



Aufhebung hydrocortisonbedingter Immunsuppression

Eine Untersuchung mit SANUKEHL PSEU in-vitro

von Dr. R. Kunze und Dipi.-Biol. J. Hartmann

veröffentlicht in SANUM-Post Nr. 41/1997, Seite 2 - 6

1. Einleitung

In den Untersuchungen „Identifikation von immunmodulatorischen Eigenschaften von SANUKEHL PSEU“ [1] wurde deutlich, daß es sich hierbei um eine Substanz handelt, die in die Regelkreise der Zytokinproduktion von mononukleären Blutzellen eingreift. Im Zusammenspiel mit Immunkomplexen wurde eine verstärkte Reaktion der Immunozyten bei der Induktion von Zytokinen in-vitro beobachtet. Ergebnisse aus diesen Untersuchungen wurden bereits in der SANUM-Post vorgestellt [1, 2].

Bemerkenswert war die Steigerung der Produktion des *granulocyte monocyte - colony stimulating factor* (GM-CSF), einem regulatorischen bzw. hämatopoetischen Zytokin. Diese Ergebnisse führten zu Schlußfolgerungen über Möglichkeiten einer tiefergehenden Analyse des immunmodulatorischen Potentials von SANUKEHL PSEU.

Zur Anwendung von SANUKEHL PSEU liegt eine Reihe klinischer Beobachtungen vor, die auf eine interessante immunmodulatorische Wirkung des Produkts schließen lassen. SANUKEHL PSEU ist offensichtlich in der Lage, immunologisch bedingte Therapieblockaden aufzuheben. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, diese Wirkeigenschaften von SANUKEHL PSEU *in-vitro* unter definierten experimentellen Bedingungen am Beispiel einer hydrocortisonbedingten Immunsuppression sichtbar zu machen.

Mit Hydrocortison wurde ein physiologisch vorkommendes Immunsup-

pressivum gewählt. Es wird vom Körper selbst gebildet und kann Therapieblockaden induzieren. Bei Krankheiten, die im Indikationsgebiet von SANUKEHL PSEU liegen, spielt Hydrocortison wahrscheinlich eine besondere Rolle. Die Untersuchung der Wirkung von SANUKEHL PSEU auf die hydrocortisonbedingte Zytokinsuppression war daher mit Blick auf die Anwender des Präparates naheliegend.

2. Ergebnisse

Es wurde experimentell untersucht, ob SANUKEHL PSEU in Kombination mit fixierten Immunglobulinen (Immunkomplexen) die regulatorischen bzw. proinflammatorischen Zytokine GM-CSF und Interleukin-1 α in Gegenwart einer die Immunaktivität blockierenden Substanz - Hydrocortison - beeinflusst.

Hierzu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus dem Blut von gesunden Spendern isoliert und mit humanem IgG inkubiert. Durch die Bindung an die sogenannten Fc-Rezeptoren unter Absättigung der adsorptiven Bindungskapazitäten der FBMC wurden diese zur Zytokinproduktion stimuliert. Es wurde nun die Abhängigkeit der Bildung der Zytokine GM-CSF und IL-1 α von steigenden Hydrocortisonkonzentrationen in Gegenwart steigender SANUKEHL PSEU-Konzentrationen und in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.

Die eingesetzten Hydrocortisonkonzentrationen (0,01 bis 10 μ M) überstreichen den Konzentrationsbereich des Hydrocortisons im humanen

Blutplasma, welcher einem zirkadianen Rhythmus unterliegt und zwischen 0,11 und 0,55 μ M schwankt.

Repräsentativ für die Analysen werden in den Bildern 1 bis 6 die Daten eines Spenders detailliert vorgestellt. Die Experimente wurden für eine Einzelfallbetrachtung angelegt. Auf diesem Niveau lassen sich so bereits relevante Ergebnisse erzielen.

Anhand der Bilder 1 bis 3 sollen die vorliegenden Daten beispielhaft vorgestellt werden. Alle Zellkulturansätze wurden parallel durchgeführt. In dem Kulturansatz ohne Hydrocortison und ohne Immunglobulin G erzeugt SANUKEHL PSEU selbst einen deutlich nachweisbaren GM-CSF-Spiegel (jeweils erste Kolumne der Bilder 1 bis 3). Fixiertes Immunglobulin allein erzeugt ein deutlich höheres Zytokinsignal (jeweils zweite Kolumne der Bilder 1 bis 3). Die Kombination von Immunglobulin G mit SANUKEHL PSEU verstärkt das Zytokinsignal erheblich (jeweils dritte Kolumne der Bilder 1 bis 3). In den Bildern 2 und 3, bei denen GM-CSF zu einem späteren Zeitpunkt bestimmt wurde, wird dieser Effekt noch deutlicher. Diese Daten dienen als Bezugssystem für die Hydrocortisonexperimente. In einem früheren Forschungsbericht wurde der überadditive Effekt der GM-CSF-Induktion durch SANUKEHL PSEU in Kombination mit Immunkomplexen ausführlich dargestellt.

