

„Das Wechselspiel zwischen Immun-, Hormon- und Nervensystem bei der Entwicklung chronischer Erkrankungen“

20. Juni 2012

Neutrophile Granulozyten

-

Bedeutung bei der normalen und der gestörten Immunabwehr

Dr. Volker von Baehr

Zelluläre Elemente des Immunsystems

Unspezifisches Immunsystem

(angeboren, nicht lernfähig)

Monozyten

→ Gewebemakrophagen

Granulozyten

- Neutrophile > 95%
- Eosinophile 1-3%
- Basophile < 1%

Mastzellen

Natürliche Killerzellen

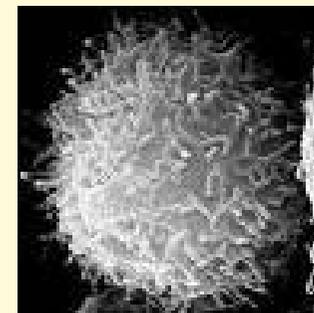
Spezifisches Immunsystem

(erworben, lernfähig)

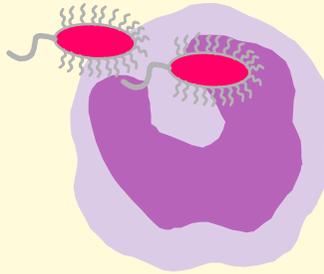
- T-Lymphozyten

- B-Lymphozyten

⇒ Antikörper

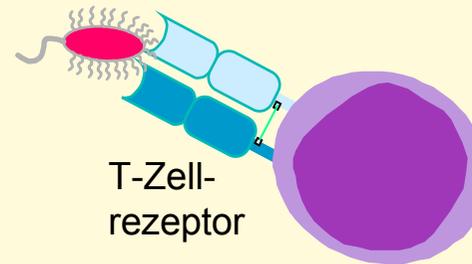


Unspezifisches Immunsystem (Entzündungssystem)



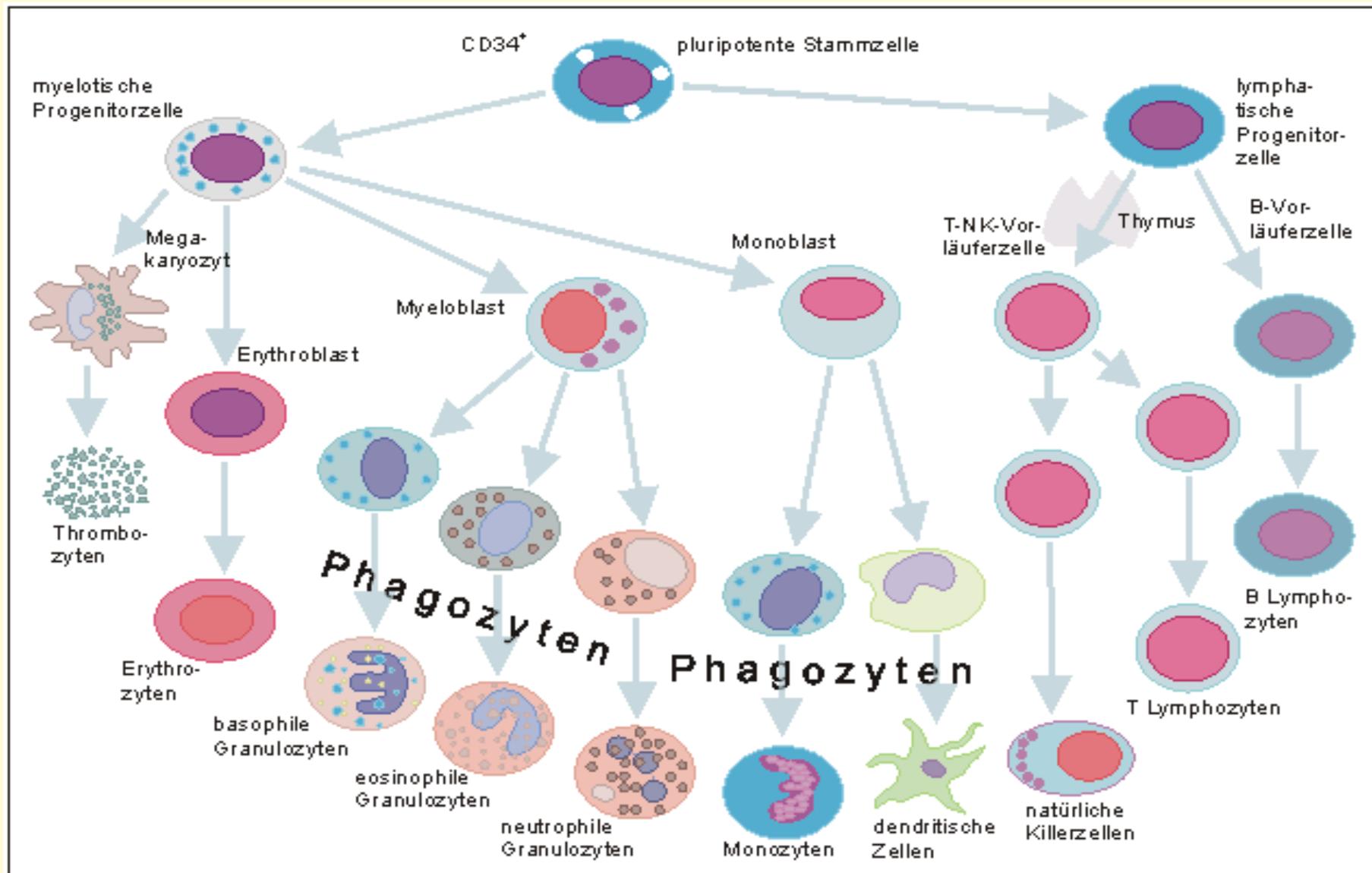
- Monozyten/Makrophagen
Granulozyten
- keine Antigen-spezifität,
d.h. „jeder kämpft gegen jedes
Antigen“
- keine Gedächtnisreaktion
- TNF- α und IL-1
- hemmen sich selbst wieder
(über IL1RA, sTNF-R, IL-10)

Spezifisches Immunsystem



- Lymphozyten und Antikörper
- Antigen-spezifität,
d.h. jedes Antigen wird von speziellen
Lymphozyten attackiert
- Immunaktivierung nur dann, wenn
Gedächtniszellen da sind
- IFN γ , IL-2, IL-4 als Effektorzytokine
- werden durch T_{reg}-Zellen wieder
gehemmt

Entwicklung der Granulozyten erfolgt im Knochenmark aus myeloischen Progenitorzellen



Granulozyt

von lat. *granulum* „Körnchen“ und altgriechisch *cýtos* „Hülle“

Es gibt neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, die je nach Färbeverhalten des Protoplasma unterteilt werden.



