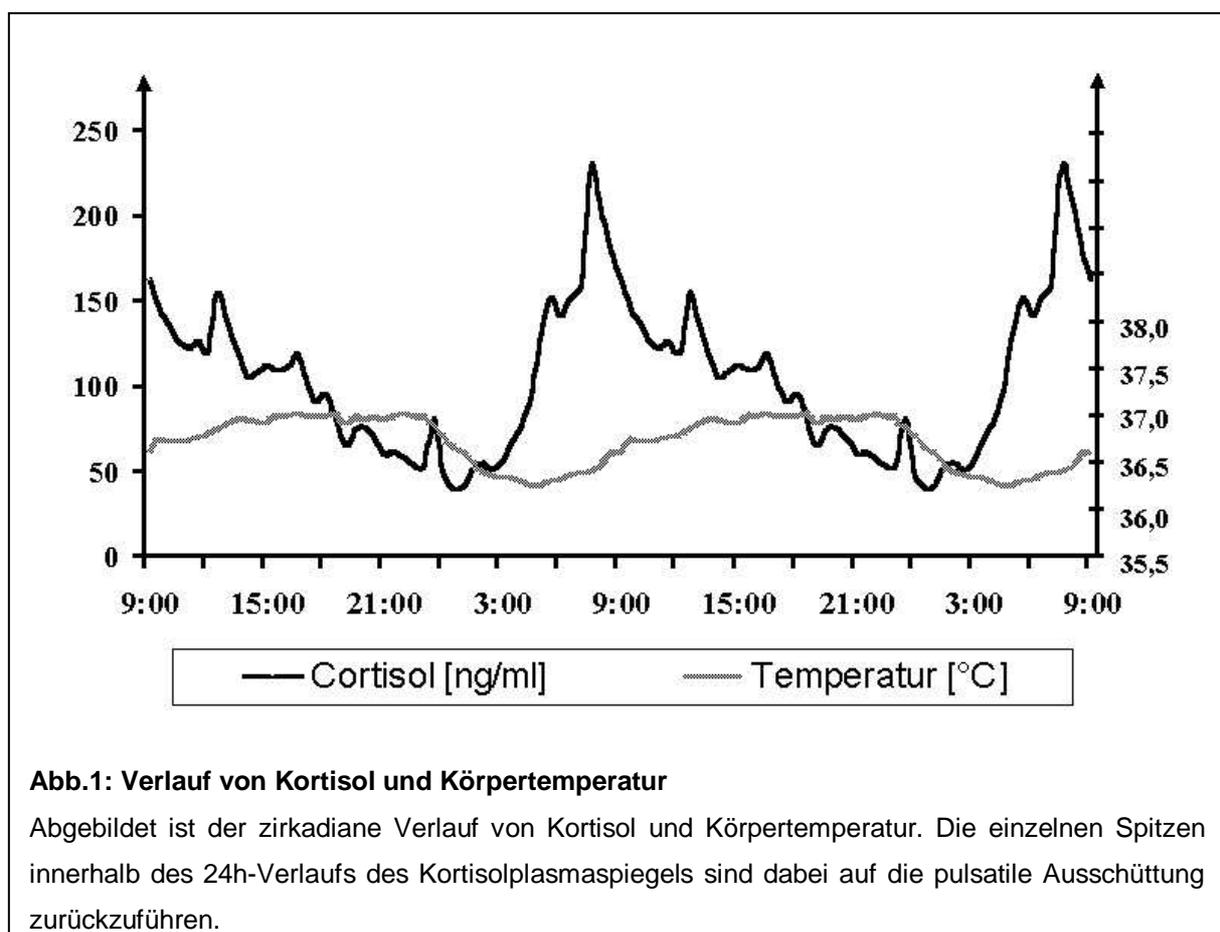
Die HHN-Achse und ihre Effektorhormone wie Glukokortikoide oder Mineralokortikoide unterliegen ausgeprägten zirkadianen physiologischen Schwankungen, die Einfluss auf verschiedene Parameter des menschlichen Lebens haben (Streeten et al., 1984):

### **1.4.1 Physiologische zirkadiane Schwankungen**

Generell finden sich physiologische zirkadiane Schwankungen in vielen Bereichen des Lebens als Anpassung einer Spezies an ihren Lebensraum und ihre Lebensumstände. Besonders ausgeprägt sind zirkadiane Verläufe beim Menschen bei der basalen Sekretion von Hormonen zu beobachten, welche sich wiederum auf spezifische tageszeitabhängige Funktionen auswirken (Aschoff, 1979). So unterliegt die basale Sekretion des Insulins einer Kurve mit gering ausgeprägtem zirkadianen Rhythmus, während die spezifische Rezeptorempfindlichkeit auf Insulin über den Tag hinweg deutlich zunimmt (Molnar et al., 1972). Weitere Hormone deren Spiegel ausgeprägte Schwankungen im zirkadianen Verlauf zeigen sind das im Hypophysenvorderlappen gebildete Prolaktin (Freeman et al., 2000) und das Thyroidea stimulierende Hormon (TSH) (Goichot et al., 1996; Behrends et al., 1998), deren Ausschüttung jedoch stärker durch das Schlaf/Wach Verhalten beeinflusst werden können als die des Insulins. Auch andere Parameter, wie Schlaf/Wach-Rhythmus und auch die Körpertemperatur unterliegen also einer Tageszeit-abhängigen Rhythmik, teilweise getriggert durch die Schwankungen der Hormonspiegel. Eine Betrachtung zirkadian variierender Parameter muss demnach immer vor dem Hintergrund ihrer basalen Sekretion zum jeweiligen Messzeitpunkt erfolgen, um die Veränderungen in sinnvoller Weise interpretieren zu können.

### 1.4.2 Zirkadiane Rhythmik der Kortisol-Ausschüttungen

Eine zirkadiane Rhythmik der Kortisolausschüttung wurde erstmals von Gregory Pincus 1943 anhand tageszeitlich unterschiedlicher Mengen an Ketosteroiden im menschlichen Urin vermutet (Pincus, 1943). Später konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Glukokortikoiden im Verlauf von 24 Stunden physiologischen Schwankungen unterliegt, die nicht von einer Aktivierung wie z.B. durch Stress hervorgerufen wird (Krieger et al., 1971).



Die basale Sekretion des Effektorhormons der HHN-Achse geschieht pulsatil im Abstand von ca. 20min. aus der Nebennierenrinde (Redekopp et al., 1986; Calogero et al., 1992). Hierbei zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine vermehrte Ausschüttung in den frühen Morgenstunden um ca. 7:00 – 8:30 Uhr. Danach sinkt über den Tag hindurch der physiologische Spiegel der Glukokortikoide ab und zeigt ein nächtliches, individuell unterschiedliches Tief zwischen 20:00 und 3:30 Uhr, bis es ab

ca. 4:00 Uhr wieder zu einem steilen Anstieg kommt (Streeten et al., 1984). (siehe Abbildung 1).

### 1.4.3 Zirkadiane Rhythmik immunologischer Prozesse

Auch die Zahlen immunkompetenter Zellen scheinen einer gewissen zirkadianen Rhythmik zu unterliegen. Dabei findet sich ein signifikanter Anstieg der Leukozyten im peripheren Blut am frühen Abend und während der ersten Nachthälfte, während es zum Morgen und über den Tag hinweg zu einem deutlichen Absinken der Zellzahl kommt (Haus et al., 1983). Es liegt nahe, dass auch die durch sie maßgeblich beeinflussten immunologischen Prozesse einer Tageszeit-abhängigen Variabilität unterliegen. Insbesondere die nachgewiesene, vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine am frühen Morgen bei stimulierten Zellen *in vitro* unterstützt diese These (Petrovsky und Harrison, 1998).

*In vivo* konnte zwar an gesunden Probanden eine Veränderung der Immunreaktion auf *Salmonella abortus equi* Endotoxin nicht im Sinne einer Erhöhung proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden, doch zeigte sich bei der abendlichen Gabe, wo die endogene Kortisolsekretion gering ist, eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur, sowie an ACTH und Kortisol im Vergleich zur morgendlichen Gabe bei vergleichsweise hohem endogenen Kortisolspiegel (Pollmächer et al., 1996).

Auch klinisch sind Aspekte zirkadian variierender immunologischer Antwort bekannt und werden therapeutisch genutzt. So zeigt sich beim klassischen Asthma bronchiale eine vermehrte Anfallshäufigkeit in den frühen Morgenstunden (Martin, 1993; Smolensky und Martin, 1999), sowie ein sich im tageszeitlichen Verlauf deutlich verändernder „Peak-Flow“ (Burioka und Sasaki, 1996). Ebenso wurden Exazerbationen von klinischen Symptomen rheumatoider Arthritis, die ebenfalls gehäuft am frühen Morgen auftreten, so erklärt (Robertson et al., 1982). Auch in der Chemotherapie bei verschiedenen mitotischen Prozessen zeigt sich ein unterschiedliches Ansprechen, aber auch eine Veränderung im Nebenwirkungsprofil, bei zirkadian unterschiedlicher Applikation verschiedener Therapeutika (Focan, 1995; Levi, 1999; Mormont und Levi, 2003).

### ***1.5 Veränderungen in der Aktivierung der HHN-Achse bei Patienten mit Depression***

Besondere Bedeutung der oben genannten Zusammenhänge ergeben sich aus wissenschaftlichen Befunden, die neben anderen neuroendokrinen Veränderungen insbesondere Alterationen im Sinne einer Aktivierung der HHN-Achse bei Patienten mit Depression ergeben haben: So konnten Nemeroff et al. bereits 1984 erhöhte CRH-Spiegel im Liquor cerebrospinalis von depressiven Patienten nachweisen (Nemeroff et al., 1984) und post mortem Untersuchungen von Gehirnen depressiver Patienten zeigten eine erhöhte CRH-Expression (Raadsheer et al., 1994). Auch in der zirkadianen Variabilität der Spiegel der Hormone der HHN-Achse ergeben sich bei diesen Patienten Veränderungen: So werden in der akuten Phase einer Depression nicht nur ACTH und Kortisol vermehrt ausgeschieden, sondern es ist auch die charakteristische zirkadiane Ausschüttung von ACTH und Kortisol verändert (Linkowski et al., 1987). Besonders gut lassen sich diese Auffälligkeiten in neuroendokrinen Funktionstests wie dem Dexamethason-Suppressionstest (Holsboer et al., 1980) oder dem komplexeren DEX-Suppressions-CRH-Stimulationstest (Heuser et al., 1994; Kunzel et al., 2003a) nachweisen. Diese Tests sind inzwischen auch zur Diagnosestellung und Prognostik weitgehend akzeptiert (Hatzinger et al., 2002; Zobel et al., 2001; Heuser et al., 1994). Ob hingegen die Alterationen der HHN-Achse ein sekundärer Effekt der Depression ohne Einfluss auf deren Symptomatik sind, oder ob sich mittels Modulation an Rezeptoren der HHN-Achse auch depressive Symptome bessern lassen, ist gegenwärtig Stand der Forschung in Tier- (Keck et al., 2001; Keck et al., 2003) und Humanstudien (Zobel et al., 2000; Kunzel et al., 2003b).

## ***1.6 Veränderungen immunologischer Funktionen bei Patienten mit Depression***

Bisher ungeklärt ist, inwieweit es neben anderen Co-Morbiditäten bei depressiven Patienten wie erhöhtem Risiko für neoplastische (Lillberg et al., 2003) und kardiovaskuläre Erkrankungen (Musselman et al., 1998; Nemeroff et al., 1998) auch zu Veränderungen des Immunsystems und der Infektabwehr kommt. Zwar berichten verschiedene Autoren über erhöhte IL-6 Spiegel bei depressiven Patienten (Maes et al., 1995; Maes et al., 1997; Penninx et al., 2003; Frommberger et al., 1997; Kubera et al., 2000), doch konnten in anderen Studien (Haack et al., 1999; Brambilla und Maggioni, 1998) hingegen keine Veränderungen nachgewiesen werden. Ebenso uneinig sind Ergebnisse bezüglich der TNF- $\alpha$  Spiegel depressiver Patienten die in verschiedenen Studien als erhöht (Mikova et al., 2001; Penninx et al., 2003), unverändert (Brambilla und Maggioni, 1998) oder erniedrigt (Haack et al., 1999) beschrieben wurden.

Diese pathophysiologisch bisher ungeklärten Immunbefunde bei der Depression werfen nun wiederum die Fragen auf, ob diese möglicherweise sekundäre Folge der neuroendokrinen Störung sind und ob die erhöhten Serumspiegelkonzentrationen von Glukokortikoiden und deren Vorläuferhormonen das Immunsystem bei depressiven Patienten beeinflussen.

## 1.7 Zielsetzung

Während ein immunsuppressiver Effekt von Glukokortikoiden wie Dexamethason in hoher, therapeutischer Dosierung insbesondere bei entzündlichen Prozessen seit langem bekannt ist und sich auch die Zusammenhänge zwischen der endokrinologischen Steuerung der HHN-Achse und der immunologischen Regulation von Infektabwehr und entzündlichen Prozessen immer besser darstellen, bleiben viele Fragestellungen weiterhin unbeantwortet. So ist weiterhin ungeklärt, ob und inwiefern geringe Dosen von Dexamethason, wie sie z.B. bei neuroendokrinen Funktionstests wie dem DEX/CRH-Test zur Klärung einer eventuellen Störung der Funktion der HHN-Achse (Heuser et al., 1994) appliziert werden, Einfluss auf das menschliche Immunsystem und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen bei gesunden Menschen *in vivo* haben. Weiterhin liegt bisher im Dunkeln, welche Rolle die Zunahme der Anzahl von Zellen mit immunologischer Funktion wie Granulozyten und Lymphozyten, die durch die Gabe von Glukokortikoiden ausgelöst wird und eigentlich einen pro-inflammatorischen Effekt haben sollte, spielen könnte.

Ziel der durchgeführten Studie war somit, die folgenden, im Vorfeld aufgestellten Hypothesen näher zu betrachten:

- Bereits die Gabe von niedrigdosierten Glukokortikoiden hat bei gesunden Menschen einen Effekt auf immunologisch relevante Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$ , sowie auf die löslichen Zytokinrezeptoren sTNF-R p55 und sTNF-R p75. Dabei ist der Effekt abhängig vom Zeitpunkt der Applikation und somit vom zirkadianen Rhythmus der HHN-Achse.
- Bereits die Gabe von niedrigdosierten Glukokortikoiden beeinflusst das periphere Blutbild bei gesunden Menschen im Sinne einer Granulozytose, deren Ausmaß abhängig ist von vom Zeitpunkt der Applikation und somit vom zirkadianen Rhythmus der HHN-Achse.

- Durch die Gabe von niedrigdosierten Glukokortikoiden bei gesunden Menschen kommt es zu einer Veränderung des Aktivierungszustandes der neutrophilen Granulozyten im Sinne einer Veränderung der Expression von CD18. Zudem sprechen die neutrophilen Granulozyten vermindert auf *in vitro* Stimulation mit LPS an. Das Ausmaß der Veränderungen in der Immunkompetenz ist dabei abhängig vom Zeitpunkt der Applikation und somit vom zirkadianen Rhythmus der HHN-Achse.

Zur Beantwortung dieser Hypothesen untersuchten wir in einer Plazebo-kontrollierten, doppelblinden Studie an 40 gesunden, männlichen Probanden immunologische und neuroendokrinologische Parameter nach Gabe von 1,5 mg bzw. 3 mg Dexamethason zu verschiedenen Zeitpunkten.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Ethische Aspekte**

Das klinische Experiment wurde bei der Ethikkommission der Bayerischen Landesärztekammer unter dem Titel „Der Einfluss von Dexamethason auf Blutbild und Zytokinplasmaspiegel bei gesunden männlichen Probanden“ (Ethikkommissions-Nr. 99101) eingereicht und positiv begutachtet. Über mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen wurden die Probanden aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung lag von allen Probanden vor.

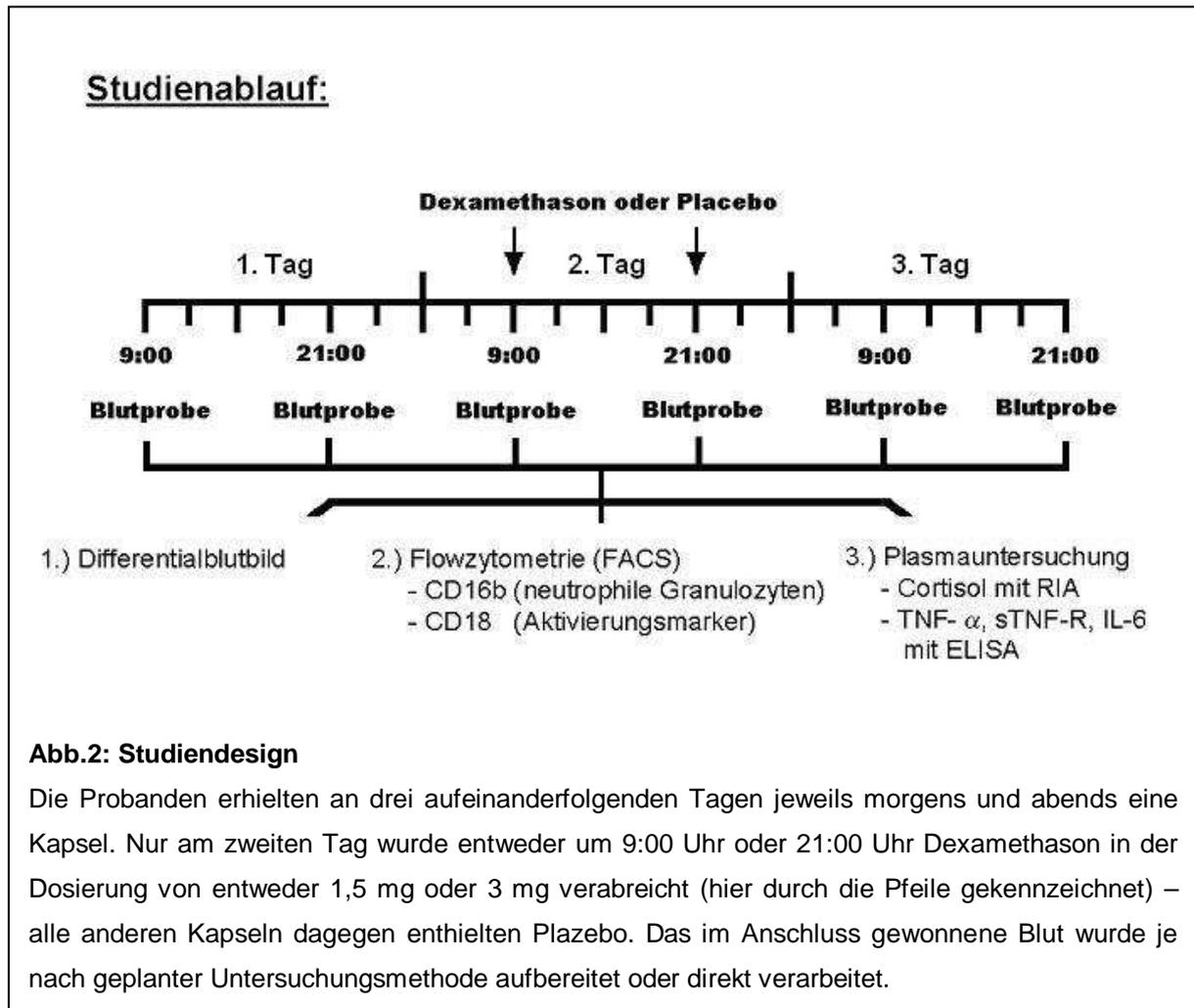
### **2.2 Population**

Für die Durchführung des Experimentes wurden 40 gesunde, männliche Probanden rekrutiert, die sich jeweils ca. eine Woche vor Experimentbeginn zu einer Voruntersuchung vorstellten. Hierbei wurden neurologische, psychiatrische und chronisch entzündliche Vorerkrankungen anamnestisch ausgeschlossen. Zum Ausschluss eines akuten Infektes wurde ein aktuelles Blutbild erstellt sowie folgende Laborparameter bestimmt: Kreatinin, Harnstoff, Natrium, Kalium, Chlorid, Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Alkalische Phosphatase (AP), gamma-Glutamyl-Transpeptidase ( $\gamma$ -GT), Lipase, Harnsäure, Triglyceride, Cholesterin, Kreatinkinase,  $\alpha$ -Amylase, Thyrotropin (TSH), Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BKS), Blutbild, Quick-Wert, Thromboplastinzeit (PTT) und Urin-Status. Größe, Gewicht und der Body-Mass-Index (BMI) wurden bestimmt. Eine orientierende neurologisch-internistische, körperliche Untersuchung und ein Drogenscreening wurden ebenfalls durchgeführt. Zu Beginn des Experimentes wurden nochmals die tympanische Temperatur, die BKS und Entzündungsparameter im Blutbild bestimmt, um einen akut aufgetretenen Infekt auszuschließen.

### **2.3 Aufbau des Experimentes**

Die Probanden wurden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen um jeweils 9.00 Uhr und 21.00 Uhr einbestellt. Zu diesen Zeiten wurde jeweils Blut für die Untersuchungen aus der Vena mediana cubiti entnommen und die Körpertemperatur mittels einer tympanischen Temperaturmessung am Ohr bestimmt. Direkt danach erhielten die Probanden jeweils eine Kapsel, die entweder Dexamethason in der Dosis 1,5 mg oder 3 mg oder aber ein Placebo enthielt. Um den Einfluss der Dosis und des Verabreichungszeitpunktes des Steroidhormons getrennt untersuchen zu können, wurden die Probanden doppelt verblindet 4 Gruppen zugeteilt. Die Verblindung erfolgte dabei durch die Apotheke des Schwabinger Krankenhauses, die für die 4 Gruppen unterschiedliche Zusammensetzungen der Kapseln bereitstellte. Dazu enthielten die einzunehmenden Kapseln für die Probanden jeder Gruppe zu den Messzeitpunkten 1 und 2 (erster Tag 9:00 und 21:00) sowie zu den Messzeitpunkten 5 und 6 (dritter Tag 9:00 und 21:00) immer Placebo. So wurde gewährleistet, dass jeder Proband am Morgen oder Abend des zweiten Tages entweder 1,5 mg oder 3 mg Dexamethason einnahm. Hierdurch konnte zum einen eine eventuelle physiologische zirkadiane Rhythmik der zu untersuchenden Parameter aus den erhobenen Daten des ersten Tages berechnet werden, zum anderen dienten die so erhobenen Werte als Placebo Kontrolle auf die Veränderungen nach der Verum Gabe. Durch die ausschließliche Gabe eines Placebos am dritten Versuchstag war gewährleistet, dass eine Verlaufskontrolle der zu untersuchenden Parameter für mindestens 24 Stunden nach der Einnahme von Dexamethason möglich war (siehe Abbildung 2).

Ein Teil des Blutes wurde sofort zur Erstellung des Blutbildes und der Untersuchungen in der Flowzytometrie verwendet. Anschließend wurde per FACS ein weiteres Blutbild erstellt, sowie die neutrophilen Granulozyten mittels des spezifischen Antikörpers CD16b gegen markiert und deren Aktivitätsgrad mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Oberflächenantigen CD18 bestimmt. Für die ELISA-Untersuchung der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ , der löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 und die Bestimmung des Kortisols mittels RIA wurde Plasma gewonnen und dieses für die zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Untersuchungen eingefroren.



Die Unterschiede der 4 Gruppen ergaben sich somit aus den Unterschieden der Dosierung und des Einnahmezeitpunktes am zweiten Versuchstag. Während zwei Gruppen jeweils zum Messzeitpunkt 3 (zweiter Tag 9:00) das Verum in den unterschiedlichen Dosierungen von 1,5 mg und 3,0mg Dexamethason erhielten, wurde den anderen beiden Gruppen zum Messzeitpunkt 4 (zweiter Tag 21:00) Dexamethason in den Dosierungen 1,5 mg bzw. 3,0mg verabreicht.

Nach Abschluss des Experimentes wurden die Probanden nochmals neurologisch-internistisch untersucht und nach aufgetretenen Wirkungen bzw. Nebenwirkungen des Präparates befragt. Anhand eines Fragebogens wurde gebeten zu schätzen, zu welchem Zeitpunkt sie Verum erhalten hätten.

## **2.4 Blutkonservierung**

Das an den verschiedenen Messzeitpunkten gewonnene Blut wurde abhängig vom Verwendungszweck unterschiedlich behandelt. Abgenommen wurde eine 3,7ml-Monovette Vollblut zur Bestimmung des Blutbildes mit dem Max-M-Counter (siehe unten), eine 10ml-Monovette Vollblut zur FACS-Bestimmung und eine weitere 10ml-Monovette Vollblut zur ELISA und RIA Analyse.