In Gegenwart von Hydrocortison (Bilder 1 bis 3) kommt es zu einer Immunsuppression der Zytokinproduktion. Sie ist mehr oder weniger kon-



zentrationsabhängig. SANUKEHL PSEU kann bei allen untersuchten Konzentrationen in Kombination mit fixierten Immunglobulinen die hydrocortisonbedingte Suppression der GM-CSF-Produktion zu allen Zeitpunkten vermindern oder aufheben. Für Interleukin-1 β gestaltet sich die Situation ähnlich (Bilder 4 bis 6).

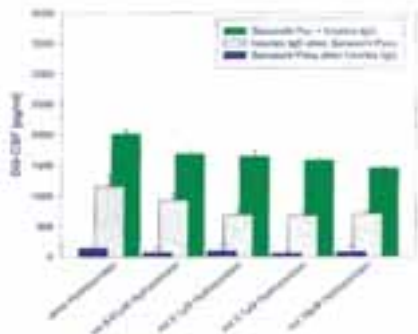


Bild 1: GM-CSF-Induktion nach 24 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

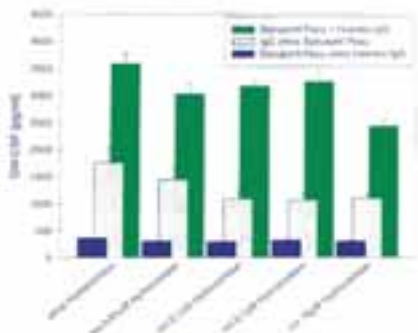


Bild 2: GM-CSF-Induktion nach 48 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

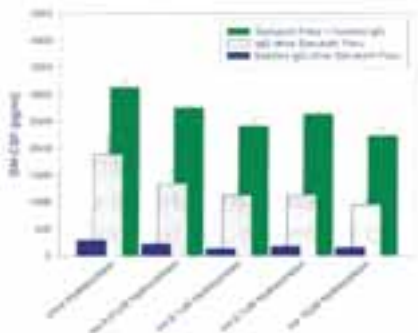


Bild 3: GM-CSF-Induktion nach 72 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

Auch hier sind Dosis-Wirkungs-Beziehungen von SANUKEHL PSEU und Hydrocortison zu erkennen. In Kombination mit fixiertem Immunglobulin G ist SANUKEHL PSEU wiederum in der Lage, die hydrocortisonbedingte Suppression aufzuheben. Die zeitlichen Verläufe der Induktion beider Zytokine unterscheiden sich dabei nur unwesentlich. Um den Einfluß der Menge von SANUKEHL PSEU zwischen den verschiedenen Spendern zusammenfassend betrachten zu können, wurden die Werte, welche mit und ohne SANUKEHL PSEU unter fixiertem IgG gemessen wurden, auf die Zytokinproduktion normiert, die nur mit fixiertem IgG ohne SANUKEHL PSEU und ohne Hydrocortison gemessen wurden (Zytokinwert = 100%).

Zur Verdeutlichung der Zusammenhänge des Reaktionsdreieckes Hydrocortison, SANUKEHL PSEU und induziertes Zytokinsignal wurde eine dreidimensionale Balkengrafik gewählt. Aus den Bildern 7 und 8 ist ersichtlich, daß sich die vier Spender nahezu gleichförmig verhalten. Mit steigender SANUKEHL PSEU-Konzentration kann die durch Hydrocortison induzierte Suppression immer besser reduziert bzw. aufgehoben werden. Bei allen drei gewählten Zeitpunkten der Zytokinbestimmung reagieren die Zellen der vier Spender ähnlich.