Neutrophiler Granulozyt



Eosinophiler Granulozyt



Basophiler Granulozyt

Bildquelle: wikipedia.de

Neutrophile Granulozyten

Neuproduktion von 10^{11} Granulozyten pro Tag im Knochenmark

Zirkulation im Blutkreislauf über 6 bis 8 Stunden, anschließend Apoptose oder Elimination durch Makrophagen in Leber oder Milz

Eiter = abgestorbene Granulozyten

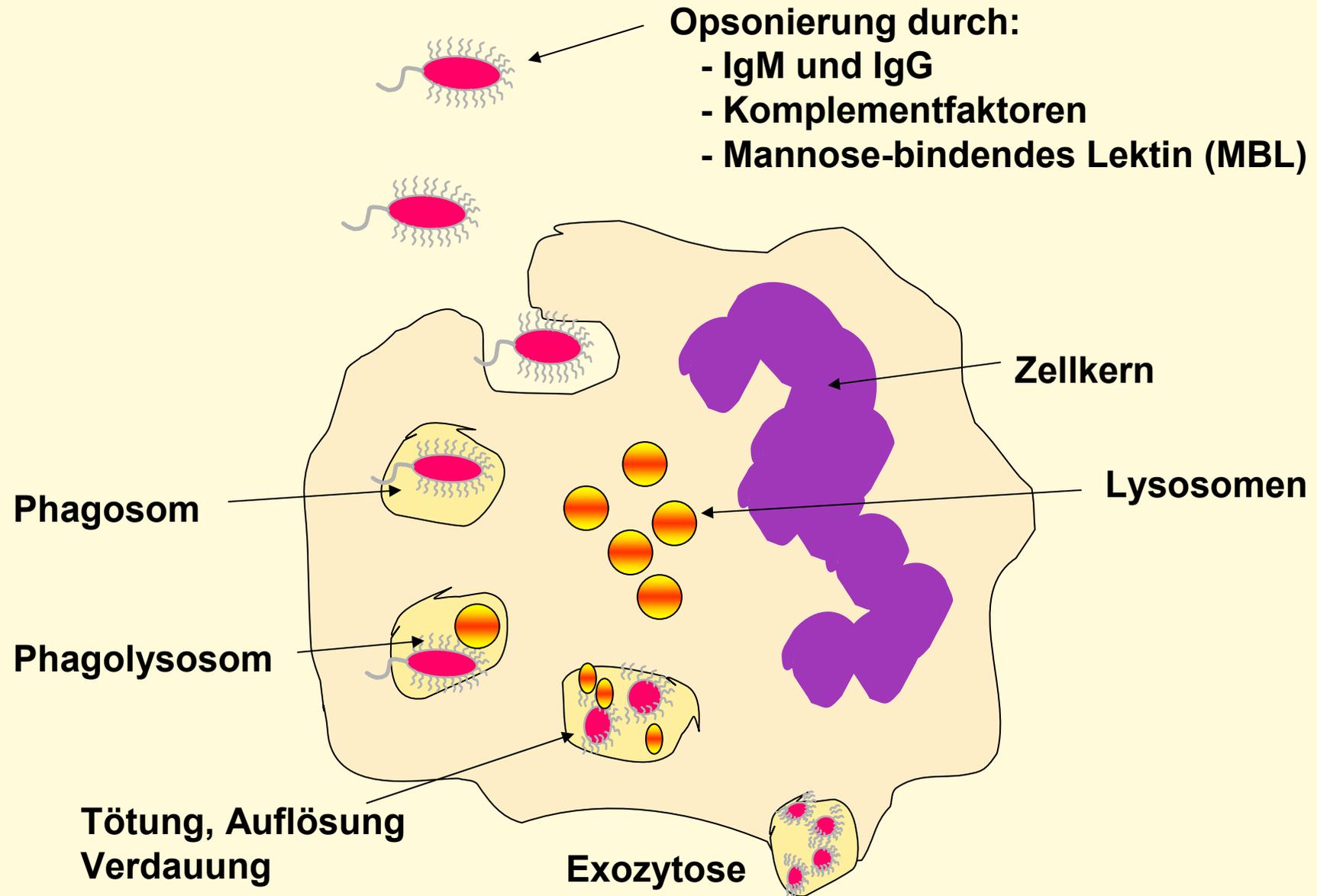
Wozu braucht unser Immunsystem Granulozyten ?