Die Monovette für die FACS Analyse wurde vor den Blutentnahmen mit 150µl Trasylol und 250µl EDTA zur Stabilisierung der längerkettigen Proteine und Hemmung der Blutgerinnung bestückt und auf Eis abgenommen. Die FACS-Analysen wurden sofort im Anschluss an die Blutentnahmen durchgeführt.

Die Monovette für die ELISA und RIA Analysen wurde vor den Blutentnahmen mit 150µl Trasylol und 250µl EDTA zur Stabilisierung der längerkettigen Proteine und Hemmung der Blutgerinnung bestückt. Direkt nach der Abnahme wurde die Monovette im Eiswasserbad gekühlt und anschließend bei 4000 Umdrehungen/min und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Plasma wurde zur Weiterverarbeitung in 6 Eppendorf-Cups aliquotiert und getrennt bei -20°C bzw. -80°C eingefroren.

## **2.5 Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung des Kortisolspiegels**

### **2.5.1 Prinzip und Funktion des RIA**

Mit Hilfe des Radioimmunoassays kann der Kortisolspiegel in einer Plasma- oder Serumprobe quantitativ bestimmt werden. Verwendet wurde der ImmuChem™ Kortisol <sup>125</sup>I RIA Kit (coated tube) der Firma ICN Biomedicals.

In diesem Assay sind auf der Innenseite der Röhrchen bereits spezifische Antikörper gegen Kortisol mit der F<sub>C</sub>-Region gebunden, so dass durch die Zugabe des zu untersuchenden Plasmas das darin enthaltene Kortisol in Form einer Antigen/Antikörper-Reaktion ebenfalls gebunden werden kann. Zur Herstellung des Kortisol-Antikörpers wurde Kortisol-3-O-Carboxymethyloxime-BSA zur Gewinnung von Antiserum injiziert und dieses kovalent an die Polypropylen-Oberfläche gebunden. In das Röhrchen wird nun das Plasma des Probanden zugegeben; das

darin enthaltene Kortisol wird von den Antikörpern gebunden. Im selben Arbeitsgang wird zudem eine definierte Menge radioaktiv markierten Kortisols zugegeben, das mit dem Probandenkortisol um die Bindungsplätze konkurriert. Nach Inkubation wird die gesamte Flüssigkeit aus den Röhren entfernt. Der Anteil des im Röhren gebundenen, radioaktiv markierten Kortisols ist somit direkt abhängig vom Kortisolgehalt der Plasmaprobe; je höher der Anteil im untersuchten Plasma, desto weniger des  $^{125}\text{J}$ -markierten Kortisols kann gebunden werden. Mit Hilfe eines Gamma-Zählers wird nun die Radioaktivität des Röhrens bestimmt.

Der genaue Wert des Plasmakortisolkonzentration lässt sich im Anschluss aus einer Standardkurve ermitteln, die für jeden Kit aus verschiedenen, definierten Standard-Kortisolkonzentrationen neu interpoliert werden muss.

### **2.5.2 Bestimmung von Kortisol**

Reagenzien und Kit wurden von der Firma DRG Diagnostics (Cortisol RIA coated tubes) bezogen, bei 4°C gelagert und innerhalb eines Monats verbraucht. Die Nachweisgrenze beträgt 0.2 ng/ml, die Intra- und Interassayvariationskoeffizienten lagen unter 8%. Vor Testbeginn wurde darauf geachtet, dass die bei -20°C gefrorenen Plasmaproben und sämtliche benötigte Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten.

Vorgehensweise:

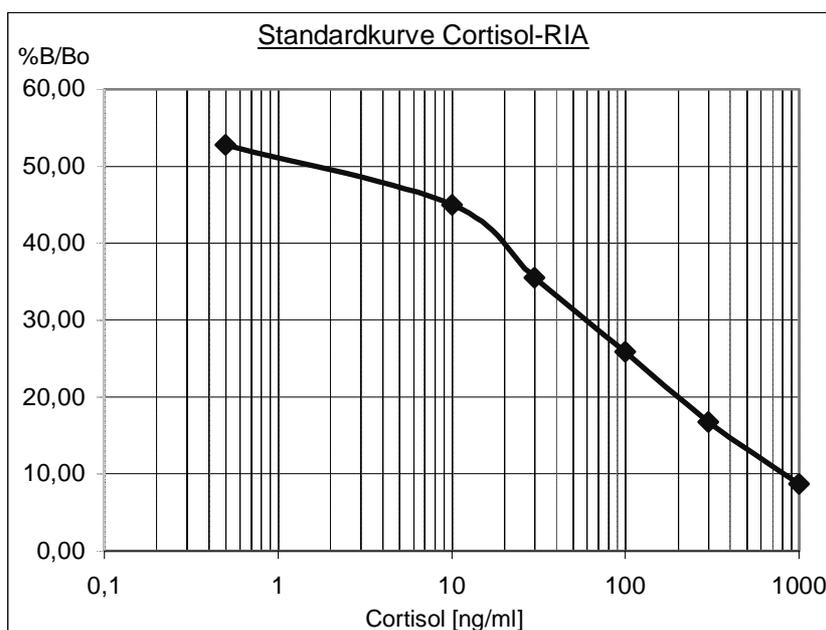
- 1.) Zunächst pipettiert man 25µl Probandenserum bzw. 25µl der verschiedenen, definierten Standardlösungen zur Erstellung der für die quantitative Bestimmung benötigten, Standardkurve in die bereitgestellten, Antikörper-beschichteten Polypropylenröhren. Die Standardlösungen enthalten Kortisol in den Konzentrationen 0,0µg/dl (Nullstandard), 0,5µg/dl, 10,0µg/dl, 30,0µg/dl, 100,0µg/dl, 300,0µg/dl und 1000,0µg/dl. Zudem werden einige Kontrollröhren mit 25µl Serum bekannter Kortisolkonzentration bestückt. Um die Genauigkeit zu erhöhen, werden sämtliche Werte doppelt bestimmt.

- 2.) Allen Röhrchen wird nun 1,0ml der mit  $^{125}\text{J}$ od-markierten Kortisoll sung zugefugt und gründlich gemischt (mit Hilfe eines Vortex-Mixers).
- 3.) Die Röhrchen werden nun im  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad für 45 Minuten inkubiert.
- 4.) Der flüssige Inhalt der Röhrchen wird abgesaugt, um ein Verbleiben noch in Lösung befindlichen  $^{125}\text{J}$ -Kortisols im Röhrchen zu verhindern.
- 5.) Die radioaktive Zerfallsstrahlung des in den Röhrchen gebundenen  $^{125}\text{J}$ -Kortisols wird mit Hilfe eines Gamma-Zählers über mindestens 1 Minute gemessen.

Um die Aktivität der Proben in Bezug auf die Aktivität des Nullstandard (100%  $^{125}\text{J}$ -Kortisol) zu berechnen, legt man folgende Formel zu Grunde:

$$\%B/B_0 = \frac{\text{Mittelwert der Probe}}{\text{Mittelwert des Nullstandards}} \times 100$$

Anhand der erhaltenen  $\%B/B_0$ -Werte für die Standardlösungen wird nun eine Standardkurve interpoliert. In dieser kann nun für die in den Probanden-RIAs gemessenen Aktivität die zugehörige Kortisolkonzentration abgelesen werden.



Standard:	Aktivität %
ng/ml	%B/B <sub>0</sub>
0,5	52,73
10	44,99
30	35,51
100	25,84
300	16,82
1000	8,74

**Abb.3: Beispiel einer RIA-Standardmesskurve**

## **2.6 Blutbildbestimmung mit MAX-M-Counter, Coulter**

Die Bestimmung des Blutbildes erfolgte mit MAX-M-Counter der Firma Coulter, einem quantitativen, automatischen Blutanalysator für die *in vitro* Diagnostik. Zugrundeliegendes Prinzip ist hierbei die Messung eines elektrischen Widerstandes, der sich je nach Größe der einzelnen Zellen unterscheidet. Hierzu wird eine Suspension von Blutzellen gleichzeitig mit einem niederfrequenten elektrischen Strom durch eine kleine Kapillaröffnung geleitet. Dabei verursachen die einzelnen, durch die Kapillaröffnung strömenden Blutzellen eine Veränderung des elektrischen Widerstandes, deren Stärke von der Größe der Zelle abhängt. Das System zählt die einzelnen Zellen und erstellt eine Zellgrößenverteilung. Durch die Eigenschaft von Zellwänden hochfrequenten Strom zu leiten, während nukleäre und granuläre Bestandteile unterschiedliche isolierende Eigenschaften aufweisen, kann auch ein Kern-Plasma-Verhältnis der Zellen bestimmt werden, was somit eine weitere Differenzierung der Zellen möglich macht.

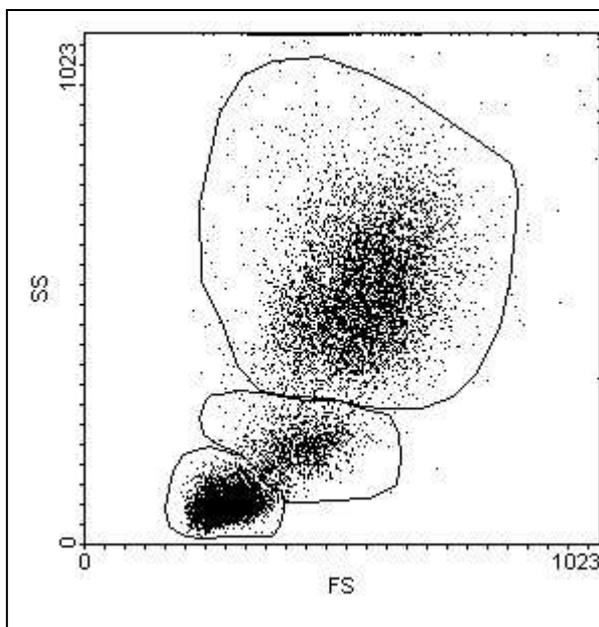
## **2.7 FACS – Analyse für Granulozyten**

### **2.7.1 Prinzip und Funktion der Immunfluoreszenzdurchflußzytometrie (FACS)**

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der chemischen und physikalischen Grundlage von Fluoreszenz und Streulicht. Hierdurch ist es möglich, Zellen nicht nur aufgrund ihrer relativen Größe und Granularität zu beurteilen, sondern auch anhand von mit Fluoreszenzfarben markierten Antikörpern, z.B. nach immunologischen Eigenschaften. Mit Hilfe einer am FACS-Gerät angeschlossenen EDV-Einheit können die ermittelten Daten analysiert und zur Dokumentation aufbereitet werden.

Grundvoraussetzung zur Messung einer Probe mit der Durchflußzytometrie ist deren Vorliegen als Suspension in einer Konzentration von etwa  $10^6$  Zellen/ml. Vor der Messung wird mit Heparin als gerinnungshemmende Substanz versetztes Vollblut mit fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen ein spezifisches

Oberflächenantigen inkubiert. Im Anschluss werden die Erythrozyten mit Hilfe einer Lyse-Reagenz lysiert. Zur Analyse wird nun die in einem Probenröhrchen befindliche, ausschließlich Leukozyten enthaltende Zellsuspension über eine Stahlkapillare mit Überdruck in den Messbereich des FACS-Gerätes überführt. Die Probenflüssigkeit ist dabei von einer Mantelflüssigkeit (sog. sheath fluid) umgeben. Diese beschleunigt die Zellen beim Eintritt in die Messkammer so stark, dass sich Aggregate auftrennen und die Zellen sequentiell den Analysepunkt erreichen. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.



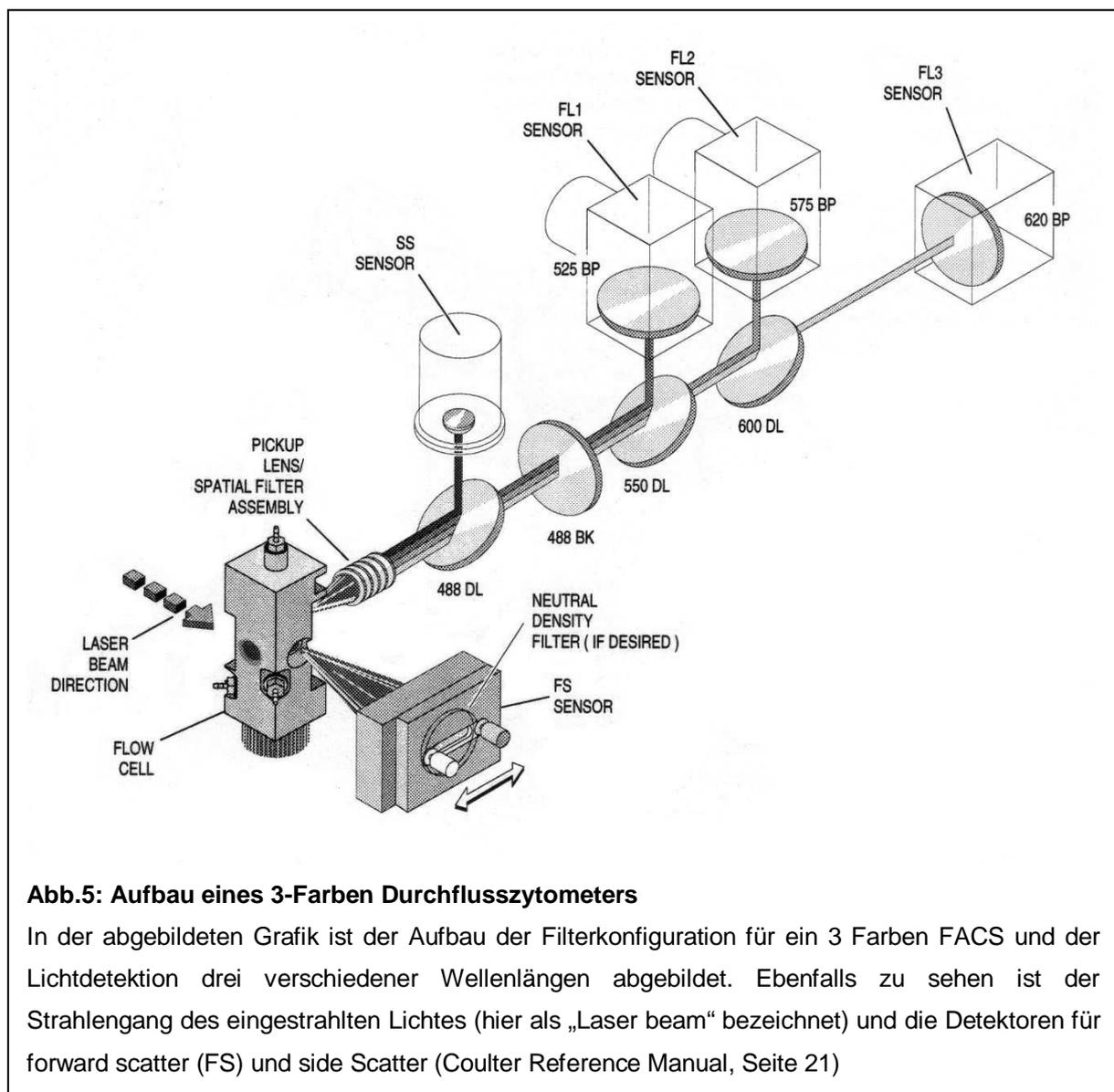
**Abb. 4 Abbildung eines Dot-Plots**

Die hier dargestellten Zellen wurden nach ihrer Größe (hier im mit FS bezeichneten forward scatter) und Granularität (hier im mit SS bezeichneten side scatter) aufgetragen. Dabei differenzieren sich die Leukozyten in einzelne Punktwolken, die die Lymphozyten (unten links), Monozyten (mittig) und Granulozyten (oben) abbilden.

Direkt unterhalb der Düsenöffnung, aus der die Zellen wie Perlen an einer Kette austreten, trifft ein Laserstrahl auf die Probenflüssigkeit. Das auf die Zellen treffende Licht wird dabei in charakteristischer Weise abgelenkt (Lichtstreuung) und mittels Spiegel- und Filtersystemen auf verschiedenen Photoverstärker geleitet, wo es messtechnisch erfasst wird. Die Wellenlänge des auftreffenden Lichts ändert sich jedoch nicht. Die Lichtstreuung wird dabei von den Zelleigenschaften Größe, Zellmembranstruktur und intrazelluläre Bestandteile (z.B. Granularität) beeinflusst. Das größte Anteil des Lichts wird in die Vorwärtsrichtung gestreut und ist in erster Linie ein Maß für die Zelloberfläche und somit der relativen Zellgröße, da kleinere Zellen weniger Lichtstreuung verursachen. Dieses Licht wird als „forward scatter“ bezeichnet. Das im rechten Winkel gestreute Licht hängt dagegen in erster Linie von der Granularität der Zellen ab und wird als „side scatter“ bezeichnet. Durch diese

Differenzierung lässt sich jede Zelle in einem 2-dimensionalen Koordinatensystem (als Dot-Plot bezeichnet) als Punkt darstellen (siehe Abbildung 4).

Zusätzlich zum side scatter emittieren die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen fluoreszierendes Licht in alle Richtungen. Fluoreszenz kommt zunächst durch die Absorption von Lichtenergie eines für jede fluoreszierende Verbindung charakteristischen Wellenlängenbereichs und der späteren Abgabe der Energie in Form eines Photons zustande. Dabei ist das abgestrahlte Licht langwelliger als das Anregungslicht und bildet das Emissionsspektrum. Fluoreszenz und side scatter werden mittels Spiegel- und Filtersystemen aufgetrennt und mit Detektoren gemessen (siehe Abbildung 5).



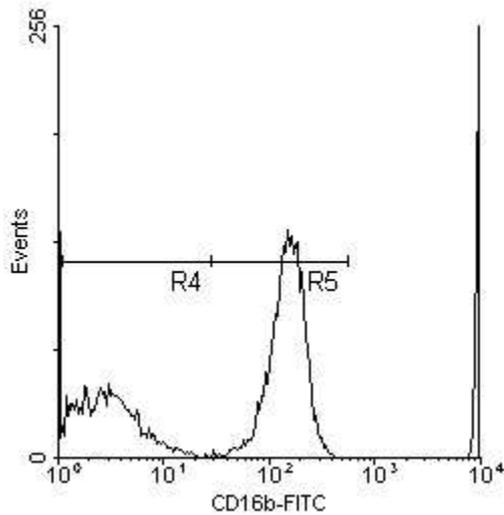
Die spezifischen Charakteristika jeder einzelnen Zelle der Suspension können im Anschluss an die Probenanalyse mit Hilfe der angeschlossenen EDV-Einheit in Form von Histogrammen ausgewertet werden. In diesen wird eine Verteilung der Zellen in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität (Mnl X) dargestellt. Da die Zellen jedes Individuums bereits eine physiologisch unterschiedliche Fluoreszenz besitzen, wird für jedes Individuum nach Abschluss der Messungen ein sogenanntes „Gating“ vorgenommen, bei welchem definiert wird, in welchem Fluoreszenzintensitätsbereich Zellen als positiv für die beobachtete Eigenschaft zu werten sind (siehe Abbildungen 6-8).

### **2.7.2 Eigenschaften des CD16b – Antikörpers**

Das humane CD16 (Fc- $\gamma$ RIII) ist ein 50-80 kDa Protein und hat zwei unterschiedliche Formen IIIa und IIIb, die auch auf unterschiedlichen Genen codiert werden. Bei der Form Fc- $\gamma$ RIIIb (CD16b) handelt es sich um ein Glykoprotein, das über Glykosylphosphatidylinositol in der äußeren Zellwand verankert ist und ausschließlich auf humanen, neutrophilen Granulozyten vorkommt (Ravetch und Perussia, 1989).

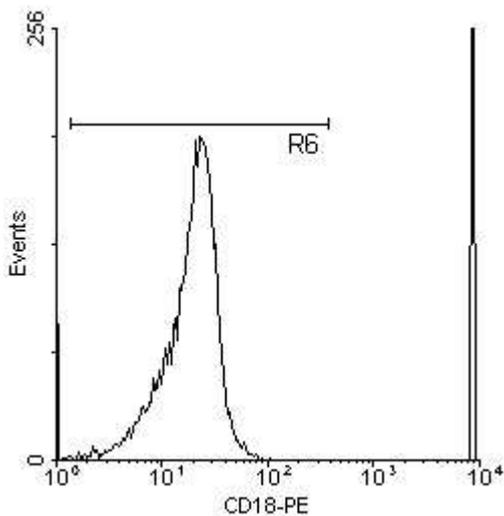
Zur Fluoreszenzmarkierung des CD16b-Oberflächenantigens wurde der monoklonale IgM  $\kappa$ -Antikörper CD16b der Firma Immunotech (Cat. No. 2353) verwendet. Dieser wurde durch Injektion gereinigter humaner Granulozyten in eine Maus und anschließende Hybridisierung der Plasmazellen gewonnen. Der Antikörper ist an der F<sub>C</sub>-Region mit FITC (Fluorescein Isocyanat), einem grün fluoreszierenden Farbstoff, konjugiert. FITC absorbiert Licht bei 488nm Wellenlänge und hat eine maximale Emissionswellenlänge bei  $\lambda=525\text{nm}$ .

Vom Hersteller wird empfohlen, die Antikörper in einer Menge von 20 $\mu\text{l}$ /100 $\mu\text{l}$  Vollblut zu verwenden.



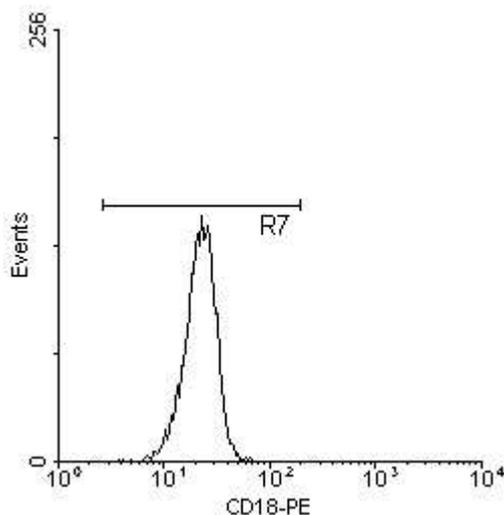
**Abb. 6 Histogramm CD16b positiver Zellen**

Hier wurden die Zellen nach ihrer Expression von CD16b Oberflächenantigenen aufgetragen. Im Gating wurden die mit R5 bezeichneten Zellen als für CD16b positiv definiert, während die Zellen unter R4 als CD16b negativ gelten. Das Integral unter den Kurven gibt die mittlere Leuchtdichte (=Mnl (X)) der jeweiligen Population an.



**Abb. 7 Histogramm CD18 positiver Zellen**

Hier wurden die Zellen nach ihrer Expression von CD18 Oberflächenantigenen aufgetragen. Im Gating wurden die mit R6 bezeichneten Zellen als für CD18 positiv definiert. Das Integral unter der Kurve gibt die mittlere Leuchtdichte (=Mnl (X)) an.



**Abb. 8 Histogramm CD18 positiver Zellen in den CD16b positiven Zellen**

Hier wurden die Zellen nach ihrer Expression von CD18 Oberflächenantigenen ausschließlich in der in Abbildung 6 dargestellten Population der CD16b positiven Zellen (Gate R5) aufgetragen. Im Gating wurden die mit R7 bezeichneten Zellen als für CD18 positiv definiert. Das Integral unter der Kurve gibt die mittlere Leuchtdichte (=Mnl (X)) an.

### 2.7.3 Eigenschaften des CD18 – Antikörpers

CD18 Antigen ist ein 90kDa integrales Membranprotein, das zur Familie der  $\beta$ 2-Integrine gerechnet wird. Dieses Molekül wird auf praktisch allen Leukozyten stark exprimiert (Harris et al., 2000). Die  $\beta$ 2-Integrine CD11 und CD18 sind involviert in Interaktionen zwischen Zellen und sind dabei zuständig für die Adhäsion der Zellen. Eine Blockade der CD18 Antigene führt demnach zu signifikanter immunologischer Inhibition (Nortamo et al., 1988; Price et al., 1987). Eine vermehrte Expression von CD18 wird als Parameter für immunologische Aktivierung angesehen.

Zur Fluoreszenzmarkierung des CD18-Oberflächenantigens wurde der monoklonale IgG1-Antikörper CD18 der Firma Immunotech (Cat. No. 1570) verwendet. Dieser wurde durch Injektion einer Lösung gereinigter gp90-160 Komplexe in eine Maus und anschließende Hybridisierung der Plasmazellen gewonnen. Der Antikörper ist an der F<sub>C</sub>-Region mit PE (Phycoerythrin), einem orange-rot fluoreszierenden Farbstoff, konjugiert. PE absorbiert Licht bei  $\lambda=488\text{nm}$  Wellenlänge und hat eine maximale Emissionswellenlänge bei  $\lambda=575\text{nm}$ .

Vom Hersteller wird empfohlen, die Antikörper in einer Menge von 20 $\mu\text{l}$ /100 $\mu\text{l}$  Vollblut zu verwenden.