3. Diskussion

Über die molekularen Mechanismen, welche zur Kompensation bzw. Aufhebung der hydrocortisonbedingten Immunsuppression führen, existiert derzeit kein eindeutig akzeptiertes Modell. Für die Induktion von Zytokinsignalen werden durch aus dem Extrazellularraum kommende, spezifische Reize über definierte Rezeptoren Signale ins Zellinnere geleitet, die die Freigabe von Zytokinen bzw. ihre Produktion induzieren. Die über den zweiten Weg induzierten Zytokine können durch Hydrocortison abge-

schaltet werden [3, 4]. Für dieses Molekül existieren im Zellinneren Rezeptoren, welche letztendlich die Proteinsynthese mitsteuern.

Für die Induktion von Zytokinen steht eine Reihe weiterer Rezeptoren bereit. Zu ihnen gehören z.B. der Endotoxinrezeptor CD 14 und die sogenannten Fc-Rezeptoren, an denen

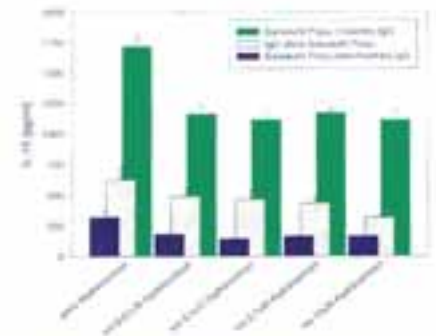


Bild 4: IL-1 β -Induktion nach 24 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

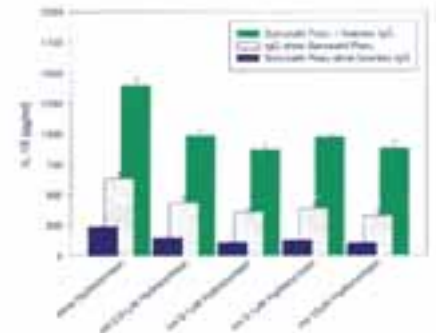


Bild 5: IL-1 β -Induktion nach 48 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

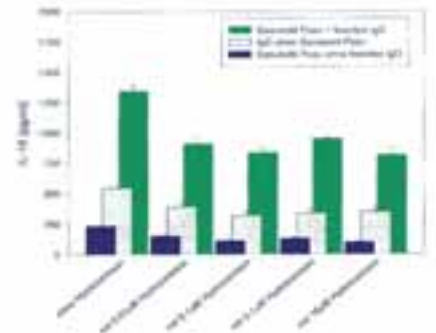


Bild 6: IL-1 β -Induktion nach 72 h unter SANUKEHL PSEU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit und ohne fixiertes Immunglobulin.

Immunglobuline bzw. Immunkomplexe binden. Auch sie induzieren dann im Zellinneren eine Reaktionskaskade [5, 6], die zur Produktion von Zytokinen führt. Hier ist wahrscheinlich der Ansatzpunkt im Verständnis der Wirkung von SANUKEHL PSEU in Kombination mit fixierten Immunglobulinen bzw. Immunkomplexen zu suchen. Es sind noch andere Mechanismen denkbar, die die dargestellten Ergebnisse erklären können. Ein sogenanntes *cross linkage*, das heißt die gleichzeitige Wechselwirkung eines Liganden oder Ligandenpaares (Immunkomplex) mit zwei Rezeptoren auf der Zelloberfläche [7, 8] kann ebenfalls zu einer Aktivierung der Zelle führen. Es könnte sowohl SANUKEHL PSEU als auch das an das Bakterienantigen gebundene Immunglobulin via Fc an zwei Rezeptortypen auf der Zelloberfläche das *cross linkage* realisieren. Nicht auszuschließen ist, daß unterschiedliche Zelltypen mit dem Immunkomplex bzw. SANUKEHL PSEU reagieren und Stoffwechselprodukte aus der einen Zelle den anderen Zelltyp, der letztendlich das Zytokin produziert, aktivieren.

Es ist weiterhin vorstellbar, daß der Effekt von SANUKEHL PSEU auf eine Aktivierung eines bisher noch nicht untersuchten Zyto- oder Chemokins beruht, welches an der Verminderung bzw. Aufhebung der hydrocortisonbedingten Zytokinsuppression beteiligt ist [8-11].