„Fressen, töten und weitere Zellen anlocken“

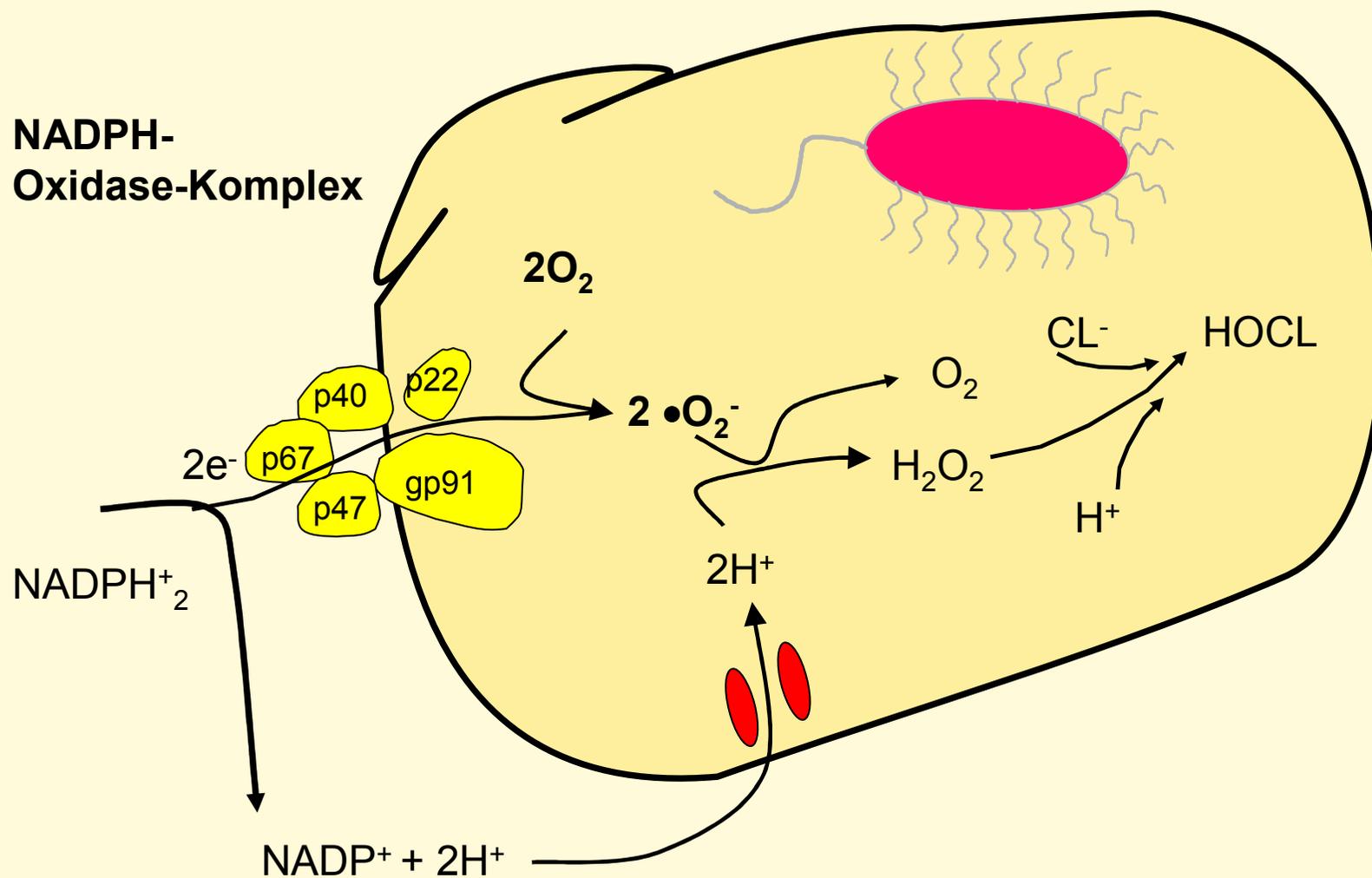
Beseitigung von Partikeln ($> 1 \mu\text{m}$) durch Phagozytose

1. Apoptotische Zellen, Abräumfunktion ehe eine entzündliche Reaktion eintritt !
2. Bakterien und Pilze vor der Verbreitung im Wirt

Phagozytose



Oxidativer Burst im Inneren des Phagosoms



Der Sauerstoffverbrauch eines Granulozyten steigt um Faktor 100 nach Phagozytose !

Intrazelluläre Abtötung von Pathogenen

Zwei Arten von Waffen in zytoplasmatischen Granula gespeichert

1. **Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) = Oxidativer *burst*** (engl. *Feuerstoß*)

2. **Bakterizide Proteine**

Azurophile (primäre, unspezifische) Granula, entsprechen den Lysosomen, enthalten saure Hydrolasen, Elastase, Proteinase 3, Defensine, Myeloperoxidase, Cathelicidine und Laktoferrin

Fehlende Aktivität in den Granula wird durch pH-Wert geregelt (Norm: < 5)

Spezifische (sekundäre) Granula, enthalten Laktoferrin, Lysozym, Kollagenasen, Plasminogenaktivatoren, Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes.

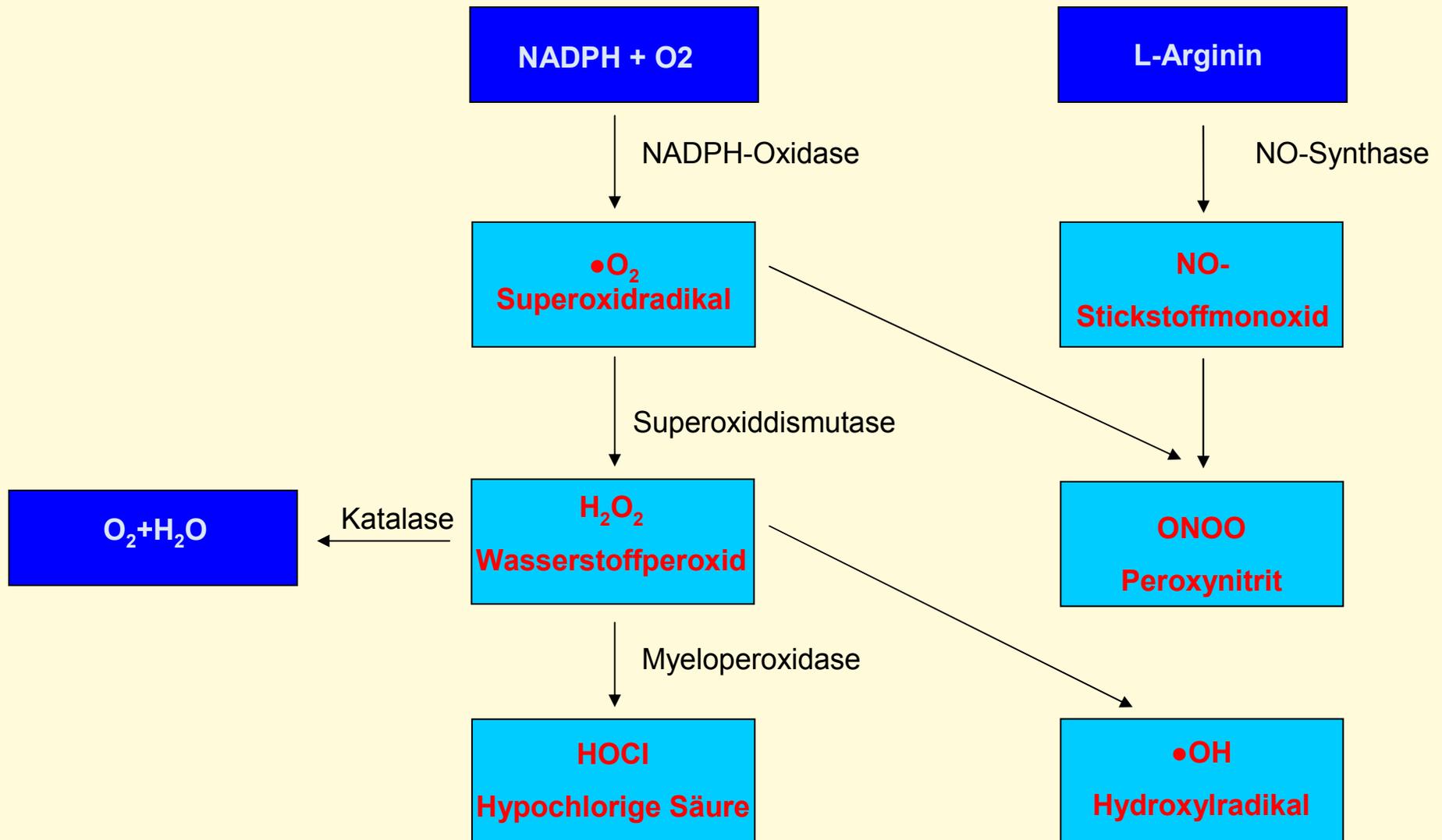
lassen sich nicht mit basischen und sauren (eosiniphilen) Farbstoffen färben, daher „neutrophil“)