### 2.7.4 Bestimmung von Absolutwerten und Leuchtdichte

Das heparinisierte Vollblut der Probanden wurde direkt im Anschluss an die Abnahme mittels FACS-Bestimmung weiterverwertet.

Verwendete Reagenzien:

FACS-sheath: Isoton<sup>®</sup> II Acide free balanced electrolyte solution

Reinigungslösung: Coulter Clenz<sup>™</sup> Cleaning Solution

Destilliertes Wasser

Erythrozyten-Lysis-Lösung: OptiLyse<sup>®</sup> C, Coulter-Immunotech

Count-Lösung: Flow-Count<sup>™</sup> Fluospheres, Lot 754814, Coulter

Monoklonale Antikörper Coulter-Immunotech: CD16b-FITC, CD18-PE

Pufferlösung: PBS-Puffer

Verwendete Geräte:

Coulter® EPICS® XL™ Flow Cytometer, Serial Nr.: AB32233

FACS-EDV: PERSONAL COMPUTER mit SYSTEM II™ Software

Vor Beginn der Messungen wurde sorgfältig darauf geachtet, dass sämtliche zu benutzenden Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten.

Vorgehensweise:

- 1.) Zunächst werden 10µl des CD16b-Antikörpers und 10µl des CD18-Antikörpers in ein Proberöhrchen pipettiert.
- 2.) Zu diesen wird 50µl des zu untersuchenden Vollblutes invers pipettiert, um die Genauigkeit zu erhöhen. Die Suspension wird sofort gut vermischt (mit Hilfe eines Vortex-Mixers) und das Zellen-Ak-Gemisch für 30min dunkel inkubiert.
- 3.) Um die für die FACS-Analyse störenden Erythrozyten zu zerstören, werden 500µl OptiLyse zupipettiert, wiederum gut gemischt und weitere 15min dunkel inkubiert.
- 4.) Zur Verdünnung der Lösung auf das Messoptimum des FACS-Gerätes werden weitere 500µl PBS-Lösung zupipettiert und nochmals 20min dunkel inkubiert.
- 5.) 50µl Count-Lösung werden direkt vor der Messung zupipettiert und mit Hilfe eines Vortex-Mixers mit den weiteren Bestandteilen gut vermischt.
- 6.) Durchführung der analytischen FACS-Messung.
- 7.) Gating jeweils aller Werte eines Probanden nach Abschluss des Messzyklus.

Nach dem Gating konnten für jeden Messzeitpunkt eines Probanden folgende Parameter bestimmt werden: Leukozytenkonzentration, Lymphozytenkonzentration, Monozytenkonzentration und Granulozytenkonzentration aus dem Scatter (SS gegen FS) sowie Konzentrationen und mittlere Leuchtintensität (MnI X) von CD16b positiven Zellen, CD18 positiven Zellen und CD18 positiven Zellen innerhalb der Population der CD16b positiven Zellen.

## 2.8 ELISA – Analyse der Zytokine

### 2.8.1 Prinzip und Funktion des ELISA

Mit Hilfe eines Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) besteht die Möglichkeit des quantitativen Nachweises eines spezifischen Antigens in einer Probe, mittels eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers. Durch die Markierung des monoklonalen Antikörpers mit einem Enzym oder der Enzymmarkierung eines zweiten Antikörpers gegen den monoklonalen Antikörper, lässt sich nach einem Waschschrift zur Entfernung überschüssiger Antikörper eine Nachweisreaktion durchführen. Dazu wird im Überschuss Substrat für eine Reaktion zugesetzt, welche vom an das Antigen gebundene Enzym abhängig ist. So kann, z.B. durch wiederholte photometrische Messung, die Menge des umgesetzten Substrates bestimmt werden und somit auf die Menge des in der Probe befindlichen und an den Antikörper gebundenen Enzyms geschlossen werden. Diese wiederum ist abhängig von der Menge des in der Ausgangsprobe enthaltenen Antigens.

**Tab.1: Charakteristika der verwendeten ELISAs zur Messung von Zytokinen und Zytokinrezeptoren**

	Hersteller	Nachweisgrenze	Variationskoeffizient	
			intra-assay	inter-assay
<b>IL-6</b>	R&D Systems, Inc. <sup>1</sup>	0,039 pg/ml	<8%	<8%
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Medgenix <sup>2</sup>	3,0 pg/ml	<8%	<8%
<b>sTNF-R p55</b>	Medgenix <sup>2</sup>	0,05 ng/ml	<8%	<8%
<b>sTNF-R p75</b>	Medgenix <sup>2</sup>	0,1 ng/ml	<8%	<8%

<sup>1</sup>Minneapolis, USA <sup>2</sup>Brüssel, Belgien

### 2.8.2 Bestimmung von Interleukin-6

Die Bestimmung von IL-6 erfolgte mittels eines hochsensiblen Sandwich-ELISA. Bei der Sandwich-Technik ist der monoklonale Antikörper gegen IL-6 bereits an eine Mikrotiterplatte gebunden. Standardlösungen und Proben werden in auf der Platte befindliche Löcher pipettiert und IL-6 dort an den Antikörpern gebunden. Nach einem Waschschrift wird am fixierten IL-6 ein freier Antikörper gebunden, an dem Alkalische Phosphatase an der F<sub>C</sub>-Region gebunden ist. Die Alkalische Phosphatase reduziert in der Reaktionskette zugegebenes NADPH zu NADH, welches wiederum ein Tetrazolium Salz reduziert und somit zu einer messbaren Farbänderung führt. Die Geschwindigkeit der Farbänderung ist somit direkt proportional zur Menge des anfangs gebundenen IL-6.

Reagenzien und Kit wurden von der Firma R&D Systems, Inc. (Quantikine HS Human IL-6 Immunoassay) bezogen, bei 4°C gelagert und innerhalb eines Monats verbraucht. Vor Testbeginn wurde darauf geachtet, dass die bei -20°C gefrorenen Plasmaproben und sämtliche benötigten Reagenzien Raumtemperatur erreicht hatten.

Vorgehensweise:

- 1.) Zunächst pipettiert man 50 $\mu$ l Verdünnungslösung, sowie 200 $\mu$ l Probandenserum bzw. 200 $\mu$ l der verschiedenen, durch mehrere Verdünnungsschritte hergestellten Standardlösungen zur Erstellung der, für die quantitative Bestimmung benötigten, Standardkurve in die Vertiefungen der bereitgestellten, Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte. Die Standardlösungen enthalten IL-6 in den Konzentrationen 0,0pg/ml (Nullstandard), 0,156pg/ml, 0,313pg/ml, 0,625pg/ml, 1,25pg/ml, 2,5pg/ml und 5pg/ml. Um die Genauigkeit zu erhöhen werden sämtliche Werte doppelt bestimmt.
- 2.) Inkubation bei Raumtemperatur für 14-20 Stunden.
- 3.) Die Flüssigkeit wird nun aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und die Vertiefungen mindestens 4malig mit Waschpuffer gespült, um Verunreinigungen auszuschließen.
- 4.) Nun werden 200 $\mu$ l der AP-markierten IL-6 Antikörper zupipettiert.
- 5.) Inkubation bei Raumtemperatur für 6 Stunden.
- 6.) Die Flüssigkeit wird nun aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und die Vertiefungen mindestens 4malig mit Waschpuffer gespült, um Verunreinigungen auszuschließen.
- 7.) Zupipettieren von 50 $\mu$ l Substratlösung (NADPH) – 60min Inkubation
- 8.) Zupipettieren von 50 $\mu$ l Amplifikationslösung – 30min Inkubation
- 9.) Zupipettieren von 50 $\mu$ l Stopplösung
- 10.) Quantifizierung der Farbintensität mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes bei einer Wellenlänge von  $\lambda=490\text{nm}$  innerhalb von 30min.

Um die IL-6 Konzentration der jeweiligen Proben zu bestimmen, wird nun aus den bestimmten Werten der optischen Dichte der Standardlösungen bekannter IL-6 Konzentration eine Standardkurve gebildet. In dieser kann dann die IL-6 Konzentration für die jeweilige bestimmte optische Dichte der Probe abgelesen werden.

### 2.8.3 Bestimmung von TNF- $\alpha$

Die Bestimmung von TNF- $\alpha$  erfolgte ebenfalls mittels eines Sandwich-ELISA (s. Kap 2.8.2). Reagenzien und Kit wurden von der Firma BioSource Europe S.A. (MEDGENIX TNF- $\alpha$  EASIA kit) bezogen, bei 4°C gelagert und innerhalb eines Monats verbraucht.

Vorgehensweise:

- 1.) Zunächst pipettiert man 50 $\mu$ l Inkubationspuffer, sowie 200 $\mu$ l Probandenserum bzw. 200 $\mu$ l der verschiedenen Standardlösungen in die Vertiefungen der bereitgestellten, Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte. Die Standardlösungen enthalten TNF- $\alpha$  in den Konzentrationen 0,0pg/ml (Nullstandard), 15pg/ml, 30pg/ml, 50pg/ml, 150pg/ml, 500pg/ml und 1500pg/ml. Um die Genauigkeit zu erhöhen werden sämtliche Werte doppelt bestimmt.
- 2.) Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einem horizontalen Rüttler bei 700rpm.
- 3.) Die Flüssigkeit wird nun aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und die Vertiefungen mindestens 4malig mit Waschpuffer gespült und abgesaugt, um Verunreinigungen auszuschließen.
- 4.) Nun werden 100 $\mu$ l Pufferlösung und 50 $\mu$ l der Enzym-markierten TNF- $\alpha$  Antikörper zupipettiert.
- 5.) Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einem horizontalen Rüttler bei 700rpm.
- 6.) Die Flüssigkeit wird nun aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte entfernt und die Vertiefungen mindestens 4malig mit Waschpuffer gespült und abgesaugt, um Verunreinigungen auszuschließen.
- 7.) Zupipettieren von 150 $\mu$ l Chromogen- und Substratlösung - 30min Inkubation auf einem horizontalen Rüttler bei 700rpm.
- 8.) Zupipettieren von 50 $\mu$ l Stopplösung
- 9.) Quantifizierung der Farbintensität mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegerätes bei einer Wellenlänge von  $\lambda=450\text{nm}$  innerhalb von 3 Stunden.

Um TNF- $\alpha$  Konzentration der jeweiligen Proben zu bestimmen, wird nun aus den bestimmten Werten der optischen Dichte der Standardlösungen bekannter TNF- $\alpha$  Konzentration eine Standardkurve gebildet. In dieser kann dann die TNF- $\alpha$  Konzentration für die jeweilige bestimmte optische Dichte der Probe abgelesen werden.

#### **2.8.4 Bestimmung der TNF-Rezeptoren p55 und p75**

Reagenzien und Kit wurden von der Firma BioSource Europe S.A. (MEDGENIX sTNF-RI EASIA kit bzw. MEDGENIX sTNF-RII EASIA kit) bezogen, bei 4°C gelagert und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Bestimmung der löslichen TNF-Rezeptoren p55 und p75 (auch als TNF-Rezeptoren 1 und 2 bezeichnet) erfolgte analog zur Bestimmung von TNF- $\alpha$ . Die Kits zur Bestimmung der löslichen TNF Rezeptoren sind, mit Ausnahme der jeweils gegen die zu detektierende Substanz gerichteten, monoklonalen Antikörper baugleich. Die Durchführung ist ausführlich im Kap. 2.8.3 beschrieben.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Die Auswertung sämtlicher gemessener Daten erfolgte mit Hilfe von handelsüblicher EDV-Software (SPSS for Windows 10.0, SPSS Inc.)

Zunächst wurde für sämtliche Parameter überprüft, ob signifikante zirkadiane Schwankungen zwischen den Messzeitpunkten 2 (Abend des 1. Tages) und 3 (Morgen des 2. Tages) vorliegen. Die Berechnung wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für Messwiederholungen berechnet.

Zur Berechnung der Effekte der Dexamethason-Gabe wurden jeweils die Werte, welche zur gleichen zirkadianen Zeit gemessen wurden, miteinander verglichen. Somit wurden jeweils die Werte 12 Stunden und 36 Stunden nach der Einnahme des Präparates mit dem Plazebo-kontrollierten Wert 12 Stunden vor Dexamethason-Einnahme für alle gemessenen Parameter verglichen. Der Wert 24 Stunden nach der Dexamethason-Einnahme wurde mit dem Plazebo-kontrollierten Wert der direkt vor der Einnahme gemessen wurde (0 Stunden prä-Dexamethason) verglichen.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe einer ANOVA für Messwiederholungen mit Berücksichtigung von Innersubjektfaktoren (Einfluss von Dexamethason) und Zwischensubjektfaktoren der einzelnen Subgruppen (Einfluss von Dosierung 1,5 mg bzw. 3,0mg und Zeitpunkt der Verumgabe 9:00 bzw. 21:00) angestellt. Zur  $\alpha$ -Korrektur wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt in den ANOVA-Modellen benutzt. Bei zulässigen Ausgangsbedingungen wurden post-hoc Tests mittels univariater T-Tests in den Subgruppen für die applizierte Dosis oder den Applikationszeitpunkt durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von 0,05 festgelegt.

Die im Text und den Tabellen abgebildeten Zahlenwerte zeigen jeweils den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. In den Abbildungen wurden die Mittelwerte mit dem dazugehörigen Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung der Stichprobe

Von 43 voruntersuchten Probanden konnten 40 in die Untersuchung eingeschlossen werden, während 3 wegen akuter bzw. chronischer Entzündungen ausgeschlossen werden mussten. Für die letztlich verbleibenden 40 gesunden Probanden ergab sich ein mittleres Alter von  $26.1 \pm 5.0$  Jahren und ein mittlerer Body-Mass-Index (BMI) von  $23.5 \pm 2.4$  kg/m<sup>2</sup>. Nach Entblindung der Studie ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Subgruppen in der ANOVA bezüglich des Alters ( $F[3;36]=0.681$ ) und des BMIs ( $F[3;36]=0.375$ ) (siehe Abbildungen 9 und 10).

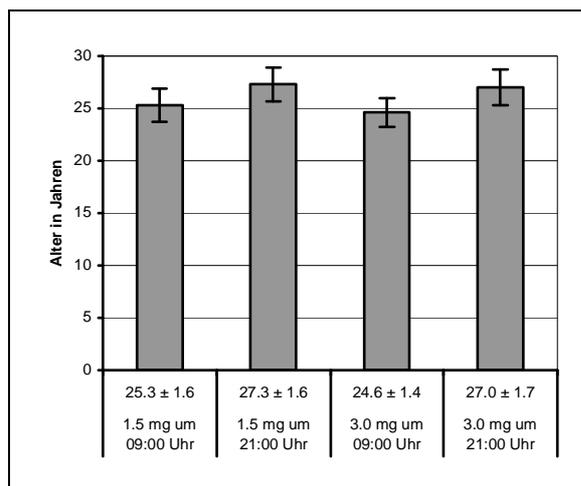


Abb.9: Altersverteilung

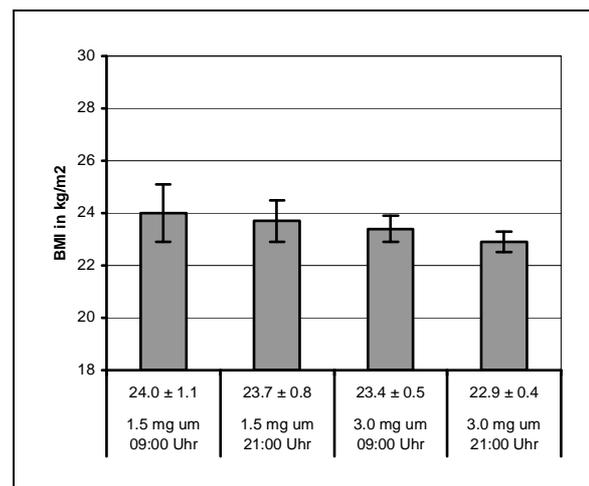


Abb.10: BMI-Verteilung

#### 3.2 Tageszeitliche Schwankungen der Messparameter

Im 24h-Verlauf vor der Applikation des Glukokortikoids ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der morgendlichen und abendlichen, tympanischen Temperatur, den Kortisolplasmaspiegeln, den Spiegeln von TNF- $\alpha$  und sTNF-R p75, der Zahl der Leukozyten, Lymphozyten und Granulozyten, der Anzahl der CD16b positiven Zellen und der Anzahl der CD18 positiven in der Population der CD16b positiven Zellen. Dabei zeigte sich, dass tympanische Temperatur, Zahl der

Leukozyten, Lymphozyten und Granulozyten, der Anzahl der CD16b positiven Zellen und CD18 positive in CD16b positiven Zellen wie auch der Expression von CD18 in den nicht CD16b positiven Zellen abends höher waren als morgens, während es sich beim Plasmakortisolspiegel und den Spiegeln von TNF- $\alpha$  und sTNF-R p75, ebenso wie bei der Zahl der CD18 positiven Zellen außerhalb der CD16b positiven Zellen umgekehrt verhielt (siehe Tabelle 1).

	Tag 1 21:00 Uhr	Tag 2 9:00 Uhr	ANOVA F [1;39]	p-Werte
Tympanische Temperatur (°C)	35,9 ± 0,5	35,6 ± 0,6	11,6	p<0,05
Kortisol (ng/ml)	63,6 ± 33,4	175,2 ± 41,0	275,3	p<0,001
IL-6 (pg/ml)	1,0 ± 1,1	0,8 ± 1,1	2,8	n.s.
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	12,2 ± 4,6	12,9 ± 4,8	5,8	p<0,05
sTNF-R p55 (ng/ml)	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,9	n.s.
sTNF-R p75 (ng/ml)	3,4 ± 0,7	3,8 ± 0,7	23,0	p<0,001
Leukozyten (*1000/ $\mu$ l)	7,6 ± 1,6	5,7 ± 1,1	77,4	p<0,001
Lymphozyten (*1000/ $\mu$ l)	2,3 ± 0,5	1,9 ± 0,5	51,9	p<0,001
Monozyten (*1000/ $\mu$ l)	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	1,3	n.s.
Granulozyten (*1000/ $\mu$ l)	4,5 ± 1,4	3,1 ± 0,9	49,3	p<0,001
CD16b positive Zellen (*2000/ $\mu$ l)	1994 ± 681	1464 ± 378	28,2	p<0,001
CD16b positive Zellen (Mnl X)	26,5 ± 14,3	27,1 ± 15,1	2,2	n.s.
CD18 pos. in CD16b pos. Zellen (*2000/ $\mu$ l)	2005 ± 681	1473 ± 379	28,4	p<0,001
CD18 pos. in CD16b pos. Zellen (Mnl X)	2,9 ± 0,7	3,1 ± 1,0	3,5	n.s.
CD18 pos. in CD16b neg. Zellen (*2000/ $\mu$ l)	973 ± 212	820 ± 185	22,1	p<0,001
CD18 pos. in CD16b neg. Zellen (Mnl X)	2,3 ± 0,4	2,6 ± 0,7	12,5	p<0,05

### 3.3 Effekte der Dexamethasongabe auf die tympanische Temperatur

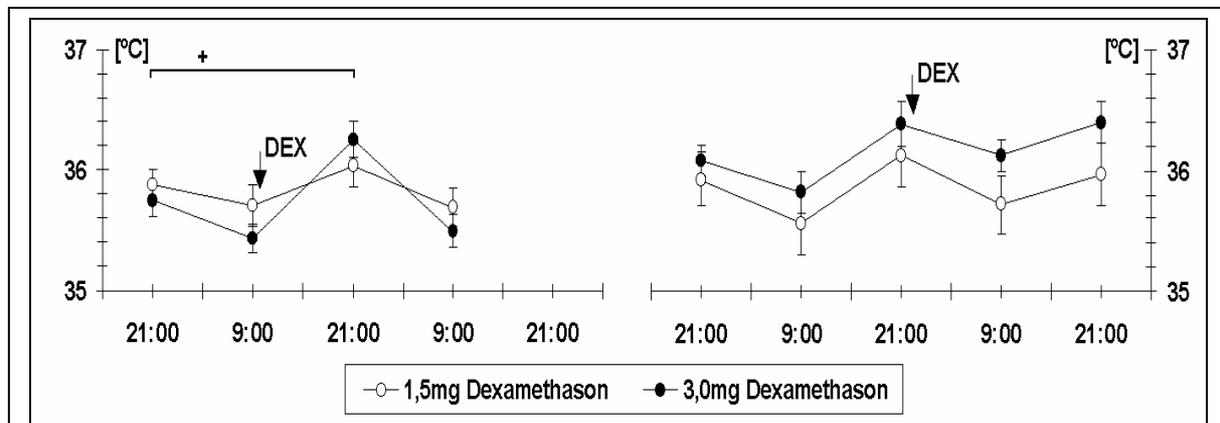
Bei der Analyse der Veränderungen der tympanischen Temperatur ergaben sich in der ANOVA ein signifikanter Bedingungseffekt, sowie signifikante Interaktionseffekte für Zeit und Bedingung und für Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 2).

<b>Tab.2: Veränderung von tympanischer Temperatur und Kortisol</b>				
	t ymp. Temperatur		Kortisol	
	F[1;36]	p-Werte	F[1;36]	p-Werte
Bedingung	7,062	p<0,05	388,311	p<0,001
Bedingung*Applikationszeitpunkt	1,045	n.s.	0,352	n.s.
Bedingung*Dosis	3,385	n.s.	0,431	n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,042	n.s.	0,664	n.s.
Zeit	0,015	n.s.	4,300	n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt	43,771	p<0,001	405,399	p<0,001
Zeit*Dosis	1,201	n.s.	1,441	n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis	1,386	n.s.	1,537	n.s.
Bedingung*Zeit	6,424	p<0,05	6,263	n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt	0,002	n.s.	247,214	p<0,001
Bedingung*Zeit*Dosis	0,209	n.s.	0,663	n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,388	n.s.	1,791	n.s.

In der Tabelle sind die Effekte der Gabe von Dexamethason in unterschiedlichen Dosierungen 1,5 mg und 3 mg und zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten 9:00 Uhr und 21:00 Uhr auf die Parameter tympanische Temperatur und Plasmakortisolspiegel bei 40 Probanden dargestellt. Die Analyse wurde mittels einer ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt, bei welcher Bedingung und Zeit als Innersubjektfaktoren und Dosis und Applikationszeitpunkt als Zwischensubjektfaktoren gewertet wurden. Als Referenz für die erhobenen Werte nach Applikation galt jeweils der zuletzt vor Applikation gemessene Wert des betreffenden Parameters.

Post-hoc-Tests zeigten, dass die Erhöhung der tympanischen Temperatur sich in den Subgruppen nur 12 Stunden nach Gabe nachweisen ließ ( $F[1;39]=11,7$ ;  $p=0,001$ ), was vor allem auf den signifikanten Effekt bei den Probanden, welche Dexamethason zum Zeitpunkt des physiologisch hohen Glukokortikoid-Spiegels am

Morgen bekommen hatten ( $F[1;19]=7,474$ ;  $p=0,013$ ) zurückzuführen ist (siehe Abbildung 11). Nach 24h war der temperaturerhöhende Effekt nicht mehr signifikant nachweisbar ( $F[1;39]=0,102$ ;  $p=0,751$ ).



**Abb.11: Veränderung der tympanischen Temperatur**

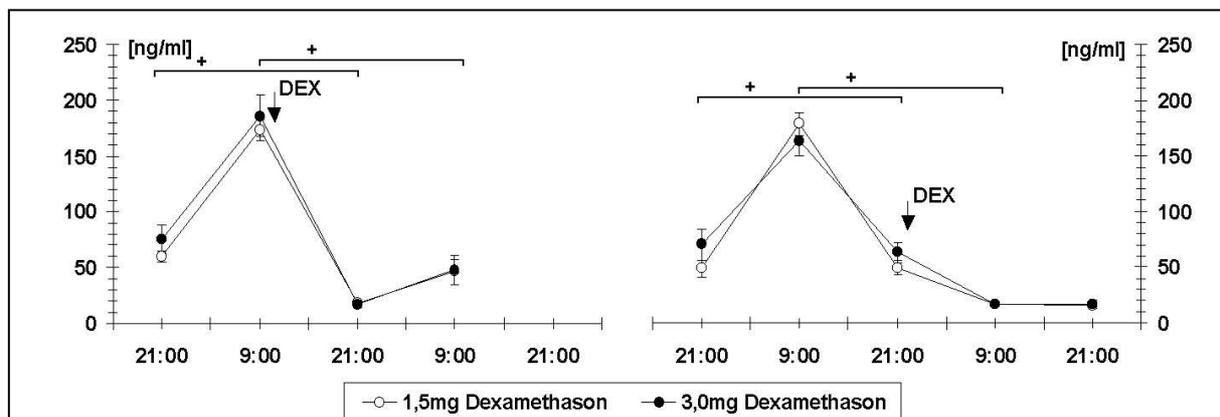
Veränderungen der tympanischen Temperatur während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links dargestellt, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Probanden markiert, die Dexamethason um 9:00 erhalten hatten. Die post hoc Tests bezogen sich jeweils auf die Mittelwerte der 1,5 mg und 3 mg Gruppen, da sich bezüglich der Dosis keine signifikanten Unterschiede ergeben hatten.