In der immunologischen Fachliteratur werden für Corticosteroide zwei molekulare Wirkungswege diskutiert:

- Auf der Genebene inhibieren sie im Komplex mit ihren Rezeptoren, durch Bindung an die „Schlüssel“-Transformationsfaktoren der Proteinsynthese (und somit auch der Zytokine). Die beteiligten Faktoren sind insbesondere AP-1 und NF κ B [3, 4, 12].
- Sie modulieren als physiologischer Gegenspieler von MIF (ma-

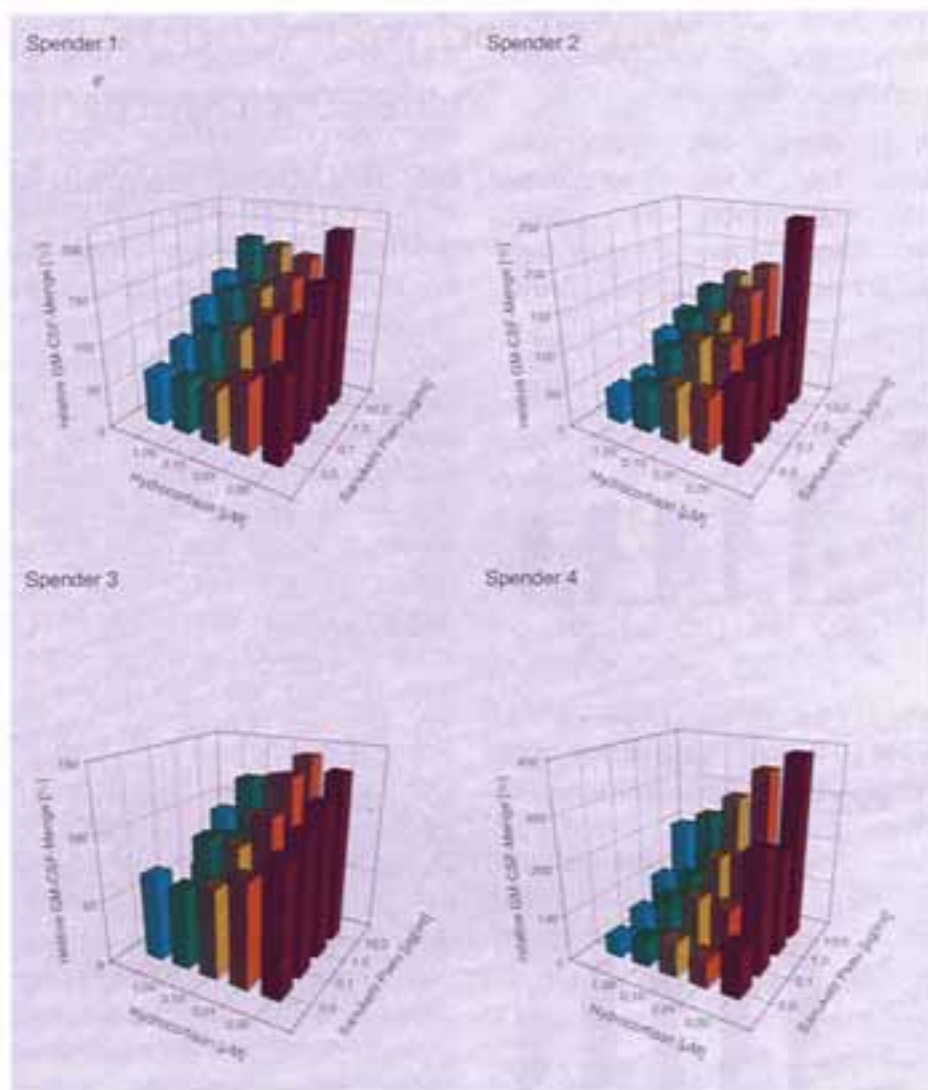


Bild 7: Einfluß von SANUKEHL PSEU in verschiedenen Konzentrationen auf die GM-CSF-Produktion unter Hydrocortison nach 48 h. Dargestellt nach Normierung auf die unter fixiertem IgG gebildete GM-CSF-Menge (100%; vorderster rechter Balken).

crophage migration inhibitory factor, besitzt immunaktivierende Eigenschaften) das Reaktionspotential von Makrophagen [10, 11].

Aus der Sicht der klinischen Immunologie ist die immunmodulatorische Wirkung von SANUKEHL PSEU von grundsätzlicher Bedeutung für das Verständnis seiner Wirkung am Patienten. In Abhängigkeit von den immunpathologischen Prozessen verschiedener Krankheiten lassen sich neue Indikationsgebiete für das Produkt zunächst theoretisch erschließen. Es sei hier an die Beeinflussung neuroimmunologischer Prozesse gedacht oder aber an die Aufhebung

immunsuppressiver Regelkreise, die durch andere Substanzen oder Prozesse in Gang gesetzt wurden. Hierzu gehört z.B. die immunsuppressive, zytostatische Wirkung von Methotrexat oder Cyclosporin-A, aber auch die durch Bestrahlung bedingte Immunsuppression. Auch die bei physischem oder psychischem Dauerstreß beobachtete Immunsuppression könnte ein zukünftiges Behandlungsfeld von SANUKEHL PSEU sein.