+ Chemotaktisch wirkende Mediatoren (z.B. IL8)

Wie wird „fremd“ von den Granulozyten erkannt?

1. Mannoserezeptor erkennt Zuckerstrukturen aus Mannose und Fruktose auf der Oberfläche der Erreger (v.a. wenn durch MBL opsoniert, Bedeutung des MBL-Mangels)
 2. Rezeptoren (CR1, CR3 und CR4) für Komplementspaltprodukte wie C3b und C4b
 3. Fc-Rezeptoren für IgG- und IgM-Antikörper
1. – 3. ⇒ Aktivierung mit Freisetzung entzündlicher Mediatoren
4. Scavenger-Rezeptoren erkennen apoptotische Zellen durch veränderte Glykosilierung auf der Zelloberfläche (*eat me*-Signale)
- ⇒ Aktivierung ohne Freisetzung entzündlicher Mediatoren und zytotoxischer Granula

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies beim oxidativen *burst*



Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind „Brennstoff“ des Circulus vitiosus bei Multisystemerkrankungen

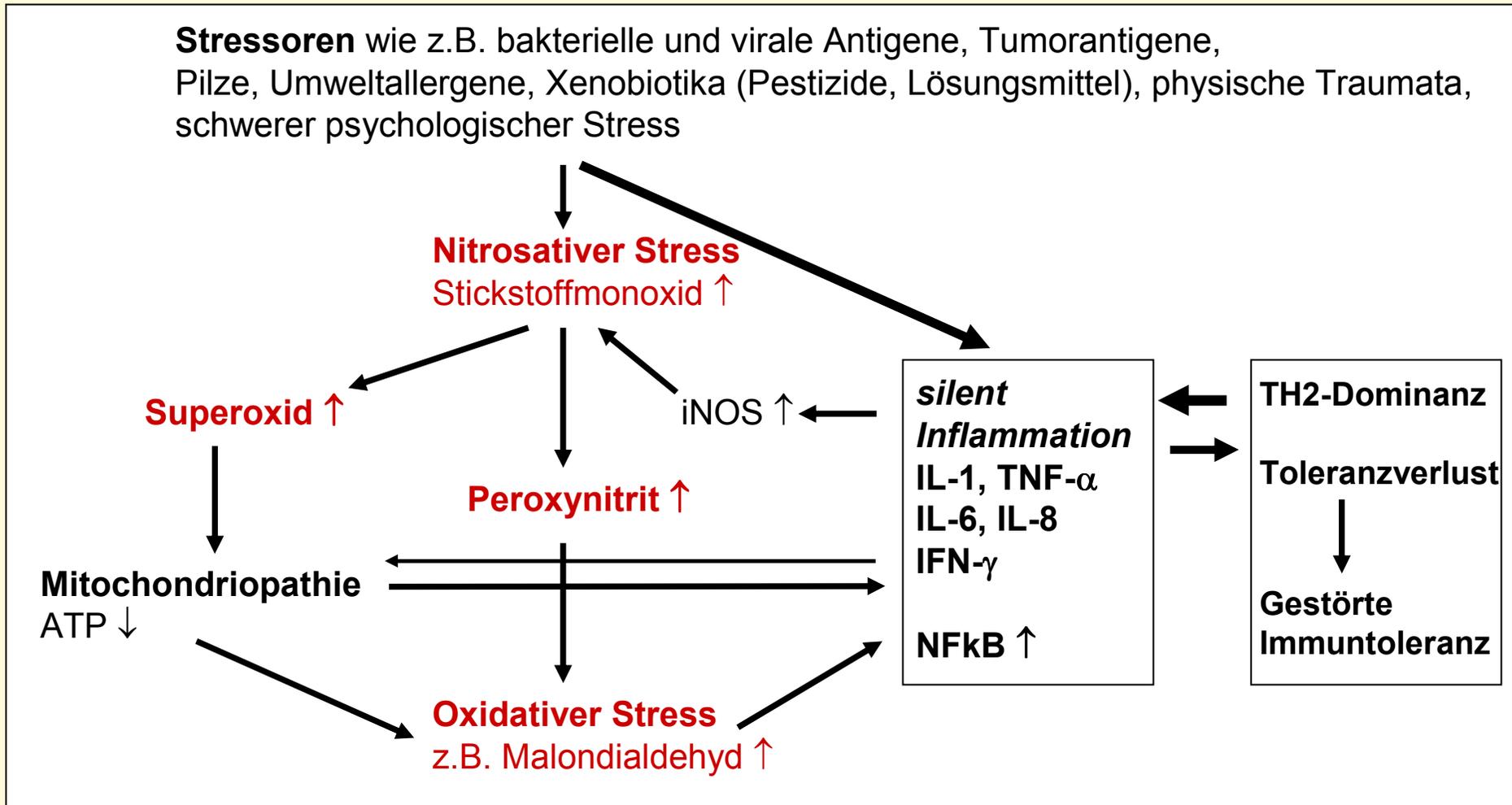
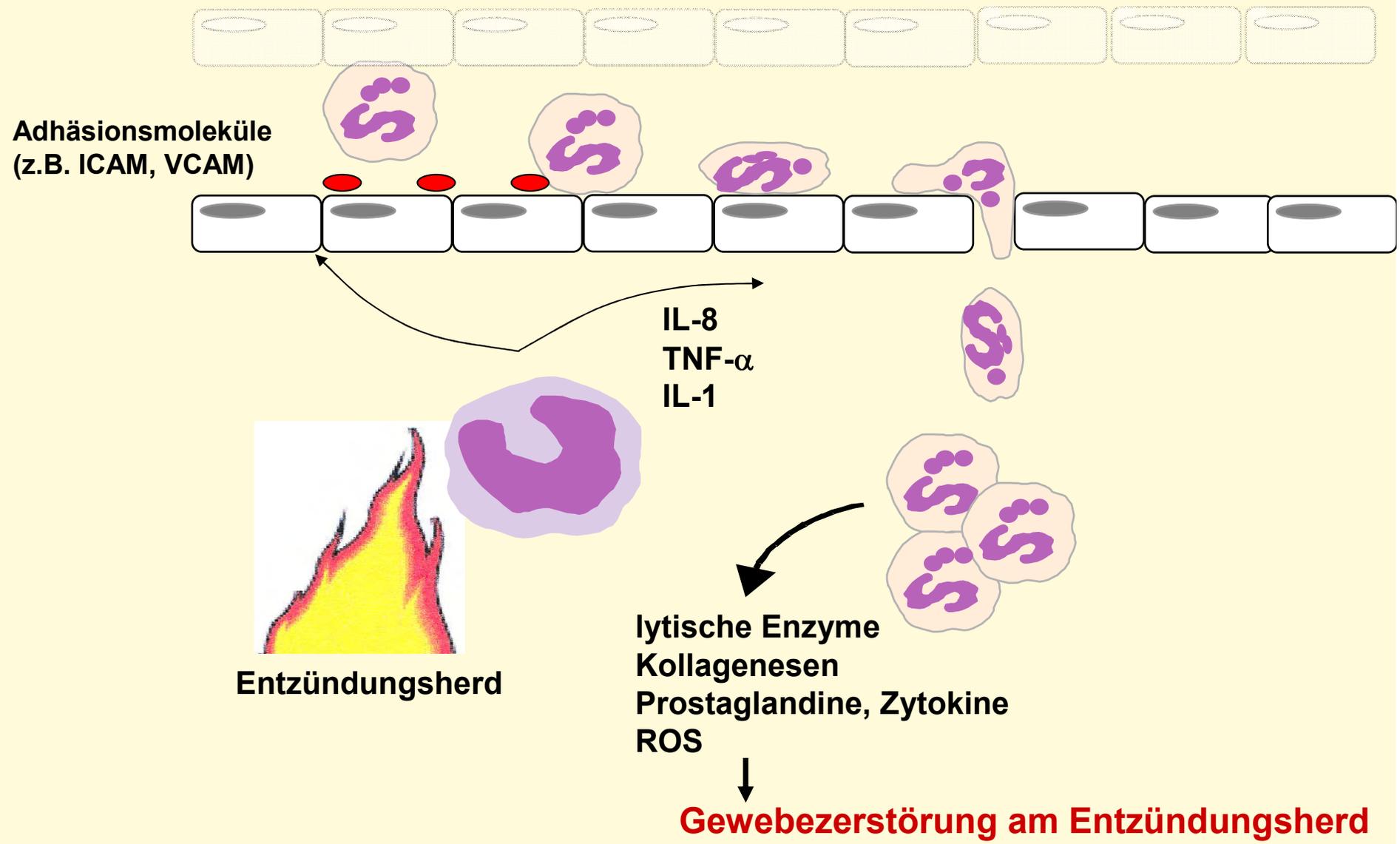