### 3.4 Effekte der Dexamethasongabe auf die Kortisol Plasmaspiegel

In der Analyse der Effekte der Dexamethasongabe auf die Kortisol-Plasma-Spiegel ergab einen signifikanten Bedingungseffekt, sowie signifikante Interaktionseffekte für Zeit und Applikationszeitpunkts und für Bedingung, Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 2).

Nach Applikation beider Dosierungen von Dexamethason waren für 24 Stunden die gemessenen Werte signifikant niedriger als unter Plazebobedingungen zum entsprechenden Tageszeitpunkt ( $F[1;39]=80,239$ ;  $p<0,001$ ). Das Ausmaß der Suppression der Kortisolspiegel war dabei abhängig vom Applikationszeitpunkt des Dexamethason. 12 Stunden nach Verabreichung des Präparates waren dabei die gemessenen Werte bei allen Probanden nahe am minimal messbaren Bereich. In

den Gruppen, die Dexamethason am Morgen, also zum Zeitpunkt des höchsten endogenen Kortisolspiegels erhielten, waren die Kortisolspiegel am folgenden Morgen deutlich geringer als 24h zuvor ( $47,1 \pm 37,8$  statt  $179,6 \pm 45,9$  ng/ml), aber dennoch leicht höher als am vorangegangenen Abend ( $17,4 \pm 6,5$  ng/ml), während sich in den Gruppen, die Dexamethason am Abend erhielten, die physiologische Spitze am nächsten Morgen gegenüber dem vorhergehenden völlig unterdrücken lies ( $17,2 \pm 6,1$  statt  $170,9 \pm 36,1$  ng/ml), und der Kortisolspiegel auch nicht über den weiteren 24h-Verlauf anstieg ( $16,2 \pm 7,7$  ng/ml). Dabei ergab die Statistik der Menge des eingenommenen Dexamethason zwischen 1,5 mg oder 3 mg keine signifikanten Unterschiede für den Verlauf der Kortisolwerte (siehe Abbildung 12).



**Abb.12: Veränderung des Kortisolspiegels**

Veränderungen der Kortisolplasmaspiegel während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links dargestellt, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Applikationszeitpunkte 9:00 Uhr und 21:00 Uhr markiert. Die post hoc Tests bezogen sich jeweils auf die Mittelwerte der 1,5 mg und 3 mg Gruppen, da sich bezüglich der Dosis keine signifikanten Unterschiede ergeben

### 3.5 Effekte der Dexamethasongabe auf das Differentialblutbild

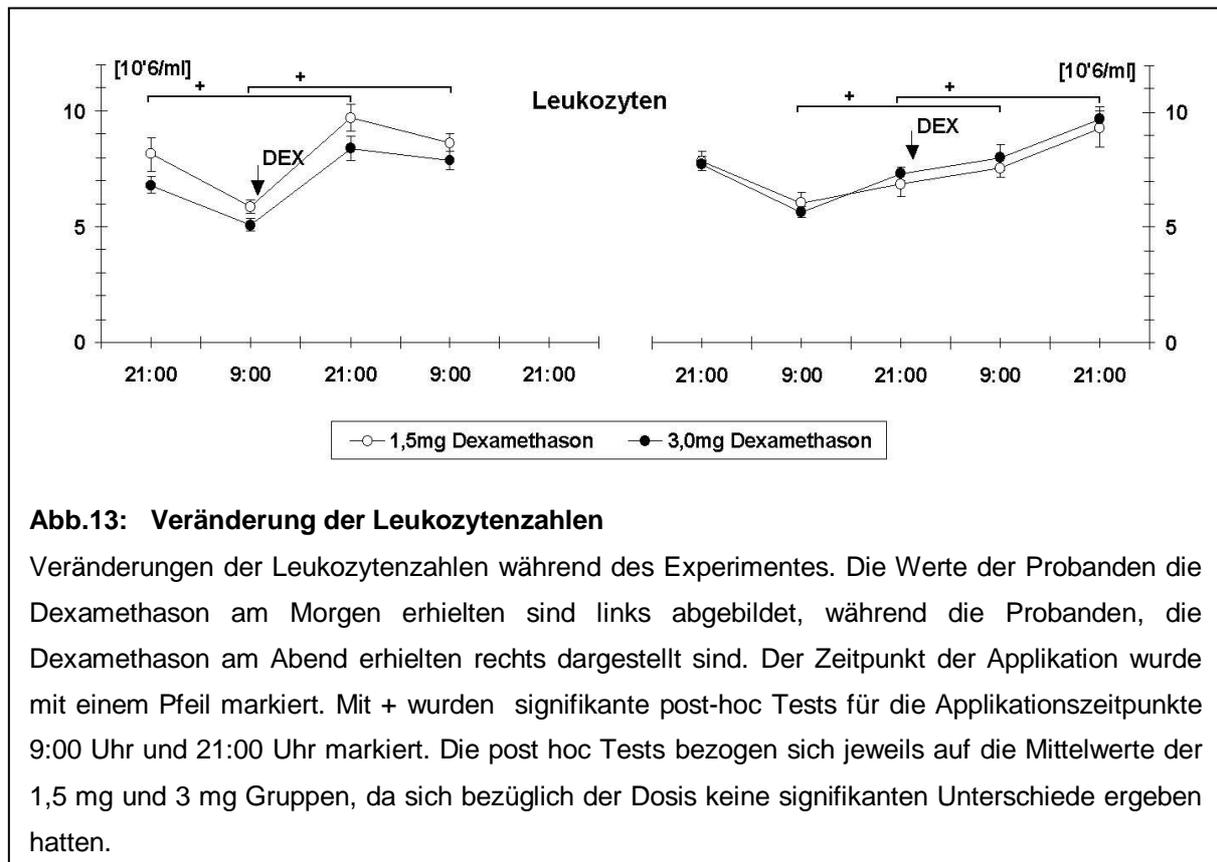
Die Analyse der Effekte von Dexamethason auf das Differentialblutbild ergab neben den Effekten auf die Gesamtleukozytenzahlen differentielle Effekte auf die einzelnen Subpopulationen:

Tab.3: Veränderungen des Differentialblutbildes				
	Leukozyten	Lymphozyten	Monozyten	Granulozyten
Bedingung F[1;36]	118,269 p<0,001	3,207 n.s.	0,554 n.s.	172,767 p<0,001
Bedingung*Applikationszeitpunkt F[1;36]	0,000 n.s.	0,002 n.s.	2,807 n.s.	0,164 n.s.
Bedingung*Dosis F[1;36]	0,304 n.s.	2,092 n.s.	0,702 n.s.	0,398 n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,277 n.s.	0,013 n.s.	0,217 n.s.	0,008 n.s.
Zeit F[1;36]	0,047 n.s.	155,624 p<0,001	29,207 p<0,001	41,739 p<0,001
Zeit*Applikationszeitpunkt F[1;36]	91,214 p<0,001	23,021 p<0,001	0,707 n.s.	46,979 p<0,001
Zeit*Dosis F[1;36]	2,742 n.s.	0,042 n.s.	0,519 n.s.	1,307 n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis F[1;36]	0,047 n.s.	1,253 n.s.	0,058 n.s.	1,176 n.s.
Bedingung*Zeit F[1;36]	7,852 p<0,05	180,465 p<0,001	26,710 p<0,001	15,441 p<0,001
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt F[1;36]	1,669 n.s.	18,230 p<0,001	2,474 n.s.	0,105 n.s.
Bedingung*Zeit*Dosis F[1;36]	0,622 n.s.	0,017 n.s.	0,013 n.s.	1,772 n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,570 n.s.	0,006 n.s.	0,316 n.s.	1,921 n.s.

In der Tabelle sind die Effekte der Gabe von Dexamethason in unterschiedlichen Dosierungen 1,5 mg und 3 mg und zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten 9:00 Uhr und 21:00 Uhr auf die Parameter Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten bei 40 Probanden dargestellt. Die Analyse wurde mittels einer ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt, bei welcher Bedingung und Zeit als Innersubjektfaktoren und Dosis und Applikationszeitpunkt als Zwischensubjektfaktoren gewertet wurden. Als Referenz für die erhobenen Werte nach Applikation galt jeweils der zuletzt vor Applikation gemessene Wert des betreffenden Parameters.

### Gesamtleukozytenzahl

Die Bestimmung Gesamtleukozytenzahl im Verlauf des Experimentes mittels ANOVA ergab einen signifikanten Effekt für Bedingung, sowie Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit und für Zeit und Applikationszeitpunktseffekt von Dexamethason auf die Zahl der Leukozyten (siehe Tabelle 3).



Die post-hoc Tests zeigten, dass zu beiden Applikationszeitpunkten verabreichtes Dexamethason die Leukozytenzahlen unterschiedlich stark, aber jeweils signifikant für 12 ( $F[1;39]=37,6$ ;  $p<0,001$ ) und 24 Stunden ( $F[1;39]=179,8$ ;  $p<0,001$ ) nach Gabe, erhöhte. Bei den Probanden, die Dexamethason morgens erhalten hatten, kam es dabei 12 Stunden nach Applikation zu einem starken Anstieg der Leukozytenzahlen gegenüber dem entsprechenden Tageszeitpunkt vor der Einnahme ( $9,0 \pm 1,8$  zu  $7,4 \pm 1,9 \cdot 1000$  Zellen/ $\mu$ l), während die Zahl der Leukozyten nach 24 Stunden bereits wieder abnahm, aber dennoch im Vergleich zum tageszeitlich entsprechenden Wert erhöht war ( $8,3 \pm 1,3$  zu  $5,5 \pm 0,9 \cdot 1000$  Zellen/ $\mu$ l). Auch bei den Probanden, die Dexamethason am Abend erhalten hatten, stieg die Zahl der Leukozyten nach 12

Stunden an ( $7,8 \pm 1,6$  zu  $5,9 \pm 1,2$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) und erhöhte sich entsprechend dem tageszeitlichen Muster auch weiter zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Einnahme ( $9,5 \pm 2,0$  zu  $7,1 \pm 1,3$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l). Ob 1,5 mg oder 3 mg Dexamethason verabreicht wurde, hatte dagegen keinerlei Auswirkungen auf den Anstieg der Zellzahlen (siehe Abbildung 13).

### **Lymphozyten**

Im Gegensatz zu den anderen Parametern des Differentialblutbildes wurde die Zahl der Lymphozyten durch Dexamethason in unterschiedlicher Weise verändert. Die Analyse des Verlaufs der Lymphozytenzahl während des Experimentes mittels ANOVA ergab einen signifikanten Effekt für Zeit, sowie signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, für Zeit und Applikationszeitpunkt und für Bedingung, Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 3).

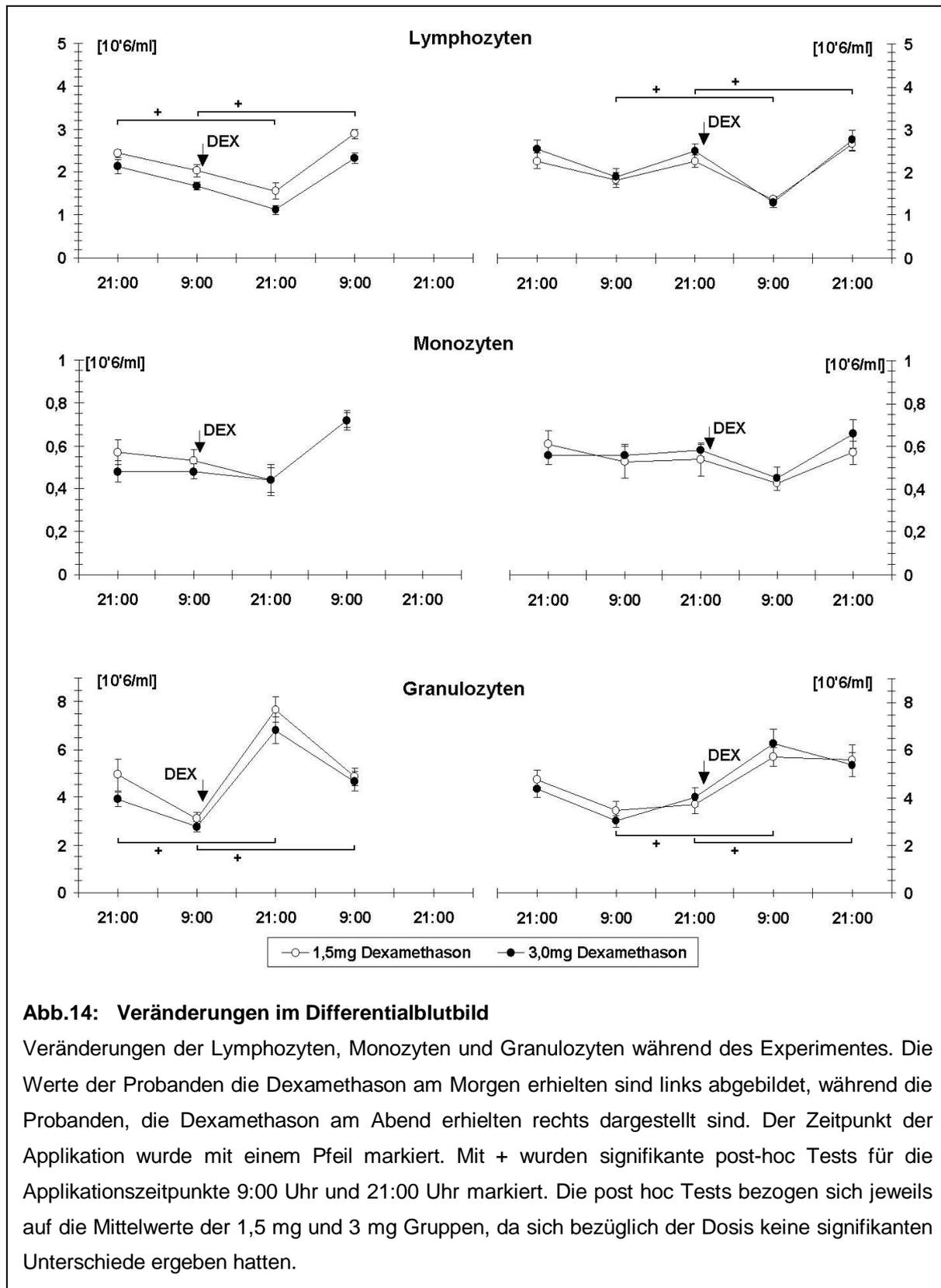
In den post-hoc Tests zeigte sich hier, dass die Zahl der Lymphozyten zunächst 12 Stunden nach Gabe sank ( $F[1;39]=101,5$ ;  $p<0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $1,3 \pm 0,5$  zu  $2,3 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l und 21-Uhr-Gruppe  $1,3 \pm 0,3$  zu  $1,9 \pm 0,5$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l), während 24 Stunden nach Applikation die Menge der sich im peripheren Blut befindlichen Lymphozyten signifikant erhöht hatte ( $F[1;39]=44,3$ ;  $p<0,001$ ). Hier stieg die Zahl der Lymphozyten bei den Probanden, die Dexamethason am Abend erhalten hatten ( $2,7 \pm 0,6$  zu  $2,4 \pm 0,5$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l), gegenüber dem tageszeitlich entsprechenden Wert geringfügig weniger stark an als bei den Probanden, die Dexamethason am Morgen erhalten hatten ( $2,6 \pm 0,5$  zu  $1,9 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) (siehe Abbildung 14-1).

### **Monozyten**

Bezüglich der Veränderung der Zahl der Monozyten während des Experimentes ergaben sich unter Dexamethasongabe ein signifikanter Zeiteffekt und ein signifikanter Interaktionseffekt für Bedingung und Zeit im Verlauf der folgenden 24h (siehe Tabelle 3).

Da sich jedoch weder ein Unterschied bezüglich des Applikationszeitpunktes, noch der verabreichten Dosis ergab, wurden alle 40 Probanden im post-hoc Vergleich gemeinsam analysiert. In der Gesamtpopulation senkte Dexamethason die Zahl der

Monozyten nach 12 Stunden ( $535 \pm 179$  zu  $440 \pm 175$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) und erhöhte sie nach 24 Stunden ( $533 \pm 164$  zu  $668 \pm 171$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) im Bezug auf den entsprechenden zirkadianen Wert vor Applikation (siehe Abbildung 14-2).



**Abb.14: Veränderungen im Differentialblutbild**

Veränderungen der Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Applikationszeitpunkte 9:00 Uhr und 21:00 Uhr markiert. Die post hoc Tests bezogen sich jeweils auf die Mittelwerte der 1,5 mg und 3 mg Gruppen, da sich bezüglich der Dosis keine signifikanten Unterschiede ergeben hatten.

## Granulozyten

Die Erhöhung der Leukozytenzahlen war hierbei weitgehend einem steilen Anstieg in der Subpopulation der Granulozyten zuzuschreiben. Hier ergaben sich in der Analyse mittels ANOVA signifikante Effekte für Zeit und Bedingung, zudem zeigten sich signifikante Interaktionseffekte für Zeit und Bedingung und für Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 3).

Post-hoc Tests zeigten auch hier, dass zu beiden Applikationszeitpunkten verabreichtes Dexamethason die Granulozytenzahlen unterschiedlich stark, aber jeweils signifikant für 12 ( $F[1;39]=128,9$ ;  $p<0,001$ ) und 24 Stunden ( $F[1;39]=89,8$ ;  $p<0,001$ ) nach Gabe erhöhte. Der gemessene Anstieg nach 12 Stunden war hierbei in der Gruppe, die Dexamethason am Morgen erhalten hatte, zwar im Vergleich zum vorhergehenden Messzeitpunkt deutlicher als in der Gruppe, die die Substanz am Abend eingenommen hatte, im Bezug auf den tageszeitlich entsprechenden Messwert war jedoch der Anstieg in der 9-Uhr-Gruppe ( $7,2 \pm 1,7$  zu  $4,4 \pm 1,6$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) etwa genauso stark wie in der 21-Uhr-Gruppe ( $6,0 \pm 1,6$  zu  $3,2 \pm 1,0$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l). Auch nach 24 Stunden waren die Veränderungen im Bezug auf den Wert 24 Stunden zuvor bei den Probanden, die Dexamethason morgens ( $4,8 \pm 1,2$  zu  $2,9 \pm 0,7$ \*1000 Zellen/ $\mu$ l) bzw. abends ( $5,5 \pm 1,8$  zu  $3,9 \pm 1,2$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) eingenommen hatten, annähernd gleich. Dabei hatte die Zahl der Granulozyten nach 24 Stunden in beiden Gruppen bereits den Höhepunkt überschritten und fiel bereits wieder ab. Ob 1,5 mg oder 3 mg Dexamethason verabreicht wurde, hatte hier ebenfalls keinerlei Auswirkungen auf den Anstieg der Zellzahlen (siehe Abbildung 14-3).

### **3.6 Effekte der Dexamethasongabe auf die Oberflächenmarker der zirkulierenden Zellen**

#### **Zellzahl CD16b positiver Zellen**

Die Zahl der gemessenen CD16b positiven Zellen, also der mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmten neutrophilen Granulozyten, korrelierte signifikant mit den im Blutbild gemessenen Granulozyten (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,903,  $p < 0,001$ ).

Dies bestätigte sich auch im Verlauf des Experimentes:

Die Analyse der Veränderung der Zahl der CD16b positiven Zellen mittels ANOVA ergab signifikante Bedingungs- und Zeiteffekte von Dexamethason auf die Zahl der Zellen. Zudem zeigten sich ebenfalls signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, sowie für Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 4).

Wie schon zuvor bei den im Blutbild bestimmten Granulozyten zeigte sich, dass Dexamethason die Zahl der neutrophilen Granulozyten je nach Applikationszeitpunkt immer unterschiedlich stark, aber jeweils signifikant für 12 Stunden ( $F[1;39]=108,7$ ;  $p < 0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $6,4 \pm 1,7$  zu  $4,0 \pm 1,5$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l und 21-Uhr-Gruppe  $5,4 \pm 1,4$  zu  $3,0 \pm 0,8$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l), bzw. 24 Stunden ( $F[1;39]=100,8$ ;  $p < 0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $4,2 \pm 1,1$  zu  $3,1 \pm 0,7$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l und 21-Uhr-Gruppe  $5,3 \pm 1,5$  zu  $3,4 \pm 0,9$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l), erhöhte. Der stärkste Anstieg war dabei jeweils nach 12 Stunden zu verzeichnen, während zum Messzeitpunkt 24 Stunden nach Applikation von Dexamethason die Zahl der neutrophilen Granulozyten bereits wieder abnahm. Dennoch waren die Werte 24 Stunden nach Gabe immer noch signifikant gegenüber dem entsprechenden tageszeitlichen Wert vor der Einnahme des Glukokortikoids erhöht. Ob 1,5 mg oder 3 mg Dexamethason verabreicht wurde, hatte hier ebenfalls keinerlei Auswirkungen auf den Anstieg der Zellzahlen (siehe Abbildung 15-1).

**Tab.4: Analyse der Veränderung der Oberflächenmarker CD16b und CD18**

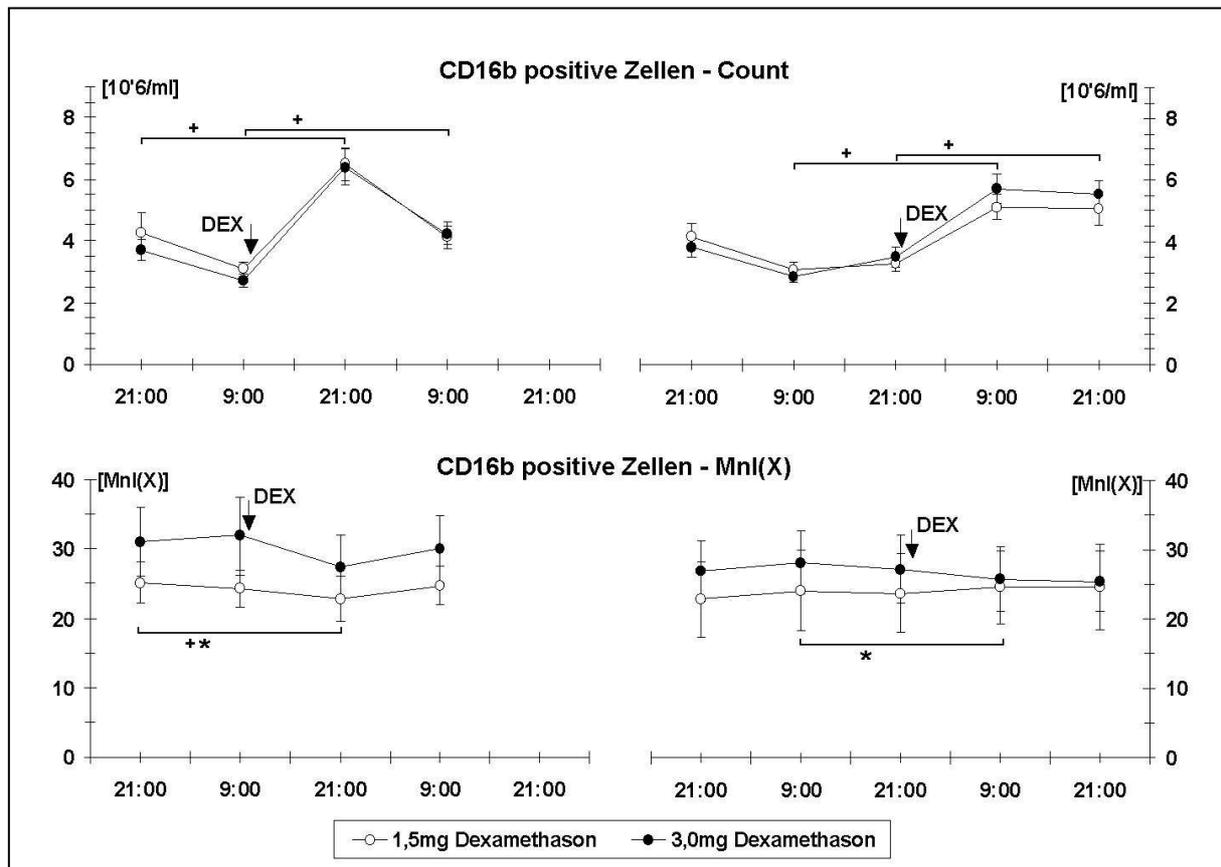
	CD16b pos. (Count)	CD16b pos. (Mnl X)	CD18 pos. in CD16b pos. (Count)	CD18 pos. in CD16b pos. (Mnl X)
Bedingung F[1;36]	140,390 p<0,001	5,944 p=0,020	142,019 p<0,001	0,074 n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt F[1;36]	0,831 n.s.	1,325 n.s.	0,872 n.s.	8,699 p=0,006
Bedingung*Dosis F[1;36]	2,155 n.s.	4,509 p=0,041	2,115 n.s.	0,162 n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,010 n.s.	0,219 n.s.	0,011 n.s.	0,022 n.s.
Zeit F[1;36]	40,073 p<0,001	1,616 n.s.	40,705 p<0,001	3,779 n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt F[1;36]	56,205 p<0,001	5,802 p=0,021	57,338 p<0,001	1,613 n.s.
Zeit*Dosis F[1;36]	0,493 n.s.	0,242 n.s.	0,495 n.s.	3,019 n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis F[1;36]	0,028 n.s.	1,621 n.s.	0,031 n.s.	0,088 n.s.
Bedingung*Zeit F[1;36]	16,595 p<0,001	5,183 p=0,029	16,359 p<0,001	14,771 p<0,001
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt F[1;36]	2,163 n.s.	1,952 n.s.	2,137 n.s.	2,588 n.s.
Bedingung*Zeit*Dosis F[1;36]	0,302 n.s.	0,115 n.s.	0,313 n.s.	,406 n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,428 n.s.	0,240 n.s.	0,436 n.s.	,357 n.s.