Denkbar ist auch die Beeinflussung des immunologischen Gleichgewichts der TH1-/TH2-Subpopulationen, welche den immunologischen

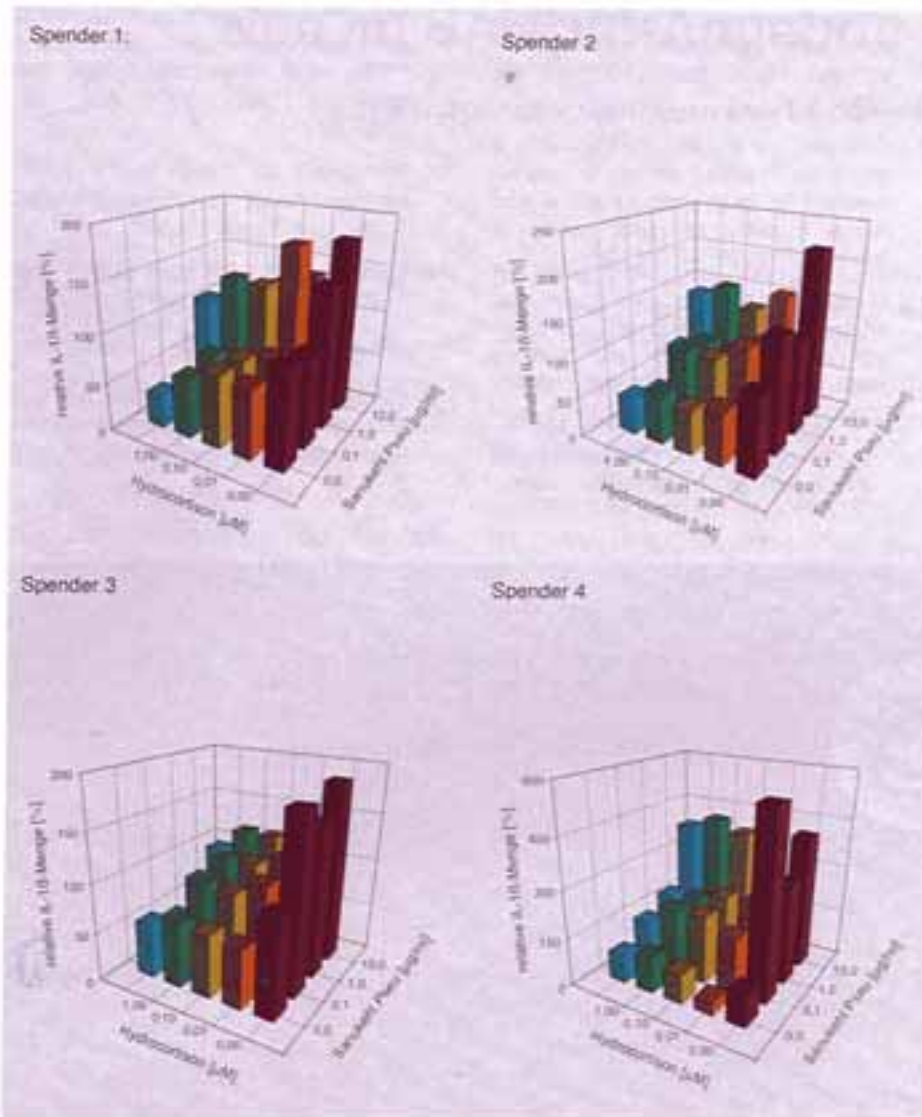


Bild 8: Einfluß von SANUKEHL PSEU in verschiedenen Konzentrationen auf die IL-1 β -Produktion unter Hydrocortison nach 48 h. Dargestellt nach Normierung auf die unter fixiertem IgG gebildete IL-1 β -Menge (100%; vorderster rechter Balken).

Phänotyp - Dominanz der zellulären oder Dominanz der humoralen Immunität - reguliert. In den letzten sechs Jahren hat sich die Analyse der Bedeutung von TH1-/TH2-Subpopulation auf die Entwicklung von Krankheitsbildern zu einem eigenständigen Forschungsgebiet entwickelt [13-15].