Abb.2 modifiziert nach Pall, Dr. (PhD) Martin L.: Explaining 'Unexplained Illnesses': Disease Paradigm for Chronic Fatigue Syndrome, Multiple Chemical Sensitivity, Fibromyalgia, Posttraumatic Stress Disorder, Gulf War Syndrome and Others, ISBN 078902389X

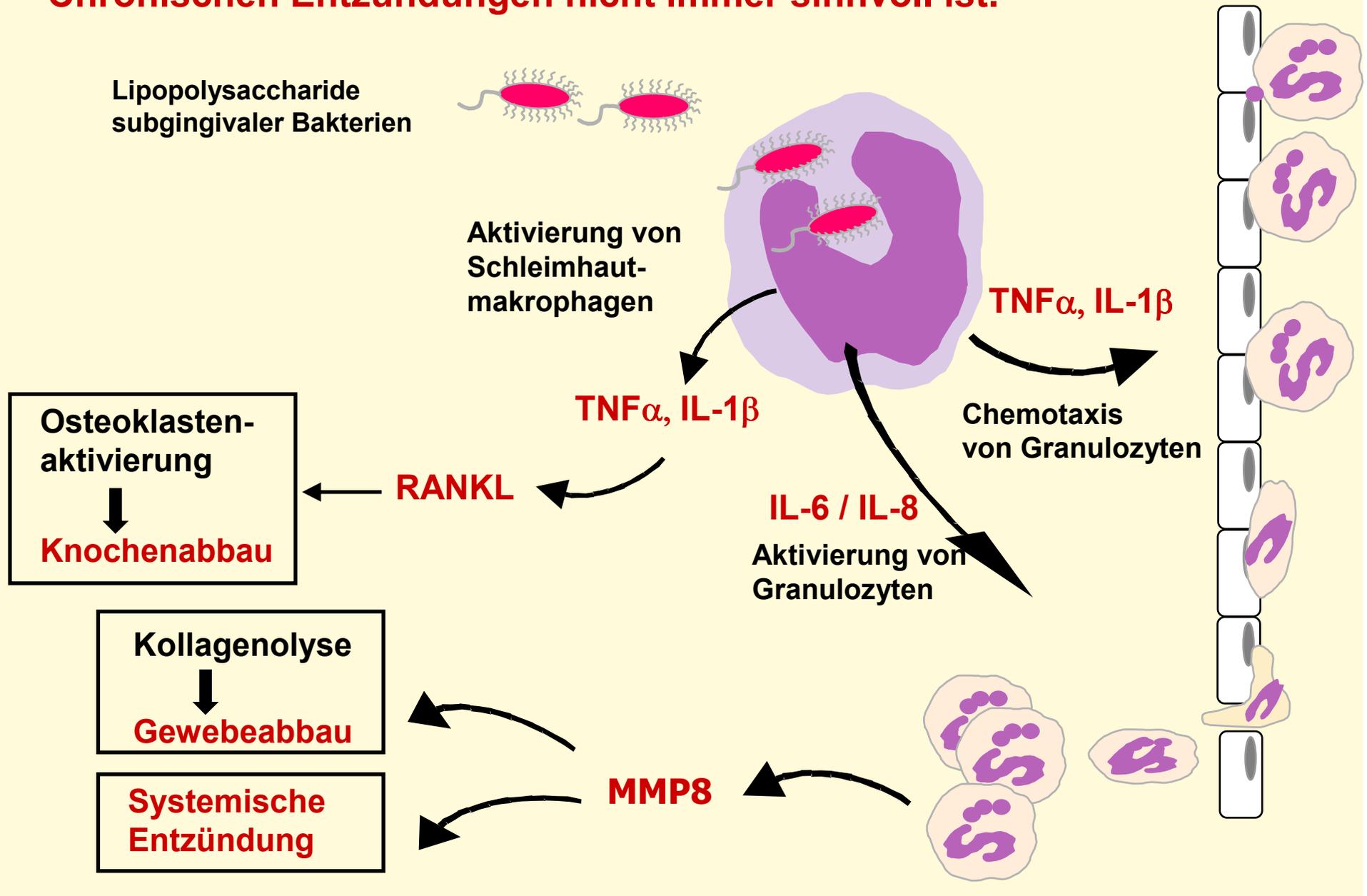
Funktion der Granulozyten

„Fressen, töten **und weitere Zellen anlocken**“

Chemotaxis = Anlockung weiterer Entzündungszellen an den Ort der tatsächlichen „Bedrohung“



Parodontitis – Beispiel dafür, dass die „Anlockung“ bei Chronischen Entzündungen nicht immer sinnvoll ist.



Neutrophile Granulozyten stellen die zahlenmäßig größte Zellfraktion im Blut

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	6.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	66.7	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	21.8	%	20.0 - 45.0
Monozyten	9.5	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	1.1	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.2	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	4.54	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.48	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.64	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.07	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.01	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Für die Beurteilung der Immunkompetenz sind die Absolutzahlen (Zellen / μ l) entscheidend.

Eine (reaktive) Granulozytose ist ein Entzündungszeichen

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	17.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	88.0	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	8.5	%	20.0 - 45.0
Monozyten	2.6	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	0.9	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.0	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	15.7	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.51	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.46	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.16	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.00	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Wichtig: Befund nicht als Lymphozytopenie missdeuten

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	17.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	88.0	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	8.5	%	20.0 - 45.0
Monozyten	2.6	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	0.9	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.0	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	15.7	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	1.51	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.46	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.16	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.00	1000/ μ l	0.00 - 0.11