In der Tabelle sind die Effekte der Gabe von Dexamethason in unterschiedlichen Dosierungen 1,5 mg und 3 mg und zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten 9:00 Uhr und 21:00 Uhr auf die Parameter CD16b und CD18 bei 40 Probanden dargestellt. Die Analyse wurde mittels einer ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt, bei welcher Bedingung und Zeit als Innersubjektfaktoren und Dosis und Applikationszeitpunkt als Zwischensubjektfaktoren gewertet wurden. Als Referenz für die erhobenen Werte nach Applikation galt jeweils der zuletzt vor Applikation gemessene Wert des betreffenden Parameters.

Die CD16b positiven Zellen (Count) entsprechen der Anzahl neutrophiler Granulozyten, während als Mnl X die Leuchtdichte der reagierenden Antikörper pro Zelle verstanden wird und somit die Expression des Antigens pro Zelle angibt. Daneben ist Subpopulation der CD18 positiven Zellen in der Fraktion der neutrophilen Granulozyten zunächst als Absolutzahl und ebenfalls mit Expression von CD18 pro Zelle abgebildet.

### Leuchtdichte (Mnl X) CD16b

In der Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD16b pro neutrophilem Granulozyten zeigten sich nach Gabe des Dexamethasons ein signifikanter Effekt für Bedingung, sowie signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, für Bedingung und Dosis und für Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 4).



**Abb.15: Veränderung der Oberflächenmarker CD16b**

Veränderungen der Absolutzahl der neutrophilen Granulozyten und Leuchtdichte von CD16b/Zelle während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Applikationszeitpunkte 9:00 und 21:00 Uhr über die Mittelwerte beider Dosierungen markiert. Das \* Symbol markiert signifikante post-hoc Tests ausschließlich für die Dexamethason Dosis 3 mg, während für 1,5 mg Dexamethason in der Analyse der Subgruppen nach Dosis keinen Effekt zeigte.

Hier zeigten die post-hoc Tests bezüglich des Applikationszeitpunktes, dass nur bei der Gruppe, die Dexamethason am Morgen erhalten hatte, die Zahl der CD16b Antigene pro Zelle 12 Stunden nach Gabe signifikant erniedrigt war ( $F[1;19]=14,3$ ;  $p<0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $25,0 \pm 12,3$  zu  $28,1 \pm 13,0$  und 21-Uhr-Gruppe  $25,1 \pm 15,3$  zu  $26,1 \pm 16,3$ ).

Bei der post-hoc Testung in der Berechnung nach der applizierten Dosis dagegen zeigte sich, dass nur 3 mg Dexamethason eine signifikante Suppression der CD16b Expression 12 Stunden nach Einnahme zur Folge hatten ( $F[1;19]=29,3$ ;  $p<0,001$ ) (1,5 mg-Gruppe:  $23,6 \pm 13,7$  zu  $24,6 \pm 14,3$  und 3,0mg-Gruppe  $26,6 \pm 14,0$  zu  $29,6 \pm 14,9$ ). 24 Stunden nach Einnahme des Glukokortikoids war dagegen kein Effekt mehr nachweisbar (siehe Abbildung 15-2).

### **Zellzahl CD18 positiver Zellen in den CD16b positiven Zellen**

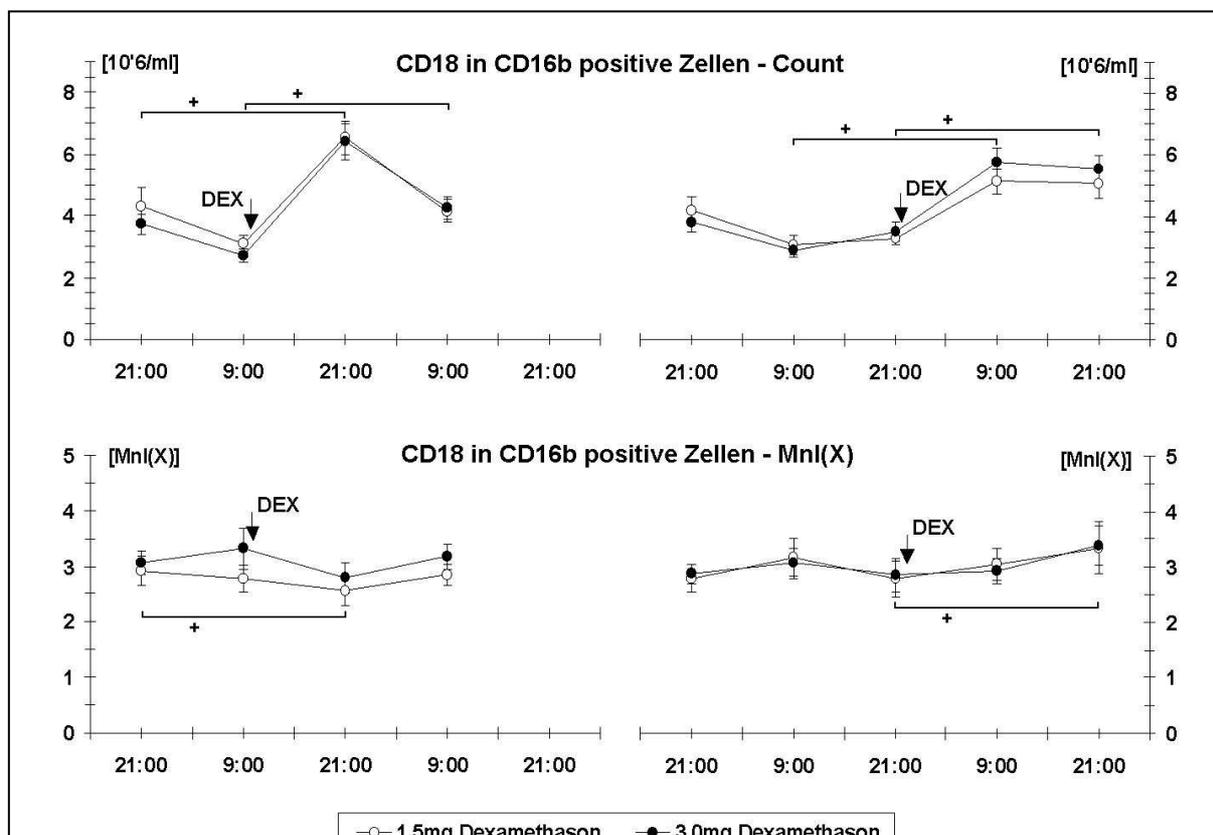
Die Statistik zeigte bezüglich der Menge der CD16b positiven Zellen, also der neutrophilen Granulozyten, und der Zellen, die sowohl CD16b als auch CD18 Oberflächenmarker exprimierten, keine signifikanten Unterschiede. Dieser gleichartige Verlauf vor und nach der Glukokortikoidgabe kam daher zustande, dass annähernd 100 Prozent aller neutrophilen Granulozyten CD18 exprimierten und somit für beide Parameter annähernd die selben Werte für die Berechnung zugrunde lagen (siehe Abbildung 16-1).

### **Leuchtdichte (Mnl X) CD18 in CD16b positiven Zellen**

Obwohl gleichsam alle CD16b positiven Zellen CD18 ebenfalls exprimierten, ergaben sich in der Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD18 pro neutrophilem Granulozyten nach Gabe des Dexamethasons signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, sowie für Bedingung und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 4).

Bei eingehender Betrachtung unter Berücksichtigung des Applikationszeitpunktes zeigte sich, dass es 12 Stunden nach Glukokortikoidgabe ausschließlich bei Probanden, die Dexamethason am Morgen eingenommen hatten, zu einer Reduktion der CD18 Expression kam ( $F[1;19]=6,83$ ;  $p=0,017$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $2,68 \pm 0,85$  zu  $2,99,1 \pm 0,75$  und 21-Uhr-Gruppe  $2,99 \pm 0,18$  zu  $3,11 \pm 0,22$ ). Nach 24 Stunden dagegen fand sich bei den Probanden, die Dexamethason am Abend eingenommen

hatten, eine signifikant höhere Dichte an CD18-Oberflächenantigen auf den neutrophilen Granulozyten als zum tageszeitlich entsprechenden Zeitpunkt vor der Einnahme ( $F[1;19]=17,43$ ;  $p=0,001$ ), während sich bei der Gruppe, die Dexamethason morgens bekommen hatte kein Effekt mehr nachweisen lies (9-Uhr-Gruppe:  $3,01 \pm 0,66$  zu  $3,044 \pm 0,23$  und 21-Uhr-Gruppe  $3,37 \pm 0,29$  zu  $2,82 \pm 0,22$ ). Beide Effekte waren dabei unabhängig von der applizierten Menge Dexamethason (siehe Abbildung 16-2).



**Abb.16: Veränderung des Oberflächenmarkers CD18 in CD16b positiven Zellen**

Veränderungen der Absolutzahl der CD18 positiver Zellen und der Leuchtdichte von CD18 der neutrophilen Granulozyten während des Experimentes. Die Werte der Probanden, die Dexamethason am Morgen erhielten, sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc für die Applikationszeitpunkte 9:00 Uhr und 21:00 Uhr markiert. Die post hoc Tests bezogen sich jeweils auf die Mittelwerte der 1,5 mg und 3 mg Gruppen, da sich bezüglich der Dosis keine signifikanten Unterschiede ergeben hatten.

### Zellzahl CD18 positiver Zellen in den CD16b negativen Zellen

Die Bestimmung der Zahl der CD18 positiven in der Population der CD16b negativen Zellen im Verlauf des Experimentes mittels ANOVA ergab signifikante Bedingungs- und Zeiteffekte von Dexamethason auf die Zahl der Zellen. Zudem zeigten sich ebenfalls signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, für Zeit und Applikationszeitpunkt und für Bedingung, Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 5).

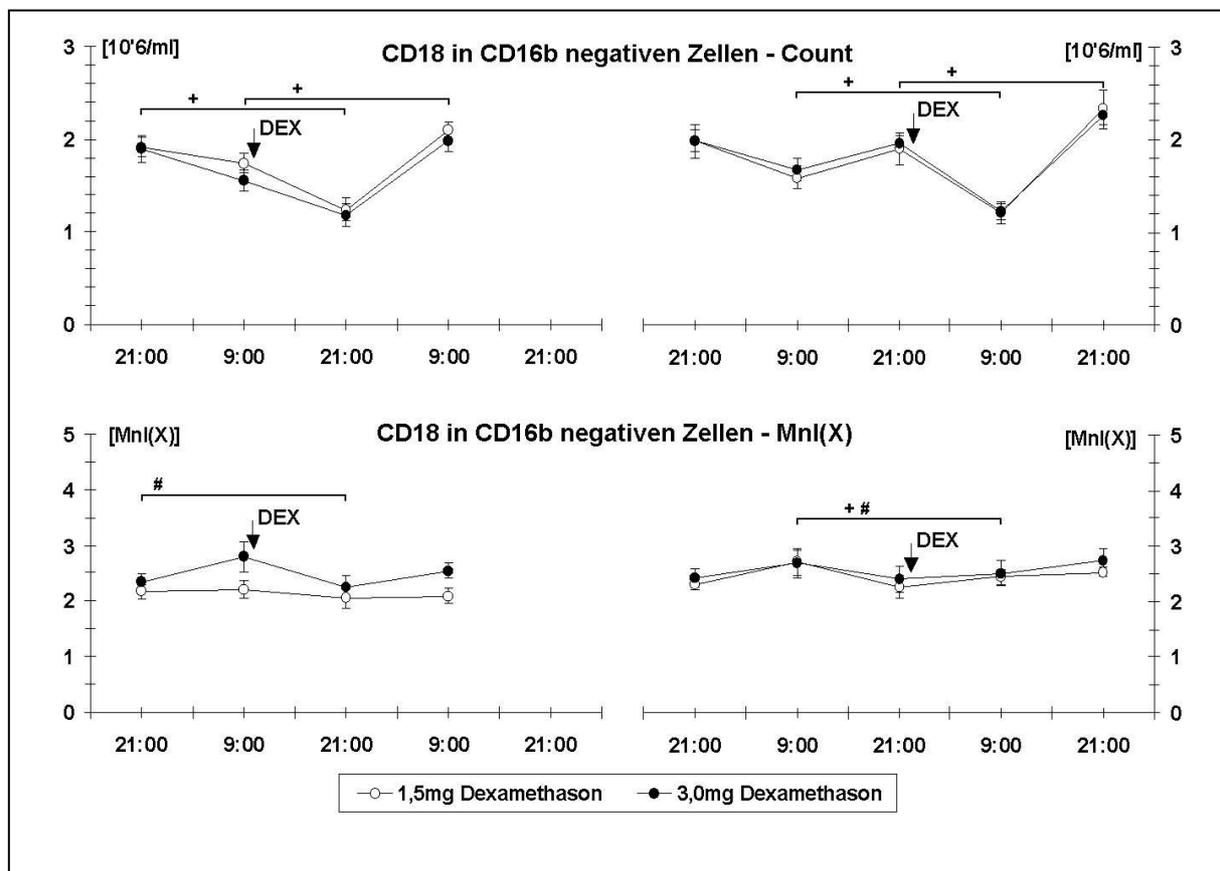
**Tab.5: Analyse der Veränderung des Oberflächenmarkers CD18 in CD16b neg. Zellen**

	CD18 pos. in CD16b neg. (Count)	CD18 pos. in CD16b neg. (Mnl X)
Bedingung	4,613	0,998
F[1;36]	p=0,039	n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt	2,248	2,702
F[1;36]	n.s.	n.s.
Bedingung*Dosis	0,283	0,018
F[1;36]	n.s.	n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,638	0,271
F[1;36]	n.s.	n.s.
Zeit	131,785	1,453
F[1;36]	p<0,001	n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt	22,714	13,966
F[1;36]	p<0,001	p=0,001
Zeit*Dosis	0,923	8,208
F[1;36]	n.s.	p=0,007
Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,89	1,256
F[1;36]	n.s.	n.s.
Bedingung*Zeit	165,954	5,160
F[1;36]	p<0,001	p=0,029
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt	4,490	9,930
F[1;36]	p=0,041	p=0,003
Bedingung*Zeit*Dosis	0,045	0,203
F[1;36]	n.s.	n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,382	0,212
F[1;36]	n.s.	n.s.

In der Tabelle sind die Effekte der Gabe von Dexamethason in unterschiedlichen Dosierungen 1,5 mg und 3 mg und zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten 9:00 Uhr und 21:00 Uhr auf den Parameter CD18 in CD16b negativen Zellen bei 40 Probanden dargestellt. Die Analyse wurde mittels einer ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt, bei welcher Bedingung und Zeit als Innersubjektfaktoren und Dosis und Applikationszeitpunkt als Zwischensubjektfaktoren gewertet wurden. Als Referenz für die erhobenen Werte nach Applikation galt jeweils der zuletzt vor Applikation gemessene Wert des betreffenden Parameters.

Die CD16b negativen Zellen enthalten alle Leukozyten außer neutrophilen Granulozyten. Count gibt dabei die Zellzahl an, während als Mnl X die Leuchtdichte der reagierenden Antikörper pro Zelle verstanden wird und somit die Expression des Antigens pro Zelle angibt.

Bei genauerer Betrachtung zeigten die post-hoc Tests, dass Dexamethason je nach Applikationszeitpunkt die Zahl der CD18 positiven Zellen außerhalb der Fraktion der neutrophilen Granulozyten immer unterschiedlich stark, aber jeweils signifikant für 12 Stunden ( $F[1;39]=103,3$ ;  $p<0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $1,2 \pm 0,4$  zu  $1,9 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l und 21-Uhr-Gruppe  $1,2 \pm 0,3$  zu  $1,6 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) erniedrigte. Nach 24 Stunden jedoch kam es in dieser Population zu einem Anstieg der Zellen ( $F[1;39]=44,33$ ;  $p<0,001$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $2,0 \pm 0,3$  zu  $1,6 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l und 21-Uhr-Gruppe  $2,3 \pm 0,5$  zu  $1,9 \pm 0,4$  \*1000 Zellen/ $\mu$ l) (Abbildung 17-1).



**Abb.17: Veränderung des Oberflächenmarkers CD18 in CD16b neg. Zellen**

Veränderungen der Absolutzahl der CD18 positiver Zellen und der Leuchtdichte von CD18 in CD16b negativen Zellen während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert.

Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Applikationszeitpunkte 9:00 und 21:00 Uhr über die Mittelwerte beider Dosierungen markiert. Das # Symbol markiert signifikante post-hoc Tests ausschließlich für die Dexamethason Dosis 1,5 mg, während für 3 mg Dexamethason in der Analyse der Subgruppen nach Dosis keinen Effekt zeigte.

### **Leuchtdichte (Mnl X) CD18 in CD16b negativen Zellen**

In der Analyse der Expression des Oberflächenmarkers CD18 pro Zelle außerhalb der neutrophilen Granulozyten zeigte sich nach Gabe des Dexamethasons ein signifikanter Zeiteffekt. Zudem zeigten sich ebenfalls signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, für Zeit und Dosis, für Zeit und Applikationszeitpunkt und für Bedingung, Zeit und Applikationszeitpunkt (siehe Tabelle 5).

Die post-hoc Tests zeigten hier, dass Dexamethason die Expression von CD18 Zellen außerhalb der Fraktion der neutrophilen Granulozyten nur dann 12 Stunden später supprimierte, wenn Dexamethason abends gegeben wurde ( $F[1;19]= 5,6$ ;  $p=0,028$ ) (9-Uhr-Gruppe:  $2,2 \pm 0,6$  zu  $2,3 \pm 0,4$  und 21-Uhr-Gruppe  $2,5 \pm 0,5$  zu  $2,7 \pm 0,7$ ). Nach 24 Stunden dagegen war kein Effekt mehr nachweisbar.

Bei post-hoc Tests in der Berechnung nach der applizierten Dosis dagegen zeigte sich, dass 1,5 mg Dexamethason ( $F[1;19]=29,3$ ;  $p<0,001$ ) sogar eine stärkere Suppression der CD18 Expression 12 Stunden nach Einnahme als 3 mg Dexamethason ( $F[1;19]=29,3$ ;  $p<0,001$ ) zur Folge hatte (1,5 mg-Gruppe:  $2,2 \pm 0,5$  zu  $2,4 \pm 0,6$  und 3,0mg-Gruppe  $2,4 \pm 0,7$  zu  $2,5 \pm 0,7$ ). 24 Stunden nach Einnahme des Glukokortikoids war dagegen kein Effekt mehr nachweisbar (Abbildung 17-2).

### 3.7 Effekte der Dexamethasongabe auf die Zytokinspiegel

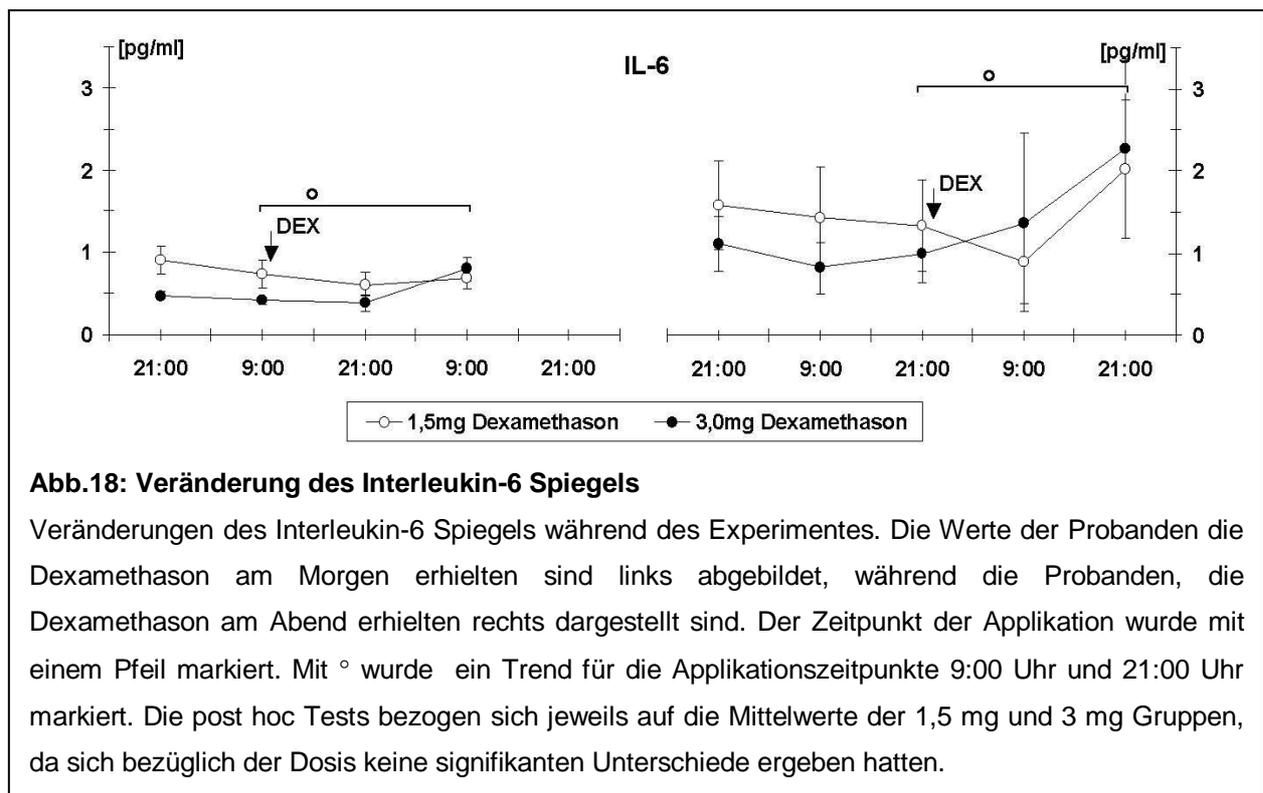
Die Analyse der Effekte von Dexamethason auf die Zytokine und die Spiegel der löslichen Zytokinrezeptoren ergab differentielle Effekte auf die einzelnen Parameter:

	IL-6	TNF	sTNF-R p55	STNF-R p75
Bedingung	1,218	47,113	0,040	90,848
F[1;36]	n.s.	p<0,001	n.s.	p<0,001
Bedingung*Applikationszeitpunkt	1,313	0,017	0,962	1,253
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bedingung*Dosis	1,726	0,000	0,132	0,016
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bedingung*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,357	1,992	0,056	1,202
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit	7,543	17,723	8,929	4,767
F[1;36]	p=0,009	p<0,001	p=0,005	p=0,036
Zeit*Applikationszeitpunkt	4,514	0,978	0,762	28,777
F[1;36]	p=0,041	n.s.	n.s.	p<0,001
Zeit*Dosis	0,329	0,814	1,542	0,378
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit*Applikationszeitpunkt*Dosis	0,191	0,981	1,058	1,685
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bedingung*Zeit	8,959	15,610	14,533	7,532
F[1;36]	p=0,005	p<0,001	p=0,001	p=0,009
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt	1,851	2,188	3,387	6,750
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	p=0,014
Bedingung*Zeit*Dosis	0,095	0,046	0,006	0,103
F[1;36]	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Bedingung*Zeit*Applikationszeitpunkt *Dosis F[1;36]	0,650	0,852	0,187	1,064
	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In der Tabelle sind die Effekte der Gabe von Dexamethason in unterschiedlichen Dosierungen 1,5 mg und 3 mg und zu unterschiedlichen Applikationszeitpunkten 9:00 Uhr und 21:00 Uhr auf die Parameter Interleukin-6, TNF- $\alpha$  und die löslichen TNF Rezeptoren p55 und p75 bei 40 Probanden dargestellt. Die Analyse wurde mittels einer ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt, bei welcher Bedingung und Zeit als Innersubjektfaktoren und Dosis und Applikationszeitpunkt als Zwischensubjektfaktoren gewertet wurden. Als Referenz für die erhobenen Werte nach Applikation galt jeweils der zuletzt vor Applikation gemessene Wert des betreffenden Parameters.