Hydrocortison und andere ähnlich strukturierte Immunsuppressiva können in den Lebenszyklus der Zellen grundsätzlich eingreifen [3]. Die sogenannte Apoptose, der programmierte und gesteuerte Zelltod, wurde in den letzten Jahren als einer der wichtigsten Prozesse bei der Rege-

lung und Aufrechterhaltung der Immunhomöostase erkannt. Es kann angenommen werden, daß SANUKEHL PSEU zumindest einige Populationen immunkompetenter Zellen positiv beeinflusst und vor der durch Hydrocortison induzierten bzw. beschleunigten Apoptose schützt.

Mit den vorliegenden Experimenten bzw. den daraus resultierenden Ergebnissen wurde belegt, daß SANUKEHL PSEU in Kombination mit fixierten Immunglobulinen eine durch Hydrocortison ausgelöste Immunsuppression vermindern oder aufheben kann.

Die aus der klinischen Anwendung von SANUKEHL PSEU resultierende Beobachtung, daß über dieses Präparat bestehende Reaktionsblockaden, die verschiedene Ansätze naturheilkundlicher Therapie bei den betroffenen Patienten scheitern lassen, aufgebrochen werden können, läßt sich auf dieser Grundlage nachvollziehen.



Schrifttum

- [1] SANUM-Kehlbeck: Unpublizierter Forschungsbericht, 1996.
- [2] Kunze, R.; Hartmann, J.: Das immunmodulatorische Profil von SANUKEHL PSEU. SANUM-Post 37 (1996), 11-18.
- [3] Scudeletti, M.; Musselli, C.; Lanza, L.; Peirano, L.; Puppo, F.; Indiveri, F.: The immunological activity of corticosteroids. *Recenti. Prog. Med.* 1996 Oct.; 87 (10): 508-515.
- [4] Brattsand, R.; Linden, M.: Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1996, 10; Suppl. 2: 81-90; discussion 91/92.
- [5] Lin, C. T.; Shen, Z.; Boros, P.; Unkeless J. C.: Fc receptor-mediated signal transduction. *J. Clin. Immunol.* 1994 Jan.; 14 (1): 1-13.
- [6] Muroi, M.; Muroi, Y.; Suzuki, T.: The binding of immobilized IgG2a to Fc gamma 2a receptor activates NF-kappa B via reactive oxygen intermediates and tumor necrosis factor-alpha 1. *J. Biol. Chem.* 1994 Dec. 2; 269 (48): 30561-30568.
- [7] Marsh, C. B.; Wewers, M. D.; Tan L. C.; Rovin, B. H.: Fc (gamma) receptor cross-linking induces peripheral blood mononuclear cell monocyte chemoattractant protein-1 expression: role of lymphocyte Fc (gamma) R111. *J. Immunol.* 1997 Feb. 1; 158 (3): 1078-1084.
- [8] Chen, W.; Knapp, W.; Majdic, O.; Stockinger, H.; Bohmig, G. A.; Zlabinger, G. J.: Co-ligation of CD31 and Fc gamma R11 induces cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 1994 Apr. 15; 152 (8): 3991-3997.
- [9] Marsh, C. B.; Anderson, C. L.; Lowe, M. P.; Wewers, M. D.: Monocyte IL-8 release is induced by two independent Fc gamma R-mediated pathways. *J. Immunol.* 1996 Sept. 16; 157 (6): 2632-2637.
- [10] Calandra, T.; Bucala, R.: Macrophage migration inhibitory factor: a counter regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock. *J. Inflamm.* 1995/96; 47 (1/2): 39-51.
- [11] Bucala, R.: MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.* 1996 Dec.; 10 (14): 1607-1613.
- [12] van der Saag, P. T.; Caldenhoven, E.; van de Stolpe, A.: Molecular mechanisms of steroid action: a novel type of cross-talk between glucocorticoids and NF kappa B transcription factors. *Eur. Respir. J. Suppl.* 1996 Aug.; 22: 146s-153s.
- [13] Romagnani, S.: Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. *Immunol. Today* 1991; 12 (8): 256/257.
- [14] Romagnani, S.: Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the „natural“ immune response? *Immunol. Today* 1992; 13 (10): 379-381.
- [15] Clerici, M.; Shearer G. M.: The TH1 and TH2 hypothesis of HIV-infection: new insights. *Immunol. Today* 1994; 15 (12): 575-581.