Differentialblutbild (mikroskopisch)			
Stabkernige 	14	%	< 3
Segmentkernige	73	%	40 - 70
Lymphozyten	9	%	20 - 45
Monozyten	3	%	0 - 10
Eosinophile Granulozyten	1	%	< 4
Basophile Granulozyten	0	%	< 1
TNF-alpha i.S. 	22.7	pg/ml	< 8.1
Hinweis auf systemische Entzündung			
CRP hoch sensitiv i.S. (CLIA) 	15.3	mg/l	< 3.0

**Bei einer Linksverschiebung tauchen unreife Granulozyten-
vorstufen Im peripheren Blut auf**



Bildquelle: wikipedia.de

**Proentzündliche Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 wirken als
„releasing factors“ Im Knochenmark**

Echte Lymphozytose und echte Granulozytopenie

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
Großes Blutbild i. EDTA-Blut			
Leukozyten	7.8	1000/ μ l	4.4 - 11.3
Differentialblutbild (automat.)			
Neutrophile Granulozyten	1.1	%	40.0 - 75.0
Lymphozyten	89.6	%	20.0 - 45.0
Monozyten	5.3	%	2.0 - 13.0
Eosinophile Granulozyten	3.4	%	0 - 4.0
Basophile Granulozyten	0.6	%	0 - 1.0
Differentialblutbild (absolut)			
Neutrophile Granulozyten	0.09	1000/ μ l	1.80 - 7.70
Lymphozyten	6.99	1000/ μ l	1.00 - 4.80
Monozyten	0.41	1000/ μ l	0.00 - 0.80
Eosinophile Granulozyten	0.26	1000/ μ l	0.00 - 0.45
Basophile Granulozyten	0.05	1000/ μ l	0.00 - 0.11

Ursache?

Granulozytopenie: < 1,5 Gpt/l
Agranulozytose: < 0,5 Gpt/l

CD8⁺ T-Zell-Lymphom als Ursache einer Agranulozytose

Durchflusszytometrische Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen aus EDTA-Blut

		Normwerte		Normwerte
Leukozyten	10950 / μ l	4000 - 10000		
Lymphozyten	10074 / μ l	1100 - 4000	92 %	20 - 40
Monozyten	657 / μ l	140 - 800	6 %	2 - 14
Granulozyten	219 / μ l	2400 - 7400	2 %	42 - 75
T-Zellen	9811 / μ l	900 - 2200	97 %	62 - 78
CD4-Helfer	1240 / μ l	590 - 1460	12 %	32 - 54
CD8-Lymph.	8541 / μ l	320 - 930	85 %	23 - 40
CD8+/CD28+ (zytotox.)	243 / μ l	130 - 450	3 %	57 - 94
CD8+/CD28- (regulativ)	8295 / μ l	20 - 300	97 %	6 - 43
CD4/CD8-Ratio	0,15	1 - 3		
CD4+/CD8+T-Zellen	11 / μ l	<100	0,1 %	< 5
B-Zellen	136 / μ l	80 - 600	1 %	7 - 19
NK-Zellen	89 / μ l	200 - 780	1 %	10 - 32
Aktivierte T-Zellen				
CD3/HLADR	3195 / μ l	<230	32 %	< 11

Deutliche Granulozytopenie und Expansion der CD8-Lymphozyten.
Dringender Verdacht auf lymphoproliferative Erkrankung.

Neutropenie (Granulozytopenie) - Agranulozytose

Verminderte Bildung der Granulozyten

Als toxische oder allergische Nebenwirkung bei Arzneimitteln (Chemotherapeutika, Sulfonamiden, Antihistaminika, Antidepressiva, Chloramphenicol u.a.), sowie Chemikalien und Schadstoffen.

Bei Virusinfektionen (Parvoviren, CMV, Adenoviren u.a.)