## Interleukin-6

Die Bestimmung der IL-6 Spiegel über den Verlauf nach Gabe von Dexamethason ergab einen signifikanten Zeiteffekt, wie auch signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, sowie für Zeit und Applikationszeitpunkt von Dexamethason auf die Menge des sich im peripheren Blut befindlichen IL-6 (siehe Tabelle 6).

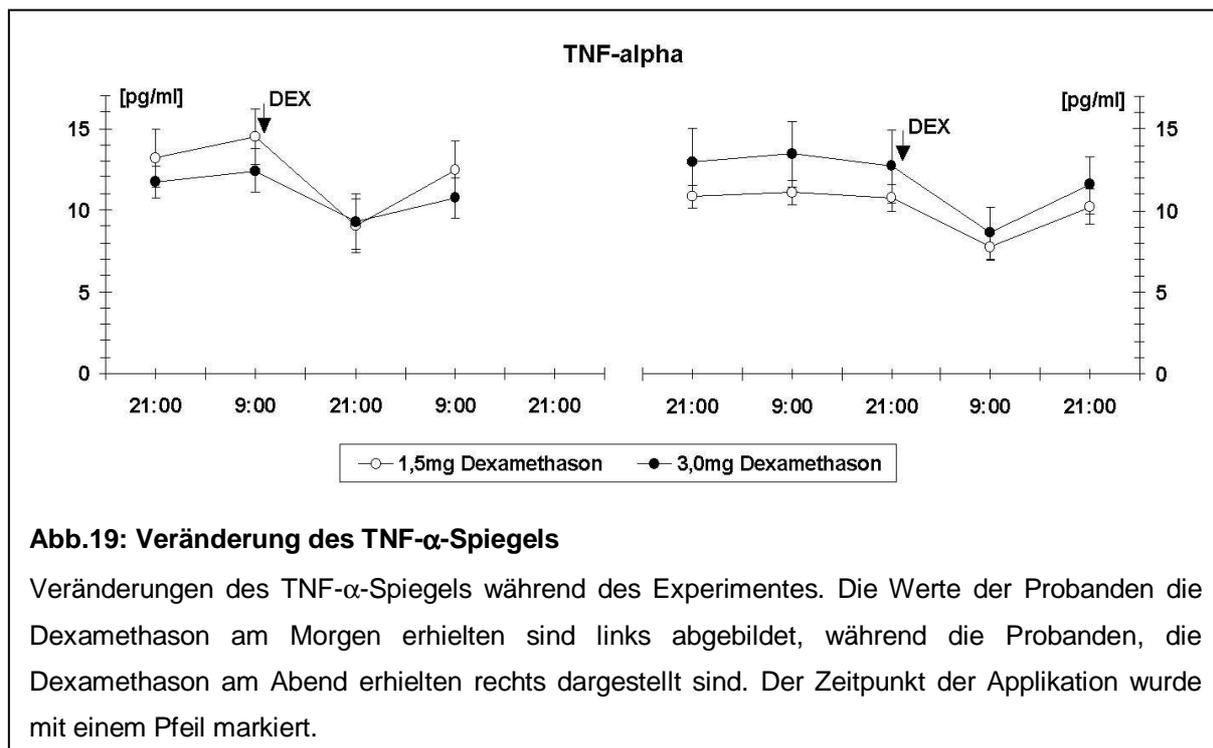


Obwohl sich ein Zeit-Applikationszeitpunkteffekt darstellte, zeigten die post-hoc Tests bezüglich des Applikationszeitpunktes keine signifikanten Unterschiede 12 Stunden nach Gabe des Glukokortikoids ( $F[1;39]=0,2$ ;  $p=0,662$ ). Nach 24 Stunden konnte zwar ein Effekt für die Gesamtzahl der Probanden gefunden werden ( $F[1;39]=4,3$ ;  $p=0,044$ ), nach Unterscheidung in 9-Uhr-Gruppe ( $F[1;19]=3,1$ ;  $p=0,09$ ) und 21-Uhr-Gruppe ( $F[1;19]=3,4$ ;  $p=0,084$ ) zeichnete sich jedoch nur noch ein Trend ab. In der Gesamtzahl der Probanden veränderte Dexamethason die IL-6 Spiegel 12 Stunden nach Einnahme nicht ( $0,91 \pm 1,14$  zu  $0,81 \pm 1,87$  pg/ml), während es nach 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg ( $1,44 \pm 2,23$  zu  $0,87 \pm 1,10$  pg/ml) führte (siehe Abbildung 18).

### TNF- $\alpha$

Bei der Betrachtung der Veränderung der TNF- $\alpha$ -Spiegel mittels ANOVA zeigten sich signifikante Effekte für Bedingung und Zeit, sowie ein signifikanter, Interaktionseffekt für Bedingung und Zeit (siehe Tabelle 6).

Da sich weder ein Hinweis auf einen Unterschied bezüglich des Applikationszeitpunktes, noch der verabreichten Dosis ergab, wurden alle 40 Probanden im post-hoc Vergleich gemeinsam analysiert. In der Gesamtpopulation senkte Dexamethason die TNF- $\alpha$ -Spiegel zunächst nach 12 Stunden ( $8.68 \pm 4.51$  zu  $12.37 \pm 4.55$  pg/ml). Auch nach 24 Stunden waren die Spiegel weiterhin signifikant supprimiert, jedoch schon wieder im Anstieg begriffen ( $11.25 \pm 4.61$  zu  $12.59 \pm 5.14$  pg/ml) (siehe Abbildung 19).



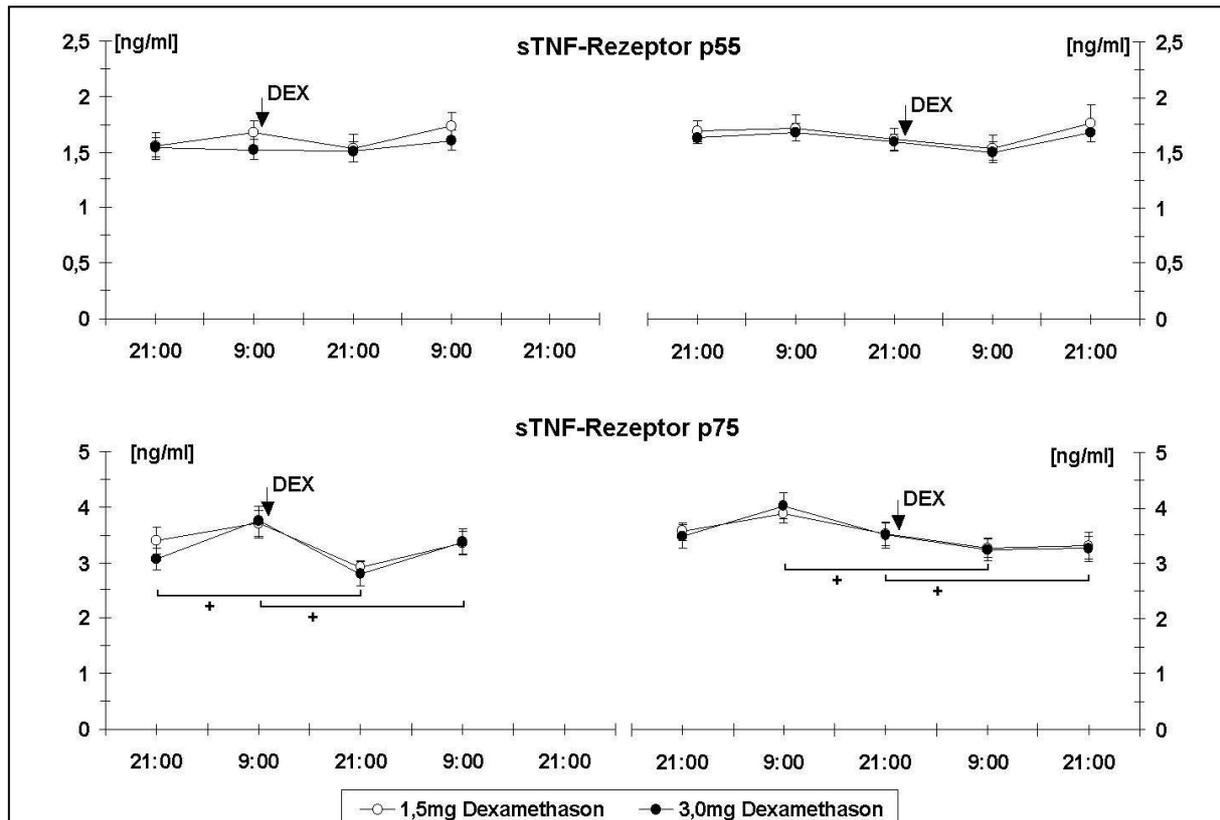
**Abb.19: Veränderung des TNF- $\alpha$ -Spiegels**

Veränderungen des TNF- $\alpha$ -Spiegels während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert.

### TNF-Rezeptor p55

Auch in der ANOVA-Analyse des Verlaufs der Spiegel des löslichen TNF-Rezeptors p55 zeigte sich keine Einflussnahme von Applikationszeitpunkt oder Dosis, sondern lediglich ein signifikanter Zeiteffekt, sowie ein signifikanter Kombinationseffekt von Bedingung und Zeit (siehe Tabelle 6).

Deshalb wurden auch hier alle 40 Probanden im post-hoc Vergleich gemeinsam analysiert. Hier waren 12 Stunden nach Glukokortikoideinnahme die Spiegel leicht niedriger ( $1.52 \pm 0.32$  zu  $1.63 \pm 0.31$  ng/ml) als zum tageszeitlich entsprechenden Zeitpunkt vor Einnahme, während es 24 Stunden nach Applikation zu einem leichten Anstieg kam ( $1.70 \pm 0.37$  zu  $1.60 \pm 0.30$ ng/ml) (siehe Abbildung 20-1).



**Abb.20: Veränderung der Spiegel löslicher TNF-Rezeptoren**

Veränderungen der Spiegel löslicher TNF-Rezeptoren während des Experimentes. Die Werte der Probanden die Dexamethason am Morgen erhielten sind links abgebildet, während die Probanden, die Dexamethason am Abend erhielten rechts dargestellt sind. Der Zeitpunkt der Applikation wurde mit einem Pfeil markiert. Mit + wurden signifikante post-hoc Tests für die Applikationszeitpunkte 9:00 Uhr und 21:00 Uhr markiert. Die post hoc Tests bezogen sich jeweils auf die Mittelwerte der 1,5 mg und 3 mg Gruppen, da sich bezüglich der Dosis keine signifikanten Unterschiede ergeben hatten.

### **TNF-Rezeptor p75**

Die Veränderungen der Spiegel des löslichen TNF-Rezeptors p75 dagegen zeigten in der ANOVA-Analyse signifikante Effekte für Bedingung und Zeit, sowie signifikante Interaktionseffekte für Bedingung und Zeit, für Zeit und Applikationszeitpunkt und für Bedingung, Zeit und Applikationszeitpunkt. Die applizierte Dosis dagegen übte keinerlei Einfluss aus (siehe Tabelle 6).

Bezüglich des Applikationszeitpunktes zeigten die post-hoc Tests, dass Dexamethason nach 12 Stunden die Rezeptorspiegel signifikant senkte ( $F[1;39]=61,1$ ;  $p<0,001$ ). Dieser Effekt war auch nach 24 Stunden noch deutlich nachweisbar ( $F[1;39]=24,6$ ;  $p<0,001$ ). Ein Unterschied zwischen den Applikationszeitpunkten ergab sich dahingehend, dass nach 12 Stunden die Menge der zirkulierenden Rezeptoren in der Gruppe, die Dexamethason am Abend bekommen hatte, deutlich stärker abnahm ( $8,2 \pm 3,9$  zu  $12,3 \pm 4,8$  ng/ml) als in der Gruppe die Dexamethason am Morgen erhalten hatte ( $9,2 \pm 5,1$  zu  $12,4 \pm 4,5$  ng/ml), während es umgekehrt nach 24 Stunden auch zu einem deutlicheren Wiederanstieg der Spiegel in der 9-Uhr-Gruppe kam (siehe Abbildung 20-2).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der durchgeführten Studie wurde zunächst ein breites Spektrum immunologischer Parameter morgens um 9:00 Uhr und abends um 21:00 Uhr bestimmt und anschließend die zirkadiane Variabilität analysiert. Dabei zeigte sich, dass die meisten der gemessenen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten aufwiesen: Während tympanische Temperatur, Leukozytenzahl, Granulozytenzahl, Lymphozytenzahl, die Zahl der aktivierten neutrophilen Granulozyten (CD18 positive Zellen in der CD16b positiven Population) und sowohl Anzahl als auch Ausmaß der Aktivierung in immunkompetenten Zellen außerhalb der neutrophilen Granulozyten abends signifikant höher waren als morgens, verhielten sich die Plasmaspiegel von Kortisol, TNF- $\alpha$  und sTNF-R p75 genau umgekehrt und lagen morgens höher als abends (siehe Tabelle 7). Diese Befunde deckten sich bezüglich Körpertemperatur, Kortisol (Czeisler und Klerman, 1999; Aschoff, 1979), Leukozyten und den Subpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Haus et al., 1983) und mit entsprechenden Daten aus der Literatur, während solche tageszeitlichen Unterschiede für die Anzahl und Leuchtdichte CD16b bzw. CD18 tragender Zellen, sowie für IL-6, TNF- $\alpha$  und die löslichen TNF-Rezeptoren so noch nicht vorbeschrieben sind. Allerdings ist bereits *ex vivo* gezeigt worden, dass Zytokine wie IL-1, IL-10 und TNF- $\alpha$  zirkadian unterschiedlich stark sezerniert werden (Petrovsky und Harrison, 1998).

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit bezog sich auf die Effekte von niedrigdosiertem, oral appliziertem Dexamethason auf die untersuchten Parameter, die in einer doppelblinden, Plazebo-kontrollierten Studie erhoben wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 noch einmal zusammengefasst.

**Tab.7: Zusammenfassung der Veränderungen beobachteter Parameter**

	Zirkadiane Schwankung	Effekt von DEX-Gabe	Effekt von Dosis und Applikationszeitpunkt
tympanische Temperatur	ja	ja,	allerdings nur bei 3,0 mg DEX
Kortisol	ja	ja,	stärkere Suppression bei Gabe um 21:00, dosisunabhängig
IL-6	nein	nein	-
TNF- $\alpha$	ja	ja	unabhängig von Dosis und Applikationszeitpunkt
sTNF-R p55	nein	nein	-
sTNF-R p75	ja	ja	stärkere Suppression bei Gabe um 21:00, dosisunabhängig
Leukozyten	ja	ja	stärkere Erhöhung bei Gabe um 9:00, dosisunabhängig
Lymphozyten	ja	ja	Suppression nach 12h unabhängig von Dosis und Zeitpunkt, höherer Rebound bei 21:00 Applikation
Monozyten	nein	nein	-
Granulozyten	ja	ja	stärkere Erhöhung bei Gabe um 9:00, dosisunabhängig
CD16b pos. Zellen	ja	ja	stärkere Erhöhung bei Gabe um 9:00, dosisunabhängig
CD16bpos. Zellen (Mnl X)	nein	ja	Suppression nur bei Gabe um 9:00 bzw. bei 3,0 mg DEX
CD18 pos. in CD16b pos. Zellen	ja	ja	stärkere Erhöhung bei Gabe um 9:00, dosisunabhängig
CD18 pos. In CD16b pos. Zellen (Mnl X)	nein	ja	Dosisunabhängig, Reduktion nach 12h nur nach 9:00 Gabe, aber Erhöhung nach 24h bei 21:00 Gabe
CD18 pos. in CD16b neg. Zellen	ja	ja	Reduktion stärker bei 9:00 Gabe, dosisunabhängig
CD18 pos. In CD16b neg. Zellen (Mnl X)	ja	ja	Suppression nur bei Gabe um 21:00, stärkerer Effekt von 1,5 mg gegenüber 3,0 mg DEX

In der Tabelle sind sowohl die Ergebnisse der Messungen von basalen, zirkadianen Schwankungen zwischen 9:00 Uhr und 21:00 Uhr der untersuchten Parameter, als auch deren Veränderung auf die Applikation von Dexamethason zusammengefasst dargestellt. Bei signifikanten Veränderungen durch DEX-Gabe wurden zudem post-hoc Tests für Dosis und Applikationszeitpunkt berücksichtigt.

Wie erwartet unterdrückte Dexamethason in beiden Dosierungen und unabhängig vom Applikationszeitpunkt die endogene Kortisolsekretion. Zusätzlich erhöhte am Abend gegebenes Dexamethason signifikant die tympanische Temperatur am nächsten Morgen.

Das Differentialblutbild dagegen wurde in komplexerer Weise durch die Glukokortikoidapplikation verändert: Die Zahl der Leukozyten stieg sowohl über 12 Stunden als auch über 24 Stunden an, wobei der Anstieg nach 12 Stunden hauptsächlich auf den starken Anstieg der Granulozyten zurückzuführen war, während Lymphozyten und Monozyten 12 Stunden nach der Verumgabe sogar erniedrigt waren und erst nach 24 Stunden signifikant anstiegen.

Über die Analyse des Differentialblutbildes hinaus wurden durchflusszytometrisch die Expression des spezifischen Markers für neutrophile Granulozyten, CD16b, erfasst. Die Untersuchung der Veränderungen in den CD16b positiven Zellen bestätigte die oben dargestellten Ergebnisse bezüglich der Veränderungen in den Granulozytenzahlen.

Ebenfalls wurde die Anzahl positiver Zellen bezüglich des Aktivitätsmarkers CD18, sowie dessen Leuchtdichte auf diesen Zellen bestimmt. Die Analyse der Expression des Aktivitätsmarkers CD18 in der Population der CD16b positiven Zellen zeigte ein signifikantes Absinken der Expressionsstärke von CD 18 pro Zelle 12 Stunden nach Gabe von Dexamethason am Morgen. Nach 24 Stunden dagegen fand sich ein signifikanter Anstieg bei den Probanden, die Dexamethason am Abend erhalten hatten. Da CD18 auch auf CD16b negativen Zellen exprimiert wurde, wurden die nicht granulozytären Zellen auf ihre CD18 Expression hin ebenfalls untersucht. Dabei war die Zahl der nicht granulozytären Zellen, die CD18 positiv waren, 12 Stunden nach Applikation von Dexamethason in Bezug auf Plazebo-kontrollierte Werte erniedrigt und erfuhr einen Anstieg nach 24 Stunden. Auch die Expression von CD18 pro einzelner Zelle in dieser Population erfuhr eine Down-Regulation 12 Stunden nach Einnahme von Dexamethason, wenn das Präparat abends verabreicht wurde.

Die Plasmaspiegel der wichtigsten Modulatoren des unspezifischen Immunsystems, der inflammatorischen Zytokine, wurden ebenfalls durch Dexamethason beeinflusst. So wurden die Spiegel von TNF- $\alpha$  und sTNF-R p75 nach Applikation für 24 Stunden signifikant gesenkt, der lösliche TNF-Rezeptor p75 wurde dabei 12 Stunden nach Einnahme stärker beeinflusst, wenn die Applikation am Abend erfolgte. Die Spiegel des anderen löslichen TNF-Rezeptors p55 dagegen waren zwar 12 Stunden nach Einnahme abgesenkt, stiegen nach 24 Stunden jedoch wieder sogar signifikant über das Ausgangsniveau an. Bei den IL-6 Spiegeln konnte nach 12 Stunden dagegen kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden, doch kam es auch hier 24 Stunden nach Einnahme von Dexamethason zu einem signifikanten Anstieg.

#### ***4.2 Tageszeitabhängige Unterschiede der Plasmaspiegel der gemessenen Parameter***

Die Tatsache, dass sich bereits vor Applikation von Dexamethason signifikant geringere Zahlen zirkulierender Leukozyten am Morgen fanden, wurde bereits früher beschrieben und deckt sich mit der bestehenden Literatur (Haus und Smolensky, 1999). Außerdem wurden mehr zirkulierende Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten während der Abendstunden und der ersten Nachthälfte beobachtet, während die Zahl dieser Zellen generell am frühen Morgen am geringsten ist (Haus et al., 1983). Bezüglich der physiologischen Regulation dieser Schwankungen wurden unterschiedliche Hypothesen publiziert. Insbesondere der Einfluss zirkadian schwankender Kortisolspiegel wurde bereits als Erklärung postuliert (Dhabhar et al., 1994). Somit lassen sich die geringeren Zahlen zirkulierender Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten am Morgen unter physiologischen Bedingungen mit einer Suppression durch erhöhte Aktivierung der HHN-Achse erklären.

Eine zirkadiane Rhythmik in der Zytokinausschüttung für TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-10 und andere Zytokine dagegen wurde bisher nur in *ex vivo* Versuchen nach Stimulation nachgewiesen (Petrovsky und Harrison, 1998). Auch vor dem Hintergrund unterschiedlich ausgeprägter Immunantwort zu verschiedenen Tageszeitpunkten (Pollmächer et al., 1996) verwundert es daher nicht, dass auch in dieser Studie die

Spiegel von TNF- $\alpha$  und dem löslichen TNF-Rezeptor p75 einen signifikanten Unterschied zwischen 9:00 Uhr und 21:00 unter Placebobedingungen aufwies. Es finden sich diesbezüglich allerdings nur wenige Untersuchungen in der Literatur. Dies liegt daran, dass zunächst in Studien an gesunden Probanden die Zytokinspiegel nicht zuverlässig messbar waren (Gudewill et al., 1992), während nachfolgende Studien sich hauptsächlich mit nächtlichen Messreihen begnügten und hier erhöhte Spiegel inflammatorischer Zytokine nachweisen konnten, insbesondere wenn die Probanden schliefen (Vgontzas et al., 1999). Genauere Informationen ob und wie zirkadiane Veränderungen von Zytokinspiegeln und Hormonen der HHN-Achse in Zusammenhang stehen, gibt es bisher nicht. Allerdings konnte an *in vitro* stimulierten Zellen gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Sekretion inflammatorischer Zytokine supprimieren (Fantuzzi und Ghezzi, 1993). Die zirkadiane Rhythmik der Zytokine ließe sich gegenüber der der immunkompetenten Zellen somit nicht auf sensibles Reagieren der Zytokine auf Veränderungen der HHN-Achse (DeRijk et al., 1997; Mulla und Buckingham, 1999; Petrovsky und Harrison, 1998) zurückführen, da ausgeschüttete Glukokortikoide die Sekretion von TNF- $\alpha$  (DeRijk et al., 1997) und sTNF-R p75 (Joyce et al., 1997) hemmen und somit zu geringeren Spiegeln am Morgen führen müssten, was jedoch gerade nicht der Fall ist. Andererseits konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass *in vivo* und *in vitro* Studien bzw. stimulierte und nicht-stimulierte Zellen nicht immer miteinander vergleichbar sind und bisweilen sogar gegenläufige Ergebnisse hervorbringen (Hinze-Selch und Pollmächer, 2001). Daher ist es durchaus vorstellbar, dass die TNF- $\alpha$ - und sTNF-R p75-Spiegel *in vitro* durch Glukokortikoide supprimiert, unter dem physiologischen Einfluss von Kortisol *in vivo* dagegen vermehrt ausgeschüttet werden.

Über tageszeitliche Schwankungen der Expression der Oberflächenantigene CD16b und CD18 dagegen ist in der Literatur nichts bekannt. Die beobachtete Erhöhung CD16b positiver Zellen am Abend lässt sich jedoch hinreichend damit erklären, dass dieser Oberflächenmarker ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, deren zirkadiane Rhythmik mit einer höheren im peripheren Blut zirkulierenden Anzahl ausreichend beschrieben ist (Haus et al., 1983; Haus und Smolensky, 1999). Die Erhöhung der CD18 positiven Zellen in der Population der CD16b positiven Zellen am Morgen ist ebenfalls auf die zirkadiane Rhythmik neutrophiler

Granulozyten zurückzuführen, da, von genetischen Variationen abgesehen, alle CD16b positiven Zellen den Aktivitätsmarker CD18 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Kusunoki et al., 1994; Price et al., 1987; Moser et al., 1995). Die Dichte von CD18 auf den neutrophilen Granulozyten (Mnl X) unterlag dagegen keinerlei tageszeitlicher Schwankungen, was wiederum darauf schließen lässt, dass eine veränderte Immunantwort auf zellulärer Ebene durch die alterierende Anzahl zirkulierender, neutrophiler Granulozyten getragen wird, sich die einzelnen Granulozyten aber in ihrer Aktivität und Bindungskapazität zirkadian unter physiologischen Bedingungen nicht verändern.

### ***4.3 Bedeutung und Ursache der Leukozytose nach Glukokortikoid-Stimulation***

Eine Zunahme der Leukozytenzahlen, insbesondere der Granulozyten, unter systemischer Glukokortikoidtherapie in hoher Dosierung wurde bereits vor Jahrzehnten beschrieben (Mishler und Emerson, 1977). In der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass bereits einmalig verabreichte geringe Mengen Dexamethason von 1,5 mg/Tag ausreichen, um das Differentialblutbild signifikant zu verändern. Die Zunahme der Granulozyten scheint dabei über Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) vermittelt zu sein, wie vor kurzem in einer Studie mit ähnlichem Design von Schuld et al. an depressiven Patienten gezeigt werden konnte (Schuld et al., 2001). Dort korrelierte der Anstieg von G-CSF direkt mit dem Anstieg der Granulozytenzahl nach Gabe von 1,5 mg Dexamethason. Auch vorher war bereits ein Zusammenhang zwischen G-CSF und einem granulopoetischen Effekt von Glukokortikoiden von verschiedenen Autoren postuliert worden (Jilma et al., 1998; Anderlini et al., 1996; Kawakami et al., 1990).

Die Veränderungen in der Zahl der Lymphozyten und Monozyten dagegen scheint weder auf die Wirkung von Kolonie-stimulierenden Faktoren zurückzuführen zu sein, noch kann sie mit einem direkten Effekt von Dexamethason auf die Mobilisierung dieser Zellen aus dem Knochenmark erklärt werden: Die Suppression der absoluten Lymphozytenzahlen nach 12 Stunden dagegen fügt sich nahtlos in die bestehende Literatur ein und so kann vermutet werden, dass es sich, wie von Tornatore et al. in

einer vergleichenden Studie an jungen und alten Probanden nach Gabe von Methylprednisolon beschrieben, um eine Reduktion der CD4+ Lymphozyten handeln dürfte, während sich Glukokortikoide weniger stark auf die Zahl von CD8+ Lymphozyten auswirkten (Tornatore et al., 1998). Beschrieben und näher untersucht wurde dieser transiente, lymphopenische Effekt von Glukokortikoiden bereits 1974 von Yu et al., die nach oraler Gabe von 60 mg Prednison insbesondere eine signifikant höhere Reduktion von T-Lymphozyten gegenüber B-Lymphozyten fanden, die jedoch 6 Stunden nach Applikation des Glukokortikoids ebenfalls reduziert waren (Yu et al., 1974). Später wurde an Kaninchen gezeigt, dass der schnellen Reduktion peripher zirkulierender Lymphozyten ein Effekt verminderter Ausschüttung von Lymphozyten aus den lymphatischen Organen zugrunde liegt (Bloemena et al., 1990). Neue Studien an Hühnern zeigen zudem eine reversible Involution von Thymusgewebe unter dem Einfluss von Glukokortikoiden und somit eine stark verringerte Bildung von T-Lymphozyten (Kong et al., 2002).

#### **4.4 Der Einfluss von Dexamethason auf die Expression von CD18 Oberflächenantigen**

Während der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Apoptoserate und die Produktion interzellulärer Botenstoffe von immunkompetenten Zellen über Induktion und Suppression von Transkriptionsfaktoren bereits weitgehend erforscht wurde (Riccardi et al., 2002), sind Auswirkungen auf die immunologische Aktivität immunkompetenter Zellen bisher wenig untersucht oder lieferten keine signifikanten Ergebnisse (Anderson et al., 1999).

Die CD18 Expression einer Zelle gilt als Maß für ihre Aktivität, da ein Komplex von CD11/CD18 direkt an Aggregations-, Adhäsions- und Phagozytoseprozessen beteiligt ist (Arnaout, 1990; Zimmerman et al., 1990) und somit eine größere Dichte an CD11/CD18 Antigen auf der Zelloberfläche für eine erhöhte Reaktivität einer immunkompetenten Zelle spricht (Mazzone und Ricevuti, 1995). Zudem scheint CD18 auch als Modulator weiterer Oberflächenrezeptoren von Leukozyten agieren zu können (Todd, III und Petty, 1997). Zu einer Erhöhung der CD18-Expressionsrate führt dabei, wie in *in vitro* (Kusunoki et al., 1994) und *in vivo* Versuchen an Mäusen

(Coxon et al., 2001) gezeigt wurde, die Stimulation des Fc- $\gamma$  Rezeptors und dessen Einfluss auf eine Tyrosinkinase, die wiederum zu erhöhter Expression von CD18 führt.

Während sich bei der Untersuchung der Expression von CD18 der neutrophilen Granulozyten (=CD16b positive Zellen) keine signifikanten Unterschiede zwischen morgendlicher und abendlicher Expression unter Plazebobedingungen zeigten, wurde die CD18 Expression in dieser Population doch zumindest bei den Probanden, die Dexamethason am Morgen erhielten, durch das Glukokortikoid signifikant supprimiert. Eine Dexamethason induzierte Suppression von CD18 nach 12 Stunden, wie sie im durchgeführten Experiment auftrat, würde auf eine Verminderung der immunologischen Fähigkeiten der neutrophilen Granulozyten hindeuten. Das heißt, dass für die immunsuppressive Wirkung der Glukokortikoide unter anderem ein direkter Einfluss auf die Aktivität von neutrophilen Granulozyten gezeigt werden konnte, so dass, trotz der Zunahme ihrer Anzahl, eine immunsuppressive Wirkung von Dexamethason auf die neutrophilen Granulozyten einleuchtend erscheint. Andererseits wurde bereits an neutrophilen Granulozyten eine Glukokortikoidrezeptor-vermittelte Hochregulation der Leuchtdichte von CD18 in *in vitro* Versuchen nachgewiesen (Filep et al., 1997).

Der späte Anstieg der Leuchtdichte von CD18 auf den neutrophilen Granulozyten, der ausschließlich bei den Probanden zu finden war, die Dexamethason am Abend erhalten hatten, lässt sich also zum einen möglicherweise mit einem Rebound-Effekt erklären, oder andererseits durch die Rezeptor-vermittelte Regulation die *in vitro* gezeigt wurde. Warum jedoch ein signifikanter Effekt der Suppression nach 12 Stunden nur bei morgendlicher Gabe von Dexamethason auftrat, bleibt weiterhin unklar. Eine Möglichkeit, warum neutrophile Granulozyten scheinbar am Morgen sensibler auf Dexamethason reagieren, könnte sein, dass eine Glukokortikoid-Schwellendosis kombiniert aus dem körpereigenen Kortisol und der definierten Menge Dexamethason nur zum Zeitpunkt des körpereigenen Kortisol-Peaks am Morgen überschritten wurde.

In der Population der CD16b negativen Zellen, die Lymphozyten, Monozyten und nicht-neutrophile Granulozyten umfasst, kam es ebenso zu Veränderungen in der CD18 Expression. Die Suppression der CD18 Expression nach 12 Stunden war dabei jedoch nicht abhängig vom Zeitpunkt der Gabe und wirkte sich erstaunlicherweise bei der geringeren Dosis Dexamethason sogar stärker aus. Diese Aktivitätsminderung der Zellen müsste sich, nachdem auch die Zahl der zirkulierenden Monozyten und Lymphozyten 12 Stunden nach Applikation sich ebenfalls verringerte, umso stärker auswirken. In *in vitro* Versuchen wurde dagegen an dendritischen Zellen beobachtet, dass Dexamethason zu einer Hochregulation der Expression von CD18 in diesen Zellen führt (Piemonti et al., 1999).

Um genauere Erkenntnisse über die Einflussnahme von Glukokortikoiden auf die Regulation von Aktivierungsmarkern in immunkompetenten Zellen gewinnen zu können, sollte daher in einer weiteren Studie mit mindestens fünf unterschiedlichen Dosen, wovon mindestens eine deutlich unter 1,5 mg und eine weitere über 3 mg liegen sollte, die Leuchtdichte von CD18 noch einmal bestimmt werden. Dabei wäre es auch besonders interessant, die CD16b negativen Zellen eventuell mittels eines zusätzlichen, spezifischen Antikörpers gegen Lymphozyten oder Monozyten zu differenzieren. Zudem wäre es wünschenswert, Dexamethason über einen längeren Zeitraum zu applizieren, z.B. an 3 Zeitpunkten über 36 Stunden, um herauszufinden, ob die Aktivitätsminderung über diesen Zeitraum anhält, oder es zu einer Gegenregulation des Körpers kommt.

#### **4.5 Veränderung der Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine und löslicher Zytokinrezeptoren nach Gabe von Dexamethason**

Die in der vorliegenden Studie gezeigten Effekte von Dexamethason auf die Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  und IL-6 passen zu den Effekten von Glukokortikoiden auf die Regulation inflammatorischer Zytokine bei Stimulation des Immunsystems: So ist bereits seit längerem klar, dass Dexamethason sowohl *in vitro* (Fantuzzi et al., 1995) als auch *in vivo* (Barber et al., 1993) in Antwort auf immunologische Aktivierung wie z.B. durch Endotoxin-Stimulation die Spiegel von inflammatorischen Zytokinen wie

TNF- $\alpha$  und IL-6 senkt. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der zirkulierenden Kortisolspiegel mit Hilfe von physischen Stressoren oder durch Infusion von Hydrokortison und nachfolgender *in vitro* Stimulation der Blutzellen mit Lipopolysaccharid zu geringerer Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen führen (DeRijk et al., 1997). Besonderes Augenmerk ist dabei jedoch darauf zu legen, dass in diesen Studien ausschließlich Glukokortikoideffekte nach vorheriger *in vivo*- oder *in vitro*-Stimulation untersucht wurden. Die einzige *in vivo* Untersuchung ohne Stimulation wurde dagegen an Patienten mit Depression durchgeführt (Schuld et al., 2001). Hier erniedrigte, wie auch in der vorliegenden Studie, die orale Gabe von 1,5 mg Dexamethason um 23:00 die Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  und sTNF-R p75 nach 10 Stunden, während der lösliche TNF-Rezeptor p55 unbeeinflusst blieb. Zusätzlich fand sich in dieser Studie ebenfalls eine Suppression des Plasmaspiegels von IL-6 nach 10 Stunden, während in der vorliegenden Studie die IL-6 Spiegel nach 12 Stunden nicht signifikant verändert wurden und nach 24 Stunden sogar einen deutlichen Anstieg erfuhren. Denkbar wäre hier, dass der Einfluss von Dexamethason auf die IL-6 Plasmaspiegel nur ein kurzfristiger suppressiver Effekt ist, der bereits nach 12 Stunden im Gegensatz zu 10 Stunden nicht mehr nachweisbar ist und im weiteren Verlauf nach 24 Stunden sogar einen Anstieg der IL-6 Spiegel auslöst. Eine andere Möglichkeit den signifikanten Einfluss von Dexamethason auf die IL-6 Plasmaspiegel gerade bei depressiven Patienten zu erklären, die in der Studie von Schuld et al. die Probandenpopulation bildeten, liefern weitere Untersuchungen zu Zytokinplasmaspiegeln bei depressiven Patienten (Maes, 1999). Verschiedene Studien zeigten hier erhöhte, basale IL-6 Plasmaspiegel bei depressiven Patienten (Frommberger et al., 1997; Sluzewska et al., 1995; Seidel et al., 1995), was eine signifikante Suppression nach Glukokortikoidgabe möglich erscheinen lässt. Da aber bei Patienten mit Depression auch eine Veränderungen in der Regulation der HHN-Achse besteht (Holsboer, 2001; Gold und Chrousos, 1999; Holsboer, 2000), können die an depressiven Patienten gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf gesunde Probanden übertragen werden.

#### **4.6 Physiologische Relevanz der Variation von Zytokinspiegeln bei Gesunden**

Sogenannten „inflammatorischen“ Zytokinen wie IL-6 und TNF- $\alpha$  wurde bisher einzig eine Funktion in der unspezifischen Immunantwort zugeordnet, wo sie bei akuter Infektion oder Endotoxinämie einen monophasischen Anstieg im peripheren Blut aufweisen und einen Teil der Immunantwort triggern (Haddad et al., 2002; Warrell et al., 2004; Lazarov et al., 2000; Pollmächer et al., 1996). Unklar ist dagegen bislang, ob die durch Glukokortikoide ausgelöste hier beobachtete Reduktion der Zytokinspiegel ebenfalls unter physiologischen Bedingungen und ohne immunologische Stimulation von Bedeutung ist. Nachdem aber in der vorliegenden Studie kleine Dosen Dexamethason verwendet wurden, wie sie z.B. auch für endokrinologische Funktionstests verwendet werden (Tsigos und Chrousos, 1996), und schon diese ausreichten, um die Spiegel inflammatorischer Zytokine und ihrer Rezeptoren signifikant zu senken, ist es anzunehmen, dass diese Veränderungen auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielen. Nachdem die applizierte Dosis Dexamethason äquivalent ist mit den für den Körper regulierbaren, endogenen Glukokortikoidspiegeln ist anzunehmen, dass es unter physiologischen Bedingungen, wie z.B. Stress, zu ähnlich hohen, aber endogenen Glukokortikoidspiegeln (in diesem Fall das körpereigene Kortisol) kommt (DeRijk et al., 1997). Weiterhin ist anzunehmen, dass diese physiologisch erhöhten Glukokortikoidspiegel ähnliche Effekte auf die Spiegel von IL-6 und TNF- $\alpha$  haben müssten wie die in dieser Studie gezeigten. Dies würde bedeuten, dass nachdem also die in der Studie iatrogen herbeigeführte Konstellation auch physiologisch auftritt, die physiologische Rolle inflammatorischer Zytokine nicht auf den monophasischen Anstieg bei Aktivierung des Immunsystems wie z.B. bei akuten Infekten oder bei experimenteller Applikation von Endotoxin (Schuld et al., 2000) reduziert werden kann. Diese These wird zudem von einer neuen Studie gestärkt, die zeigte, dass die intravenöse Applikation von Hydrokortison unabhängig von der Funktion der HHN-Achse die Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine supprimierte (Schuld et al., 2003).

Die Frage, welchen Sinn eine weitere Suppression dieser Zytokine unter die physiologische hat, ist bisher ungeklärt und liefert Raum für Spekulationen. Neuere

Studien jedoch zeigen, dass bereits kleinste Veränderungen zirkulierender Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  entscheidende Veränderungen auf die Immunsystem – Gehirn Interaktion ausüben und zu zentralnervösen Veränderungen führen können (Pollmächer et al., 2000a). Auch korrelieren die Spiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen bei gesunden Probanden (Vgontzas et al., 1999), Schlaf-Apnoe Patienten, adipösen Patienten (Vgontzas et al., 1998) und Insomnie-Patienten (Vgontzas et al., 2002) mit deren jeweiliger Vigilanz, während die Injektion von TNF- $\alpha$  bei Mäusen sich direkt sowohl auf deren Schlaf/Wach-Verhalten, wie auch auf das Schlafprofil auswirkt (Krueger et al., 1998; Krueger und Toth, 1994). Gerade Zytokine wie TNF- $\alpha$  scheinen demzufolge also eine entscheidende Rolle in der Schlaf/Wach-Regulation zu spielen (Pollmächer et al., 2000b).

#### ***4.7 Relevanz der in der Studie erhobenen Befunde für die biologisch-psychiatrische Forschung***

Seit Längerem bekannt ist der Einfluss von Schwankungen in den Plasmaspiegeln zirkulierender inflammatorischer Zytokine auf die Schlaf/Wach-Regulation beim Menschen (Krueger und Toth, 1994; Mullington et al., 2000). Auch bei depressiven Patienten konnten signifikante Veränderungen der Spiegel von IL-6 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Maes, 1999), was einen Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen und der individuellen Stimmung generell wahrscheinlich macht (Haack et al., 1999). Diese These wird unterstützt durch weitere Studien, in denen gezeigt wurde, dass Veränderungen von Zytokinspiegeln auch Veränderungen in Appetit, Stimmung, Kognition und Schlaf/Wach-Verhalten (Pollmächer et al., 1995) nach sich ziehen (Mullington et al., 2000; Reichenberg et al., 2001; Reichenberg et al., 2002). Die Tatsache, dass sich in der vorliegenden Studie bei jungen, gesunden Probanden die Spiegel von TNF- $\alpha$  und dem löslichen TNF-Rezeptors p75 durch die Applikation von Dexamethason supprimieren ließen, deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Studie, die an depressiven Patienten durchgeführt wurde (Schuld et al., 2001). Zusätzlich fand sich jedoch bei den depressiven Patienten ebenfalls eine Suppression des Plasmaspiegels von IL-6 nach 10 Stunden, während in der vorliegenden Studie die IL-6 Spiegel nach 12 Stunden nicht signifikant verändert

wurden und nach 24 Stunden sogar einen deutlichen Anstieg erfuhren. Dies lässt sich mit der bereits mehrfach erwähnten Alterationen der HHN-Achse bei Depression (Holsboer, 2001; Gold und Chrousos, 1999; Holsboer, 2000) erklären. So wurde mehrfach beschrieben, dass es bei Depression zu erhöhten Spiegeln von IL-6 kommt (Frommberger et al., 1997; Maes et al., 1997; Kubera et al., 2000; Maes et al., 1995). Vor dem Hintergrund erhöhter IL-6 Spiegel in depressiven Patienten erscheint es somit wahrscheinlich, dass in der Studie von Schuld et al. (Schuld et al., 2001) die „Baseline“ IL-6 Level bereits erhöht waren, und sich somit im Vergleich zu den in dieser Studie untersuchten gesunden Probanden nur dadurch durch Glukokortikoide supprimieren ließen. Andererseits erscheint die postulierte Erhöhung von IL-6 bei Depression nach neueren Studien, die multiple konfundierende Variablen wie Nikotinkonsum, Alter, Geschlecht und Medikation berücksichtigen (Haack et al., 1999) wiederum fraglich, da hier nach Berücksichtigung dieser Variablen keine signifikante Erhöhung von IL-6 mehr nachweisbar war.

Die Untersuchung dieser Interaktion ist insbesondere vor dem Hintergrund der bereits in der Einleitung beschriebenen Aktivierung der HHN-Achse bei depressiven Patienten von besonderem Interesse. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass nicht nur die experimentelle Gabe eines synthetischen Glukokortikoids die Spiegel der Zytokine senkt, sondern es scheint sogar so zu sein, dass bereits die Depression-assoziierte Aktivierung des HHN-Systems über erhöhte Kortisolspiegel mit niedrigeren TNF- $\alpha$ -Spiegel assoziiert ist (Schuld et al., 2003). Hierüber erklärt sich gegebenenfalls ein Teil der Befunde über Immunauffälligkeit bei der Depression.

Zusammenfassend konnten wir erstmals zeigen, dass auch *in vivo* geringe Dosen von Glukokortikoiden in Abwesenheit von Immunaktivierung durch akute inflammatorische Reaktion die zirkulierenden Immunparameter modulieren, was sowohl für die Immunregulation, als auch bezüglich der Frage nach der physiologischen Rolle solch niedriger Spiegel von Bedeutung ist.

## 5 Zusammenfassung

Das unspezifische Immunsystem und die HHN-Achse stehen in engem Zusammenhang und beeinflussen sich gegenseitig in komplexer Weise: Während die zum Immunsystem zählenden Zytokine bei inflammatorischen Reaktionen auf verschiedenen Ebenen die Aktivierung der HHN-Achse erhöhen und somit zu vermehrter Sekretion von Kortisol aus der Nebenniere führt, hemmt die Zugabe von Glukokortikoiden die Ausschüttung eben dieser inflammatorischen Zytokine aus immunkompetenten Zellen (Chrousos, 1995; Mulla und Buckingham, 1999).

Bereits kleinste Veränderungen der Spiegel von durch das neuroendokrine System regulierten, zirkulierenden Zytokinen spielen zudem eine wichtige Rolle in der Interaktion von Gehirn und Immunsystem, sowie in Erkrankungen des ZNS: So werden Parameter wie Vigilanz, Appetit, Kognition und Schlaf-Wach-Verhalten durch die Spiegel von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  beeinflusst (Pollmächer et al., 2000a).

Demzufolge wirken Glukokortikoide immunmodulatorisch auf das aktivierte, unspezifische Immunsystem und bereits kleine Veränderungen zirkulierender inflammatorischer Zytokine haben physiologische Relevanz in Bezug auf die Interaktion von ZNS und Immunsystem. Es ist jedoch nicht klar, ob geringfügige physiologische Änderungen von Glukokortikoidspiegeln bei Gesunden und nicht immunaktivierten Menschen überhaupt Zytokine supprimieren können.

In einer doppelblinden, Plazebo-kontrollierten Studie wurde daher in einer aufwendigen Studie mit Bestimmung von Zytokinen durch ELISA Verfahren und Analyse immunologisch aktiver Zellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz-durchflusszytometrie (FACS) der Einfluss von 1.5mg beziehungsweise 3.0mg Dexamethason (DEX), welches zu verschiedenen Zeitpunkten entweder um 9:00 Uhr oder um 21:00 appliziert wurde, an gesunden männlichen Probanden untersucht. Dabei zeigte sich zunächst, dass die meisten der gemessenen Parameter bereits unter Plazebo - Bedingungen signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten aufwiesen, was sich im wesentlichen mit der bestehenden Literatur deckt (Czeisler und Klerman, 1999; Aschoff, 1979; Haus et al., 1983), während solche tageszeitlichen Unterschiede für die Anzahl und Leuchtdichte CD16b bzw. CD18 tragender Zellen in der Immunfluoreszenz, sowie für IL-6, TNF- $\alpha$  und die löslichen TNF-Rezeptoren so noch nicht *in vivo* vorbeschrieben sind.

Weiterhin konnte neben einer Dosis- und Applikationszeitpunkts-unabhängigen Suppression der endogenen Kortisolsekretion auch eine signifikante Temperaturerhöhung am Morgen durch abendlich appliziertes DEX nachgewiesen werden. Eine mehrfach vorbeschriebene Leukozytose konnte über die Versuchsreihe über 24 Stunden gezeigt werden, wobei diese nach 12 Stunden auf einen Anstieg der Granulozytenzahlen, nach 24 Stunden auf Anstiege von Lymphozyten- und Granulozytenzahlen zurückzuführen war. In ihrer Aktivität wurden neutrophile Granulozyten 12 Stunden nach morgendlicher Gabe gemindert, während 24 Stunden nach DEX-Gabe sich dagegen sogar ein signifikanter Anstieg bei Abend-Applikation von DEX einstellte.

Die Spiegel von TNF- $\alpha$  und des löslichen TNF-Rezeptors p75 wurden nach Applikation für 24 Stunden signifikant gesenkt. Dabei wurden die Spiegel von sTNF-R p75 12 Stunden nach Einnahme stärker beeinflusst, wenn die Applikation am Abend erfolgte. Die Spiegel des anderen löslichen TNF-Rezeptors p55 dagegen waren zwar 12 Stunden nach Einnahme abgesenkt, stiegen nach 24 Stunden jedoch wieder sogar signifikant über das Ausgangsniveau an. Bei den IL-6 SpiegelIn konnte nach 12 Stunden dagegen kein signifikanter supprimierender Effekt nachgewiesen werden, nach 24 Stunden nach Einnahme von DEX kam es zu einem signifikanten Anstieg.