Bei Neoplasien (z. B. bei Leukämien, Myelofibrose, T-Zell-Lymphome)

Erhöhter Verbrauch der Granulozyten

Auswanderung ins Gewebe bei akuten (bakteriellen) Entzündungen, wenn der Bedarf die Neubildung im Knochenmark übersteigt
(ggf. mit Linksverschiebung, weil unreife Vorläuferzellen freigesetzt werden).

Verstärkter „Abbau“ der Granulozyten

Bei primärer oder sekundärer autoimmuner Granulozytopenie
- primär: AAK gg. Fc-gamma III-Rezeptor, CD11b/CD18 u.a.)
- sekundär: z.B. bei Systemischen Lupus erythematodes

Qualitative Immunanalysen

T-Lymphozyten: ⇒ LTT-Immunkfunktion

NK-Zellen ⇒ NK-Zell-Zytotoxizitätstest

Granulozyten ⇒ Phagozytostest
 ⇒ Respiratory Burst Test
 (Freisetzung von $^{\circ}\text{O}$ -Radikalen)

B-Lymphozyten ⇒ IgG, IgA, IgM im Serum ausreichend

Quantitative Analysen ersetzen niemals die immunologischen Funktionstests

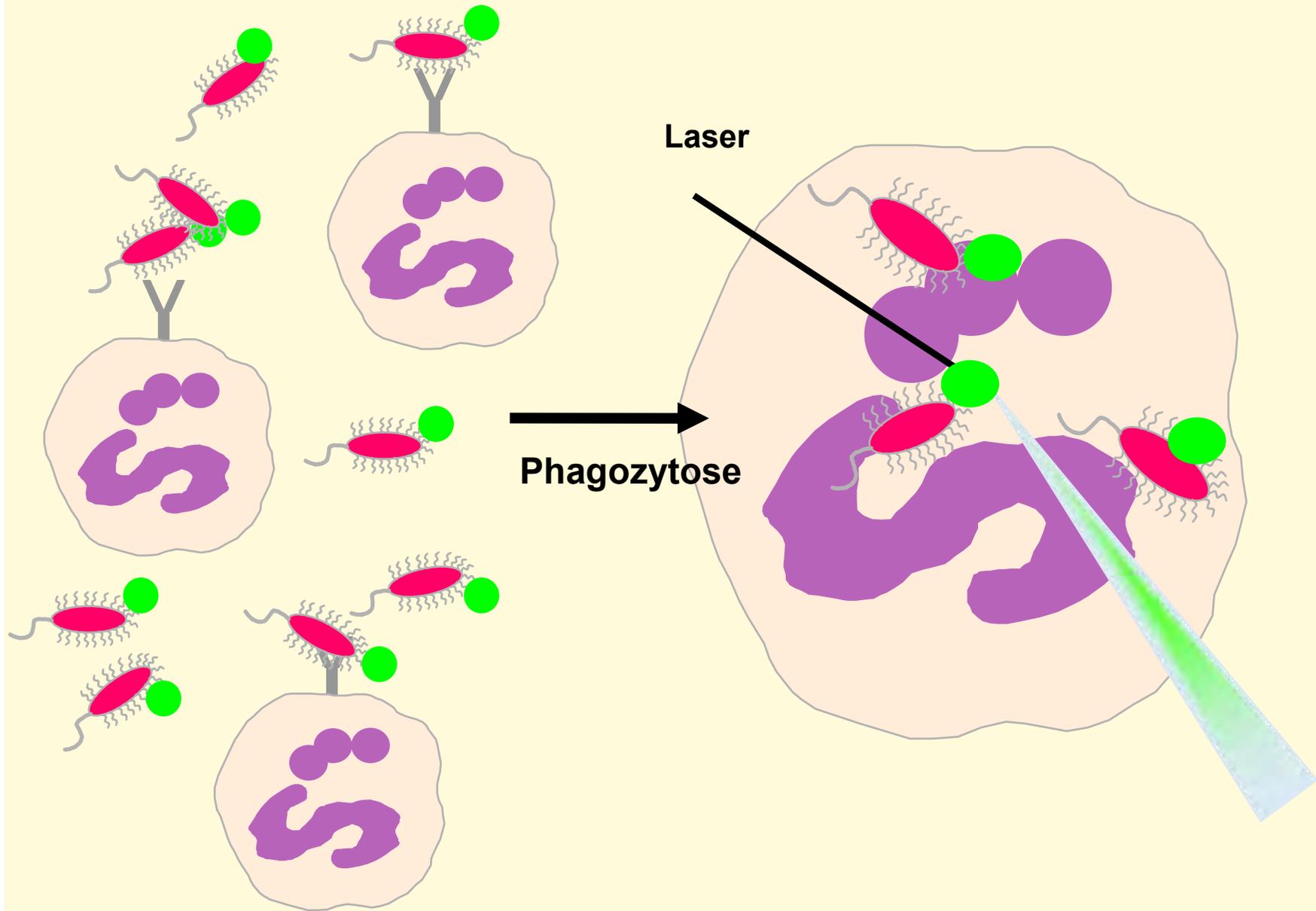
Eine intakte Phagozytose- und Oxidativer Burst-Funktion schließen einen primären und sekundären Immundefekt der Granulozyten aus.

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
E.coli-Phagozytose	88.6	% pos.	> 84
Burst-positive Zellen	99.6	%	> 90
Burst-Aktivität	633	mean	400 - 1000

Interpretation

Unauffälliger Befund.

Die Anzahl der uneingeschränkt zur Phagozytose und zum Respiratory Burst befähigten neutrophilen Granulozyten sowie die Burst-Aktivität befinden sich im Normbereich. Somit ergibt sich kein Hinweis auf eine ineffiziente Eliminierung mikrobieller Erreger durch Granulozyten.



Inkubation von Patientenblut mit FITC-markierten E.coli

Analyse des Anteils aufgenommener E.coli mittels Durchflusszytometrie

Hier intakte Phagozytose aber deutlich reduzierter Oxidativer Burst, sowohl prozentual als auch bei der Aktivität

Material:

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
E.coli-Phagozytose	95.4	% pos.	> 84
Burst-positive Zellen	52.6	%	> 90
Burst-Aktivität	101	mean	400 - 1000

Interpretation

Verminderte Burst-Aktivität der Granulozyten. Dieses weist auf eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale hin. Vorkommen bei granulozytärer Immundefizienz aber auch sekundär bei systemischen Entzündungen, konsumierenden Grunderkrankungen, und auch als Nebenwirkung antioxidativer Therapiemassnahmen.

**V.a. CGD (aus engl. Bezeichnung chronic granulomatous disease)
= septische Granulomatose,
Die primäre Form ist aber sehr selten**

Ursachen für eine sekundäre (latente) Störung des Oxidativen Burst

1. Akute und chronische systemische Entzündungen

- Ausschüttung unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark
- Einwirkung von TNF- α und IL-1 auf zirkulierende Granulozyten

2. Antioxidative Therapien bei Hinweis auf oxidativen Stress, u.a.

- Vitamine C, E, Coenzym Q10,
- sekundäre Pflanzenstoffe: Karotinoide, Flavonoide, Polyphenole u.a.,

Hilfe: Absenkung der Aktivität bis ca. 200 mfi als Zielwert, Therapiestop bei prozentualen Werten < 90%

Ein derartiger Befund kann Therapieziel sein !

Material:

Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
E.coli-Phagozytose	91.3	% pos.	> 84
Burst-positive Zellen	94.5	%	> 90
Burst-Aktivität	233	mean	400 - 1000

Interpretation

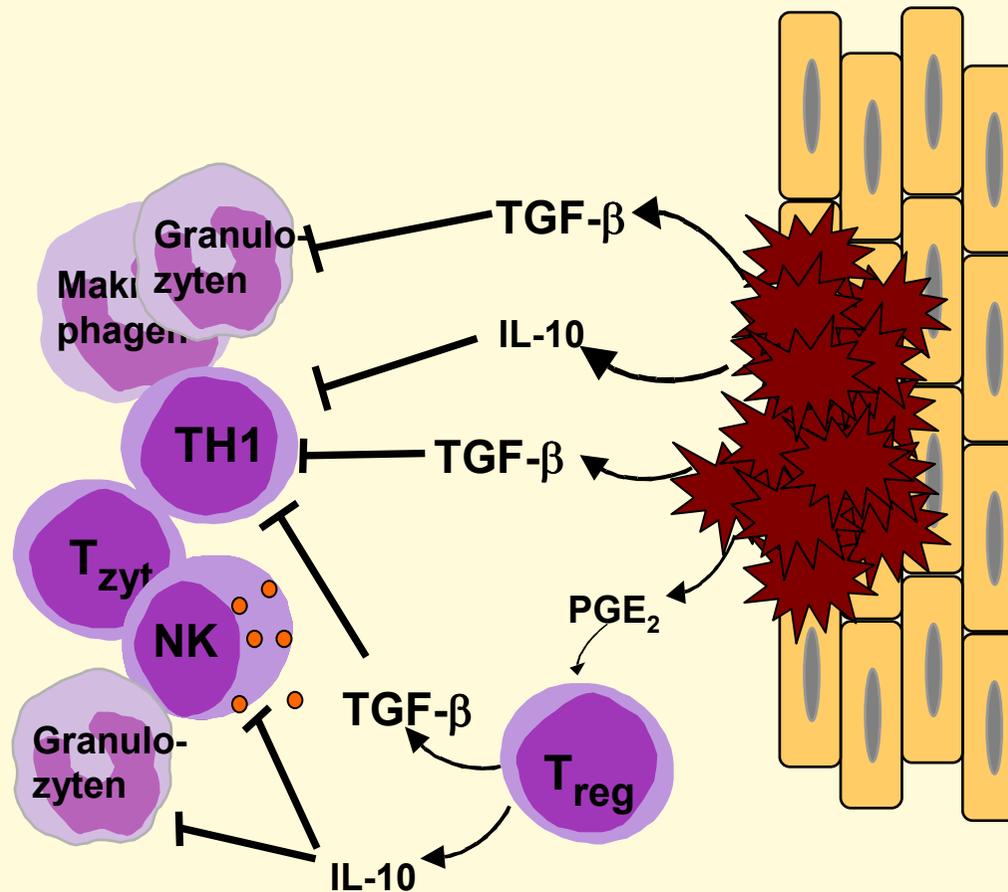
Der normale prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten die zur Phagozytose und zum Respiratory Burst in der Lage sind, schließt einen signifikanten Immundefekt aus.

Eine verminderte Burst-Aktivität der Granulozyten ist zumeist sekundär bedingt. Sie belegt eine reduzierte Bildung freier Sauerstoffradikale, was unter antioxidativer Therapie, als Folge chronischer Immunaktivierungen oder z.B. auch bei Diabetes mellitus vorkommen kann.

Intakte Granulozyten sind wichtig für die:

- Schnelle Elimination von extrazellulären Erregern (Bakterien, Pilze, Hefen)
- Elimination von Tumorzellen (analog NK-Zellen nicht MHC-abhängig)
- Verhinderung von Autoimmunphänomenen (Elimination gealterter Zellen ohne Entzündung)
- physiologische Elimination von Bakterien und Pilzen insbesondere bei leaky gut. (Candida-assoziierte Entzündungen bei Phagozytose-defekten)

Entzündung \Rightarrow TGF- β \uparrow \Rightarrow Granulozytenfunktion \downarrow



Untersuchung	Ergebnis	Einheit	Referenzbereich
TNF-alpha i.S.	9.4	pg/ml	< 8.1
Interleukin 10 i.S.	33.1	pg/ml	< 9.1
TGF-beta i.S. (ELISA)	134.7	ng/ml	18.3 - 63.4

Der Befund zeigt eine deutliche Erhöhung von TGF-beta und auch Interleukin-10 bei relativ schwacher proentzündlicher Immunantwort. Insbesondere die Erhöhung von TGF-beta ist mit einer ungünstigen Prognose bei soliden Tumoren assoziiert.

Zusammenfassung

Intakte Granulozytenfunktion heißt:

- Intakte Elimination von extrazellulären Erregern (Bakterien, Pilze, Hefen) und Tumorzellen
- Verhinderung von Autoimmunphänomenen (Elimination gealterter Zellen ohne Entzündung)
- Verhinderung von chronischer Entzündung

Funktionsanalysen für Granulozyten sind:

Phagozytostest (Analyse 7, 33,22 €)

Respiratory Burst-Test (Analyse 8, 33,22 €)

inflammatio
Akademie



ONLINEFORTBILDUNG





Nächste online-Fortbildung nach der Sommerpause

Neuroimmunologie und Neuroinflammation

-

Die Immunologie der Blut-Hirn-Schranke

22. August 2012, 15:00 Uhr

Dr. med. Volker von Baehr