Die Untersuchung immunmodulatorischer Effekte von Dexamethason auf Leukozyten und Plasmaspiegel von inflammatorischen Zytokinen bestätigte also bekannte Effekte von DEX, lieferte aber auch neue Erkenntnisse und sogar unerwartete Befunde: Zusätzlich zur bekannten Granulozytose konnte bei geringen Mengen DEX auch ein später Anstieg von Lymphozyten und Monozytenzahlen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Erstmals konnte in der durchgeführten Studie zudem gezeigt werden, dass sich die geringen, beim Gesunden vorhandenen Spiegel von TNF- $\alpha$ , sTNF-R p55 und p75 durch kleine Mengen Dexamethason supprimieren lassen. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine Erhöhung der Spiegel inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren, sondern auch Suppression derselben unter physiologischen Bedingungen ohne Aktivierung des Immunsystems eine bedeutende Rolle zum Beispiel in Bezug auf Interaktionen zwischen Gehirn und Immunsystem (Pollmächer et al., 1995) spielen kann.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbling M (15-10-1996) Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 88: 2819-2825
2. Anderson BH, Watson DL, Colditz IG (1999) The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Vet.Res.Commun.* 23: 399-413
3. Andreis PG, Neri G, Belloni AS, Mazzocchi G, Kasprzak A, Nussdorfer GG (1991) Interleukin-1 beta enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. *Endocrinology* 129: 53-57
4. Arnaout MA (1-3-1990) Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 75: 1037-1050
5. Aschoff J (1979) Circadian Rhythms: General Features and Endocrinological Aspects. In: Krieger DT (ed) *Endocrine Rhythms*. Raven Press, New York, pp 1-61
6. Barber AE, Coyle SM, Marano MA, Fischer E, Calvano SE, Fong Y, Moldawer LL, Lowry SF (1-3-1993) Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J.Immunol.* 150: 1999-2006
7. Behrends J, Prank K, Dogu E, Brabant G (1998) Central nervous system control of thyrotropin secretion during sleep and wakefulness. *Horm.Res.* 49: 173-177
8. Benigni F, Fantuzzi G, Sacco S, Sironi M, Pozzi P, Dinarello CA, Sipe JD, Poli V, Cappelletti M, Paonessa G, Pennica D, Panayotatos N, Ghezzi P (1-3-1996) Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1. *Blood* 87: 1851-1854
9. Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H (23-10-1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238: 524-526
10. Besedovsky HO, del Rey A (2000) The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z.Rheumatol.* 59 Suppl 2: II/26-II/30
11. Besedovsky HO, del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Monge AG, Kabiersch A (1991) Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 40: 613-618

12. Bloemena E, Weinreich S, Schellekens PT (1990) The influence of prednisolone on the recirculation of peripheral blood lymphocytes in vivo. *Clin.Exp.Immunol.* 80: 460-466
13. Bornstein SR, Chrousos GP (1999) Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84: 1729-1736
14. Brambilla F, Maggioni M (1998) Blood levels of cytokines in elderly patients with major depressive disorder. *Acta Psychiatr.Scand.* 97: 309-313
15. Burioka N, Sasaki T (1996) [Chronopharmacology and chronotherapy for asthma by using PEF]. *Nippon Rinsho* 54: 2956-2961
16. Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW (25-10-1988) Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res.* 463: 28-36
17. Calogero AE, Norton JA, Sheppard BC, Listwak SJ, Cromack DT, Wall R, Jensen RT, Chrousos GP (1992) Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery. *Metabolism* 41: 839-845
18. Chrousos GP (18-5-1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N.Engl.J.Med.* 332: 1351-1362
19. Coxon A, Cullere X, Knight S, Sethi S, Wakelin MW, Stavrakis G, Luscinskas FW, Mayadas TN (2001) Fc gamma RIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. a mechanism for neutrophil accumulation in immune-mediated inflammation. *Immunity.* 14: 693-704
20. Czeisler CA, Klerman EB (1999) Circadian and sleep-dependent regulation of hormone release in humans. *Recent Prog.Horm.Res.* 54: 97-130
21. Dantzer R, Bluthé RM, Laye S, Bret-Dibat JL, Parnet P, Kelley KW (1-5-1998) Cytokines and sickness behavior. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 840: 586-590
22. Delves PJ, Roitt IM (6-7-2000) The immune system. First of two parts. *N.Engl.J.Med.* 343: 37-49
23. DeRijk R, Michelson D, Karp B, Petrides J, Galliven E, Deuster P, Paciotti G, Gold PW, Sternberg EM (1997) Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) production in humans: high sensitivity of TNF alpha and resistance of IL-6. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 82: 2182-2191
24. Dhabhar FS, Miller AH, Stein M, McEwen BS, Spencer RL (1994) Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav.Immun.* 8: 66-79
25. Eskandari F, Sternberg EM (2002) Neural-immune interactions in health and disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 966: 20-27

26. Fantuzzi G, Di Santo E, Sacco S, Benigni F, Ghezzi P (1-10-1995) Role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the regulation of TNF production in mice. Effect of stress and inhibition of endogenous glucocorticoids. *J.Immunol.* 155: 3552-3555
27. Fantuzzi G, Ghezzi P (1993) Glucocorticoids as cytokine inhibitors: role in neuroendocrine control and therapy of inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* 2: 263-270
28. Filep JG, Delalandre A, Payette Y, Foldes-Filep E (1-7-1997) Glucocorticoid receptor regulates expression of L-selectin and CD11/CD18 on human neutrophils. *Circulation* 96: 295-301
29. Focan C (1995) Circadian rhythms and cancer chemotherapy. *Pharmacol.Ther.* 67: 1-52
30. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80: 1523-1631
31. Frommberger UH, Bauer J, Haselbauer P, Fraulin A, Riemann D, Berger M (1997) Interleukin-6-(IL-6) plasma levels in depression and schizophrenia: comparison between the acute state and after remission. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 247: 228-233
32. Goichot B, Brandenberger G, Schlienger JL (15-6-1996) [Secretion of thyrotropin during states of wakefulness and sleep. Physiological data and clinical applications]. *Presse Med.* 25: 980-984
33. Gold PW, Chrousos GP (1999) The endocrinology of melancholic and atypical depression: relation to neurocircuitry and somatic consequences. *Proc.Assoc.Am.Physicians* 111: 22-34
34. Gordon S (27-12-2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111: 927-930
35. Goujon E, Laye S, Parnet P, Dantzer R (1997) Regulation of cytokine gene expression in the central nervous system by glucocorticoids: mechanisms and functional consequences. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1: S75-S80
36. Gudewill S, Pollmächer T, Vedder H, Schreiber W, Fassbender K, Holsboer F (1992) Nocturnal plasma levels of cytokines in healthy men. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 242: 53-56
37. Gwosdow AR, Kumar MS, Bode HH (1990) Interleukin 1 stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am.J.Physiol* 258: E65-E70
38. Haack M, Hinze-Selch D, Fenzel T, Kraus T, Kuhn M, Schuld A, Pollmächer T (1999) Plasma levels of cytokines and soluble cytokine receptors in psychiatric patients upon hospital admission: effects of confounding factors and diagnosis. *J.Psychiatr.Res.* 33: 407-418

39. Haddad JJ, Saade NE, Safieh-Garabedian B (2002) Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J.Neuroimmunol.* 133: 1-19
40. Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (4-8-2000) The leukocyte integrins. *J.Biol.Chem.* 275: 23409-23412
41. Hatzinger M, Hemmeter UM, Baumann K, Brand S, Holsboer-Trachsler E (2002) The combined DEX-CRH test in treatment course and long-term outcome of major depression. *J.Psychiatr.Res.* 36: 287-297
42. Haus E, Lakatua DJ, Swoyer J, Sackett-Lundeen L (1983) Chronobiology in hematology and immunology. *Am.J.Anat.* 168: 467-517
43. Haus E, Smolensky MH (1999) Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol.Int.* 16: 581-622
44. Heuser I, Yassouridis A, Holsboer F (1994) The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J.Psychiatr.Res.* 28: 341-356
45. Hinze-Selch D, Pollmächer T (2001) In vitro cytokine secretion in individuals with schizophrenia: results, confounding factors, and implications for further research. *Brain Behav.Immun.* 15: 282-318
46. Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23: 477-501
47. Holsboer F (2001) Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J.Affect.Disord.* 62: 77-91
48. Holsboer F, Barden N (1996) Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr.Rev.* 17: 187-205
49. Holsboer F, Bender W, Benkert O, Klein HE, Schmauss M (27-9-1980) Diagnostic value of dexamethasone suppression test in depression. *Lancet* 2: 706
50. Hosoi T, Okuma Y, Nomura Y (2000) Electrical stimulation of afferent vagus nerve induces IL-1beta expression in the brain and activates HPA axis. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 279: R141-R147
51. Jilka B, Stohlawetz P, Pernerstorfer T, Eichler HG, Mullner C, Kapiotis S (1998) Glucocorticoids dose-dependently increase plasma levels of granulocyte colony stimulating factor in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 83: 1037-1040
52. Joyce DA, Kloda A, Steer JH (1997) Dexamethasone suppresses release of soluble TNF receptors by human monocytes concurrently with TNF-alpha suppression. *Immunol.Cell Biol.* 75: 345-350

53. Kawakami M, Tsutsumi H, Kumakawa T, Abe H, Hirai M, Kurosawa S, Mori M, Fukushima M (15-11-1990) Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood* 76: 1962-1964
54. Keck ME, Welt T, Muller MB, Landgraf R, Holsboer F (2003) The high-affinity non-peptide CRH1 receptor antagonist R121919 attenuates stress-induced alterations in plasma oxytocin, prolactin, and testosterone secretion in rats. *Pharmacopsychiatry* 36: 27-31
55. Keck ME, Welt T, Wigger A, Renner U, Engelmann M, Holsboer F, Landgraf R (2001) The anxiolytic effect of the CRH(1) receptor antagonist R121919 depends on innate emotionality in rats. *Eur.J.Neurosci.* 13: 373-380
56. Kong FK, Chen CL, Cooper MD (15-6-2002) Reversible disruption of thymic function by steroid treatment. *J.Immunol.* 168: 6500-6505
57. Krieger DT, Allen W, Rizzo F, Krieger HP (1971) Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 32: 266-284
58. Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J (29-9-1998) Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 856: 148-159
59. Krueger JM, Toth LA (31-10-1994) Cytokines as regulators of sleep. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 739: 299-310
60. Kubera M, Kenis G, Bosmans E, Zieba A, Dudek D, Nowak G, Maes M (2000) Plasma levels of interleukin-6, interleukin-10, and interleukin-1 receptor antagonist in depression: comparison between the acute state and after remission. *Pol.J.Pharmacol.* 52: 237-241
61. Künzel HE, Binder EB, Nickel T, Ising M, Fuchs B, Majer M, Pfennig A, Ernst G, Kern N, Schmid DA, Uhr M, Holsboer F, Modell S (2003a) Pharmacological and nonpharmacological factors influencing hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis reactivity in acutely depressed psychiatric in-patients, measured by the Dex-CRH test. *Neuropsychopharmacology* 28: 2169-2178
62. Künzel HE, Zobel AW, Nickel T, Ackl N, Uhr M, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2003b) Treatment of depression with the CRH-1-receptor antagonist R121919: endocrine changes and side effects. *J.Psychiatr.Res.* 37: 525-533
63. Kusunoki T, Tsuruta S, Higashi H, Hosoi S, Hata D, Sugie K, Mayumi M, Mikawa H (1994) Involvement of CD11b/CD18 in enhanced neutrophil adhesion by Fc gamma receptor stimulation. *J.Leukoc.Biol.* 55: 735-742
64. Lazarov S, Balutsov M, Ianev E (2000) [The role of bacterial endotoxins, receptors and cytokines in the pathogenesis of septic (endotoxin) shock]. *Vutr.Boles.* 32: 33-40
65. Levi F (1999) Cancer chronotherapy. *J.Pharm.Pharmacol.* 51: 891-898

66. Lillberg K, Verkasalo PK, Kaprio J, Teppo L, Helenius H, Koskenvuo M (1-3-2003) Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 women: a cohort study. *Am.J.Epidemiol.* 157: 415-423
67. Linkowski P, Mendlewicz J, Kerkhofs M, Leclercq R, Golstein J, Brasseur M, Copinschi G, Van Cauter E (1987) 24-hour profiles of adrenocorticotropin, cortisol, and growth hormone in major depressive illness: effect of antidepressant treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 65: 141-152
68. Maes M (1999) Major depression and activation of the inflammatory response system. *Adv.Exp.Med.Biol.* 461: 25-46
69. Maes M, Bosmans E, De Jongh R, Kenis G, Vandoolaeghe E, Neels H (1997) Increased serum IL-6 and IL-1 receptor antagonist concentrations in major depression and treatment resistant depression. *Cytokine* 9: 853-858
70. Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Desnyder R (18-8-1995) Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J.Affect.Disord.* 34: 301-309
71. Martin RJ (1993) Nocturnal asthma: circadian rhythms and therapeutic interventions. *Am.Rev.Respir.Dis.* 147: S25-S28
72. Mazzone A, Ricevuti G (1995) Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80: 161-175
73. Mikova O, Yakimova R, Bosmans E, Kenis G, Maes M (2001) Increased serum tumor necrosis factor alpha concentrations in major depression and multiple sclerosis. *Eur.Neuropsychopharmacol.* 11: 203-208
74. Mishler JM, Emerson PM (1977) Development of Neutrophilia by serially increasing doses of dexamethasone. *Br.J.Haematol.* 36: 249-257
75. Molnar GD, Taylor WF, Langworthy AL (1972) Plasma immunoreactive insulin patterns in insulin-treated diabetics. Studies during continuous blood glucose monitoring. *Mayo Clin.Proc.* 47: 709-719
76. Mormont MC, Levi F (1-1-2003) Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives. *Cancer* 97: 155-169
77. Moser R, Etter H, Oligati L, Fehr J (1995) Neutrophil activation in response to immune complex-bearing endothelial cells depends on the functional cooperation of Fc gamma RII (CD32) and Fc gamma RIII (CD16). *J.Lab Clin.Med.* 126: 588-596
78. Mulla A, Buckingham JC (1999) Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 13: 503-521

79. Mullington J, Korth C, Hermann DM, Orth A, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T (2000) Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278: R947-R955
80. Musselman DL, Evans DL, Nemeroff CB (1998) The relationship of depression to cardiovascular disease: epidemiology, biology, and treatment. *Arch.Gen.Psychiatry* 55: 580-592
81. Nemeroff CB, Musselman DL, Evans DL (1998) Depression and cardiac disease. *Depress.Anxiety.* 8 Suppl 1: 71-79
82. Nemeroff CB, Widerlov E, Bissette G, Walleus H, Karlsson I, Eklund K, Kilts CD, Loosen PT, Vale W (14-12-1984) Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344
83. Nortamo P, Patarroyo M, Kantor C, Suopanki J, Gahmberg CG (1988) Immunological mapping of the human leucocyte adhesion glycoprotein gp90 (CD18) by monoclonal antibodies. *Scand.J.Immunol.* 28: 537-546
84. Penninx BW, Kritchewsky SB, Yaffe K, Newman AB, Simonsick EM, Rubin S, Ferrucci L, Harris T, Pahor M (1-9-2003) Inflammatory markers and depressed mood in older persons: results from the Health, Aging and Body Composition study. *Biol.Psychiatry* 54: 566-572
85. Perlstein RS, Mougey EH, Jackson WE, Neta R (1991) Interleukin-1 and interleukin-6 act synergistically to stimulate the release of adrenocorticotrophic hormone in vivo. *Lymphokine Cytokine Res.* 10: 141-146
86. Perlstein RS, Whitnall MH, Abrams JS, Mougey EH, Neta R (1993) Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology* 132: 946-952
87. Petrovsky N, Harrison LC (1998) The chronobiology of human cytokine production. *Int.Rev.Immunol.* 16: 635-649
88. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, Di C, V (1-6-1999) Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J.Immunol.* 162: 6473-6481
89. Pincus G (1-4-1943) A Diurnal Rhythm in the Excretion of Urinary Ketosteroids by Young Men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 3: 195-199
90. Pollmächer T, Haack M, Schuld A, Kraus T, Hinze-Selch D (2000a) Effects of antipsychotic drugs on cytokine networks. *J.Psychiatr.Res.* 34: 369-382
91. Pollmächer T, Mullington J, Korth C, Hinze-Selch D (1995) Influence of host defense activation on sleep in humans. *Adv.Neuroimmunol.* 5: 155-169

92. Pollmächer T, Mullington J, Korth C, Schreiber W, Hermann D, Orth A, Galanos C, Holsboer F (1996) Diurnal variations in the human host response to endotoxin. *J.Infect.Dis.* 174: 1040-1045
93. Pollmächer T, Schuld A, Kraus T, Haack M, Hinze-Selch D, Mullington J (2000b) Experimental immunomodulation, sleep, and sleepiness in humans. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 917: 488-499
94. Price TH, Beatty PG, Corpuz SR (15-12-1987) In vivo inhibition of neutrophil function in the rabbit using monoclonal antibody to CD18. *J.Immunol.* 139: 4174-4177
95. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF (1994) Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60: 436-444
96. Ravetch JV, Perussia B (1-8-1989) Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J.Exp.Med.* 170: 481-497
97. Redekopp C, Irvine CH, Donald RA, Livesey JH, Sadler W, Nicholls MG, Alexander SL, Evans MJ (1986) Spontaneous and stimulated adrenocorticotropin and vasopressin pulsatile secretion in the pituitary venous effluent of the horse. *Endocrinology* 118: 1410-1416
98. Reichenberg A, Kraus T, Haack M, Schuld A, Pollmächer T, Yirmiya R (2002) Endotoxin-induced changes in food consumption in healthy volunteers are associated with TNF-alpha and IL-6 secretion. *Psychoneuroendocrinology* 27: 945-956
99. Reichenberg A, Yirmiya R, Schuld A, Kraus T, Haack M, Morag A, Pollmächer T (2001) Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Arch.Gen.Psychiatry* 58: 445-452
100. Riccardi C, Bruscoli S, Migliorati G (2002) Molecular mechanisms of immunomodulatory activity of glucocorticoids. *Pharmacol.Res.* 45: 361-368
101. Robertson JC, Helliwell MG, Cantrell EG, Cawley MI, Ellis RM (10-4-1982) Circadian variation in disease activity in rheumatoid arthritis. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* 284: 1114-1115
102. Rook GA (1999) Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 13: 567-581
103. Sauer J, Polack E, Wikinski S, Holsboer F, Stalla GK, Arzt E (1995) The glucocorticoid sensitivity of lymphocytes changes according to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Psychoneuroendocrinology* 20: 269-280

104. Schuld A, Kraus T, Haack M, Hinze-Selch D, Zobel AW, Holsboer F, Pollmächer T (2001) Effects of dexamethasone on cytokine plasma levels and white blood cell counts in depressed patients. *Psychoneuroendocrinology* 26: 65-76
105. Schuld A, Mullington J, Friess E, Hermann DM, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T (2000) Changes in dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate plasma levels during experimental endotoxemia in healthy volunteers. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 85: 4624-4629
106. Schuld A, Schmid DA, Haack M, Holsboer F, Friess E, Pollmächer T (2003) Hypothalamo-pituitary-adrenal function in patients with depressive disorders is correlated with baseline cytokine levels, but not with cytokine responses to hydrocortisone. *J.Psychiatr.Res.* 37: 463-470
107. Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Behnisch A, Kirchner H (1995) Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand.J.Immunol.* 41: 534-538
108. Shea C, Morse ED (1978) Inhibition of human neutrophil chemotaxis by corticosteroids. *Ann.Clin.Lab Sci.* 8: 30-33
109. Sluzewska A, Rybakowski JK, Laciak M, Mackiewicz A, Sobieska M, Wiktorowicz K (21-7-1995) Interleukin-6 serum levels in depressed patients before and after treatment with fluoxetine. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 762: 474-476
110. Smolensky MH, Martin RJ (1999) Nocturnal asthma: role of circadian rhythms in its mechanisms and therapy. *Chronobiol.Int.* 16: vii-vix
111. Streeten DH, Anderson GH, Jr., Dalakos TG, Seeley D, Mallov JS, Eusebio R, Sunderlin FS, Badawy SZ, King RB (1984) Normal and abnormal function of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in man. *Endocr.Rev.* 5: 371-394
112. Szalai AJ, van Ginkel FW, Wang Y, McGhee JR, Volanakis JE (15-7-2000) Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. *J.Immunol.* 165: 1030-1035
113. Tilders FJ, DeRijk RH, Van Dam AM, Vincent VA, Schotanus K, Persoons JH (1994) Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals. *Psychoneuroendocrinology* 19: 209-232
114. Todd RF, III, Petty HR (1997) Beta 2 (CD11/CD18) integrins can serve as signaling partners for other leukocyte receptors. *J.Lab Clin.Med.* 129: 492-498
115. Tornatore KM, Venuto RC, Logue G, Davis PJ (1998) CD4+ and CD8+ lymphocyte and cortisol response patterns in elderly and young males after methylprednisolone exposure. *J.Med.* 29: 159-183
116. Tsigos C, Chrousos GP (1996) Differential diagnosis and management of Cushing's syndrome. *Annu.Rev.Med.* 47: 443-461

117. Turnbull AV, Rivier C (1995) Regulation of the HPA axis by cytokines. *Brain Behav.Immun.* 9: 253-275
118. Van der Meer MJ, Sweep CG, Pesman GJ, Borm GF, Hermus AR (1995) Synergism between IL-1 beta and TNF-alpha on the activity of the pituitary-adrenal axis and on food intake of rats. *Am.J.Physiol* 268: E551-E557
119. Vgontzas AN, Bixler EO, Tan TL, Kantner D, Martin LF, Kales A (22-6-1998) Obesity without sleep apnea is associated with daytime sleepiness. *Arch.Intern.Med.* 158: 1333-1337
120. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Lotsikas A, Zachman K, Kales A, Prolo P, Wong ML, Licinio J, Gold PW, Hermida RC, Mastorakos G, Chrousos GP (1999) Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84: 2603-2607
121. Vgontzas AN, Zoumakis M, Papanicolaou DA, Bixler EO, Prolo P, Lin HM, Vela-Bueno A, Kales A, Chrousos GP (2002) Chronic insomnia is associated with a shift of interleukin-6 and tumor necrosis factor secretion from nighttime to daytime. *Metabolism* 51: 887-892
122. Wakayama T, Sohmiya M, Furuya H, Murakami Y, Kato Y (1996) Increased serum human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) levels following intravenous infusion of high-dose methylprednisolone. *Endocr.J.* 43: 67-72
123. Ward PA, Marks RM (1989) The acute inflammatory reaction. *Curr.Opin.Immunol.* 2: 5-9
124. Warrell D, Cox T, Firth J, Benz E (2004) Innate Imune System. In: Warrell D, Cox T, Firth J, Benz E (eds) *Oxford Textbook of Medicine - online version.* Oxford University Press, Oxford,
125. Weyts FA, Flik G, Verburg-van Kemenade BM (1998) Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Dev.Comp Immunol.* 22: 563-572
126. Yu DT, Clements PJ, Paulus HE, Peter JB, Levy J, Barnett EV (1974) Human lymphocyte subpopulations. Effect of corticosteroids. *J.Clin.Invest* 53: 565-571
127. Zhou D, Shanks N, Riechman SE, Liang R, Kusnecov AW, Rabin BS (1996) Interleukin 6 modulates interleukin-1-and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Neuroendocrinology* 63: 227-236
128. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Otsuka K (1990) Brief review: molecular mechanisms of neutrophil binding to endothelium involving platelet-activating factor and cytokines. *J.Lipid Mediat.* 2 Suppl: S31-S43
129. Zobel AW, Nickel T, Künzel HE, Ackl N, Sonntag A, Ising M, Holsboer F (2000) Effects of the high-affinity corticotropin-releasing hormone receptor 1 antagonist R121919 in major depression: the first 20 patients treated. *J.Psychiatr.Res.* 34: 171-181

- 
130. Zobel AW, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Holsboer F, Ising M (2001) Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression. a prospective study. *J.Psychiatr.Res.* 35: 83-94
  131. Zuckerman SH, Shellhaas J, Butler LD (1989) Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur.J.Immunol.* 19: 301-305

## 6.2 Lebenslauf

Steffen Birkmann, geboren am 10. Dezember 1975 in Regensburg

1982-1986	Schüler der Grundschule Laaber
1986-1995	Schüler des mathematisch naturwissenschaftlichen Gymnasiums Parsberg
1995	Allgemeine Hochschulreife
1995/1996	Zivildienst bei „Autonomes Leben für behinderte Menschen e.V.“ in Regensburg
1996-1998	Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt) an der Universität Regensburg
1998-2003	Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt) an der Technischen Universität München und der University of Aberdeen, Schottland
1998-2003	Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Schlaflabor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie in München
1999-2003	Experimente im Rahmen dieser Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Pollmächer am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München
August 2003 -August 2004	Junior House Officer (Arzt im Praktikum) in der Stroke - Unit und der Inneren Medizin an der Royal Infirmary of Edinburgh (University of Edinburgh), Schottland
seit September 2004	Assistenzarzt im Schlaflabor der Neurologie bei Prof. Bassetti am Universitätsspital Zürich, Schweiz

### **6.3 Danksagung**

Mein ausdrücklicher und ganz besonderer Dank gilt meinem Freund und Betreuer Herrn Dr. Andreas Schuld für sein tiefgreifendes und kontinuierliches Engagement sowohl während der dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente, als auch weit darüber hinaus bei der Entstehung dieser Arbeit.

Ebenso sehr möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Pollmächer sowohl für die Überlassung dieser Arbeit, als auch für die Möglichkeit deren Ergebnisse vorstellen zu dürfen, sowie für seine allzeit hilfsbereite und geduldige Art bei meiner Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München durchführen zu dürfen.

Bei den Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe Dr. Monika Haack, Dr. Mira Dalal und Dr. Thomas Kraus möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente und besonders bei der statistischen Auswertung bedanken.

Bei Dr. Wolfgang Liebetrau möchte ich mich für die Einführung in das Arbeiten mit der Immunfluoreszenzdurchflußzytometrie bedanken.

Frau Gabriele Kohl danke ich besonders für die schnelle und überaus sorgfältige Messung der meisten Proben.

Meinem guten Freund und Kollegen Pierre Beitinger danke ich besonders für die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Eltern Rolf und Anke Birkmann und meinem Bruder Jens Birkmann danke ich sowohl für die Hilfe bei der Dateneingabe und -verarbeitung, als auch für die finanzielle und emotionale Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit.